DOKTORA TEZİ

STREPTOCOCCUS MUTANS BİYOFİLMLERİNE KARŞI BOR BİLEŞİKLERİNİN TEK BAŞINA VE DOĞAL ÜRÜNLERLE KOMBİNASYON HALİNDE İN VİTRO ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

CEMRE ÖZKANCA

DANIŞMAN
PROF. DR. SİBEL DÖŞLER

FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
FARMASÖTİK MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL-2024

BEYAN

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

Cemre Özkanca

İTHAF

Mikroorganizmalara ithaf ediyorum.

TEŞEKKÜR

Bilim büyülü bir dünya, onu bu kadar büyüleyici yapan da birçok kişinin bir araya gelerek oluşturduğu ortak çalışmalar. Öncelikle danışmanım, beni her adımımda destekleyen ve tüm zorlukların üstesinden gelmemde rehberlik eden Prof. Dr. Sibel DÖŞLER'e teşekkürlerimi sunuyorum. Ona ne zaman yeni bir fikirle gitsem beni daima cesaretlendirdiği için bugün bu tezi sunma fırsatını buldum. Bir danışmanda bulunması gereken tüm özelliklere ve belki de daha fazlasına sahip olan kıymetli hocam, hayatımın sonuna kadar sizin en büyük şanslarımdan biri olduğunuzu söylemeye devam edeceğim. Binlerce kez teşekkür ederim.

Tezimi bir araya getirmek, büyük bir bulmacayı çözmek gibiydi ve bu bulmacanın tamamlanmasına katkıda bulunan SBÜ Haydarpaşa Numune SUAM, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Sebahat Aksaray'a, İÜ Diş Hekimliği Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü'nden Prof. Dr. Nursen Topçuoğlu'na, İSTÜN Diş Hekimliği Fakültesi Dekan Yardımcısı Dr. Öğr. Üyesi Mustafa Özcan'a, Dr. Dt. Onur Eroğlu'na, MSKÜ Fen Fakültesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nurdan Saraç'a, öğrencisi Sayın İrem Demir'e ve sevgili arkadaşım Sefa Döğer'e tezime farklı alanlardaki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Anabilim Dalı'na ilk geldiğim günden itibaren her zaman sorularımı yanıtlayan, sadece bilimsel anlamda değil, hayatımın her alanında bana destek olan tüm İ.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Ayşe Seher Birteksöz Tan'a, Prof. Dr. Berna Özbek Çelik'e, Prof. Dr. Çağla Bozkurt Güzel'e, Doç. Dr. Emel Mataracı Kara'ya, Doç. Dr. Mayram Hacıoğlu'na, Kimyager Emine Tuncer'e, Dr. Öğr. Üyesi Özlem Oyardı'ya, Arş. Gör. Dr. Fatıma Nur Yılmaz'a, Arş. Gör. M.S. Bekir Özer'e, Teknisyen Ahmet Kesim'e, bu yolda tanıştığım tüm arkadaşlarıma ve dostlarıma teşekkür ederim. Katkılarınız, hem tezimi hem de hayatımı daha anlamlı kıldı. Bir akademisyenin eğitim ve öğretim hayatının mihenk taşlarından biri olan doktora sürecim, sayenizde bilgi ve sevgiyle tamamlandı.

Doktoram boyunca beni her anlamda destekleyen çok değerli ailem ve dostlarıma teşekkür ederim. Tıkandığım, yorulduğum ve artık yapamayacağımı düşündüğüm her anımda yardımıma koştuğunuz, yanımda olduğunuz için minnettarım.

Son olarak, bu yolculukta gösterdiğim azim ve kararlılık için kendime de teşekkür ederim, her şeye rağmen ayağa kalkıp devam edebilmek, bugün ulaştığım bu noktayı mümkün kılan en büyük gücümdü.

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: TDK-2023-39906

İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü . . . . . Fakültesi, ... Anabilim Dalı, ... Programında Doktora/Yüksek Lisans öğrencisi . . . . . tarafından . . . . . .'nın danışmanlığında hazırlanan ". . . . . ." başlıklı tez aşağıdaki jüri üyeleri tarafından . . /. ./202. . tarihinde yapılan Tez Savunma Sınavında başarılı bulunmuş ve Doktora/Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

Jüri
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

Jüri
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

Jüri
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

Jüri
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

Jüri-(Danışman)
Ünvanı Adı Soyadı
Üniversite, Fakülte
Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

BEYAN ..... İİ
İTHAF ..... İİİ
TEŞEKKÜR ..... İV
İÇİNDEKİLER ..... Vİ
TABLOLAR LİSTESİ X
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... Xİ
SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ ..... XİV
ÖZET ..... XVİ
ABSTRACT ..... XVİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Biyofilmler Hakkında Genel Bilgiler 3
2.1.1. Biyofilmler ve Antimikrobiyal Maddelere Karşı Direnç İlişkisi 6
2.2. Ağız Boşluğunun Genel Özellikleri 8
2.2.1. Diş Çürükleri ve Dental Plak Oluşumu 10
2.2.2. Şeffaf Plaklar ile Ortodontik Tedavi 10
2.2.2.1. Ağız Hijyeni ve Şeffaf Plakların Temizlenmesinde Kullanılan Ürünler 11
2.2.3. Dental Plaklar, Diş Çürükleri ve Biyofilmler Arasındaki İlişki 12
2.2.4. Şeffaf Plaklar ve Biyofilm Oluşumu 15
2.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar 15
2.3.1. Streptococcus mutans 16
2.3.1.1. *S. mutans* Virülans Faktörleri 17
2.3.2. Candida albicans 19
2.3.2.1. *C. albicans* Virülans Faktörleri 20
2.4. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler 21
2.4.1. Borlu Bileşikler 21
2.4.1.1. Borik Asit 22
2.4.1.2. Sodyum Borat 23
2.4.2. Doğal Maddeler 24
2.4.2.1. Epigallokateşin gallat 25

2.4.2.2. Mentol 26
2.4.2.3. Öjenol 27
2.4.2.4. Ökaliptöl 29
2.4.2.5. Resveratrol 30
2.4.2.6. Sinnamaldehit 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 33
3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Maya Suşları 33
3.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler 33
3.2.1. Borlu Bileşikler 33
3.2.2. Doğal Maddeler 33
3.2.3. Antibiyotikler ve Antifungaller 34
3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı 35
3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri 35
3.4.1. Mitis salivarus (M-S) Agar 35
3.4.2. %5 Koyun Kanlı Agar 35
3.4.3. Katyon İlaveli Mueller Hinton Buyyon (KİMHB) / KİMHB-LEAK 35
3.4.4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 36
3.4.5. RPMI 1640 36
3.4.6. DMEM 36
3.4.7. CHROMagar Candida 36
3.4.8. Brain-Heart Infusion (BHI) Buyyon 36
3.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler 37
3.5.1. Kalsiyum Klorür ve Magnezyum Klorür Tuzları 37
3.5.2. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS) 37
3.5.3. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT) 37
3.5.4. Resazurin 37
3.5.5. Metanol 37
3.5.6. Kristal Viyole 37
3.6. Çalışmada Kullanılan Diğer Malzemeler 38
3.7. Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Maya İnokulumlarının Hazırlanması 38
3.8. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi 39
3.8.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi 39
3.8.2. Kombinasyon Halindeki Antimikrobiyal Etkilerin Belirlenmesi 40

3.9. Biyofilm Oluşumu 41
3.9.1. *S. mutans* Biyofilmlerinin Oluşturulması 41
3.9.2. *C. albicans* Biyofilmlerinin Oluşturulması 42
3.9.3. Miks Biyofilm Oluşturulması 42
3.10. Biyofilm Oluşumu İnhibisyon Deneyleri 43
3.10.1. Çalışılan Maddelerin Tek Başına Biyofilm İnhibisyon Deneyleri 43
3.10.2. Kombinasyon Halinde Biyofilm İnhibisyon Deneyleri 44
3.11. Olgun Biyofilm İnhibisyoon Deneyleri 45
3.12. Toksisite Deneyleri 46
3.13. Karışımın Hazırlanması ve Etkilerinin Belirlenmesi 47
3.13.1. En Etkili Karışımın Belirlenmesi 48
3.13.2. Karışımın Etkinliklerinin Belirlenmesi 48
3.14. Karışım ile Zamana Bağlı Miks Biyofilm Eradikasyon Deneyleri 48
3.15. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülenmesi 49
4. BULGULAR 50
4.1. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesine Ait Bulgular 50
4.1.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi 50
4.1.2. Kombinasyon Halindeki Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi 52
4.2. Biyofilm Oluşumuna Ait Bulgular 53
4.2.1. *S. mutans* ve *C. albicans* Biyofilmlerinin Oluşturulması 53
4.2.2. Miks Biyofilmlerin Oluşturulması 54
4.3. Biyofilm İnhibisyon Deneylerine ait Bulgular 54
4.3.1. Çalışılan Maddelerin Tek Başına Biyofilm İnhibisyon Deneyleri 54
4.3.2. Kombinasyon Halinde Biyofilm İnhibisyon Deneyleri 57
4.3.2.1. Borlu Bileşikler ile Epigallokateşin Gallat Kombinasyonları 57
4.3.2.2. Borlu Bileşikler ile Ökaliptol Kombinasyonları 61
4.3.2.3. Borlu Bileşikler ile Resveratrol Kombinasyonları 64
4.4. Olgun Biyofilm İnhibisyon Deneylerine ait Bulgular 67
4.4.1. *S. mutans* Olgun Biyofilmlerine Etkiler 67
4.4.2. *C. albicans*'ın Olgun Biyofilmlerine Etkiler 70
4.5. Toksisite Deneylerine ait Bulgular 72
4.6. Karışımın Hazırlanması ve Etkilerinin Belirlenmesine ait Bulgular 75

4.6.1. En Etkili Karışımın Belirlenmesi 75
4.6.2. Karışımın Etkinliklerinin Belirlenmesi 76
4.7. Karışım ile Zamana Bağlı Miks Biyofilm Eradikasyon Deneylerine ait Bulgular 78
4.8. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülenmesine ait Bulgular 82
5. TARTIŞMA 85
KAYNAKLAR 101
İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI 121

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan maddeler ve çözücüleri 34
Tablo 3-2: Kombinasyon halindeki maddelerle biyofilm inhibisyon deneyi örnek tablosu 45
Tablo 3-3: Hazırlanan karışımlar ve içerikleri 47
Tablo 4-1: Borlu bileşiklerin ve doğal ürünlerin *S. mutans* standart ve klinik suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri 51
Tablo 4-2: Borlu bileşiklerin ve doğal ürünlerin *C. albicans* standart ve klinik suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri 51
Tablo 4-3: Borik asit ve doğal maddelerin kombinasyon halinde *S. mutans* suşlarına karşı belirlenen FIK indeksleri 52
Tablo 4-4 : Sodyum borat ve doğal maddelerin kombinasyon halinde *S. mutans* suşlarına karşı belirlenen FIK indeksleri 53
Tablo 4-5: Hazırlanan farklı karışımların *S. mutans* suşlarına karşı MİK değerleri 76

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2-1: Biyofilm oluşum aşamalarının şematik gösterimi 3
Şekil 2-2: a) Ağız boşluğunun anatomik yapısı, b) Dişlerin anatomik yapısı. 9
Şekil 2-3: Demineralizasyon ve remineralizasyon süreçlerinin şematik gösterimi. 14
Şekil 2-4: Borik asitin kimyasal yapısı 22
Şekil 2-5: Sodyum boratın (Boraks) kimyasal yapısı 24
Şekil 2-6: Epigallokateşin gallatın kimyasal yapısı 25
Şekil 2-7: Mentolün kimyasal yapısı 27
Şekil 2-8: Öjenolün kimyasal yapısı 28
Şekil 2-9: Ökaliptölün kimyasal yapısı 30
Şekil 2-10: Resveratrolün kimyasal yapısı 31
Şekil 2-11: Sinnamaldehitin kimyasal yapısı 32
Şekil 3-1: Diş numaralandırma şeması 42
Şekil 4-1: *S. mutans* standart ve klinik suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin kristal viyole ile boyanması sonucu elde edilen görüntüler. 54
Şekil 4-2: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borik asit ve sodyum boratın biyofilm inhibisyon etkinlikleri 55
Şekil 4-3: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün biyofilm inhibisyon etkinlikleri. 56
Şekil 4-4: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borik asit ve sodyum boratın biyofilm inhibisyon etkinlikleri. 56
Şekil 4-5: *S. mutans* klinik suşlarına karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün biyofilm inhibisyon etkinlikleri 57
Şekil 4-6: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 59
Şekil 4-7: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 59
Şekil 4-8: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 60
Şekil 4-9: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 60

Şekil 4-10: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile ökaliptölün kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 62
Şekil 4-11*: S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 62
Şekil 4-12: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 63
Şekil 4-13: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 63
Şekil 4-14: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 65
Şekil 4-15: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 65
Şekil 4-16: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile resverarol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 66
Şekil 4-17: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri 66
Şekil 4-18: *S. mutans* ATCC 25175 olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici konsantrasyonları 68
Şekil 4-19: *S. mutans* ATCC 25175 olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici konsantrasyonları 68
Şekil 4-20: *S. mutans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici konsantrasyonları 69
Şekil 4-21: *S. mutans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici konsantrasyonları. 69
Şekil 4-22: *C. albicans* ATCC 10231 olgun biyofilmine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici konsantrasyonları 70
Şekil 4-23: *C. albicans* ATCC 10231 olgun biyofilmine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici konsantrasyonları 71
Şekil 4-24: *C. albicans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici konsantrasyonları 71
Şekil 4-25: *C. albicans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici konsantrasyonları. 72
Şekil 4-26: HGF-2 hücreleri üzerinde borik asitin sitotoksisite grafiği 73

Şekil 4-27: HGF-2 hücreleri üzerinde sodyum boratın sitotoksisite grafiği..... 73
Şekil 4-28: HGF-2 hücreleri üzerinde epigallokateşin gallatın sitotoksisite grafiği 74
Şekil 4-29: HGF-2 hücreleri üzerinde ökaliptolün sitotoksisite grafiği 74
Şekil 4-30: HGF-2 hücreleri üzerinde resveratrolün sitotoksisite grafiği 75
Şekil 4-31: Karşım 1'in, standart ve klinik *S. mutan*s suşlarına karşı biyofilm inhibisyonu 77
Şekil 4-32: Karşım 1'in, standart ve klinik *S. mutans* suşlarının olgun biyofilmleri üzerinde gösterdiği eradike edici etkileri 77
Şekil 4-33: Karşım 1'in, HGF-2 hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkiler 78
Şekil 4-34: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* ATCC 25175 standart suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği 79
Şekil 4-35: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 1 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği 80
Şekil 4-36: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 2 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği. 80
Şekil 4-37: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 3 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği. 81
Şekil 4-38: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 4 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği. 81
Şekil 4-39: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 5 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği. 82
Şekil 4-40: Üzerinde Miks biyofilm oluşturulan şeffaf plakların SEM mikroskobu ile çekilen görüntüleri 83
Şekil 4-41: Üzerinde Miks biyofilm oluşturulan şeffaf plakların, karışım ile muamele edildikten sonra çekilen SEM görüntüleri 84

SEMBOLLER / KISALTMALAR LİSTESİ

AIDS: Kazanılmış Bağışıklık Yetmezliği Sendromu

Als: Aglutinin benzeri dizi

API: Analytical Profil Index

BHI: Brain Heart Infusion

CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium

DMSO: Dimetil sülfoksit

DNA: Deoksiribonükleikasit

Eap1: Epitelyal Adezin

EC: Epikateşin

EGC: Epigallokateşin

EGCG: Epigallokateşin gallat

EPS: Ekzopolisakkarit

FBS: Fetal Bovine Serum

FİK: Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su

Gtfs: Glukoziltransferazlar

HGF-2: Human Gingival Fibroblast-2

Hifal duvar proteini 1: Hwp1

KİMHB: Katyon İlaveli Mueller Hinton Buyyonu

KİMHB-LEAK: %5 lize edilmiş at kanı içeren KİMHB

Kob: Koloni Oluşturan Birim

MİK: Minimum İnhibitör Konsantrasyon

MOPS: Morfolino Propan Sulfonik Asit

M-S Agar: Mitis Salivarus Agar

MTT: (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide)

NACL: Sodyum Klorür

QS: Quarum Sensing

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

SAP: Salgılanan Aspartil Proteazlar

SDA: Sabouraud Dextrose Agar

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu

TRPM8: Geçici Reseptör Potansiyeli Melastatin 8

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

ÖZET

Özkanca, C. (2024). **Streptococcus mutans Biyofilmlerine Karşı Bor Bileşiklerinin Tek Başına ve Doğal Ürünlerle Kombinasyon Halinde in vitro Etkilerinin İncelenmesi**. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Farmasötik Mikrobiyoloji ABD. Doktora Tezi. İstanbul.

Streptococcus mutans diş çürüklerine sebep olan en önemli patojenlerden biri olarak kabul edilmektedir. Bu bakterilerin ortodontik diş tedavisinde kullanılan şeffaf diş plakları üzerinde biyofilm oluşturabildikleri, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Tedavi boyunca günde 20-22 saat sürekli takılması gereken ve sadece yemek yeme esnasında çıkartılan bu diş plaklarının temizliği, ağız sağlığının korunması açısından önem teşkil etmektedir. Piyasada bulunan ortodontik plak temizleyicilerin içeriğinde genellikle yüksek konsantrasyonda kimyasal maddeler bulunmakta olup, özellikle ortodontik tedavinin merkezinde bulunan çocukların sağlıkları açısından, bu alanda kullanılabilecek doğal ve yerli bir ürüne ihtiyaç duyulmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, rezervlerinin büyük kısmı Türkiye'de bulunan borlu bileşikler ile çeşitli doğal maddelerden oluşan bir temizleme ürünü prototipi tasarlanması amaçlanmıştır. Kullanılan ürünlerin tek başlarına ve kombinasyon hallerindeki antimikrobiyal, biyofilm oluşumunu inhibe edici ve olgun biyofilm eradike edici etkileri, S. mutans'ın standart ve kliniklerden izole edilmiş suşlarının tek başlarına ve Candida albicans ile birlikte oluşturdukları biyofilmler üzerinde incelenmiş, ayrıca HGF hücrelerine karşı sitotoksisiteleri belirlenmiştir. Elde edilen veriler doğrultusunda, doğal ürünlerin farklı konsantrasyonları bir arada denenmiş ve toksik olmayan en etkili karışım seçilmiştir. Borlu bileşiklerden borik asit ile yeşil çayda yoğun miktarda bulunan epigallokateşin gallat, üzüm çekirdeğinde bulunan resveratrol ve ökaliptöl kullanılarak hazırlanan karışımın yüksek ve düşük dozlu formlarının, şeffaf plaklar üzerindeki miks biyofilmlere karşı zamana bağlı öldürme etkileri 1/4, 1/2, 1, 2 ve 24. saatlerde incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, hazırlanan karışımın yüksek dozu, 24 saatte biyofilmdeki S. mutans sayılarında 1.85-5.40-$\log_{10}$'luk düşüşlere sebep olmaktadır. Buna göre, hazırlanan karışımın ortodontik diş plaklarının temizlenmesinde kullanılabilecek etkin ve güvenli bir ağız bakım ürünü olmak için gereken potansiyeli taşıdığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Streptococcus mutans, Ortodontik şeffaf diş plakları, Miks biyofilm, Borlu bileşikler, Doğal antimikrobiyal maddeler, Antimikrobiyal aktivite, Antibiyofilm etkinlik

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje No: 39906

ABSTRACT

Özkanca, C. (2024). **Investigation of the in vitro Effects of Boron Compounds Alone and in Combination with Natural substances against Streptococcus mutans Biofilms**. Istanbul University, Institute of Health Science, Department of Pharmaceutical Microbiology. PhD Thesis. Istanbul.

Streptococcus mutans is recognized as one of the major causes of dental caries. Studies have shown that these bacteria can form a biofilm on clear aligners used in orthodontic treatment. Cleaning these aligners, which must be worn continuously for 20-22 hours a day during treatment and are only removed during meals, is important for protecting oral health. The dental plaque cleaners available on the market are products with a high chemical potential, and a natural and local product is needed, especially when considering the health of children, who are at the center of orthodontic treatment. For this purpose, the aim of the study was to design a prototype cleaning product using boron compounds, most of the reserves of which are found in Turkey, and natural antimicrobial substances. The antimicrobial, biofilm formation inhibitory, and mature biofilm eradicating effects of the substances either alone and or in combination were investigated against biofilms formed by standard and clinically isolated strains of S. mutans single or mixed biofilms with Candida albicans, and their cytotoxicity against HGF cells was determined. In line with the obtained data, different concentrations of natural products were tested together for the cleaning product, and the most effective and non-toxic mixture was selected. The time-dependent killing effects of the high and low doses forms of the mixture, which contains boric acid, epigallocatechin gallate, which is found in large amounts in green tea, resveratrol in grape seeds and eucalyptus oil, against mixed biofilms on clear aligners were investigated at 1/4, 1/2, 1, 2 and 24 hours. The obtained results show that the high dose of the mixture causes 1.85-5.40-$\log_{10}$ decreases in the number of S. mutans in the biofilm at 24th hour. It is concluded that the prepared mixture has the necessary potential to be an effective and safe oral care product that can be used in the cleaning of orthodontic clear aligners.

Key Words: Streptococcus mutans, Orthodontic clear aligners, Mixed biofilm, Boron compounds, Natural antimicrobial substances, Antimicrobial activity, Antibiofilm activity

The present work was supported by the Research Fund of Istanbul University. Project No. 39906.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Sağlıklı ve düzgün şekilde sıralanmış dişlere ve güzel bir gülümsemeye sahip olmak, tüm toplumlardaki bireylerin tercih ettiği ve bu amaçla çeşitli yöntemlere başvurduğu bir özelliktir. Çocukluk çağında ortodontik tedavi görmeyen bireyler, ilerleyen yaşlarda bunu istese de, klasik diş teli uygulamalarının dış görünüşte yarattığı bozulma sebebiyle genellikle tedaviden kaçınabilmektedir. Bu amaçla son yıllarda kullanıma sunulan şeffaf diş plakları, diş çarpıklıklarının düzeltilmesinde kullanılan yenilikçi ortodontik tedavi ekipmanlarıdır. Bu plaklar kişiye özel olarak, diş yapısının bilgisayar teknolojileri ile analiz edilmesi suretiyle hazırlanmakta ve her bir plak yaklaşık olarak iki hafta kullanılmaktadır. Plaklar mikro hareketler ile dişleri hareket ettirmekte ve bu sayede sahip olunan diş yerleşim bozuklukları düzeltilmektedir. Günde yaklaşık 20-22 saat boyunca takılan bu plaklar, tedavinin başarıya ulaşabilmesi için sadece yemek yerken ve diş fırçalarken çıkartılmaktadır (Rossini ve ark. 2015). Ancak gün boyu ağız içinde, dişlere takılı olarak kalan bu plaklar üzerinde başta *Streptococcus mutans* olmak üzere çeşitli bakterilerin yerleşerek biyofilm oluşturabildiği, yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Özellikle uygun şekilde temizlenmeyen şeffaf diş plaklarının, oral floranın yapısını bozabileceği ve çeşitli sistemik enfeksiyonlara zemin hazırlayabileceği de düşünülmektedir (Charavet ve ark. 2022).

S. mutans, diş çürüklerinin oluşumunda önemli role sahip olan asidojenik bir bakteridir. Bu bakterinin aside dirençli yapısı ve metabolik aktivitesi sonucunda ortaya çıkan asitler, dişeti hastalıklarına ve ilerleyen durumlarda diş çürüklerine yol açmaktadır. Özellikle şeker açısından zengin beslenmek, oral floradaki *S. mutans* sayısında ciddi artışlara yol açabilmekte olup, bu bakterinin başka oral flora elemanları ile, özelllikle de *Candida albicans* ile birlikte miks biyofilmler oluşturabildiği de bilinmektedir (Metwalli ve ark. 2013). Biyofilmler, mikroorganizmaların tercihen abiyotik yüzeyler üzerinde bir araya gelerek, oluşturdukları bir ekzopolisakkarit matriks içerisinde yşayan toplulukları olup, tek bir tür bakteriden oluşabilecekleri gibi, bakteri ve maya hücrelerini içeren karışık kolonilere de sıklıkla rastlanılmaktadır. Diş minesi, yapısı gereği biyofilmlerin tutunması için uygun bir ortam olup, dişlerin araları ve dişetleri de özellikle anaerop / fakültatif anerop bakteri ve mayaların çoğalması ve biyofilm oluşturması için gerekli şartları oluşturmaktadır (Moye ve ark. 2014).

Üzerlerinde oluşabilecek kirlilikler ve biyofilmlerden kurtulmak amacıyla, şeffaf diş plaklarının temizlenmesi için kullanılan yöntemler arasında diş fırçası ile mekanik temizlik yapılması, diş macunu kullanmak ve piyasada bulunan 'dental plak temizleyici tablet/kristaller'in kullanımı yer almaktadır. Ancak bu yöntemlerin her birinin güçlü ve zayıf oldukları bazı noktalar bulunmaktadır. Örneğin diş fırçaları, plakların diş tarafına yerleşen iç bölgelerinin tamamına erişememekte ve diş macunu kalıntıları da plakların içerisinde kalabilmektedir. Temizleyici tabletler ise yüksek konsantrasyondaki kimyasal içerikleri ile, özellikle de uzun süreli kullanım sonucunda plaklar üzerinde kalıntı bırakabilmektedir (Charavet ve ark. 2022). Ortodontik tedavilerin sıklıkla çocukluk çağında başladığı da göz önünde bulundurulduğunda, bu tür durumların çeşitli sağlık problemlerine yol açabileceği düşünülmekte olup, bu alanda doğal ürünler kullanılarak hazırlanan temizleyici bir ürünün eksikliği göze çarpmaktadır.

Türkiye, bor rezervleri açısından Dünya piyasasında zirvededir ve elde edilen bor ve borlu bileşiklerin birçok kullanım alanı bulunmakla birlikte, özellikle antiseptik ve dezenfektan ürünlerin eldesinde kullanılmaları önem teşkil etmektedir (Das ve ark. 2022). Çalışmamızın çıkış noktası olarak borlu bileşiklerin tercih edilmesinin bir sebebi de, elde edilen sonuçlar doğrultusunda potansiyel bir temizleyici ürün oluşturulması durumunda, Türkiye'nin doğal kaynaklarının kullanımına katkı sağlamaktır. Bunun yanısıra, özellikle ağız sağlığına olumlu etkileri bilinen yeşil çay, ökaliptöl, resveratrol gibi antimikrobiyal ve antikanser araştırmaların en popüler ürünlerinin de borlu bileşiklerle oluşturdukları potansiyel sinerjist etkiler mevcuttur (Barbosa ve ark. 2016; Schneider-Rayman ve ark. 2021; Xia ve ark. 2017).

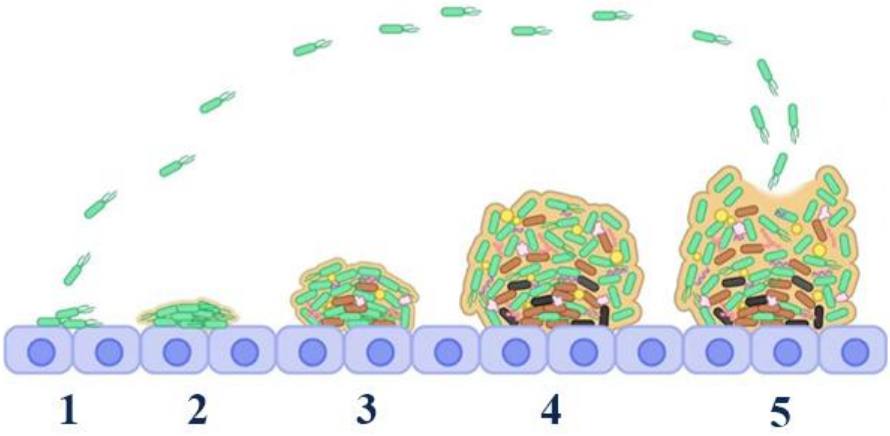
İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, "Farmasötik Mikrobiyoloji Doktora Programı'na" bağlı olarak yürütülen tez çalışmamızda, in-vitro olarak şeffaf diş plaklarının temizlenmesi için kullanılabilecek, borlu bileşikler ve çeşitli antimikrobiyal doğal maddelerin birarada kullanıldığı etkili bir karışım elde edilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla, çalışmada kullanılan maddelerin ayrı ayrı ve kombinasyon halinde oluşturdukları antimikrobiyal ve antibiyofilm etkileri incelenmiş ve en etkili karışım oluşturularak diş plakları üzerinde *S. mutans* ve *C. albicans* suşları ile oluşturulan miks biyofilmlere karşı zamana bağlı etkileri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bir ürün prototipi oluşturulmuş olup, yapılacak çalışmalarla bunun piyasaya sunulabilecek doğal içerikli, yerli üretim, güvenli bir ürün haline gelebileceği düşünülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyofilmler Hakkında Genel Bilgiler

Biyofilmler; canlı ya da cansız yüzeylere geri dönüşümsüz şekilde bağlanan mikroorganizmaların salgıladığı polisakkarit, protein ve nükleik asitleri içeren hücre dışı polimerik maddeler olan ekzopolisakkaritten (EPS) oluşan bir matris içinde gömülü halde bulunan mikrobiyal hücre topluluklarıdır (El Othmany ve ark. 2021). Biyofilmler canlı dokular, tıbbi cihazlar, endüstriyel veya doğal ortamlar da dâhil olmak üzere çeşitli yüzeylerde oluşabilmektedirler. EPS, biyofilm içerisindeki mikroorganizmalara yapısal bir stabilite sağlamakta ve antimikrobiyal ajanlar yada konakçı bağışıklık sistemine ait bileşenler de dahil olmak üzere çevresel stres faktörlerinden korumaktadır (Roy ve ark. 2017). Biyofilmler düzensiz yapılanmalar değil, farklı fizyolojik ve fenotipik özelliklere sahip oldukça organize topluluklardır. Bu topluluk içinde organizasyonel yapılar ve sıklıkla belirli rollere hizmet eden farklılaşmış hücreler bulunmaktadır. Örneğin bazı hücreler besin alımından sorumlu olabilirken, bir kısmı atıkları uzaklaştırmakta, diğerleri ise biyofilm savunmasına ve yapısal bütünlüğe katkı sağlamaktadır (Bridier ve Briandet 2022).

Biyofilm oluşumu, Şekil 2-1'de görüldüğü gibi beş basamaktan meydana gelen dinamik bir süreçtir.



Şekil 2-1: Biyofilm oluşum aşamalarının şematik gösterimi

1. Basamak; yapışma, 2. Basamak; geri dönüşümsüz bağlanma, 3. Basamak; mikrokoloni oluşumu, 4. Basamak; olgun biyofilm oluşumu ve 5. Basamak; biyofilmden koparak yayılma.

İlk basamak; planktonik, hareketli mikroorganizmaların yüzeye tutunması ile biyofilm oluşumu da başlamaktadır. Bu süreçte yüzeyin ve mikroorganizmanın sahip olduğu tutunma proteinlerinin özellikleri önem taşımaktadır. Planktonik mikroorganizmalar genellikle yüzeylere Brown hareketi, yerçekimi kuvveti ve hareket organelleri olan flagellaları sayesinde yaklaşmaktadır. Yüzeyin hidrofobikliği, iyon yükü ve pürüzlülüğü de bu bağlanmanın kuvveti üzerine doğrudan etki etmektedir. Bakterilerin hücre duvarında bulunan adezinler, yüzeydeki spesifik reseptörleri tanıyıp onlara bağlanma özelliği gösteren proteinler iken, pililer ise yüzeye zayıf, geri dönüşümlü bağlanmayı kolaylaştıran bakteri hücre duvarı uzantılarıdır. Birinci basamağın sonucunda oluşan bu zayıf bağlar, geri dönüşümlüdür ve eğer ortam bakterilerin biyofilm oluşturmaları için uygun değilse, hücreler yüzeyden ayrılabilmektedir (S. Sharma ve ark. 2023).

İkinci basamak; ilk geri dönüşümlü tutunmanın ardından mikroorganizmalar, bağlandıkları bölgede içerisinde çeşitli polisakkaritler, proteinler, lipitler ve hücre dışı deoksiribonükleik asitin (DNA) bir karışımı bulunan hücre dışı polimerik maddeleri üretmeye başlamakta ve bu EPS maddesinin üretimi, yüzeyle olan ilişkilerini daha kalıcı hale getirmektedir. Başka bir deyişle EPS, hücreleri yüzeye ve birbirlerine sıkı bir şekilde bağlayan bir yapıştırıcı görevi görmektedir. Salgılanan EPS'nin tek görevi hücreyi dışarıdan gelecek etkilere karşı korumak değildir, bu madde ayrıca biyofilm gelişiminin sonraki aşamaları için bir iskelet de oluşturmaktadır. Bu basamakla birlikte mikroorganizmalar artık geri dönüşümsüz bir şekilde yüzeye bağlanırlar (Donlan 2002; S. Sharma ve ark. 2023).

Üçüncü basamak; bu aşamaya gelindiğinde biyofilmi oluşturan mikroorganizmalar, mikrokoloniler oluşturmaya başlarlar. Mikrokoloniler ilk yerleşen mikroorganizmaların çoğalması ile meydana gelen ve çok sayıda hücre içeren kümelerdir. Kolonilerin etrafı, gerçekleşen fizyolojik olaylar sonucunda ortaya çıkan atıkların, alınan besinlerin ve çeşitli sinyal moleküllerinin dolaşımını sağlayan kanallarla çevrilir. Bu kanallar biyofilmin oluşmasında ve olgunlaşmasında önemli bir role sahip olan Quarum Sensing (QS) molekülleri, EPS ve diğer virülans faktörlerinin üretimini düzenleyerek biyofilm gelişmesine katkı sağlamaktadır (Azimi ve ark. 2020).

QS, bakterilerin hücre popülasyonu yoğunluğundaki değişikliklere yanıt olarak gen ifadelerini düzenlemesine olanak tanıyan, hücreden hücreye bir iletişim mekanizmasıdır. Bu sürece, bakteri popülasyonu büyüdükçe çevrede biriken ve oto indüktör adı verilen küçük sinyal molekülleri aracılık etmektedir. Bu moleküller, hücre sayısı yeterince arttığı ve eşik konsantrasyonuna ulaştığında spesifik reseptörlere bağlanırlar ve biyofilm oluşumu da dahil olmak üzere çeşitli fizyolojik süreçleri etkileyebilecek gen ekspresyonundaki değişiklikleri tetiklerler (Higgins ve ark. 2018).

Dördüncü basamak; bu aşamada biyofilm olgunlaşmaya devam ederek stabilitesini ve direncini arttırmakta ve nihayetinde üç boyutlu bir yapıya ulaşmaktadır. Diğer bir deyişle biyofilmler, iyi yapılandırılmış su kanalları ve heterojen hücre dağılımıyla daha kompleks bir yapıya dönüşmektedir. Bu kompleks oluşum, biyofilmlerin çevresel strese ve antimikrobiyal ajanlara karşı geliştirdikleri direnç bakımından da oldukça önemlidir. Olgun biyofilmlerde EPS maddesi bir bariyer görevi görerek antimikrobiyal ajanların penetrasyonunu sınırlandırmakta ve içeride bulunan mikroorganizmaları korumaktadır (Siddharth ve ark. 2021).

Beşinci basamak; bu aşamada mikroorganizmaların biyofilmden ayrılması ve yeni yüzeylere dağılarak tutundukları yüzeylerde yeni biyofilmler oluşturmaları söz konusudur. Fazlasıyla büyüyen biyofilm kütlesi içerisinde besin alımında meydana gelen azalmalar, oksijen seviyesindeki değişiklikler, atık madde birikimleri, çeşitli stres koşulları ve çevresel faktörler, mikroorganizmaların bir kısmının koparak biyofilmden ayrılmalarını etkileyen faktörlerdendir. Dispersin B gibi biyofilm matrisini parçalayıcı enzimler de hücrelerin biyofilmden ayrılmasını kolaylaştırmaktadır. Biyofilmden salınan hücreler serbest olarak hareket edebildikleri gibi, yeni yüzeylerde kolonize olma potansiyelini barındıran planktonik hücre formuna da geri dönebilmekte ve döngü ilk basamaktan tekrar başlamaktadır (Chauhan ve ark. 2023; Kaplan 2010; Rabin ve ark. 2015).

Biyofilmler insan vücudunun çeşitli bölgelerinde yaygın olarak oluşabilirler ve sağlık üzerinde önemli etkileri bulunmaktadır. Örneğin, kistik fibrozisli hastalarda *Pseudomonas aeruginosa*'nın oluşturduğu biyofilmler, akciğerlerde kalıcı ve tedavisi zor solunum yolu enfeksiyonlarına yol açmaktadır (Thi ve ark. 2020). Enfektif endokardit de kalp kapakçıklarında biyofilm oluşumunun sebep olduğu ciddi bir enfeksiyondur ve özellikle Stafilokok ve Streptokok cinsi bakteriler tarafından

oluşturulmaktadır. Kalp kapakçıklarındaki enfeksiyonlar kapak hasarına, emboliye, sepsise ve sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir (Hoen ve Duval 2013; Lin ve ark. 2021). Ayrıca kronik rinosinüzit de, sinüslerin kalıcı olarak enfekte olmasını durumunu tanımlanmakta olup özellikle *Staphylococcus aureus* ve *P. aeruginosa* gibi bakterilerin oluşturduğu biyofilmler bu enfeksiyonun kronik doğasına katkıda bulunarak tedaviyi güçleştirmektedir (Y. Huang ve ark. 2022).

Gastrointestinal sistemdeki biyofilmler kronik gastrit, inflamatuar bağırsak hastalıkları ve kolorektal kanser gibi kronik mukozal hastalıklarda önemli bir rol oynamaktadır. Kronik ayak yarası ya da diğer bası yaralarında da çeşitli mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmler iyileşmeyi geciktirebilmektedir (Pouget ve ark. 2020). Yine biyofilm oluşumu ile karakterize kronik otitis media enfeksiyonlarında *Haemophilus influenzae* ve *Streptococcus pneumoniae* sıklıkla karşılaşılan patojenlerdir (Niedzielski ve ark. 2021).

Tıbbi açıdan incelendiğinde biyofilmler, hastane kaynaklı enfeksiyonlardaki rolleri nedeniyle büyük bir endişe kaynağıdır ve bu enfeksiyonların büyük kısmının implante edilebilir tıbbi cihazların üzerindeki biyofilm oluşumundan kaynaklı olabileceği düşünülmektedir (Khatoon ve ark. 2018). Biyofilmler birçok tıbbi cihazın yüzeyinde meydana gelerek kalıcı enfeksiyonlara ve cihaz arızalarına da yol açabilmektedir. Özellikle üriner kateterler ve ortopedik implantlar, yapay kalp kapakçıkları ve diş implantları biyofilmler tarafından kolonize edilebilme özelliği taşımaktadır (Stewart ve Bjarnsholt 2020).

2.1.1. Biyofilmler ve Antimikrobiyal Maddelere Karşı Direnç İlişkisi

Biyofilmlerle mücadele, özellikle sağlık, endüstri ve çevre üzerindeki olumsuz etkileri nedeniyle önem teşkil etmektedir. Biyofilm oluşturan mikroorganizmalar antibiyotiklere ve antimikrobiyal etkinlik gösteren maddelere karşı yüksek oranda direnç göstererek enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Bu direnç özellikle EPS'den ve biyofilm içinde yüzeye tutunmuş halde bulunan, antibiyotiklere daha az duyarlı olan hareketsiz hücrelerin varlığından kaynaklanmaktadır (Sharahi ve ark. 2019). Biyofilmlerin gösterdikleri yüksek antimikrobiyal madde direnci, uzun süreli tedavileri, tekrarlayan enfeksiyonlar ile daha güçlü ve daha pahalı antimikrobiyal tedavilere duyulan ihtiyacı arttırmakta ve bunun bir sonucu olarak da sağlık bakım maliyetlerinde artışlar gözlenmektedir (Krukiewicz ve ark. 2022). Biyofilmler

antimikrobiyal direncin hızla artmasına katkıda bulunarak ciddi bir küresel sağlık tehdidi de oluşturmaktadır. Direncin bu hızlı gelişimi ve tedavide karşılaşılan zorluklar, enfeksiyonların ortadan kaldırılmasını güçleştirmekte ve dolayısıyla yeni tedavi stratejilerine duyulan ihtiyacı arttırmaktadır (Dutt ve ark. 2022) .

Bakteriyel biyofilmlerin üç boyutlu yapısı, antimikrobiyal maddelere karşı doğal bir bariyer görevi görmekte, bu durum da biyofilmin kullanılan antimikrobiyallere karşı hassasiyetini azaltmaktadır. Planktonik mikroorganizmalar ile karşılaştırıldıklarında biyofilm yapılarının, antimikrobiyal ajanlara karşı 10-1000 kat arası direnç gösterdiği, yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Ferreres ve ark. 2023). Mikroorganizmalar antibakteriyel maddelere karşı, bu maddelerin bağlandıkları reseptör bölgelerinde değişiklikler, efluks pompaları, azaltılmış hücre geçirgenliği ve nötralize edici proteinler üretmeleri gibi çeşitli direnç mekanizmaları gösterirler (Lata ve ark. 2015; D. Sharma ve ark. 2015; 2016). Bunlara ek olarak biyofilm topluluklarında, güçlü antimikrobiyal maddelerin etkisi altında dahi hayatta kalabilen inatçı ‘çekirdek’ hücreler bulunmaktadır. Bu hücreler anoksiktir, yavaş büyüme ve çoğalma özelliğine ve DNA onarım sistemlerine sahiplerdir. Metabolizmalarının normalden daha yavaş olması, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından fark edilmelerini zorlaştırmakta ve antimikrobiyal maddelerin de onlara karşı etkinlikte yetersizlik göstermesine sebep olmaktadır (Rather ve ark. 2021). Ek olarak biyofilmlerdeki fenotipik çeşitlilik ve EPS varlığı, içeri giren antimikrobiyallerin konsantrasyonunu azaltmakta ve biyofilmlerin ortadan kaldırılmasını zorlaştırmaktadır (D. Sharma ve ark. 2019).

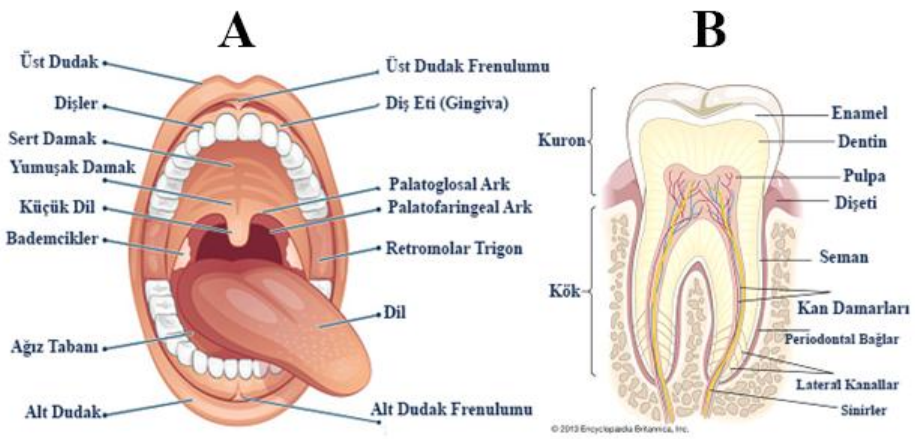
Biyofilmlere karşı kullanılan ve kullanılması planlanan tedavi şekilleri QS inhibitörlerini, bakteriyofaj ve peptitleri, enzimler ve nanopartiküller vb. anti-biyofilm ajanların kullanımı gibi yenilikçi yaklaşımları kapsamaktadır. Bu stratejiler biyofilm oluşumunu bozmayı ve antimikrobiyal tedavilerin etkinliğini arttırmayı amaçlamaktadır (Asma ve ark. 2022).

Biyofilmlere karşı yenilikçi tedavilerden özellikle nanopartiküller, umut vaat eden çalışmalar arasında yer almaktadır. Çeşitli antimikrobiyal maddelerle oluşturulan nanopartiküllerin küçük boyutları, bu ajanların doğrudan biyofilm içinde bulunan bakteri hücrelerine iletilmelerini sağlayarak tedavi sonuçlarını iyileştirmektedir (Xiu ve ark. 2021). Fotodinamik terapi de biyofilmlerin tedavisinde kullanılan yöntemlerdendir ve biyofilm içinde bulunan bakteriler ile öldürücü reaktif oksijen bileşikleri oluşturmak

amacıyla ışık ve ışığa duyarlı hale getirici ajanları bir araya getirmektedir (K. Zhang ve ark. 2020). Bir diğer önemli anti-biyofilm stratejisi olarak enzim tedavileri, DNaz ve proteazlar gibi enzimleri kullanarak biyofilmlerin hücre dışı matrikslerini bozmakta ve bakterileri, antimikrobiyal ajanlara karşı daha duyarlı hale getirmektedir (Thorn ve ark. 2021). Bakteriyofajların da biyofilmlerde bulunan spesifik patojenleri hedef almak üzere kullanıldığı çalışmalar bulunmaktadır. Depolimeraz isimli bakteriyofaj enzimlerinin biyofilm matriks yapısını bozma özelliği bulunmakta olup, bu özelliklerinden tedavide faydalanılabileceği düşünülmektedir (Topka-Bielecka ve ark. 2021). QS inhibitörleri ise biyofilm oluşumu ve devamlılığı için gereken sinyalleri bozarak etki göstermektedir. Bu durum biyofilmin sağlamlığını bozmakta ve popülasyondaki mikroorganizmaları antimikrobiyallere karşı duyarlı hale getirmektedir (Srinivasan ve ark. 2021). Son olarak farklı grup antibiyotiklerin peptitler ya da uçucu yağlar gibi ajanlarla kombinasyon halinde kullanımları da antimikrobiyal maddelerin etkinliklerini arttırmakta olup, bu kombinasyonlar penetrasyonu iyileştirmek ve bakterilerin hayatta kalma oranlarını azaltmak için kullanılan maddelerin farklı etki mekanizmalarından faydalanmaktadır (Y. Jiang ve ark. 2020).

2.2. Ağız Boşluğunun Genel Özellikleri

Ağız boşluğu, Şekil 2-2'de görüldüğü gibi anatomik olarak uzun bir boru şeklindeki sindirim sisteminin başlangıç kısmını oluşturmakta olup bu boşluğu kaplayan oral mukoza; epitel doku ve epitel dokunun altında bulunan bağ dokusunun birleşmesinden meydana gelmektedir. Kendi içinde çiğneyici, örtücü ve özelleşmiş bölümlere ayrılan oral mukoza, vücudu patojenlerden, kimyasallardan ve mekanik hasarlardan koruyan fiziksel ve immünolojik bir bariyer görevi görmektedir (Bernardi ve ark. 2022; Souza ve ark. 2015). Bu bariyer işlevi; vücudun homeostazisini koruyan ve mikrobiyal enfeksiyonlar da dahil olmak üzere çeşitli faktörlerin neden olduğu bozulmalara yanıt veren epitel hücreler, hücresel bağlantılar, tükürük salgısı ve çeşitli bağışıklık sistemi elemanları ile desteklenmektedir (Şenel 2021).



Şekil 1-2: A) Ağız boşluğunun anatomik yapısı, B) Dişlerin anatomik yapısı.

Ağız boşluğunun en önemli elemanları olan dişler, periodontal ligament (dişi, içinde bulunduğu alveol kemiğine bağlayan özel bir bağ dokusu lifi) ve alveol kemiği tarafından desteklenen ve yüksek oranda mineral içeren mine, sement ve dentinden oluşan yapılardır. Dişlerin en önemli görevi, sindirimin ilk adımı olan gıdanın mekanik parçalanmasını gerçekleştirmektir. Yiyeceklerin çiğnenip mekanik olarak parçalanması, yiyecek parçacıklarının yüzey alanının artmasına yardımcı olarak mide ve bağırsaklardaki enzimatik faaliyetin daha verimli olmasını sağlamaktadır. Bu işlem yalnızca besin emilimine yardımcı olmakla kalmaz, aynı zamanda gıdanın daha kolay yutulmasını ve sindirimin düzgün bir şekilde gerçekleştirilmesini de sağlar (Lynnerup ve Klaus 2019).

Streptococcus, Actinomyces, Veillonella ve Fusobacterium dahil olmak üzere 700'den fazla bakteri ve mantar türü, ağız boşluğunun doğal florasının elemanlarıdır. Bu mikroorganizmaların yaşam bölgeleri arasında dil, dişler, dişeti oluğu, yumuşak ve sert damaklar gibi çeşitli bölgeler bulunmaktadır (Morrison ve ark. 2023). Ağız florasının doğal elemanları, dışarıdan gelen patojenlerin enfeksiyon oluşturmalarını engellerken, floranın dengesinde meydana gelen bozukluklar ise diş çürükleri, periodontal hastalıklar ve ağız kanserleri gibi çeşitli patolojik durumların ortaya çıkmasına sebep olabilmektedir (Şenel 2021; Willis ve Gabaldón, 2020).

2.2.1. Diş Çürükleri ve Dental Plak Oluşumu

Diş çürükleri tükürükteki kimyasal maddeler, dişin anatomik yapısı gibi konağa bağlı faktörler, mikroorganizmalar (özellikle *S. mutans* ve Lactobacilli) ve fermente edilebilir karbonhidratlar (şeker ve nişasta) arasındaki karmaşık etkileşimden kaynaklanmaktadır. Bakterilerin karbonhidratları metabolize etmesinin sonucu olarak ortaya çıkan asitler, diş yüzeyinin demineralizasyonuna yol açarak diş çürümesi olarak adlandırılan duruma yol açmaktadır (Frencken ve ark. 2012; Warreth 2023). Özellikle *S. mutans'ın*, sahip olduğu glukoziltransferazlar, adezinler ve bakterinin sahip olduğu asidojenite ile asite karşı direnç gösterme gibi virülans faktörleri, diş çürüklerinin oluşmasında anahtar role sahiptir (Clark ve ark. 2014; Lin ve ark. 2021).

Dental plaklar, diş yüzeylerindeki karışık mikroorganizma topluluklarından oluşan biyofilmlerdir. Düzenli olarak temizlenmeyen diş yüzeylerinde olgunlaşıp diş çürüklerine ve dişeti hastalıklarına yol açabilmektedirler. Dental plak oluşumu, diş üzerinde erken kolonize olan bakterilerin (örn. Streptococcus türleri) diş yüzeyine yapışmasıyla başlamaktadır. Bu bakterilerin çoğalması ve çeşitli polisakkaritleri üretmesi sonucunda diş minesi ve ağızdaki diğer yüzeylere yapışan EPS oluşmaktadır. Dental plaklar, ağız florasının doğal bir parçası olarak kabul edilse de, ağız hijyeni uygulamalarıyla uygun şekilde ortadan kaldırılmadıkları durumlarda diş çürükleri ve dişeti hastalıklarına yol açabilmektedir (Hajishengallis ve ark. 2012; Jakubovics ve ark. 2021).

2.2.2. Şeffaf Plaklar ile Ortodontik Tedavi

Ortodontik tedavi, dişlerin uygun pozisyonda bulunmaması olarak bilinen maloklüzyonun düzenlenmesini, diş estetiğini sağlamayı ve diş fonksiyonlarını iyileştirmeyi amaçlayan çeşitli yöntemleri kapsamaktadır. Ortodontik tedavi planlaması, diş ve çene iskeleti ilişkilerinin, büyüme modellerinin ve bireysel hasta ihtiyaçlarının değerlendirilmesini içermektedir. Geleneksel ortodontik tedavi, dişleri zaman içinde kademeli olarak istenilen pozisyonlara hareket ettirmek için braket ve teller kullanan sabit aparatları (diş telleri) içermektedir (de Almeida ve ark. 2006; Yassir ve ark. 2021). Son yıllarda geleneksel yöntemlerin yanı sıra şeffaf plak tedavisi (örn. Invisalign) ve lingual diş telleri (dişlerin dil tarafına yerleştirilen diş telleri) gibi daha yeni teknikler özellikle estetik kaygı taşıyan kişiler için popülerlik kazanmaktadır (Rossini ve ark. 2015; Wajekar ve ark. 2022).

Şeffaf plak tedavileri, dişlerin istenen pozisyonlara hareket ettirilmesi için her hastaya özel olarak hazırlanan şeffaf ve çıkarılabilir, hizalayıcı plakların kullanılmasını içermektedir. Ortodontistler, hastanın dişlerinin 3 boyutlu bir modelini oluşturmak için ağız içi tarayıcıları kullanarak gerekli diş kayıtlarını, ölçülerini, fotoğraflarını ve röntgenlerini içeren kapsamlı bir muayene yaparak plakları hazırlamaktadır. Ortodonti hastalarının, şeffaf plakların her bir setini 1-2 hafta süreyle kullanması gerekmektedir. Plakların kullanım süreleri günde 20-22 saat arasında olup sadece yeme, içme (su hariç) ve temizlik işlemleri esnasında çıkartılmaları önerilmektedir (Ben Gassem 2022).

2.2.2.1. Ağız Hijyeni ve Şeffaf Plakların Temizlenmesinde Kullanılan Ürünler

Ağız hijyeni uygulamaları kültürel, ekonomik ve toplumsal faktörlere bağlı olarak dünya çapında önemli ölçüde farklılık göstermektedir. İyi bir ağız hijyeni; genel ağız sağlığının korunması, diş çürükleri ve periodontal hastalıkların önlenmesi ve vücut sağlığının desteklenmesi için önemlidir. Dişlerin düzenli fırçalanması, diş çürüklerinin önlenmesine yardımcı olmakta ve çürüklere sebep olan bakterileri ortadan kaldırarak dişeti hastalığı riskini azaltmaktadır (Yaacob ve ark. 2014). Diş ipi veya ara yüz fırçası kullanmak, diş fırçası kıllarının etkili bir şekilde ulaşamadığı diş aralarını ve dişeti çizgisinin altını temizlemekte, plak oluşumunu azaltmakta ve dişeti hastalıklarının önlemesine yardımcı olmaktadır (Marchesan ve ark. 2020). Ayrıca klorheksidin veya uçucu yağlar gibi antibakteriyel maddeler içeren gargaralar, özellikle ağızdaki ulaşılması zor alanlarda bulunan bakteri yükünü azaltarak fırçalama ve diş ipi kullanımını tamamlamaktadır (James ve ark. 2017). Rutin olarak diş hekimleri tarafından muayene edilmek, yüksek şeker ve asit içerikli besinler tüketmemeye özen göstermek, florür içerikli diş macunlarının kullanılması ve ağız hijyeni eğitiminin çocukluktan itibaren düzgün bir şekilde öğretilmesi de ağız sağlığının korunması için önemli faktörler arasındadır (Kramer ve Splieth 2022; Moynihan ve Petersen 2004).

Çürüklere ve dişeti hastalıklarına yol açabilecek plak birikimini önlemek için, şeffaf plaklarla ortodontik tedavi gören hastalar tarafından bu plakların günlük olarak temizlenmesi gerekmektedir. Bu amaçla plakları yumuşak bir diş fırçası ve diş macunu kullanarak fırçalamak veya özel temizleme kristalleri ya da temizleme tabletleri kullanmak gibi çeşitli temizleme yöntemleri bulunmaktadır. Ultrasonik temizleyiciler de kalıntıları ve bakterileri parçalayan yüksek frekanslı titreşimler üreterek şeffaf plakların temizliği amacıyla periyodik olarak kullanılabilmektedir (Charavet ve ark. 2022).

Şeffaf plak temizleme tabletleri genel olarak plak malzemesine zarar vermeden etkili bir şekilde temizlemek ve dezenfekte etmek için tasarlanmış bileşenler içermektedir. Formülasyonlar markadan markaya değişiklik gösterebiliyor olsa da, temizleme tabletlerinde bulunan ortak bileşenler; sodyum bikarbonat, sodyum perborat, sitrik asit, sodyum lauril sülfat ve proteazlar gibi çeşitli kimyasal maddeler ile enzimleri içermektedir (Charavet ve ark. 2022).

2.2.3. Dental Plaklar, Diş Çürükleri ve Biyofilmler Arasındaki İlişki

Dental plaklar, ağız boşluğunda yaşayan mikroorganizma popülasyonlarının oluşturduğu biyofilmlerdir. Bu biyofilmlerin yapısında bazıları patojenik özellik gösteren ve diş çürükleri ile periodontal hastalıklar gibi çeşitli ağız enfeksiyonlarına sebep olan 700'den fazla bakteri türü bulunabilmektedir. Diş çürükleri genellikle, oral florada bulunan asidojenik bakterilerin yaşamsal metabolizmaları sonucu ortaya çıkan asitler sebebiyle gerçekleşmektedir. Bu bakteriler, özellikle biyofilm oluşumunun sebep olduğu düşük pH'lı ortamlarda gelişmekte olup, diş yüzeyinin demineralizasyonuna da yol açmaktadır (Marsh ve ark. 2015). Diş plağı oluşumuna sebep olarak dişlerin çürümesine katkıda bulunan başlıca mikroorganizmalar arasında *S. mutans,* Laktobacillus, Aktinomiçes, Veillonella, *S. aureus* ve *C. albicans* yer almaktadır (J. L. Baker ve Edlund 2019; Barani-Sveçla ve ark. 2024).

Dental plak oluşumu, tükürüğün diş yüzeyi üzerinde pelikül olarak adlandırılan protein yapısında bir zar oluşturmasını takiben *Streptococcus sanguinis* ve *Streptococcus oralis* cinsi öncü bakterilerin sahip oldukları spesifik adezinleriyle bu zara tutunması ile başlamaktadır. Bu bakteriler tutundukları yüzeylerde çoğalarak EPS üretmekte ve *S. mutans* gibi ikincil kolonicilerin tutunması için uygun ortam hazırlamaktadır. Bakterilerin diş yüzeyine yapışmasını, biyofilmin stabilitesini arttıran adezinler ve EPS maddeleri de desteklemektedir. Biyofilm olgunlaştıkça daha kompleks bir hale gelmekte ve karyojenik bir ortam oluşmasını sağlamaktadır (Jakubovics ve ark. 2021; Koo ve ark. 2013).

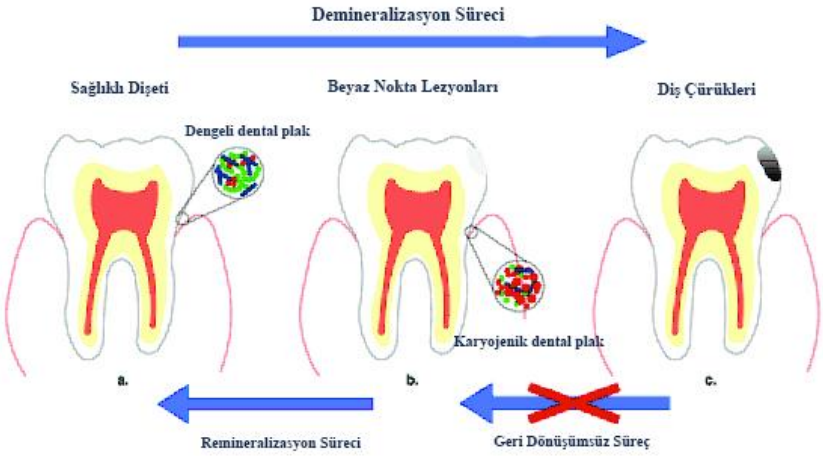
Diyette alınan karbonhidratlardan özellikle sükroz, diş çürüklerinin oluşumunda önemli bir rol oynamaktadır. Sükroz sadece bakteriyel fermantasyonda değil, aynı zamanda biyofilm matriksini güçlendiren EPS maddelerinin sentezi için de öncül bir molekül görevi görmektedir (Costa Oliveira ve ark. 2021; Moye ve ark. 2014). Sükroz, *S. mutans* tarafından glukoziltransferaz ve fruktoziltransferaz enzimleri aracılığıyla

glukan ve fruktan üretmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu üretilen EPS elemanları, bakteriyel adezyonu arttırarak biyofilm yapısına ve patojeniteye katkıda bulunmaktadır (Bowen ve Koo 2011). *S. mutans* ve Laktobasiller gibi karyojenik bakteriler, diyet şekerlerini glikoliz yoluyla metabolize eder ve yan ürün olarak laktik asit oluştururlar. Bu laktik asit oluşumu, biyofilm içindeki pH'nın düşmesine yol açarak demineralizasyonu destekleyen asidik bir ortam oluşturmaktadır (Buzalaf ve ark. 2012).

Demineralizasyon ve remineralizasyon, diş çürüklerinin ilerlemesini ve geriye çevrilmesini tanımlayan terimlerdir. Biyofilmdeki pH değeri, kritik eşiğin (yaklaşık olarak 5.5) altına düştüğünde diş yüzeyindeki ve dentindeki hidroksiapatit kristalleri çözünmeye başlayarak kalsiyum ve fosfat iyonlarını serbest hale geçirir. Bu asit atakları sırasında laktik asitteki hidrojen iyonları mine içerisine difüze olmakta ve hidroksiapatit ile reaksiyona girerek çözünebilir kalsiyum ve fosfat iyonları oluşturmaktadır. Bu süreç boyunca mikroskobik gözenekler ve boşluklar oluşarak dişteki mineral içeriği kayba uğramaktadır (Featherstone 2008; O. L. Zhang ve ark. 2023). Tükürük, karyojenik bakteriler tarafından üretilen asitleri nötralize eden ve remineralizasyon için gerekli kalsiyum, fosfat ve florür iyonlarını sağlayarak diş minesinin doğal onarım sürecinde önemli role sahip bir tampon görevi görmektedir. İçeriğindeki bahsedilen iyonlardan özellikle florür, aside daha dirençli bir mineral olan florapatit oluşturarak remineralizasyonu arttırmaktadır (ten Cate 2013).

Dental plak oluşumu özetle, Şekil 2-3'te görüldüğü gibi diş yüzeyine planktonik bakterilerin yapışması ve geri dönüşümsüz şekilde adezinlerini kullanarak tutunmasının ardından, EPS salgılanmasıyla birlikte biyofilm olgunlaşmasını içermektedir (Malcangi ve ark. 2023). Doğru ağız hijyeni uygulamaları ile düzenli olarak ortadan kaldırılmadığı takdirde, bu biyofilmler diş çürüklerine yol açabilmektedir. Oral mikroorganizmaların ağız boşluğu içerisindeki simbiyotik ilişkisi, dental plağa sebep olan bakterilerin oluşturduğu biyofilmlerin bileşimini ve patojenitesini etkileyerek onları çevresel değişikliklere ve antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli hale getirmektedir (de Vos ve ark. 2022; R. Huang ve ark. 2011; Kolenbrander ve ark. 2006). Örneğin Laktobasiller, *S. mutans* tarafından oluşturulan düşük pH'lı ortamlarda gelişen asit üreten bakterilerdir. *S. mutans*, çürük oluşumunu başlatırken Laktobasiller asit üretmeye devam ederek oluşturulan çürük lezyonlarının diş yüzeyinde daha da ilerlemesine neden olurlar (V. R. D. Santos ve ark. 2021). Benzer şekilde Aktinomiçes türleri, *S. mutans* ile

bir araya gelerek daha stabil ve patojenik biyofilmlerin oluşturulmasını sağlarken bir başka karyojenik bakteri olan *S. sobrinus* da yine *S. mutans* ile birlikte asit oluşturarak, tek başlarına oluşturacaklarından daha fazla zararın meydana gelmesine sebep olmaktadır (Banas ve Drake 2018; R. V. D. de Oliveira ve ark. 2020).



Şekil 2-2: Demineralizasyon ve remineralizasyon süreçlerinin şematik gösterimi

Ağız boşluğundaki biyofilmler sadece lokal ağız hastalıklarından sorumlu olmayıp, aynı zamanda çeşitli sistemik enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Oral biyofilmlerde bulunan patojenlerin, koroner endotelyal hücrelere yapışma özelliği de bulunmakta ve bu durum aterom plakların oluşumu ile damar esnekliğinde bozulmalara yol açabilmektedir. Benzer durum böbrek damarlarında da gözlenmektedir (Bascones-Martínez ve ark. 2009). Ayrıca, ağız florasının elemanlarından fırsatçı bir patojen olan *Fusobacterium nucleatum*'un, kolon kanserine direkt etkisi olduğu belirtilmemiş olsa da, yapılan çalışmalar bu bakterinin kanser hücrelerinin birikimini arttırabileceğinden bahsetmektedir (Leung ve ark. 2015).

Yapılan bazı çalışmalar, periodontitis görülen kadınlarda erken doğum ve düşük doğum ağırlıklı bebeklerin doğması arasında bir ilişkinin olabileceğini vurgulamaktadır. Bu çalışmalarda, biyofilme ait inflamatuar moleküllerin dolaşım sistemine karışarak plasentayı geçebileceği ve fetal membrana ulaşarak burada enfeksiyona sebep olabileceği gösterilmiş olup, periodontal patojenlerin hücre duvarlarındaki lipopolisakkaritlerle prostaglandin üretimini tetikleyebildiği ve bu durumun da erken doğum riskini arttırdığı ifade edilmiştir (Silva de Araujo Figueiredo ve ark. 2017).

Uygun şekillerde temizlenmeyen protezler, geçirilen diş operasyonları ya da dişlerin aşırı kuvvet uygulanarak fırçalanması, dişetini travmatize ederek kan dolaşımına bakterilerin karışmasına, bunun sonucu olarak da bakteriyel endokardit, aspirasyon pnömonisi ve gastrointestinal enfeksiyonlar gibi sistemik enfeksiyonlara sebep olma potansiyelini barındırmaktadır (Altamura ve ark. 2024; Svensäter ve Bergenholtz 2004).

2.2.4. Şeffaf Plaklar ve Biyofilm Oluşumu

Günümüzde geleneksel ortodontik tedavinin getirdiği çeşitli olumsuzluklar sebebiyle gerek yetişkinler gerekse çocuklar ve gençler, farklı bir tedavi seçeneği olarak şeffaf diş plaklarını tercih edebilmektedir. Şeffaf plaklar ortodontik tedavilerde dişlerin hizalanması amacıyla yaygın olarak kullanılmakta, ancak uygun şekilde temizlenmediklerinde üzerlerinde biyofilm oluşabilmektedir. Şeffaf diş plaklarında biyofilm oluşumunu etkileyen birçok faktör söz konusu olup özellikle malzeme özellikleri, yüzeyin pürüzlülüğü ve çevre koşulları, bakteriyel yapışmayı ve biyofilm gelişimini önemli ölçüde etkilemektedir (Engel ve ark. 2020). Yapılan çalışmalarda 14 gün boyunca takılan şeffaf plakların yüzeylerinde mikro çatlaklar, aşınmış alanlar, lokalize kalsifiye biyofilm birikintileri ve şeffaflık kaybı gözlemlenmiştir (Gracco ve ark. 2009).

Araştırmalar şeffaf diş plakları üzerinde oluşan biyofilmlerde çeşitli mikroorganizmaların bulunabileceğini de göstermektedir (Baybekov ve ark. 2023; Rouzi ve ark. 2023; Tektas ve ark. 2020; M. Zhang ve ark. 2020). En sık karşılaşılan mikroorganizmalar arasında *S. mutans, Porphyromonas gingivalis, Lactobasiller, S. sanguinis, Streptococcus mitis, Veillonella sp., Actinomiçesler, F. nucleatum, Prevotella intermedia* gibi bakterilere ek olarak *C. albicans* gibi spesifik mantarların varlığının, biyofilm oluşum sürecini daha da kompleks hale getirerek plak kullanıcılarında ciddi potansiyel oral enfeksiyonlara yol açabildiği gösterilmiştir (Alotaibi ve Bukhari 2021).

2.3. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizmalar

Ağız sağlığı açısından önemi olan birçok mikroorganizma bulunmakta olup, bu mikroorganizmalar arasında özellikle diş çürüklerinden en sık sorumlu tutulan bakteri olarak karşımıza *S. mutans* çıkmaktadır. *S. mutans,* diyetteki karbonhidratları fermente etme, asit üretme, diş yüzeylerine yapışarak dişin demineralizasyonuna sebep olma ve

diş çürüklerinin oluşmasına katkıda bulunma özellikleri ile bilinmektedir (Bowen ve Koo 2011; Lemos ve ark. 2019; Loesche 1986).

Diş çürüklerinin oluşumunda rol oynayan mantarlar incelendiğinde ise, üzerinde çalışılan birincil organizma *C. albicans*'tır. *S. mutans* özellikle diş çürükleriyle daha sık ilişkilendirilirken, *C. albicans*'ın ise ağız içi enfeksiyonlarına katkıda bulunma ve çürük oluşumunu şiddetlendirme potansiyeli üzerinde sıklıkla durulmaktadır (Lu ve ark. 2023; Metwalli ve ark. 2013).

2.3.1. Streptococcus mutans

Streptococcaceae ailesine ait Gram pozitif, fakültatif anaerobik bir bakteri olan *S. mutans*, 0.5 ila 1.5 μm çapında ve kok şeklinde bir hücresel morfolojiye sahiptir. *S. mutans* katalaz ve oksidaz negatif özellik göstermekte olup, %5 koyun kanlı agar yüzeyinde γ-hemoliz oluşturmaktadır (Krzyściak ve ark. 2017). Tipik olarak *S. mutans* kolonileri küçük, 1-2 mm çapında, yuvarlak, opak ve hafif kabarık olup yüzeyleri pürüzsüz ve parlak görünmektedir. Genellikle beyaz ve krem renklidirler. Optimal üreme sıcaklıkları 35-37°C civarında olup, eşeysiz olarak ikiye bölünerek çoğalırlar ve jenerasyon süreleri yaklaşık 30 dakikadır. Yaşam alanı genellikle ağız boşluğudur ve beslenme ile alınan şekerleri asitlere fermente etme yeteneği ile diş çürüklerinin gelişmesine yol açabilmektedir (Loesche 1986). Optimum olarak pH 6,0 civarında, hafif asidik ortamda en iyi gelişmeyi göstermekte, asit toleransı sebebiyle asidik koşullarda da (pH 5,0) hayatta kalabilmektedir. Bu özellikleri, pH'ın diyet şekerleriyle sıklıkla değişiklik gösterdiği oral boşlukta hayatta kalabilmesinin temel sebepleri arasında yer almaktadır (Lemos ve ark. 2019). *S. mutans*, metabolik aktivitelerine devam edebilmek için sükroz, glukoz ve fruktozu kullanabilirken, özellikle sükroza maruz kaldığında diş yüzeylerinde biyofilm oluşumunu kolaylaştıran hücre dışı polisakkaritleri üretmektedir. Biyofilm ortamı, *S. mutans*'ı çevresel stres faktörlerinden korumakta ve bu koruyucu matriks içinde güvenle üremesine izin vermektedir (Koo ve ark. 2010). Şeker metabolizması sırasında karbonhidratları fermente ederek yan ürün olarak laktik asit üreten *S. mutans*, laktik asidin sebep olduğu asidik ortamda, oral boşlukta bulunan ve aside daha duyarlı olan diğer bakterilerle rekabet ederek daha verimli bir şekilde çoğalabilmektedir. Bu asidojenik özellik, diş minesinin demineralizasyonuna doğrudan katkıda bulunduğu için, diş çürümesindeki rolü açısından da önemlidir (Ma ve ark. 2021).

Kalp odacıkları ve kapakçıklarının iç zarlarının enfeksiyonuna enfektif endokardit ismi verilmekte olup sıklıkla kalp rahatsızlıklarına sahip bireylerde veya yapay kalp kapakçığı olan kişilerde bu enfeksiyona rastlanmaktadır. *S. mutans*, diş çekimi ya da diğer kanamalı diş prosedürleri sırasında veya ağız hijyenine dikkat etmeyen bireylerde kan dolaşımına karışıp, kalp kapakçıklarında kolonize olarak enfektif endokardite neden olabilmektedir (Rouzi ve ark. 2023). Daha nadir görülmekle birlikte *S. mutans*'ın, özellikle bağışıklık sistemi baskılanmış bireylerde bakteriyemi gibi çeşitli sistemik enfeksiyonlara yol açtığı da çeşitli çalışmalarda raporlanmıştır (Abranches ve ark. 2018).

2.3.1.1. *S. mutans* Virülans Faktörleri

Glukozil transferazlar (GTFs): Bir laktik asit bakterisi olan *S. mutans*'ın enerji üretimi glikolize dayanmakta olup, en önemli özelliği farklı karbonhidratları metabolize edebilmesidir. Glukoz ve fruktozdan oluşan bir disakkarit olan sükrozun, tüm karbonhidratlar arasında en karyojenik şeker olduğu çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. *S. mutans*, asit üretim sürecinde sükrozu katabolize etmek üzere birden çok yol geliştirmiştir (Ajdić ve ark. 2002; Zeng ve Burne 2013). Sahip olduğu GTF-B, GTF-C ve GTF-D enzimleri, sükroz gibi diyet şekerlerinden suda çözünebilen ve suda çözünemeyen glukanları sentezleyerek EPS oluşumuna ve bunu takiben de bakteri kolonilerinin diş yüzeyine tutunmasına yardımcı olmaktadır (Bowen ve Koo 2011). Glukanların oluşumu, virülansta önemli bir rol oynamakta ve tutkal benzeri bir polisakkarit matrisi oluşturarak biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadırlar. Ayrıca yapılan modelleme çalışmalarında GTFs'nin hem dental demineralizasyondaki, hem de aside toleranslı türlerin nihai baskınlığına elverişli, heterojen ve difüzyonu sınırlayıcı, düşük pH'lı bir matris oluşumundaki benzersiz rolü doğrulanmıştır (Bowen ve Koo 2011; Xiao ve ark. 2012).

Asitojenite ve Aside Karşı Direnç: *S. mutans*'ın, beslenme ile alınan şekerleri fermente ederek oluşturduğu metabolik yan ürün olan laktik asit üretimi, diş yüzeyinde oluşan biyofilmlerin pH'ını düşürmekte ve diş minesinin demineralizasyonuna yol açmaktadır (Loesche 1986). *S. mutans*'ın diş plağı içindeki ani çevresel değişikliklere uyum sağlama yeteneği, diş çürüğünün başlıca etiyolojik etkeni olma statüsüne katkıda bulunan önemli bir özelliktir. Konak tarafından tüketilen fermente edilebilir karbonhidratlar, *S. mutans* ve diğer laktik asit bakterileri için bir substrat sağlamakta ve

biyofilm içinde biriken asidik son ürünler üretilmektedir. Düşük pH değerlerinde gelişmek için *S. mutans'*ın, sitoplazma tamponlamasına ve membran yağ asidi bileşimindeki değişikliklere katkı sağlayan yolların indüklenmesini kapsayan, sonucunda ise hücresel mekanizmayı asit hasarından koruyan ve stres esnasında bakterinin hayatta kalmasına katkıda bulunan güçlü bir asit tolerans tepkisi bulunmaktadır (J. l. Baker ve ark. 2017; Lemos ve Burne 2008; Matsui ve Cvitkovitch 2010).

Çevresel asidifikasyon ayrıca, *S. mutans*'ın plazma membran bileşiminin proton geçirgenliğini değiştirebilecek şekilde modifiye edilmesini de tetiklemektedir. Bu modifikasyonlar, tekli doymamış yağ asiti oranının arttırılması ve bu membran yağ asitlerini oluşturan karbon zincirlerinin uzatılması ile gerçekleşmektedir (Fozo ve Quivey 2004).

Reaktif Oksijen Türevlerinden Korunma: Diş plağı ortamının anaerobik olduğu düşünülüyor olsa da, oral floranın oksijen miktarını azaltma kapasitesinin yüksek olduğu ve bunun sonucunda da toksik oksijen reaktiflerinin oluştuğu bilinmektedir (Marquis 1995). Çoğu *S. mutans* suşu, diş plağında bulunan peroksijenik streptokoklar gibi diğer türlerin metabolizması sonucunda ortaya çıkan veya ağız hijyeni ürünlerinin bir bileşeni olan H_2O_2'ye maruz kalmaktadır. Yüksek seviyelerde H_2O_2'ye ve daha zararlı parçalanma ürünleri olan hidroksil radikalleri ile süperoksit anyonlarına maruz kalmak, enzimlerin yanlış metallenmesini tetikleyerek ya da proteinlere zarar vererek DNA bütünlüğünü bozmakta ve geri dönülemez hücresel hasarlara yol açabilmektedir (Imlay 2013). Oral streptokoklar katalaz enzimine sahip olmasa da *S. mutans*, toksik reaktif oksijen türevlerinin birikimini önlemek için bir dizi sisteme sahiptir. Manganez bağımlı bir süperoksit dismutaz, alkil hidroperoksidaz redüktaz ve glutaredoksin sistemleri bunlardan bazılarıdır (Kajfasz ve ark. 2017).

Mutasinler (Bakteriyosinler): QS molekülleri, mikroorganizmaların besin ve popülasyon yoğunluğu gibi çevresel koşulları algılamasını ve bunlara yanıt vermelerini sağlayan iletişim ağlarıdır. Mikroorganizma popülasyonu arttıkça, QS molekülü yoğunluğunda da artış gözlenmekte olup, Gram pozitif bakterilerde bu moleküller peptit feromonlar tarafından koordine edilmektedir (Lyon ve Novick 2004; Shanker ve Federle 2017). *S. mutans*'ta QS sistemleri, diğer oral flora elemanlarına karşı savunma amaçlı peptit antibiyotikler olan bakteriyosinlerin üretimini düzenlemek için

evrimleşmiştir. Mutasinler, *S. mutans* tarafından üretilen, ortamdaki diğer bakterilerin çoğalmasını engelleyen ve bu yetenekleri ile *S. mutans*'a rekabet avantajı sağlayarak oral mikrobiyotadaki hayatta kalma oranlarını artıran antimikrobiyal peptitlerdir. Bu mutasinler, lantibiyotikler veya lantibiyotik olmayanlar olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Lantibiyotikler lantiyonin içeren antibiyotik anlamına gelmekte olup, ribozomal olarak sentezlenen antimikrobiyal peptitlerdir (Kamiya ve ark. 2011).

Adezinler: *S. mutans*, tükürük glikoproteinlerine ve diş minesindeki reseptörlere bağlanmayı kolaylaştıran hücre yüzey proteinlerine sahiptir. Bu proteinler *S. mutans*'ın diş yüzeyindeki kolonizasyonunu ve biyofilm oluşumunu kolaylaştırmaktadır (Kreth ve ark. 2005).

Biyofilm Oluşumu: Oral boşlukta bulunan erken kolonizatörler (*Streptococcus gordonii, S. mitis* ve Actinomyces spp. vb.) tükürük proteinleri aracılığı ile diş minesine bağlanmakta ve non-karyojenik koşullar altında biyofilm oluşturmaya başlamaktadır. Nötre yakın pH seviyelerinde, peroksijenik bakteriler tarafından H_2O_2 üretimi ve oral kommensaller tarafından üretilen diğer antimikrobiyal ürünler, dental biyofilmlerde *S. mutans* gibi patojenlerin aşırı miktarda çoğalmasını engellemekte, ancak pH'ın aside yakınlaşması bu durumu değiştirmektedir. Konak tarafından sürekli sükroz alımı, *S. mutans* gibi asit oluşturan ve yüksek asidojenik bakterilerin çoğalmasını destekleyen bir dizi ekolojik ve yapısal değişikliğe yol açmaktadır. Bu değişiklikler oral biyofilm metabolizmasını değiştirerek bol miktarda organik asit üretimine ve çevresel pH'ın düşmesine katkıda bulunmaktadır. *S. mutans* biyofilmde baskın hale geldiğinde, yüksek miktarlarda mutasin salgılaması ile peroksijenik streptokoklar gibi ortamdaki diğer rakiplerinin ölmesine yol açmaktadır.

S. mutans tarafından salgılanan GTF'ler, sükrozu katabolize ederek büyük miktarlarda çözünen/çözünemeyen glukanları üretmekte ve bu da özellikle çözünmeyen bileşenler içeren sağlam bir EPS oluşumuna katkı sağlamaktadır. EPS matrisi glukanlar, *S. mutan*s glukan bağlayıcı proteinleri ve diğer organizmalar için bağlanma bölgeleri sağladığından, biyofilm yapısı için mimari bir iskele görevi görerek diş minesine ve bakterilere sıkı bir şekilde yapışmaya aracılık etmektedir. Hücre dışı DNA, oral biyofilm matrisinin bir başka birimi olarak görev alıp, hücreleri hücrelere ve hücreleri substratlara bağlayarak biyofilmin yapısal bütünlüğüne katkı sağlayan nanofiberler oluşturmaktadır (Lemos ve ark. 2019).

2.3.2. Candida albicans

C. albicans insan vücudunun çeşitli anatomik bölgelerinde yaygın olarak yerleşim gösteren fırsatçı bir patojendir. Canlılar sınıflandırmasındaki yeri; Mantarlar Alemi, Ascomycota Şubesi, Saccharomycetes Sınıfı, Saccharomycetales Takımı ve Saccharomycetaceae Familyasında bulunmaktadır. Dimorfizm özelliği göstermesi sebebiyle maya, psödohif ve hif formları da dahil olmak üzere, ortam şartlarına bağlı olarak farklı şekillerde bulunabilmektedir. Bu form değiştirme yetenekleri, *C. albicans* patojenitesi açısından büyük önem teşkil etmektedir (Sudbery ve ark. 2004).

C. albicans, sağlıklı bireylerin gastrointestinal kanallarında, oral boşlukta ve vajinal mukozada yaygın olarak bulunan komensal bir organizmadır. Normal mikrobiyotanın bir parçası olarak kabul edilmekle birlikte belirli koşullar altında patojenik hale gelebilmektedir. Bağışıklık sistemi çeşitli sebeplerden baskılanmış kişilerde, kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu (AIDS) hastalarında, kemoterapi gören kanser hastalarında, organ nakli alıcılarında ve geniş spektrumlu antibiyotik kullanan kişilerde sıklıkla fırsatçı kandida enfeksiyonlarına rastlanmaktadır (Calderone ve Fonzi 2001).

Yapılan çalışmalar göstermektedir ki *C. albicans,* sıklıkla *S. mutans* kaynaklı çocukluk çağı diş çürüklerinde yüksek miktarlarda tespit edilmektedir (de Carvalho ve ark. 2006). *S. mutans*'a ait GTF-B enziminin, *C. albicans* yüzeyinde bulunan mannan reseptörlerine bağlandığı, bu durumun da *C. albicans*'ın yapışma miktarını arttırdığı ve biyofilm miktarında artışa yol açtığı gözlemlenmiştir (Falsetta ve ark. 2014). Ayrıca *C. albicans*'ın, *S. mutans*'ın EPS üretimini arttırma özelliğine sahip farnesol sentezlediği de bilinmektedir (Kim ve ark. 2017).

2.3.2.1. *C. albicans* Virülans Faktörleri

Adhezyon: *C. albicans*, konak dokularına ve çeşitli tıbbi cihazlara tutunmasını kolaylaştıran, adezinler olarak da bilinen çeşitli hücre yüzeyi proteinlerine sahiptir. Temel adezinleri arasında aglütinin benzeri dizi (Als) proteinleri, hifal duvar proteini 1 (Hwp1) ve epitelyal adezin (Eap1) yer almaktadır (Hoyer ve ark. 2008).

Enzim Üretimi: *C. albicans,* doku istilasına ve konakçının bağışıklık tepkisinden kaçmasına yardımcı olan proteazlar, fosfolipazlar ve lipazlar gibi hidrolitik enzimler salgılamaktadır. Salgılanan aspartil proteazlar (SAP) konakçı proteinlerini bozarak doku istilasını ve bağışıklıktan kaçmayı kolaylaştırmaktadır. Ayrıca sahip

olduğu fosfolipazlar, konakçı hücre zarlarının yapısal bütünlüğünü bozarak doku penetrasyonuna yardımcı olurken, lipazlar da besin alımına ve biyofilm oluşumuna katkıda bulunmaktadır (Ghannoum 2000; Naglik ve ark. 2003). *C. albicans*'ın süperoksit dismutaz gibi enzimleri ise, konakçı bağışıklık sisteminin maya hücreleri üzerinde neden olduğu oksidatif stresten korunmaya yardımcı olmaktadır (Gow ve ark. 2012).

Biyofilm Oluşumu: *C. albicans*, tıbbi cihazlar ve çeşitli dokular üzerinde antifungal tedaviye dirençli ve kronik enfeksiyonlara katkıda bulunan biyofilmler oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Özellikle *S. mutans* ile bir araya gelerek oluşturdukları biyofilmlerin diş çürükleri ve çeşitli dişeti hastalıklarına yol açtığı, yapılan farklı çalışmalarda gösterilmiştir (Ramage ve ark. 2005).

2.4. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

Antimikrobiyal maddeler, çeşitli patojenlerin neden olduğu enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla kullanılan kimyasal ajanlardır. Bu maddeler, mikroorganizmaların üremesini engellemek veya öldürmek için spesifik mekanizmaları hedef alan sentetik ya da doğal olarak türetilmiş bileşikleri içermektedir (Hutchings ve ark. 2019). Klinik uygulamalarda, özellikle bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde antibiyotikler kullanılmakla birlikte, bu antibiyotiklerin yanlış kullanımları ve çok miktarda reçete edilmeleri, dirençli bakteri türlerinin gelişmesi gibi büyük sorunlara yol açmaktadır. Antibiyotiklerin yanlış kullanımları, Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) vurguladığı gibi, antibiyotik direncini en önemli on halk sağlığı problemi arasına yerleştirmektedir (Hrast 2022). Yeni dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkması ve hali hazırda var olan mikrobiyal dirençle mücadele edebilmek adına yeni antimikrobiyal ajanların sürekli olarak geliştirilmesi gerekmektedir (Carvalho 2022). Bu nedenler göz önünde bulundurulduğunda, diş çürüklerinin engellenmesi ve oral florada bulunan patojenik mikroorganizmaların inhibe edilmesi konularında umut verici bir potansiyele sahip olan borlu bileşikler ve doğal ürünler, bu çalışmanın temelinde kullanılmak üzere seçilmiştir.

2.4.1. Borlu Bileşikler

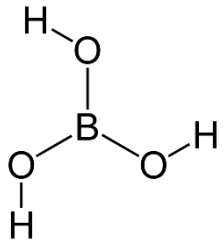
Bor bileşikleri bakteriler, mantarlar ve biyofilmlerin sebep olduğu çeşitli mikrobiyal enfeksiyonlarla mücadelede önemli bir antimikrobiyal ajan potansiyeli göstermektedir (Çelebi ve ark. 2023; Çelikezen ve Şahin 2023). Bu bileşiklerin etki mekanizması temelde; mikroorganizmaların hücre zarlarının parçalanması, enzim

aktivitelerinin inhibisyonu ve biyofilm oluşmasının engellenmesi şeklinde sıralanmaktadır. Bu özellikleri sebebiyle bor bileşikleri kişisel bakım ürünlerinde koruyucu, gıda endüstrisinde katkı maddesi ve tıpta potansiyel terapötik ajanlar olarak çeşitli uygulamalarda kullanılabilmektedir (Scott ve ark. 2018).

Bor bileşikleri tek başlarına antimikrobiyal aktivite gösterebilmekle birlikte, diğer antimikrobiyal ajanlarla birlikte kullanıldıkları çeşitli çalışmalarda, bu maddelerin etkilerini arttırdıkları da açıkça gösterilmiştir. Geleneksel antibiyotiklerle kombinasyon halinde, dirençli suşlar üzerine uygulandıklarında sıklıkla sinerjist etki göstermelerine ek olarak, fenil gruplarıyla birlikte kullanılan bor bileşikleri de, güçlü ve geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir (Das ve ark. 2022). Çinko borat ile gerçekleştirilen deneylerde, *C. albicans* ve *S. aureus*'un üremesini etkili bir şekilde engellediği ve bu bağlamda yara enfeksiyonlarını önlemede etkili olabileceği de gösterilmiştir (Boran ve ark. 2023).

2.4.1.1. Borik Asit

Şekil 2-4'te görüldüğü gibi H_3BO_3 kimyasal formülüne sahip bir bileşik olan borik asit, çeşitli endüstriyel ve sağlık uygulamalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Sıklıkla antiseptik veya diğer kimyasal bileşiklerin öncüsü olarak kullanılan zayıf bir bor asidi olan borik asit, suda çözündüğünde beyaz, kristalimsi bir madde olarak görünmektedir (D. G. Hall 2005). Borik asit, antiseptik etkinliği sebebiyle göz yıkama solüsyonları, topikal antiseptikler ve mantar enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan merhemler gibi çeşitli tıbbi formülasyonlarda kullanılmaktadır (Schubert 2015).



Şekil 2-3: Borik asitin kimyasal yapısı

Yüksek oranda antimikrobiyal etkinliğe sahip olan borik asitin *C. albicans, S. aureus, P. aeruginosa, Staphylococcus intermedius, Staphylococcus epidermidis,*

Clostridium botulinum, Salmonella enteritidis gibi patojen mikroorganizmalar üzerinde gösterdiği antimikrobiyal etkiler, çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Argın ve ark. 2019; Gavilanes-Martínez ve ark. 2021; Hashemabadi ve ark. 2014; Hernandez-Patlan ve ark. 2018; Safari ve Yousefi 2010; Seydibeyoglu ve ark. 2021).

Borik asit, *C. albicans* gibi mayaların yanı sıra *S. mutans*'a karşı da antibakteriyel aktivite göstermektedir. Çalışmalar, *S. mutans* kaynaklı diş çürüklerini önlemek için borik asidin diş hijyeni ürünlerinde yardımcı madde olarak potansiyel kullanımının önemini vurgulamaktadır. Araştırmalar ayrıca, borik asidin hücre duvarı polisakkaritlerini değiştirebildiğini ve potansiyel olarak büyüme ve biyofilm oluşumunu etkileyebildiğini de göstermektedir. Borik asit, timol ve triklosan gibi bileşiklerle bir arada kullanıldığında da *S. mutans*'a karşı sinerjist bir etki oluşturarak antibakteriyel etkiyi arttırmaktadır (Salmerón-Valdés ve ark. 2022).

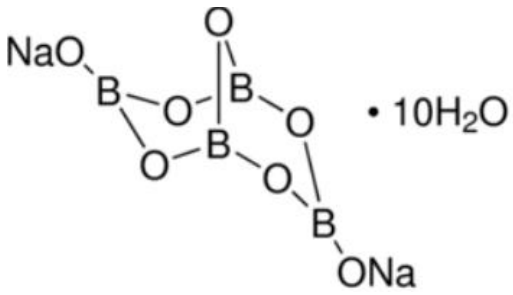
Genel olarak borik asidin antimikrobiyal etkisi, bakteriyel hücre zarının bozulması, metabolik yolaklara müdahale, gen ekspresyonunun modülasyonu ve antioksidan savunmanın arttırılması dahil olmak üzere birçok mekanizmayı içermektedir (Yardımcı ve ark. 2023). Borik asit, hücre yapısını ve fonksiyonunu korumak için gerekli olan temel bakteriyel enzimleri ve kofaktörleri inhibe ederek bakteriyel hücre zarının yapısını bozmakta ve bu da hücre lizisine yol açarak antimikrobiyal etkinlik göstermesini sağlamaktadır (El-Batal ve ark. 2019; Farfán-García ve ark. 2023). Ayrıca maya hücrelerinde antioksidatif ve apoptotik genlerin ekspresyonunu modüle ederek toksisiteyi indüklemektedir (Yardımcı ve ark. 2023).

Borik asit, bahsi geçen çok sayıda ve çeşitli alanlardaki yararlı etkilerinin yanında, yutulması veya yanlış dozlarda kullanılması durumunda toksik etkiler de göstermektedir. Borik asit zehirlenmelerine ait raporlar, özellikle gıda ürünlerinde kullanımlarına dair farkındalığın arttırılması gerektiğini vurgulamaktadır (See ve ark. 2010).

2.4.1.2. Sodyum Borat

Kimyasal yapısı Şekil 2-5'te gösterilen sodyum borat ($Na_2B_4O_7$), ya da daha sık bilinen ismiyle boraksın antimikrobiyal etkinliği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Suda kolaylıkla çözünebilen beyaz kristal bir toz olan sodyum boratın çeşitli maddelerle birlikte kullanımı, bu maddelerin antimikrobiyal özelliklerini arttırarak onları tıbbi cihazlardan yara pansumanlarına kadar çok çeşitli uygulamalar için kullanılabilir hale

getirmektedir. Yüksek konsantrasyonlardaki sodyum borat, biyofilm oluşumunu ve bakteri kolonizasyonunu etkili bir şekilde engelleyebilmekte ve bu da onu implantlarla ilişkili enfeksiyonları önlemek için tıbbi uygulamalarda önemli hale getirmektedir (Coskun ve ark. 2022).



Şekil 2-4: Sodyum boratın (Boraks) kimyasal yapısı

Sodyum borat da tıpkı borik asit gibi bakteri hücre zarını bozarak hücre lizisine ve ölümüne yol açmaktadır. Bu bozulma, hücre zarının bütünlüğünü tehlikeye atarak hücresel içeriklerin sızmasına ve akabinde hücre ölümüne neden olmaktadır (L. Yang ve ark. 2020). Bu mekanizma özellikle *S. aureus, Acinetobacter septikus, Escherichia coli* ve *P. aeruginosa* gibi çeşitli bakteri türlerine karşı etkilidir (Yılmaz 2012).

Sodyum borat, ayrıca *S. mutans*'ın sebep olduğu diş çürüklerinin tedavisinde de etkili olarak kullanılabilmesini sağlayan güçlü bir antimikrobiyal aktivite sergilemektedir (Nagavi-alhoseiny ve ark. 2019). Sodyum borattan türetilen borinik esterlerin, bakteriyel büyüme ve replikasyon için önemli olan metiltransferazlar, CcrM ve MenH gibi önemli bakteriyel enzimleri inhibe ederek kritik metabolik süreçlere müdahale ettikleri gösterilmiştir (Benkovic ve ark. 2005).

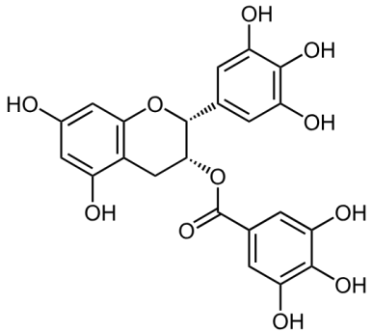
2.4.2. Doğal Maddeler

Doğal olarak bitkiler, hayvanlar ve mikroorganizmalar da dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan elde edilen ürünler, antimikrobiyal maddeler olarak önemli bir potansiyel sergilemektedir ve birçok patojene karşı aktivite göstermektedir. Bitkilerden elde edilen çeşitli maddelerin antimikrobiyal özelliklere sahip olması, onları enfeksiyonlarla mücadelede değerli kılmaktadır. Örneğin, *Thevetia peruviana*'dan (Peru Zakkumu) elde edilen ekstraktlar, hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı önemli antibakteriyel aktivite göstermiştir (Deshmukh ve Shelke 2019). Benzer şekilde, *Codiaeum variegatum*'un (Kroton) yapraklarından elde edilen ekstraktlar,

Serratia marcescens ve *Bacillus subtilis*'e karşı güçlü antibakteriyel aktivite sergileyerek geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlara dönüşme potansiyellerini ortaya koymuştur (Mohamed ve ark. 2019). Ayrıca zencefil ve tarçın gibi baharatların da metisiline dirençli *S. aureus* ve *P. aeruginosa* gibi dirençli bakteri türlerine karşı güçlü antimikrobiyal aktivitelere sahip olduğu gösterilmiştir (Liu ve ark. 2017). Özetle doğal ürünler, geniş uygulama alanları ve etki spektrumlarıyla, kullanımda olan antimikrobiyal maddelere umut verici bir alternatif sunmaktadır.

2.4.2.1. Epigallokateşin gallat

Epigallokateşin gallat (EGCG) yeşil çayda bol miktarda bulunan bir polifenolik bileşik sınıfı olan kateşin türevidir. Flavonoid ailesinin bir parçası olarak antioksidan ve anti inflamatuar özellikler de göstermektedir. Yapısal olarak, Şekil 2-6'da görüldüğü gibi flavan-3-ol olarak sınıflandırılmakta ve molekül üzerinde belirli yerlere konumlandırılmış hidroksil gruplarına sahip bir kateşin omurgasından oluşmaktadır. Yeşil çayda (*Camellia sinensis*), özellikle oksitlenmemiş formunda, bol miktarda bulunmakta olup diğer formları da Epikateşin galat (ECG), epikateşin (EC) ve epigallokateşin (EGC)'dir (Chacko ve ark. 2010).



Şekil 2-5: Epigallokateşin gallat'ın kimyasal yapısı

EGCG'nin *S. aureus, E. coli, Helicobacter pylori* ve Salmonella spp. gibi hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı antibakteriyel özellikler gösterdiği çeşitli çalışmalarda belirtilmiştir (Friedman ve ark. 2006; Jubair ve ark. 2022; Lee ve ark. 2017). Etki mekanizmaları arasında bakteriyel hücre zarlarının parçalanması, bakteriyel enzimlerin inhibe edilmesi ve bakterinin konakçı hücreye yapışmasının engellenmesi yer almaktadır.

EGCG ayrıca çeşitli mantar türlerine karşı antifungal özellikler sergilemektedir. İnsanlarda mantar enfeksiyonlarının yaygın bir nedeni olan *C. albicans* gibi mayalara karşı etkili olduğu da çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olup, bu antifungal aktivite mantar hücre zarlarının parçalanmasını ve büyüme ve hayatta kalma için gerekli enzimlerin inhibe edilmesini içermektedir (X. Jiang ve ark. 2015; Park ve ark. 2011).

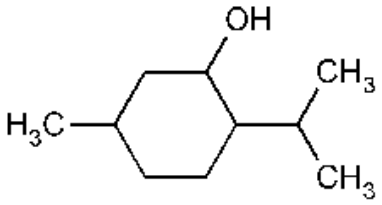
Çeşitli çalışmalarda, diş plağı ve diş çürüklerine neden olan *S. mutans* biyofilmlerinin oluşumunun engellenmesinde EGCG'nin etkili olduğu gösterilmiştir. Sistematik bir inceleme, EGCG'nin de içinde bulunduğu yeşil çay kateşinlerinin *S. mutans* üzerinde doğal antibakteriyel maddeler olarak potansiyelini ortaya koymakta ve bu bakterinin metabolik süreçlerini ve biyofilm matris sentezini etkileyerek virülansını azalttığını göstermektedir (Aragão ve ark. 2022; 2024). Ayrıca bazı çalışmalar, EGCG'nin *S. mutans*'ın büyümesini ve biyofilm oluşumunu engellemedeki etkinliğini doğrulayarak diş bakım ürünlerinde kullanımını da desteklemektedir (Schneider-Rayman ve ark. 2021).

EGCG, tıpkı diğer kateşinler gibi, serbest radikalleri ortadan kaldırmakta ve hücrelerdeki oksidatif stresi azaltarak antioksidan görevi görmektedir. Çalışmalar, EGCG'nin pro-inflamatuar sitokinleri ve siklooksijenaz-2 (COX-2) vb. enzimleri inhibe etmek gibi inflamatuar yolakları modüle edebildiğini ve böylece inflamasyonu azaltabildiğini göstermiştir (Peairs ve ark. 2010). Lipid metabolizmasını düzenleyerek ve kan damarlarındaki oksidatif stresi azaltarak kardiyovasküler hastalıklara ait risk faktörlerini azaltmak konusunda da potansiyel rolleri bulunmaktadır. EGCG ve diğer kateşinler ayrıca, kanser hücrelerinde tümör büyümesini inhibe ederek ve apoptozu (programlanmış hücre ölümü) teşvik ederek kemopreventif özellikler göstermektedir (H.-C. Li ve ark. 2000). EGCG'nin insülin duyarlılığını ve glikoz metabolizmasını iyileştirmede rol oynayabildiği ve potansiyel olarak diyabet veya diğer metabolik sendromlu bireylere fayda sağlayabileceği de düşünülmektedir (Rosen 2012).

2.4.2.2. Mentol

Mentol, nane (*Mentha piperita*) ve mısır nanesi (*Mentha arvensis*) gibi bitkilerin yağından elde edilen doğal bir bileşiktir. Karakteristik aroması ve serinletici hissi nedeniyle çeşitli tıbbi, kozmetik ve gıda ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Mentol, Şekil 2-7'de görüldüğü gibi moleküler formülü $C_{10}H_{20}O$ olan siklik bir

alkoldür, oda sıcaklığında katı halde bulunur ve karakteristik bir kokuya sahiptir (Kamatou ve ark. 2013).



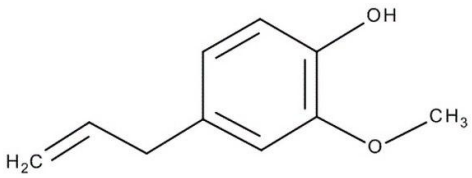
Şekil 2-6: Mentolün kimyasal yapısı

Mentol, bakteri ve mantar hücre duvarlarının yapısını bozarak mikroorganizmaların üremesini engellemektedir. *S. aureus* ve *E. coli* üzerinde yapılan çalışmalarda mentolün, hücre zarındaki lipit yapısında bozulmalara yol açabileceği, bunun da hücre zarı geçirgenliğinde değişikliklere ve dışarıya hücre içeriği sızmasına yol açabileceği gösterilmiştir (Trombetta ve ark. 2005). Çalışmalar ayrıca, mentolün *S. mutans* ve *C. albicans* gibi oral patojenlere karşı da antimikrobiyal etkinliği olduğunu bildirmekte ve *S. mutans*'ı hedef alan yeni antimikrobiyallerin geliştirilmesinde, biyoaktif özelliklerinden dolayı kullanılmaktadır (B. Zhang ve ark. 2022).

Mentol, soğuk ve sıcaklıkların algılanmasından sorumlu olan duyu nöronlarındaki geçici reseptör potansiyeli melastatin 8 (TRPM8) reseptörlerini aktive etmekte ve bunun sonucunda ciltte veya mukozada bir soğuma hissi yaratmaktadır (Patel ve ark. 2007). Ayrıca ağrı reseptörlerini duyarsızlaştırarak ve ağrı algısını azaltarak hafif bir lokal anestezik ve analjezik görevi de görmektedir. Mentol, inflamatuar mediyatörleri ve sitokinleri inhibe ederek anti-inflamatuar özellikler de sergilemekte ve böylelikle inflamasyonu ve şişliği azaltmaktadır (Oz ve ark. 2017). Bu özelliklerine dayanarak mentol, topikal olarak kas ağrılarını ve kaşıntıyı hafifletmek için kremler, jeller ve merhemler gibi preparatlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra boğaz ve ağız ferahlatıcı ve rahatlatıcı etkisinden dolayı diş macunu, gargara ve boğaz pastillerine de eklenmektedir. Mentol ayrıca solunum sistemi rahatsızlıklarının tedavisinde (inhalerlerde) ve analjezik losyonlarda bir bileşen olarak da farmasötik formülasyonlarda kullanılmaktadır (Galeotti ve ark. 2002).

2.4.2.3. Öjenol

Kimyasal yapısı Şekil 2-8'de gösterilen öjenol çeşitli bitkilerde, özellikle karanfil, hindistan cevizi, tarçın ve defne yaprağında bulunan doğal bir bileşiktir. Hoş aroması ve tadıyla yaygın olarak parfümlerde, kozmetik ve gıda ürünlerinde kullanılmaktadır. Bakteriler, mantarlar ve virüsler dahil olmak üzere çeşitli patojenlere karşı güçlü antimikrobiyal özellikleriyle bilinmekte olup, mikrobiyal hücre zarlarının yapısında bozulmaya sebep olmakta ve üremelerini engellemektedir. *S. aureus, Enterococcus faecalis, Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, E. coli, P aeruginosa, Salmonella* ve *H. pylori* ile yapılan çalışmalarda öjenolün antimikrobiyal etkinlikleri gözlemlenmiştir (Marchese ve ark. 2017). Ağız bakım ürünlerinde ve doğal gıda koruyucusu olarak da potansiyel kullanımı bulunmaktadır (J. R. de Oliveira ve ark. 2017; Rauha ve ark. 2000).



Şekil 2-7: Öjenolün kimyasal yapısı

Öjenolün *S. mutans*'ın karyojenik özelliklerini azalttığı ve bunun da sıçanlarda diş çürüğü gelişiminde azalmayı sağladığı yapılan in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (J.-S. Xu ve ark. 2013). Diş hekimleri tarafından yapılan ağız ameliyatlarında kullanılan öjenol emdirilmiş cerrahi dikişler, *S. mutans*'ın biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe etmektedir (Carneiro ve ark. 2019). Çalışmalar ayrıca, öjenolün, antimikrobiyal ilaçların *S. mutans*'a karşı etkinliğini artırabildiğini, yani sinerjist bir etkileşim oluşturduğunu göstermektedir (Jafri ve ark. 2020). Öjenol içeren diş macunlarının, *S. mutans* da dahil olmak üzere ağızdaki patojenlere karşı etkinlik göstermesi, öjenolün ağız bakım ürünlerindeki potansiyel kullanımını desteklemektedir (Tjandrawinata ve ark. 2019).

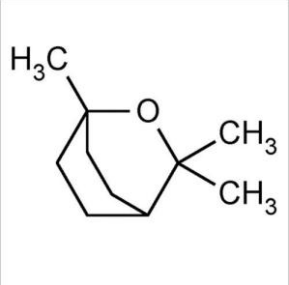
Öjenol, iltihaplanma yanıtında yer alan pro-inflamatuar sitokinleri ve enzimleri inhibe ederek anti-inflamatuar etki sergilemektedir. Ayrıca merkezi ve periferik sinir sistemi ile kardiyovasküler sistem içinde, aksiyon potansiyelleri biçiminde bilgi üretmek ve iletmekten sorumlu bir iyon kanalı olan voltaj kapılı sodyum kanallarını bloke ederek lokal anestezik görevi de görebilmektedir (da Silva ve ark. 2018; de Cássia da Silveira E Sá ve ark. 2017). Serbest radikalleri temizleyerek ve antioksidan enzimlerin aktivitesini artırarak bir antioksidan görevi görmesinin yanı sıra bu özellikleriyle, oksidatif strese bağlı hastalıklara karşı potansiyel koruyucu etkileri de bulunmaktadır (Austin ve Sunila 2009). Öjenolün ayrıca kanser hücrelerinde çoğalmayı engelleme ve apoptozu tetikleme konusunda yürütülen çalışmaları bulunmaktadır. Etki mekanizması olarak kanser hücrelerinin yayılımında rol oynayan çeşitli moleküler yolakları modüle ettiği; meme, prostat ve cilt kanserleri gibi çeşitli kanser türlerinde gösterilmiştir (Zari ve ark. 2021).

Öjenol, gıda katkı maddesi olarak küçük miktarlarda veya topikal uygulamalarda kullanıldığında genellikle güvenli kabul edilmekle birlikte, yüksek konsantrasyonda veya uzun süreli maruziyette bazı kişilerde ciltte tahrişe ve alerjik reaksiyonlara neden olabildiği gösterilmiştir (Api ve ark. 2016).

2.4.2.4. Ökaliptöl

Kimyasal yapısı Şekil 2-9'da gösterilen ve 1,8-sineol olarak da bilinen ökaliptöl, çeşitli okaliptüs türlerinden elde edilen uçucu yağların önemli bir bileşenidir. Hoş aromasıyla bilinir ve tıp alanında da kullanılan oldukça önemli farmakolojik özelliklere sahiptir. Solunum sağlığı üzerindeki yararlı etkileri nedeniyle yaygın olarak kullanılan ökaliptöl, mukusu gevşetmeye ve hava akışını iyileştirmeye yardımcı olan mukolitik bir madde görevi görmektedir. Bu nedenle öksürük şuruplarında, boğaz pastillerinde ve inhalasyon preparatlarında sıklıkla kullanılmaktadır. Araştırmalar, ökaliptolün anti-inflamatuar özelliklere sahip olduğunu ve bunun astım, bronşit ve artrit gibi inflamatuar hastalıkların tedavisinde faydalı olabileceğini göstermektedir (Cai ve ark. 2021; F. A. Santos ve Rao 2000). Ayrıca bakteri, mantar ve virüslere karşı antimikrobiyal aktivite sergilediği de bilinmekte ve hafif analjezik özelliklere sahip olması sebebiyle bazı topikal ağrı giderici ürünlerde kullanılmaktadır (Zheng ve ark. 2019). Düz kas gevşetici ve antiinflamatuar etkileri nedeniyle gastrointestinal bozukluklardaki potansiyelleri de araştırılmaktadır (Barbosa ve ark. 2016).

Ökaliptölün hem bakterilerin birbirleriyle haberleşme yolu olan QS sinyalleri hem de biyofilm oluşumunu bozarak spesifik bakteriyel reseptörleri bozduğu, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca *E. coli* ve *S. aureus*'un morfolojilerinde bozulmalara yol açarak hücre ölümlerine sebep olmaktadır. Sahip olduğu hidrofobik yapının, lipopolisakkarit membrana sahip bakterilere karşı antimikrobiyal etkinliğinin sebebi olabileceği düşünülmektedir (L. Li ve ark. 2014; Sybiya Vasantha Packiavathy ve ark. 2012).



Şekil 2-8: Ökaliptölün kimyasal yapısı

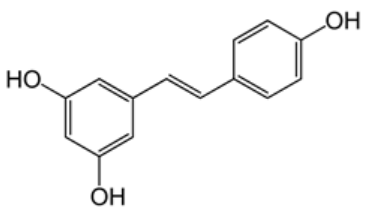
Ökaliptöl içeren okaliptüs yağının antibakteriyel özellikleri, *S. mutans* ve *E. faecalis*'e karşı araştırılmış ve önemli inhibitör etkiler gözlemlenmiştir (Balhaddad ve AlSheikh 2023). Ökaliptöl, diğer doğal preparatlarla birleştirildiğinde potansiyel sinerjistik etkiler göstererek *S. mutans*'a karşı da antibakteriyel aktivitede artış sağlamıştır (Alexa ve ark. 2019). Ökaliptölün antibakteriyel mekanizmasının, bakteri hücre zarını parçalaması ve bu şekilde hücre lizisi ile ölümüne sebep olması olduğu düşünülmektedir (Banavar Ravi ve ark. 2017).

2.4.2.5. Resveratrol

Yapısı Şekil 2-10'da gösterilen resveratrol; üzüm, çilek ve yer fıstığı dahil olmak üzere çeşitli bitkilerde bulunan doğal bir polifenolik bileşiktir. Resveratrol güçlü bir antioksidan özellik göstermekte olup serbest radikalleri temizleme ve yaşlanma karşıtı etkisinin yanı sıra çeşitli kronik hastalıklara yol açan oksidatif stresin azaltılmasında da etkilidir (Xia ve ark. 2017). Resveratrolün sağlık üzerindeki potansiyel yararları, özellikle de antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri nedeniyle günümüzde büyük ilgi görmektedir. Resveratrol sadece inflamasyona sebep olan

yolakların ekspresyonunu inhibe etmekle kalmayıp ayrıca kan basıncını düşürmek, endotel fonksiyonlarını iyileştirmek ve trombosit agregasyonunu engellemek dahil olmak üzere kardiyovasküler hastalıklara karşı da potansiyel koruyucu etkilere sahiptir (Baur ve ark. 2006; Tomé-Carneiro ve ark. 2013).

Resveratrol, *B. cereus* ve *Mycobacterium smegmatis* gibi birçok bakterinin üremesini, 100 µg/mL'nin altındaki konsantrasyonlarda durdurmaktadır. Resveratrolün etki mekanizmaları arasında bakteriyel toksin üretimini azaltmak, biyofilm oluşumunu önlemek, bakteri hareketlerini sınırlamak ve ayrıca QS moleküllerini engellemek yer almaktadır (Vestergaard ve Ingmer 2019).



Şekil 2-9: Resveratrolün kimyasal yapısı

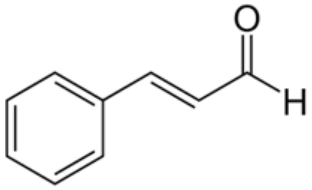
Resveratrolün, *S. mutans*'ın karyojenik virülans özelliklerini etkileyerek, diş çürüğünün gelişimi için çok önemli olan asit oluşumunu ve asidojenitesini azalttığı gösterilmiştir (J. Li ve ark. 2020). Resveratrol, *S. mutans*'ın biyofilm oluşumu için gerekli olan hücre dışı polisakkaritlerinin üretimini de engellemekte olup, EPS üretimindeki bu azalma diş plağı oluşumunu azaltma potansiyeline sahiptir (Wu ve ark. 2020).

Bilişsel işlevin arttırılması, Alzheimer ve Parkinson hastalıkları gibi nörodejeneratif hastalıklara karşı koruma dahil olmak üzere potansiyel nöroprotektif etkiler gösterdiği bilinen resveratrol ayrıca, tümör hücrelerinde karsinojenezin inhibisyonu ve apoptozun teşviki dahil olmak üzere çeşitli mekanizmalar yoluyla kanserin başlamasını ve ilerlemesini önleme potansiyeli açısından da araştırılmaktadır (Athar ve ark. 2007; Cui ve ark. 2010; Vingtdeux ve ark. 2010; Walle 2011).

2.4.2.6. Sinnamaldehit

Sinnamaldehit, Şekil 2-11'de görüldüğü gibi C_9H_8O formülüne sahip organik bir bileşiktir. Doğal olarak trans izomer halinde bulunur ve tarçına kendine özgü lezzetini ve kokusunu verir. Sıklıkla şeker ve kurabiye gibi gıdalarda tatlandırıcı ve parfümlerde koku verici olarak kullanılmaktadır. Ayrıca glikoz ve lipit homeostazisini iyileştirme potansiyeline sahip olduğundan diyabet ve kardiyovasküler sağlığın düzenlenmesinde de faydalı olduğu gösterilmiştir (M. Silva ve ark. 2020; Usai ve Di Sotto 2023).

Tarçın yağının önemli bir bileşeni olan sinnamaldehit, çeşitli bakteri ve mantarlara karşı antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. *E. coli, S. aureus,* Salmonella spp. ve Bacillus spp. gibi patojenlere karşı antibakteriyel ve antifungal özelliklerini, hücre zarlarının yapısını bozmak ve metabolik süreçleri engellemek suretiyle göstermektedir (Pereira ve ark. 2021; Usai ve Di Sotto 2023). Özellikle *P. aeruginosa* gibi çoklu ilaca dirençli bakterilere karşı da etkili olduğu gösterilmiştir (Utchariyakiat ve ark. 2016).



Şekil 2-10: Sinnamaldehitin kimyasal yapısı

Sinnamaldehitin, diş sağlığı açısından önemli olan *S. mutans* gibi patojenlerin biyofilm oluşumunu engellediği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (He ve ark. 2019; M. F. da Silva ve ark. 2024). *S. mutans*'ın hücre zarını bozmakta ve biyofilm oluşumu için hayati önem taşıyan enzimler olan glukozil transferazların aktivitesini engellemektedir (Q. Zhang ve ark. 2021). Sinnamaldehitin florür ve klorheksidin gibi diğer antimikrobiyal maddelerle kombinasyonlarının, *S. mutans*'a karşı arttırılmış antibakteriyel etkiler gösterdiği de, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Kamarehei ve ark. 2022).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Maya Suşları

Çalışmamızda kullanılmak üzere diş çürüklerinden izole edilmiş beş adet klinik *S. mutans* suşu, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Temel Tıp Bilimleri Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Laboratuvarında bulunan -80°C'lik derin dondurucuda saklanan kültür koleksiyonundan; özofagus ve balgam örneklerinden izole edilmiş iki adet klinik *C. albicans* suşu ise, Florence Nightingale Hastanesi Mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiştir. Bakteri suşlarının identifikasyonu, Gram boyama ve koloni morfolojisi incelemesinin ardından MALDI-TOF/TOF Kütle Spektrofotometresi ile, maya identifikasyonu ise Gram Boyama ve Analytical Profil Index (API)® 20C (BioMérieux, France) kiti ile gerçekleştirilmiştir. Standart suş olarak *S. mutans* Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu (ATCC) 25175 ve *C. albicans* ATCC 10231 suşları ile antibiyotik duyarlılık testlerinin validasyonu amacıyla Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI) tarafından önerilen *E. coli* ATCC 25922 suşu kullanılmıştır.

3.2. Çalışmada Kullanılan Antimikrobiyal Maddeler

3.2.1. Borlu Bileşikler

Toz halindeki borik asit ve sodyum borat tuzları (Tekkim), en yüksek konsantrasyonları sırasıyla 40.000 µg/ml ve 80.000 µg/ml olacak şekilde tartılmış ve distile su içerisinde çözdürülmüştür. Stok çözeltiler her deney için günlük olarak hazırlanmış ve gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır.

3.2.2. Doğal Maddeler

Çözücüleri Tablo 3-1'de belirtilen askorbik asit (Sigma), çay ağacı yağı (Sigma), *Centella asiatica* (Gotu Kola) ekstresi (Sigma), epigallokateşin gallat (Sigma), mentol (Sigma), öjanol (Sigma), ökaliptöl (Sigma), resveratrol (Sigma), sinnamaldehit (Sigma), sitrik asit (Biomatik) ve timol (Sigma) en yüksek konsantrasyonları 10.000 µg/mL olacak şekilde hazırlanan stok çözeltilerinden gerekli seyreltmeler yapılarak kullanılmıştır. Tüm maddeler deneylerde kullanılmak üzere uygun çözücüleriyle günlük olarak hazırlanmıştır.

Tablo 3-1: Çalışmada kullanılan maddeler ve çözücüleri

Maddenin Adı	Formu	Çözücüsü
Askorbik Asit	Toz	FTS
Çay Ağacı Yağı	Sıvı	DMSO
Centella asiatica ekstresi	Toz	DMSO
Epigallokateşin gallat	Toz	FTS
Mentol	Kristal	DMSO
Öjanol	Sıvı	DMSO
Ökaliptöl	Sıvı	DMSO
Resveratrol	Toz	DMSO
Sinnamaldehit	Sıvı	DMSO
Sitrik Asit	Toz	FTS
Timol	Kristal	DMSO

FTS: Fizyolojik Tuzlu Su, DMSO: Dimetil sülfoksit

3.2.3. Antibiyotikler ve Antifungaller

Çalışmanın standardizasyonu için kullanılan antibiyotik ile antifungal olan ve toz halinde bulunan Sefotaksim (aktivitesi %99) Sanofi'den, Vorikonazol (aktivitesi %98) ise Sandoz İlaç'dan temin edilmiştir. Antimikrobiyal maddelerin stok çözeltilerini hazırlamak için gereken miktarları, aşağıda gösterilen formül kullanılarak hesaplanmış, hassas terazi ile tartılarak distile su içerisinde çözündürülmüş ve stok çözeltiler elde edilmiştir. Sırasıyla 1280 ve 640 µg/mL olarak hazırlanan stok çözeltiler üç ay boyunca -20°C'de saklanmıştır.

$$\text{Tartılan antimikrobiyal maddenin miktarı (mg)} = \frac{\text{Çözücünün hacmi (mL) x İstenen konsantrasyon (µg/mL)}}{\text{Antimikrobiyal maddenin aktivitesi (µg/mL)}}$$

3.3. Çalışmada Kullanılan Hücre Hattı

Çalışmada İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı hücre hattı koleksiyonunda bulunan ve -152°C'lik derin dondurucuda saklanan İnsan Gingival Fibroblast Hücreleri (Human Gingival Fibroblast, HGF-2) ATCC PCS-201-018 kullanılmıştır.

3.4. Çalışmada Kullanılan Besiyerleri

Çalışmada kullanıma hazır petriler halinde satın alınan %5 Koyun Kanlı Agar, Mitis Salivarus Agar (M-S Agar), Katyon İlaveli Mueller Hinton Buyyonu (KİMHB), %5 lize edilmiş at kanı içeren KİMHB (KİMHB-LEAK), Sabouraud Dextrose Agar (SDA), Morfolino Propan Sulfonik Asit (MOPS) ile tamponlanmış Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 besiyeri, Fetal Bovine Serum (FBS) ve antibiyotik ilaveli Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), CHROMagar Candida ve Brain Heart Infusion (BHI) Buyyon besiyerleri kullanılmıştır.

3.4.1. Mitis salivarus (M-S) Agar

Toz halinde bulunan M-S Agar'dan (Sigma) 90 gr tartılıp 1000 mL distile su içerisinde çözdürülmüştür. Hazırlanan besiyeri 500 mL hacimdeki cam balonlara paylaştırılmış ve otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından besiyeri yaklaşık 45-50°C'ye soğutulmuş, steril tek kullanımlık petri kutularına 12-15 mL'lik hacimler halinde dağıtılmış ve katılaşmaya bırakılmıştır.

3.4.2. %5 Koyun Kanlı Agar

Çalışmada kullanılan %5 Koyun Kanı ilaveli agarlar (EKBAK), kullanıma hazır, onlu paketler halinde satın alınmış ve raf ömürleri boyunca +4°C'de saklanmıştır.

3.4.3. Katyon İlaveli Mueller Hinton Buyyon (KİMHB) / KİMHB-LEAK

Toz halinde bulunan MHB'den (Oxoid) 21 gram tartılıp 1000 mL distile su içerisinde çözdürülmüş, 200 mL hacimdeki Erlen Mayer şişelerine paylaştırılmış ve otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan besiyerlerinin içerisine, Bölüm 3.5.1'de tarif edilen kalsiyum ve magnezyum tuzları, final konsantrasyonları sırasıyla 50 mg/L ve 25 mg/L olacak şekilde ilave edilmiştir.

Streptokokların antimikrobiyal duyarlılık deneylerinde kullanılmak üzere steril edilen KİMHB besiyerinin içerisine, son konsantrasyonu %5 olacak şekilde lize edilmiş at kanı (Liofilchem) ilave edilerek KİMHB-LEAK hazırlanmıştır.

3.4.4. Sabouraud Dextrose Agar (SDA)

Toz halinde bulunan SDA'dan (Merck) 47 gram tartılıp 1000 mL distile su içerisinde çözdürülmüş, 200 mL hacimdeki Erlen Mayer şişelerine paylaştırılmış ve otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika steril edilmiştir. Sterilizasyon işleminin ardından besiyeri yaklaşık 45-50°C'ye soğutulmuş, steril tek kullanımlık petri kutularına 12-15 mL'lik hacimler halinde dağıtılmış ve katılaşmaya bırakılmıştır.

3.4.5. RPMI 1640

Toz halinde bulunan RPMI 1640 (Capricorn) besiyerinden 5,23 gram tartılıp 500 mL'lik distile su ile çözdürülmüş ve üzerine pH'ın 7.0 olması amacıyla MOPS (NZYTech) tamponundan 5 gram ilave edilmiştir. Elde edilen çözeltinin pH'ının kontrol edilmesinin ardından sterilizasyon amacıyla 0.22 µm çapındaki filtreden (Isolab) geçirilmiş ve 50 mL'lik steril tüplere pay edilerek +4°C'de saklanmıştır.

3.4.6. DMEM

Hazır olarak satın alınan steril DMEM (ATCC-30-2002) besiyerine, son konsantrasyonları sırasıyla; mililitre başına 10.000 ünite penisilin, 10 mg streptomisin sülfat ve 25 µg amfoterisin B olacak şekilde Sigma-Aldrich Kimyasal A.Ş. (St. Louis, MO, USA) kaynaklı reaktifler ve %10 oranında FBS (ATCC-30-2020) eklenerek sitotoksisite deneylerinde kullanılmıştır.

3.4.7. CHROMagar Candida

Toz halinde bulunan CHROMagar Candida (CHROMagar) besiyerinden 47,7 gram tartılarak Cam balonlarda 500 mL distile su içerisinde çözdürülmüş, sterilizasyon amacıyla 100°C'lik su banyosunda 2 saat bekletilmiştir. Kaynatma ile yapılan sterilizasyondan sonra steril tek kullanımlık petri kutularına 12-15 mL'lik hacimlerde dağıtılmış ve katılaşmaya bırakılmıştır.

3.4.8. Brain-Heart Infusion (BHI) Buyyon

Toz halinde bulunan BHI buyyon besiyerinden (Merck) 52 gram tartılarak 1000 mL distile su içerisinde çözdürülmüş ve 200 mL'lik Erlenmayer şişelerine pay

edildikten sonra otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika steril edilmiştir.

3.5. Çalışmada Kullanılan Çözeltiler

3.5.1. Kalsiyum Klorür ve Magnezyum Klorür Tuzları

Katyon ilavesi amacıyla kullanılan Kalsiyum klorür ($CaCl_2.2H_2O$, Alfasol) ve Magnezyum klorürün ($MgCl_2.6H_2O$, Kimyalab) distile su içerisindeki 10 mg/mL'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiş ve besiyeri içerisindeki son konsantrasyonları kalsiyum için 50 mg/L, magnezyum için ise 25 mg/L olacak şekilde eklenmişlerdir.

3.5.2. Fizyolojik Tuzlu Su (FTS)

Toz halindeki sodyum klorür (NaCl)'den (Kimyalab) 8,5 gram tartılıp 1000 mL distile suda çözdürülmüş ve cam şişeler içerisine konularak otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika boyunca steril edilmiştir.

3.5.3. (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT)

Toz halindeki MTT'den (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide) (Sigma-Aldrich) 5 mg tartılarak 1 mL steril distile su içerisinde çözdürülmüş ve üzerine eklenen 9 ml FTS ile seyreltilerek kullanıma hazır hale getirilmiştir.

3.5.4. Resazurin

Toz halindeki Resazurin sodyum tuzundan (Sigma-Aldrich) 5 mg tartılarak 10 mL distile su içerisinde çözdürülmüş ve 0,22 µm'lik filtrelerden geçirilerek steril edilmiştir. Kullanılacağı zaman bu stok çözelti, 1/5 oranında sulandırılarak mikroplaklara kuyucuk başına 25 µL olacak şekilde ilave edilmiştir.

3.5.5. Metanol

Sıvı haldeki metanol (Merck), üreticisinden hazır olarak alınmış ve deneylerde direkt olarak kullanılmıştır.

3.5.6. Kristal Viyole

Sıvı haldeki kristal viyole (Merck), üreticisinden hazır olarak alınmış, deneylerde kullanılmak üzere 1 ml kristal viyole, 99 ml distile su içerisine katılarak %1'lik çözelti elde edilmiş ve deneylerde kullanılmak üzere buzdolabında saklanmıştır.

3.6. Çalışmada Kullanılan Diğer Malzemeler

Çalışmada U ve düz tabanlı steril mikroplaklar (NEST), steril tek kullanımlık petri kutuları (NEST), 15 mL ve 50 mL'lik tek kullanımlık steril polipropilen tüpler (LP ITALIANA), tek kullanımlık steril özeler (LP Italiana), 0,22 µm gözenek çaplı membran filtre (NEST) ve 1,5 mL'lik reaksiyon tüpleri (Eppendorf) kullanılmıştır. Ayrıca, tek kanallı ve sekiz kanallı otomatik pipetler (Axygen) ile steril edilebilen uygun pipet uçları (NEST) kullanılmıştır.

3.7. Çalışmada Kullanılan Bakteri ve Maya İnokulumlarının Hazırlanması

Deneylerde kullanılan *S. mutans* suşlarının -80°C'de saklanan kültürlerinden kanlı agar besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmış ve 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Oluşan kolonilerden bir öze dolusu alınmış, 3-5 mL'lik BHI buyyon içerisine inokule edilmiş ve 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Fakültatif anaerop olmaları sebebi ile tüpün dibinde oluşan kültürden öze yardımıyla kanlı agara pasaj yapılmış ve 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Oluşan tek düşmüş kolonilerden birkaç tanesi öze yardımı ile MHB'ye inoküle edilmiş, McFarland cihazında (Biosan DEN1) ölçülen 0,5 bulanıklık değerinde, yaklaşık $1x10^8$ koloni oluşturan birim (kob)/mL'lik bakteri süspansiyonu elde edilmiştir. CLSI'ın önerileri doğrultusunda, antimikrobiyal duyarlılık testlerinde kullanılmak üzere MHB besiyeri ile gerekli seyreltmeler yapılarak son konsantrasyon $5x10^5$ kob/mL olacak şekilde Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerlerinin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon deneylerinde kullanılmıştır. Süspansiyondaki bakteri sayısının tespiti amacıyla 1/10'luk yeterli seyreltmeler yapılmış ve kanlı agara 100 µL inokulüm yayılarak 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübe edilmiştir. Ertesi gün oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörleri ile çarpılarak canlı bakteri sayısı hesaplanmıştır. Biyofilm deneylerinde ise bakterilerin $1x10^7$ kob/mL'lik süspansiyonları kullanılmıştır.

C. albicans suşları için, -80°C'de saklanan kültürden SDA besiyerine azaltma yöntemi ile ekim yapılmış, 25°C'de 24-48 saatlik inkübasyonun ardından tek düşmüş kolonilerden öze ile alınarak 2-3 mL RPMI besiyeri içerisine inoküle edilmiş ve McFarland cihazı (Biosan DEN1) ile 0.7-1.0 arasında ölçülen bulanıklık ile yaklaşık $1x10^7$ kob/mL'lik maya süspansiyonu elde edilmiştir. CLSI önerileri doğrultusunda, mikrodilüsyon deneylerindeki son konsantrasyon olan $5x10^3$ kob/mL yoğunluğa

ulaşmak için RPMI besiyeri ile gerekli seyreltmeler yapılmıştır. Hazırlanan inokulumdaki maya sayısının tespit edilmesi amacıyla FTS ile 1/10 oranında seyreltmeler yapılmış, SDA besiyerine 100 µL inokulum yayılmış ve 24-48 saatlik inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılıp seyreltme faktörleri de göz önünde bulundurularak canlı maya sayısı hesaplanmıştır. Biyofilm deneylerinde ise mayaların $1x10^6$ kob/mL'lik süspansiyonları kullanılmıştır.

3.8. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

3.8.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan maddelerin, standart suşlar ile beş adet *S. mutans* ve iki adet *C. albicans* klinik suşuna karşı antimikrobiyal etkinliklerini belirlemek üzere, CLSI'da belirtilen mikrodilüsyon yöntemi esaslarına uygun olarak MİK değerleri tespit edilmiştir (CLSI 2016, CLSI 2000). Bu amaçla antimikrobiyal maddeler, 96 kuyucuklu ve U tabanlı mikroplaklarda bulunan 1 ve 2 numaralı kolonlardaki kuyulara 50'şer µL olacak şekilde tatbik edilmiş, mikroplakların 2 ila 12 numaralı kolonları arasındaki kuyulara bakteriler için KİMHB-LEAK, mayalar için ise RPMI-1640 besiyerinden 50'şer µL ilave edilmiştir. Mikroplaklardaki 2 numaralı kolondaki kuyularda pipetaj yapılarak besiyeri ve maddeler karıştırılmış ve 2 - 11. kuyular arasında çift kat seri dilüsyonlar yapılmıştır. Tüm mikroplaklardaki 12 numaralı kuyular mikroorganizmaların üreme kontrolü olarak kullanılmış, dilüsyona dahil edilmemiştir. Son aşamada mikroplaktaki bütün kuyulara, hazırlanışları Bölüm 3.7'de anlatılan, sırasıyla $1x10^6$ ve $1x10^4$ kob/mL'lik bakteri ve maya süspansiyonlarından 50'şer µL eklenmiş ve kapakları kapatıldıktan sonra buharlaşmayı önlemek için naylon bir kılıf içine yerleştirilmiştir. Bakteriler için 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılan mikroplaklarda bulanıklığının görülmediği kuyu; mayalar için ise 37°C'de 24-48 saat inkübasyon sonunda BioTek Eon Yüksek Performans Mikroplak Spektrofotometresinde 595 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerde üremeyi en az %50 oranında azaltan en son kuyudaki madde miktarı MİK değeri olarak kabul edilmiştir.

Çalışmanın standardizasyonu amacıyla standart antibiyotik ve antifungal olarak kullanılan sefotaksim ve vorikonazolün etkinlikleri, tüm deneylerde sırasıyla *E. coli* ATCC 25922 ve *C. albicans* ATCC 10231 standart suşlarına karşı denenmiş, sonuçların CLSI tarafından bildirilen kalite kontrol limitleri içerisinde bulunması esas alınmıştır.

3.8.2. Kombinasyon Halindeki Antimikrobiyal Etkilerin Belirlenmesi

Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri sonucunda etkili bulunan doğal ürünler ile borlu bileşiklerin kombinasyonlarının, antimikrobiyal etkilerinde meydana gelen değişikliklerin incelenmesi amacıyla mikrodilüsyon checkerboard (dama tahtası) yöntemi kullanılmıştır. Bu deneylerde, dikey düzlemde borlu bileşikler olan borik asit ve sodyum borat, yatay düzlemde ise etkili bulunan doğal maddeler olan epigallokateşin gallat, resveratrol, ökaliptöl, öjanol, sinnemaldehit ve timolün farklı konsantrasyonlardaki kombinasyonlarının etkileri, standart ve klinik *S. mutans* suşları üzerinde denenmiştir.

Dama tahtası yönteminde, çalışılan maddelerin mikroplaktaki son konsantrasyonları, denenen suşa karşı saptanan MİK değerlerinin iki katından başlayarak, MİK değerinin sekiz kat altına kadar olacak şekilde beş farklı dilüsyondaki çözeltileri hazırlanmıştır. Mikroplaklara dikey olarak uygulanan maddenin en yüksek konsantrasyonu en üst sırada olmak üzere aşağıya doğru azalan konsantrasyonlarda 25'er µL, yatay düzlemde eklenen maddelerin ise en yüksek konsantrasyonları en sağ sütundaki kuyularda olmak üzere, azalan konsantrasyonlarda 25'er µL hacimlerde tatbik edilmiştir. Mikroplakların ilk kolonları ile son satırlarında bulunan ve maddelerin tek başlarına MİK değerlerinin gözlendiği, sadece borlu birleşikler ya da sadece doğal ürünleri içeren kuyulara, hacmi eşitlemek için 25'er µL besiyeri ilave edilmiştir. Son olarak, hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan $1x10^6$ kob/mL'lik bakteri süspansiyonlarından tüm kuyucuklara 50'şer µL eklenmiş, mikroplakların üzeri steril kapağı ile kapatılmış ve buharlaşmayı engellemek için plastik bir poşet içerisinde 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonucunda üreme görülmeyen ve her iki maddenin de en düşük konsantrasyonda bulunduğu kuyular belirlenerek Fraksiyonel İnhibitör Konsantrasyon (FİK) endeksleri hesaplanmıştır. Üremenin gözle net olarak ayırt edilemediği durumlarda kuyulara, hazırlanışı Bölüm 3.5.4.'de belirtilen resazurin çözeltisinden 25'er µL eklenerek 1-2 saat boyunca 37°C'de, %5'lik CO_2'li ortamda bekletildikten sonra görülen pembe renkli kuyular üreme pozitif, mor renkli kuyular ise üreme negatif kabul edilmiştir. Her antimikrobiyal maddenin FİK değeri, üreme görülmeyen kuyudaki en düşük antimikrobiyal madde konsantrasyonunun, o maddenin tek başına aynı suşa karşı aynı mikroplakta saptanan MİK değerine bölünmesi ile elde edilmiştir. FİK indeksi ise, her

iki antimikrobiyal maddeye ait FİK değerlerinin toplanması sonucunda elde edilmiştir (M. J. Hall ve ark. 1983; Eliopoulos, G. ve Moellering Jr., R.C. 1996).

Buna göre;

$$\frac{A}{\text{MİK A}} + \frac{B}{\text{MİK B}} = \text{FİKA} + \text{FİKB} = \text{FİK indeksi}$$

A: A antibiyotiğinin, B antibiyotiği ile kombinasyon halinde üremeyi durdurduğu kuyudaki en düşük konsantrasyonu

MİKA: A antibiyotiğinin tek başına denenen suşa karşı saptanan MİK değeri

FİKA: A antibiyotiğinin fraksiyonel inhibitör konsantrasyonudur.

Aynı tanımlar B, MİKB ve FİKB için de geçerlidir.

Çalışmada elde edilen sonuçlar, FİK indeksleri esas alınarak aşağıdaki şekilde değerlendirilmiştir (Odds, 2003).

- FİK indeksi ≤ 0.5 olan kombinasyonlar sinerjist,

- FİK indeksi > 0,5 - < 4,0 olan kombinasyonlar additif,

- FİK indeksi ≥ 4.0 olan kombinasyonlar antagonist olarak belirlenmiştir.

3.9. Biyofilm Oluşumu

3.9.1. *S. mutans* Biyofilmlerinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılan standart ve klinik suşların biyofilm oluşturma özelliklerini gözlemlemek amacıyla, 24 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikroplaklarına (NEST), BHI buyyon besiyeri içerisinde, hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan bakteri süspansiyonlarından $1x10^7$ kob/mL olacak şekilde 200'er µl ilave edilmiş ve 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, mikroplağa yapışmayan planktonik hücrelerinin uzaklaştırılması amacıyla üst sıvı nazikçe aspire edilmiş ve kuyuların üzerine üçer kez 200'er µL FTS eklenip çekilerek yıkanmıştır. Oluşan biyofilmlerin incelenmesi amacıyla kuyulara 200'er µL metanol ilave edilip biyofilmi fikse etmek amacıyla 15 dakika beklenmiş ve metanol çekilerek kuyular havada kurumaya bırakılmıştır. Ardından biyofilm kütlesini boyamak amacıyla hazırlanışı Bölüm 3.5.6'da açıklanan %1'lik kristal viyole çözeltisinden 200 µL ilave edilerek 5 dakika boyunca beklenmiş, kuyular ikişer kere 200'er µL FTS ile yıkanmış

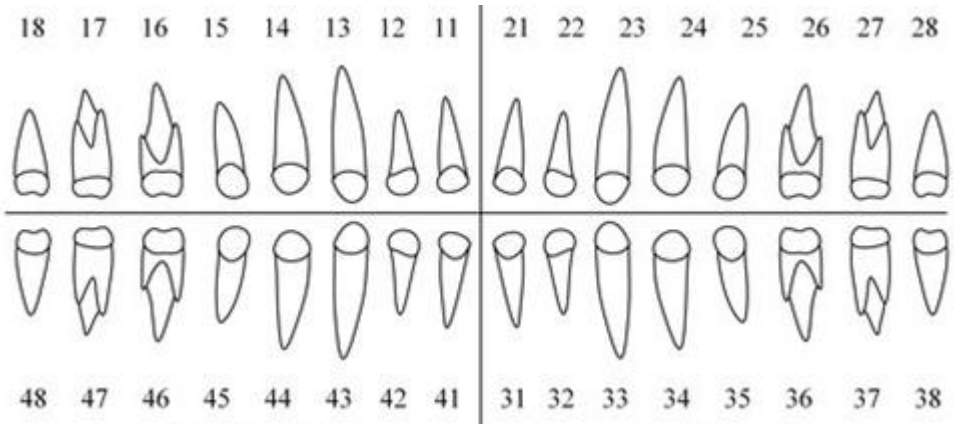
ve %95 etanol (ISOLAB) ilave edilerek 30 dakika boyunca çalkalayıcıda tutulmuştur. Plakların 570 nm dalga boyunda optik dansite ölçümleri yapılmış, biyofilm oluşturduğu bilinen *S. mutans* ATCC 25175 suşu ile kıyaslanarak, çalışılan klinik suşların biyofilm oluşturup oluşturmadığı belirlenmiştir (Dosler ve Karaaslan, 2014).

3.9.2. *C. albicans* Biyofilmlerinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılan standart ve klinik suşların biyofilm oluşturma özelliklerini gözlemlemek amacıyla 24 kuyulu düz tabanlı hücre kültürü mikroplaklarına, BHI buyyon besiyeri içerisinde, hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan maya süspansiyonlarından $1x10^7$ kob/mL olacak şekilde 200'er µL ilave edilmiş ve 25°C'de, 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmıştır. Ertesi gün, mikroplağa yapışmayan planktonik hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla üst sıvı nazikçe aspire edilmiş ve kuyular üçer kez 200'er µL FTS ile yıkanmıştır. Oluşan biyofilmlerin incelenmesi amacıyla 3.9.1 bölümünde anlatıldığı şekilde metanol ile fiksasyon ve kristal viyole ile boyama işlemleri yapılmıştır.

3.9.3. Miks Biyofilm Oluşturulması

Şekil 3.1'de numaralandırılması görülen diş şeması temel alınarak, deneyde kullanılmak üzere hastalar tarafından kullanılmış şeffaf diş plaklarının on yedi, on sekiz, yirmi altı, yirmi yedi, otuz yedi, otuz sekiz, kırk yedi ve kırk sekiz numaralı azı dişlerine denk gelen kısımları kesilerek ayrılmıştır (H. Li ve ark. 2020). Kesilen parçalar steril distile su içerisinde 15 dakika boyunca sonikasyon cihazında (VEVOR) bekletilerek üzerlerine yapışmış bulunan proteinler ve kirlerden fiziksel olarak arındırılmıştır.



Şekil 3-1: Diş numaralandırma şeması

Sonikasyonun ardından %70'lik alkol ile durulanan şeffaf plak parçaları zarf yöntemi ile kurutma kağıtlarına sarılmış ve cam bir beherin içerisinde otoklavda 121°C'de, 1 atmosfer basınç altında, 15 dakika boyunca steril edilmiştir. Steril pens ile aseptik şartlar altında paketinden çıkartılan bu parçalar, 24 kuyucuklu mikroplaklara, içerisinde birer mL maya, bakteri ya da maya ve bakteri süspansiyonu ($1x10^7$ bakteri ve $1x10^6$ maya) karışımı bulunan kuyulara bırakılmıştır. Şeffaf diş plakları, 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li etüvdeki inkübasyonun ardından planktonik hücrelerin uzaklaştırılması amacıyla FTS ile üç kez yıkanmıştır. Şeffaf diş plakları üzerindeki biyofilm oluşumuna yönelik deney metodu, benzer çalışma bulunmadığından, kaynak alınmaksızın, deneyin gereksinimlerine ve amaçlarına uygun şekilde özgün olarak tasarlanmıştır.

Miks biyofilm oluşumunun gözlemlenmesi amacıyla, biyofilm oluşturulmuş şeffaf diş plakları bulunan 24 kuyucuklu mikroplağın her bir kuyusuna birer mL steril FTS konulmuş, plakların üstü su geçirmez jelatin ile örtülmüş ve 15 dakika boyunca sonikasyona tabi tutularak biyofilm içerisindeki hücrelerin ayrışması sağlandıktan sonra mikroplak çalkalayıcıda (Biosan) 15 dakika karıştırılmıştır. Sonikasyon ve çalkalama işlemlerinin ardından, alınan örneklerde gerekli seyreltmeler yapılarak bakteriler için M-S Agar, mayalar için ise CHROMagar'a akıtma yöntemi ile ekimler yapılmış ve 24 saat boyunca bakterilerin üremesi için 37°C'de %5 CO_2'li ortamda, mayalar için ise 24-48 saat 25°C'deki inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmış ve seyreltme faktörleri de dikkate alınarak canlı bakteri ve maya sayıları ayrı ayrı hesaplanmıştır (Hacioglu ve ark. 2020).

3.10. Biyofilm Oluşumu İnhibisyon Deneyleri

Biyofilm oluşum inhibisyonu deneylerinde amaç, deneyde kullanılan antimikrobiyal maddelerin mikroorganizmalar tarafından oluşturulan biyofilmi, henüz oluşmadan engelleme potansiyellerinin ölçülmesidir. Biyofilm deneyleri BHI buyyon besiyeri ile gerçekleştirilmiştir.

3.10.1. Çalışılan Maddelerin Tek Başına Biyofilm İnhibisyon Deneyleri

Deneyde kullanılan borik asit ve sodyum borat ile antimikrobiyal etkinliği bulunan doğal maddelerden epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün, MİK ve

altındaki konsantrasyonlarının *S. mutans* klinik ve standart suşlarının biyofilm oluşumunu engelleme potansiyelleri ölçülmüştür. Doğal maddeler seçilirken maksimum çözünme verimi alınan ve MİK değerleri en düşük olan maddeler olmalarına dikkat edilmiştir. Bu amaçla tüm maddelerin MİK, MİK/2, MİK/4, MİK/8, MİK/16 ve MİK/32'lik çözeltileri, mikroplaktaki seyrelme de göz önünde bulundurularak istenen konsantrasyonların on katı olacak şekilde ayrı ayrı hazırlanmıştır. Düz tabanlı, 96 kuyucuklu hücre kültürü mikroplaklarında, her maddenin her bir konsantrasyonu için dörder kuyu olmak üzere 20'şer µL madde eklenmiş, üzerlerine, hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan $1x10^6$ kob/mL'lik bakteri inokulumlarından 180'er µL ilave edilmiştir. Mikroplaklar kapakları kapatılıp naylon bir kılıf içerisinde 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li etüvde inkübe edildikten sonra, kuyulardaki sıvı kısım dikkatlice aspire edilmiş, kuyular 200'er µL FTS ile ikişer kez yıkanmış ve üzerlerine hazırlanışı bölüm 3.5.3'te anlatılan MTT çözeltisinden 100'er µL ilave edilmiştir. Üreticinin kullanım talimatları doğrultusunda üç saat boyunca karanlıkta inkübasyona bırakılan mikroplakların her bir kuyusuna 100'er µL DMSO eklenmiş, 20 dakika boyunca mikroplak çalkalayıcıda karıştırıldıktan sonra 570 nm dalga boyunda optik dansite ölçümleri yapılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde, hiçbir antimikrobiyal madde ile muamele edilmemiş kontrol kuyularındaki biyofilm oluşumu %100 kabul edilmiş ve bununla kıyaslanarak her bir maddenin biyofilm engelleme oranları hesaplanmıştır (Dosler ve Karaaslan, 2014).

3.10.2. Kombinasyon Halinde Biyofilm İnhibisyon Deneyleri

Bu deneyler, borlu bileşikler ve deneyde kullanılmak üzere seçilen antimikrobiyal etkili doğal maddelerin birbirleri ile kombinasyon halinde iken biyofilm oluşumunu engelleyici etkinliklerini belirlemek üzere yapılmıştır. Bu amaçla borik asit ve sodyum boratın mikroplaktaki son konsantrasyonları MİK/2 ve MİK/4 olacak şekilde hazırlanan çözeltileri ile doğal maddelerin her birinin uygun çözücüleri içerisinde ve son konsantrasyonları MİK/2, MİK/4, MİK/8 ve MİK/16 olacak şekilde hazırlanan çözeltileri ayrı ayrı kombine edilerek, düz tabanlı, 96 kuyucuklu hücre kültürü mikroplaklarında dörder kuyuya, toplamda 200'er µL olacak şekilde yarı yarıya tatbik edilmiştir. Kontrol grubu olarak borik asit ve sodyum boratın tek başlarına MİK/2 ve MİK/4'lük çözeltilerini içeren kuyular ile hiçbir antimikrobiyal madde ile muamele

edilmemiş, sadece besiyeri içeren kuyular 200'er µL olacak şekilde deneye dahil edilmiştir. Örnek mikroplak düzeni Tablo 3-2'de gösterilmiştir.

Tablo 3-2: Kombinasyon halindeki maddelerle biyofilm inhibisyon deneyi örnek tablosu

BA/2+ ÖK/2	**BA/2+ ÖK/2**	**BA/2+ ÖK/2**	**BA/2+ ÖK/2**	**BA/2+ ÖK/4**	**BA/2+ ÖK/4**	**BA/2+ ÖK/4**	**BA/2+ ÖK/4**	**BA/2+ ÖK/8**	**BA/2+ ÖK/8**	**BA/2+ ÖK/8**	**BA/2+ ÖK/8**
BA/2+ ÖK/16	BA/2+ ÖK/16	BA/2+ ÖK/16	BA/2+ ÖK/16	BA/2	BA/2	BA/2	BA/2	BES	BES	BES	BES
BA/4+ ÖK/2	BA/4+ ÖK/2	BA/4+ ÖK/2	BA/4+ ÖK/2	BA/4+ ÖK/4	BA/4+ ÖK/4	BA/4+ ÖK/4	BA/4+ ÖK/4	BA/4+ ÖK/8	BA/4+ ÖK/8	BA/4+ ÖK/8	BA/4+ ÖK/8
BA/4+ ÖK/16	BA/4+ ÖK/16	BA/4+ ÖK/16	BA/4+ ÖK/16	BA/4	BA/4	BA/4	BA/4	BES	BES	BES	BES

BA: Borik Asit, ÖK: Ökaliptöl, BES: Besiyeri

Antimikrobiyal maddelerin üzerine hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan bakteri inokulumlarından, son konsantrasyon $1x10^6$ kob/mL olacak şekilde, 20'şer µL ilave edilmiş ve 37°C'de, 24 saat boyunca %5'lik CO_2'li ortamda inkübasyon sağlanmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde Bölüm 3.12'de anlatılan MTT yöntemi kullanılmış ve 570 nm dalga boyunda optik dansite ölçümleri yapılarak, biyofilm oluşturması %100 olarak kabul edilen antimikrobiyal eklenmemiş kontrol grubu ile kıyaslanan kombinasyonların biyofilm oluşumunu engelleme oranları hesaplanmıştır (Dosler ve ark. 2016).

Aynı çalışma MİK sonuçlarına göre seçilen *C. albicans* suşları üzerinde de tekrarlanarak kombinasyonların mayalar üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Bu amaçla antimikrobiyallerin tatbik edildiği mikroplaklara, hazırlanışı Bölüm 3.7'de anlatılan maya inokulumundan, son konsantrasyon $1x10^5$ kob/mL olacak şekilde 20'şer µL ilave edilmiş, 25°C'de, 24-48 saat inkübasyonun ardından MTT yöntemi ile sonuçların değerlendirmesi, kontrolle kıyaslanarak gerçekleştirilmiştir.

3.11. Olgun Biyofilm İnhibisyon Deneyleri

Bu deneyler, borlu bileşiklerin ve doğal ürünlerin *S. mutans* ve *C. albicans* suşlarının 24 saatlik olgun biyofilmlerine karşı etkilerinin incelenmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanışı 3.9 bölümünde anlatılan 24 saatlik olgun bakteri ya da maya biyofilmleri üzerine, borik asit, sodyum borat ve doğal maddelerin uygun çözücüleri ile hazırlanan, MİK ile 32xMİK arasında değişen konsantrasyonlardaki çözeltilerinden her kuyuya 200'er µL ilave edilmiş ve bakteriler 37°C'de, %5'lik CO_2'li etüvde 24 saat boyunca, mayalar ise 25°C'de 24-48 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyonun ardından üst sıvılar nazikçe çekilmiş, 200'er µL FTS ile üç kez yıkama ve hücrelerin birbirinden ve yüzeyden ayrılması amacıyla 15 dakikalık sonikasyondan sonra, hayatta kalan mikroorganizmaların tespit edilmesi amacıyla Bölüm 3.12'de anlatılan MTT yöntemi uygulanmıştır. Çalışmada kontrol olarak kullanılan kuyulardaki olgun biyofilmler üzerine hiçbir antimikrobiyal madde tatbik edilmemiş, sadece besiyeri eklenmiştir. 570 nm dalga boyunda yapılan ölçümlerin ardından, %100 canlı kaldığı kabul edilen kontrol ile kıyaslanarak çalışılan maddelerin anti-biyofilm etkinlikleri hesaplanmıştır. Deney sonunda kontrole kıyasla biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayısını en az %50 oranında azaltan madde miktarları, olgun biyofilm inhibe edici konsantrasyon olarak değerlendirilmiştir (F. Khan ve ark. 2000).

3.12. Toksisite Deneyleri

Çalışmada kullanılan maddelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla 96 kuyucuklu düz tabanlı hücre kültürü mikroplaklarının her bir kuyusuna, %10 FBS'li DMEM besiyeri içinde hazırlanan ve mL'de $1x10^5$ HGF-2 hücresi bulunan süspansiyondan 100'er µL konulmuştur. Hücreler 37°C'de %5 CO_2'li ortamda 72 saat inkübe edildikten sonra, üzerlerindeki besiyeri uzaklaştırılmış ve kuyulara deneyde kullanılacak maddelerden her birinin 8xMİK- MİK/16 arasındaki çözeltileri eklenmiştir. Mikroplaktaki son iki kolon kontrol grubu olarak belirlenmiş ve sadece besiyeri ilave edilerek 24 saat boyunca 37°C'de %5 CO_2'li ortamda inkübe edilmiştir. Ardından tüm kuyulardaki süspansiyonlar nazikçe aspire edilmiş ve ikişer kez 100'er µL FTS ile yıkanmıştır. Deneyde her madde için üçer kuyucuk kullanılmış, sonuçların hesaplanmasında bu kuyuların ortalama değerleri alınmıştır. Hücrelerin sağ kalımlarının hesaplaması amacıyla kuyucukların her birine, Bölüm 3.12'de anlatılan MTT

çözeltisinden 100'er µL eklenerek 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 3 saat inkübe edilmiştir. 570 nm dalga boyunda okunmuş ve kontrol grubu ile karşılaştırılarak % sitotoksisite değerleri hesaplanmıştır. Bu amaçla kullanılan formül aşağıdaki gibidir;

Sitotoksisite (%) = (A-B)/A x 100

A: hücre kontrol grubunun ortalama OD'si,

B: maddelerin her bir konsantrasyonunun ortalama OD değerleri.

Kontrol grubu ile kıyaslandığında hücrelerin OD değerlerini %50 azaltan doz, %50 sitotoksik doz (CC50) değeri olarak kabul edilmiştir. Bu değerler GraphPad Prism programı aracılığı ile non-lineer regresyon analizi kullanılarak hesaplanmıştır (Andrighetti-Fröhner ve ark. 2003).

3.13. Karışımın Hazırlanması ve Etkilerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan her bir borlu bileşik ve doğal madde için ayrı ayrı ve kombinasyon halinde gerçekleştirilen deneylerin ardından, şeffaf diş plaklarının temizlenmesinde kullanılabilecek, antimikrobiyal ve anti-biyofilm etkinliği bulunan ancak sitotoksik olmayan bir karışımın hazırlanması hedeflenmiştir. Bu aşamada borik asit, daha düşük konsantrasyonlarda etkili olması ve çözünürlüğünün daha yüksek olması sebebiyle karışımda kullanılacak asıl borlu bileşik olarak seçilmiştir. Etkinliği yüksek ve sitotoksisitesi düşük bulunan diğer doğal maddeler olarak seçilen epigallokateşin gallat ve resveratrolün MİK/2 ve MİK/4'lük konsantrasyonları, borik asitle bir araya getirilerek Tablo 3-3'te özetlenen sekiz farklı karışım elde edilmiştir. Toksisite deneyleri sonucunda diğer maddelere göre daha toksik bulunan ökaliptöl ise, sabit tutulduğu MİK/4 değerinde tüm karışımlara ilave edilmiş olup, toksik olan MİK/2 konsantrasyonu ise çalışmada kullanılmamıştır.

Tablo 3-3: Hazırlanan karışımlar ve içerikleri

Karışım 1	BA/2 + RES/2 +EP/2	**Karışım 5**	BA/4 + RES/2 + EP/2
Karışım 2	BA/2 + RES/2 + EP/4	**Karışım 6**	BA/4 + RES/2 + EP/4
Karışım 3	BA/2 + RES/4 + EP/2	**Karışım 7**	BA/4 + RES/4 + EP/2

Karışım 4	BA/2 + RES/4 + EP/4	**Karışım 8**	BA/4 + RES/4 + EP/4

BA: Borik Asit, **RES:** Resveratrol, **EP:** Epigallokateşin gallat ifade etmektedir. Her karışıma ayrıca MİK/4 değerinde ökaliptöl ilave edilmiştir.

3.13.1. En Etkili Karışımın Belirlenmesi

Hazırlanan karışımlardan her birinin, standart ve klinik *S. mutans* suşlarına karşı antimikrobiyal etkinliği, Bölüm 3.8'de anlatılan mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş ve MİK değerlerine göre en düşük konsantrasyonda etki eden karışım, en etkili kombinasyon olarak seçilmiştir.

3.13.2. Karışımın Etkinliklerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal aktivitesine göre seçilen karışım ile biyofilm inhibisyonu, olgun biyofilme etki ve toksisite deneyleri sırasıyla Bölüm 3.10, 3.11 ve 3.12'de anlatıldığı biçimde tekrarlanmıştır. Bu deneylerde kullanılmak üzere karışımın bir adet düşük ve bir adet yüksek konsantrasyonu hazırlanmıştır. Yüksek konsantrasyon, karışımın 32 katı olarak, düşük konsantrasyon ise karışımın MİK değeri olacak şekilde belirlenmiştir.

3.14. Karışım ile Zamana Bağlı Miks Biyofilm Eradikasyon Deneyleri

Önceki deneylerde elde edilen sonuçlara göre hazırlanan en etkili antimikrobiyal madde karışımının, *S. mutans* ve *C. albicans*'ın birlikte oluşturduğu miks biyofilmler üzerindeki etkilerini araştırmak üzere eradikasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, hazırlanan karışım ile şeffaf diş plaklarının üzerinde oluşturulan miks biyofilmler, plakların temizleme çözeltileri ile günlük hayattaki olası temas süreleri boyunca bir arada tutulmuştur. Deneylerde 24 kuyucuklu mikroplakların her bir kuyucuğuna, hazırlanışı Bölüm 3.9.3 kısmında bildirildiği şekilde biyofilm oluşturulmuş şeffaf plaklardan birer adet konmuş ve üzerlerine karışımın yüksek ve düşük dozlarından birer mL eklenmiştir. Mikroplaklar 37°C'de, %5 CO_2'li ortamda 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 24 saat inkübe edildikten sonra kuyulardaki plak parçaları FTS ile üçer kez yıkanmıştır. Ardından içerisinde birer mL steril FTS bulunan 24 kuyucuklu mikroplağın kuyularında, plakların üstü su geçirmez jelatin ile örtülmüş halde 15 dakika boyunca sonikasyona tabi tutularak biyofilm içerisindeki hücrelerin ayrışması sağlanmış ve mikroplak çalkalayıcıda 15 dakika karıştırılmıştır. Her bir

bekleme süresinde kullanılmak üzere ayrı mikroplaklar hazırlanmış olup, kontrol olarak kullanılan biyofilm oluşturulmuş diş plaklarının üzerine sadece besiyeri eklenmiştir. Sonikasyon ve çalkalama işlemlerinin ardından, alınan örneklerde gerekli seyreltmeler yapılarak bakteriler için M-S Agar, mayalar için ise CHROMagar'a akıtma yöntemi ile ekimler yapılmış ve 24 saat boyunca bakteriler için 37°C'de %5 CO_2'li etüvde, mayalar için ise 24-48 saat 25°C'deki inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayılmış, seyreltme faktörleri de dikkate alınarak canlı mikroorganizma sayıları hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar kontrol ile kıyaslanarak hazırlanan karışımın etkinliği belirlenmiştir.

Deneyler tüm bakteriler için üç tekrarlı olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen zamana bağlı öldürme grafikleri, her bir zaman sonunda yapılan sayımlarda tespit edilen canlı mikroorganizma sayılarının ortalamasının Log10 değerleri kullanılarak hazırlanmıştır. Çalışmadaki sayımların tespit edilebilirlik limiti 1-log10 cfu/ml olarak belirlenmiştir. Deney sonunda başlangıç inokulumuna göre en az 3-Log10 azalma gözlenmesi bakterisidal aktivite olarak değerlendirilmiştir (NCCLS 1999).

3.15. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülenmesi

Oluşturulan karışımın şeffaf diş plakları üzerinde oluşturulan biyofilmlere olan etkisinin gözlenmesi amacıyla, Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope, SEM) görüntülemesi, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden (DETAUM) hizmet alımı şeklinde yaptırılmıştır. Çekimlerde, kontrol grubu olarak şeffaf diş plakları üzerinde oluşturulmuş ve hiçbir antimikrobiyal madde ile muamele edilmemmiş olgun miks biyofilm, deney grubu olarak ise hazırlanan yüksek dozlu karışımla 24 saat boyunca muamele edilmiş miks biyofilmler kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Çalışmada Kullanılan Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesine Ait Bulgular

4.1.1. Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Değerlerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan borlu bileşikler ve doğal maddelerin standart suşlar ile kliniklerden izole edilmiş beş adet *S. mutans* ve iki *C. albicans* suşuna karşı antimikrobiyal etkinlikleri, CLSI'da belirtilen mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenmiş ve tespit edilen MİK değerleri Tablo 4-1 ve 4-2'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre askorbik asit, *C. asiatica* ekstratı ve sitrik asit çalışılan mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinlik göstermemiştir. Etkili bulunan diğer maddelerle ilgili olarak gerek etki ettikleri konsantrasyonlar ve gerekse maddelerin çözünebilirlikleri göz önünde bulundurulduğunda, *S. mutans* suşlarına karşı kombinasyon deneylerinde kullanılmak üzere epigallokateşin gallat, öjanol, ökaliptöl, sinnamaldehit, timol ve resveratrol seçilmiştir. Mentol ve ökaliptöl ferahlatıcı amaçla karışıma eklenmek istenmiş olup, benzer MİK değerlerine sahip olsalar da mentolün toksisitesi daha yüksek olarak bilindiğinden çalışmaya ökaliptöl ile devam edilmesine karar verilmiştir (Puig-Herreros ve ark. 2024).

Çalışmanın standardizasyonu amacıyla CLSI tarafından önerilen kalite kontrol suşu olan *E. coli* ATCC 25922 ve *C. albicans* ATCC 10231'e karşı sefotaksim ve vorikonazolün MİK değerleri çalışma boyunca CLSI'nın bildirdiği kalite kontrol sınırları olan sırasıyla ≤ 0.06 ve ≤ 2 µg/mL olarak bulunmuştur (CLSI 2023).

Tablo 4-1: Borlu bileşiklerin ve doğal maddelerin *S. mutans* standart ve klinik suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri

	MİK (µg/mL)	
Maddeler	***S. mutans* ATCC 25175**	***S. mutans* Klinik Suşlar (n=5)**
Borik Asit	2500	1250-5000
Sodyum Borat	4000	4000-8000
Askorbik Asit	>10.000	>10.000
Çay Ağacı Yağı	0.25	0.25-0.5
C. asiatica ekstratı	>10.000	>10.000
Epigallokateşin gallat	156	156-312
Mentol	250	62,5-250
Öjanol	250	62,5-250
Ökaliptöl	125	125-500
Resveratrol	625	312-625
Sinnamaldehit	1250	1250
Sitrik Asit	>10.000	>10.000
Timol	625	625
Sefotaksim	0.125	0.125-0.5

Tablo 4-2: Borlu bileşiklerin ve seçilen doğal maddelerin *C. albicans* standart ve klinik suşlarına karşı elde edilen MİK değerleri

	MİK (µg/mL)	
Maddeler	***C. albicans* ATCC 10231**	***C. albicans Klinik* (n=2)**
Borik Asit	1600	800-1600
Sodyum Borat	1250	625-1250
Epigallokateşin gallat	1500	1500
Ökaliptöl	500	250-500
Resveratrol	>3000	3000
Vorikonazol	1	1

4.1.2. Kombinasyon Halindeki Maddelerin Antimikrobiyal Etkilerinin Belirlenmesi

Antimikrobiyal duyarlılık deneyleri sonucunda etkili bulunan doğal maddeler ile borlu bileşiklerin bir arada gösterdikleri etkiler, mikrodilüsyon checkerboard yöntemi ile belirlenmiş olup, elde edilen sonuçlar Tablo 4-3 ve 4-4'te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre FIK indeksi ≤ 0.5 olan ve sinerjist olarak değerlendirilen kombinasyonların genellikle epigallokateşin gallat, ökaliptol, resveratrol ve sinnamaldehit içeren kombinasyonlar olduğu belirlenmiştir. Ayrıca, borik asit ile yapılan kombinasyonlarda, sodyum borata kıyasla daha fazla sinerjist etki gözlemlenmiş, özellikle borik asit - ökaliptol kombinasyonu ile sinerjist etki elde edilmesine karşılık, aynı etki sodyum borat deneylerinde gözlemlenmemiştir. Çalışmada kullanılan timol ve öjanol ile borlu bileşikler arasında herhangi bir sinerjist etki görülmediğinden, kombinasyon deneylerinin sonuçları doğrultusunda deney planından çıkartılmışlardır. Sinnamaldehit ise, kombinasyon içerisinde sinerjist etki göstermesine rağmen fazla viskoz olması, çözdürülürken yaşanan problemler ve diğer maddelerle homojen şekilde karışmamaları sebebiyle çalışmanın bu aşamasında deney planından çıkartılmıştır. Çalışmada denenen diğer kombinasyonların aditif etkili oldukları görülmüş, hiçbir kombinasyonda antagonist etki saptanmamıştır.

Tablo 4-3: Borik asit ve doğal maddelerin kombinasyon halinde *S. mutans* suşlarına karşı belirlenen FIK indeksleri

	S. mutans ATCC 25175	*S. mutans* Klinik 1	*S. mutans* Klinik 2	*S. mutans* Klinik 3	*S. mutans* Klinik 4	*S. mutans* Klinik 5
Epigallokateşin gallat	1	0,75	0,56	**0,5**	1	1
Öjanol	0,625	1	0,75	0,75	1	1
Ökaliptol	0,625	0,56	**0,5**	**0,5**	0,75	0,56
Resveratrol	0,75	0,75	**0,5**	**0,5**	0,625	0,75
Sinnamaldehit	**0,5**	**0,375**	0,56	0,75	0,56	0,56
Timol	1	1	2	2	1	2

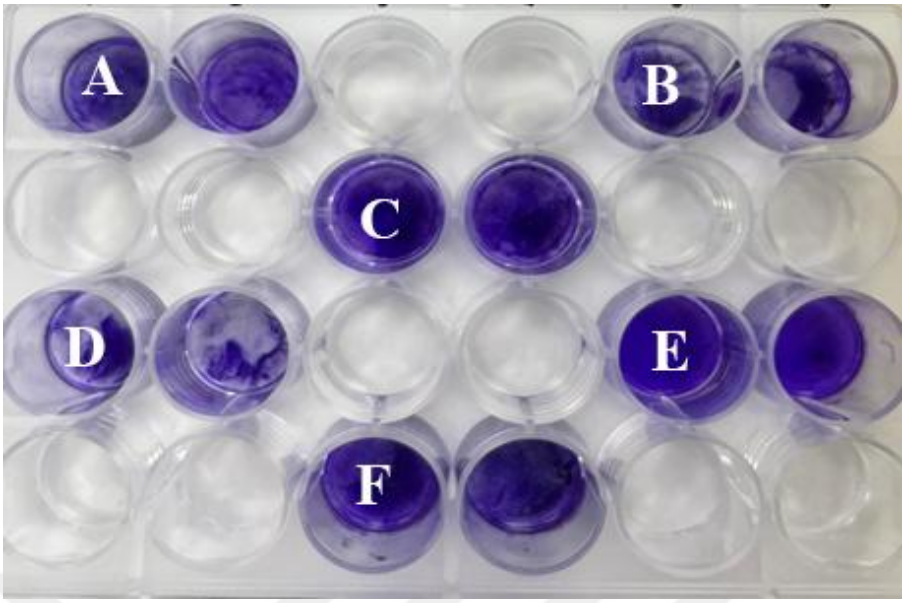
Tablo 4-4: Sodyum borat ve doğal maddelerin kombinasyon halinde *S. mutans* suşlarına karşı belirlenen FIK indeksleri

	S. mutans ATCC 25175	*S. mutans* Klinik 1	*S. mutans* Klinik 2	*S. mutans* Klinik 3	*S. mutans* Klinik 4	*S. mutans* Klinik 5
Epigallokateşin gallat	2	2	1	**0,5**	1	1
Öjanol	1	0,75	0,75	0,625	1	2
Ökaliptol	1	**0,5**	1	**0,5**	0,75	1
Resveratrol	0,75	0,75	**0,5**	**0,5**	0,625	0,75
Sinnamaldehit	**0,5**	**0,375**	0,625	0,75	2	1
Timol	1	1	0,75	0,75	1	1

4.2. Biyofilm Oluşumuna Ait Bulgular

4.2.1. *S. mutans* ve *C. albicans* Biyofilmlerinin Oluşturulması

Çalışmada kullanılan standart ve klinik *S. mutans* ve *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşturma potansiyellerini belirlemek üzere hazırlanan biyofilmlerin, kristal viyole ile boyanarak incelenmesi sonucunda *S. mutans*'a ait standart ve klinik suşların tamamının güçlü şekilde biyofilm oluşturabildiği tespit edilmiştir. Yapılan deneye ait örnek görüntüler Şekil 4-1'de gösterilmiştir. *C. albicans* suşlarının biyofilm oluşumları incelendiğinde ise standart suşun zayıf, iki adet klinik suşun ise güçlü şekilde biyofilm oluşturduğu görülmüştür.



Şekil 4-1: *S. mutans* standart ve klinik suşlarının oluşturdukları biyofilmlerin kristal viyole ile boyanması sonucu elde edilen görüntüler.

A: *S. mutans* ATCC 25175, **B-F:** *S. mutans* klinik suşları

4.2.2. Miks Biyofilmlerin Oluşturulması

Gerçek hayatta diş üzerinde oluşan ve birçok mikroorganizma türü barındıran biyofilmlere örnek teşkil etmek üzere, oral biyofilmlerde en sık izole edilen mikroorganizmalar arasında yer alan *S. mutans* ve *C. albicans* suşları ile miks biyofilmler hazırlanmıştır. Oluşturulan biyofilmde yer alan her iki tür için de ayrı ayrı canlı hücre sayımları yapılarak miks biyofilmin içerisindeki mikroorganizma sayısı ve homojen bir yapıya sahip olup olmadığı belirlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre biyofilmdeki canlı *S. mutans* ve *C. albicans* sayıları sırasıyla $5x10^6$ ve $2x10^6$ kob/mL olarak belirlenmiştir.

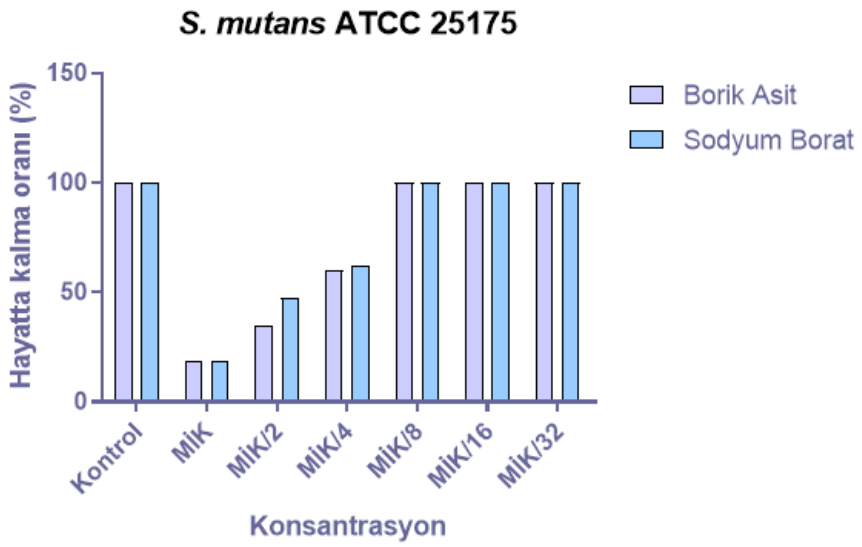
4.3. Biyofilm Oluşumu İnhibisyon Deneylerine ait Bulgular

4.3.1. Çalışılan Maddelerin Tek Başına Biyofilm İnhibisyon Deneyleri

Deneyde kullanılan bor bileşikleri olan borik asit ve sodyum borat ile antimikrobiyal etkili oldukları tespit edilen, ayrıca çözünebilirlik ve viskozite gibi fiziksel özelliklerine göre seçilen doğal maddeler olan epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün MİK ve altındaki konsantrasyonlarının *S. mutans* klinik ve standart suşlarının biyofilm oluşumunu engelleme potansiyelleri belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4-2, 4-3, 4-4, ve 4-5'te özetlenmiştir.

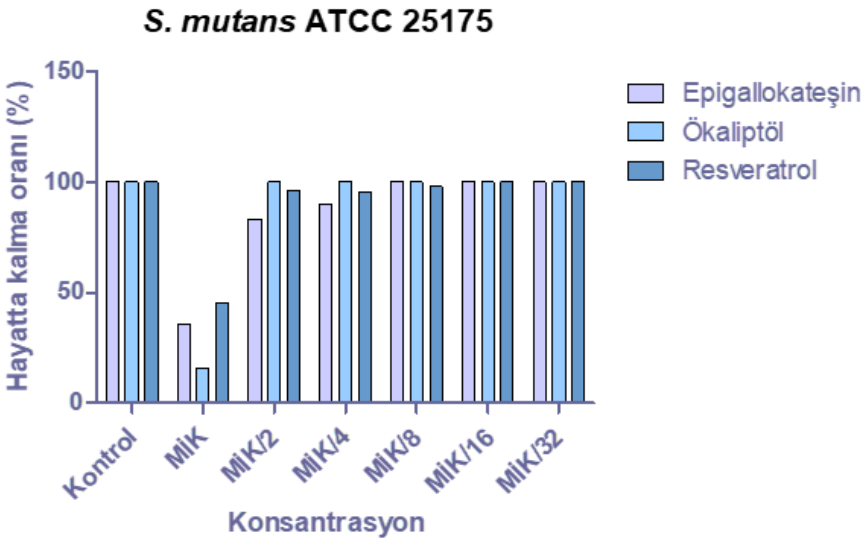
Bu sonuçlara göre *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşiklerin MİK değerlerinin biyofilm oluşumunu engellemekte yeterli olduğu, MİK/2 ve MİK/4'lük sub-MİK konsantrasyonlarında da kontrol ile kıyaslandığında yaklaşık %40-60'lık bir inhibisyon meydana getirdikleri görülmektedir. Ayrıca, doğal bileşiklerin de MİK değerlerinde bakterinin biyofilm oluşumunu yüksek oranda engellediği, özellikle ökaliptölün, seçilen üç madde arasında en fazla etkiye sahip olduğu görülmektedir. Ancak doğal maddelerin sub-MİK konsantrasyonları, standart suşun biyofilm oluşturma özelliğini engellemede yetersiz kalmaktadır.

Benzer şekilde *S. mutans*'ın klinik suşları üzerinde gerçekleştirilen biyofilm inhibisyon deneyi sonuçları da göstermektedir ki, borik asit ve sodyum boratın MİK değerleri biyofilm oluşumunu engellemekte yeterlidir. Bu bileşikler daha düşük konsantrasyonlarda sınırlı bir etki göstermiş olmakla birlikte, borik asitin MİK/4 konsantrasyonunda sodyum borata göre daha etkili olduğu görülmektedir. Doğal ürünlerin klinik suşlar üzerindeki etkilerine bakıldığında, yine MİK değerlerinde biyofilm inhibisyonu gözlemlenmekte, MİK/2 konsantrasyonda ise resveratrolün kontrol grubuna kıyasla %20 oranında bir inhibisyon gösterdiği görülmektedir.



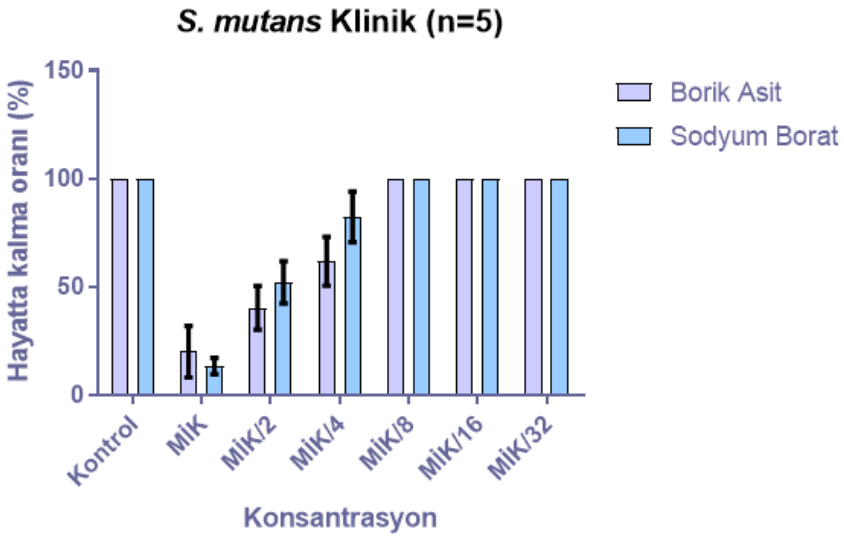
Şekil 4-2: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borik asit ve sodyum boratın biyofilm inhibisyon etkinlikleri

X ekseni: Kullanılan madde konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri ifade etmektedir.



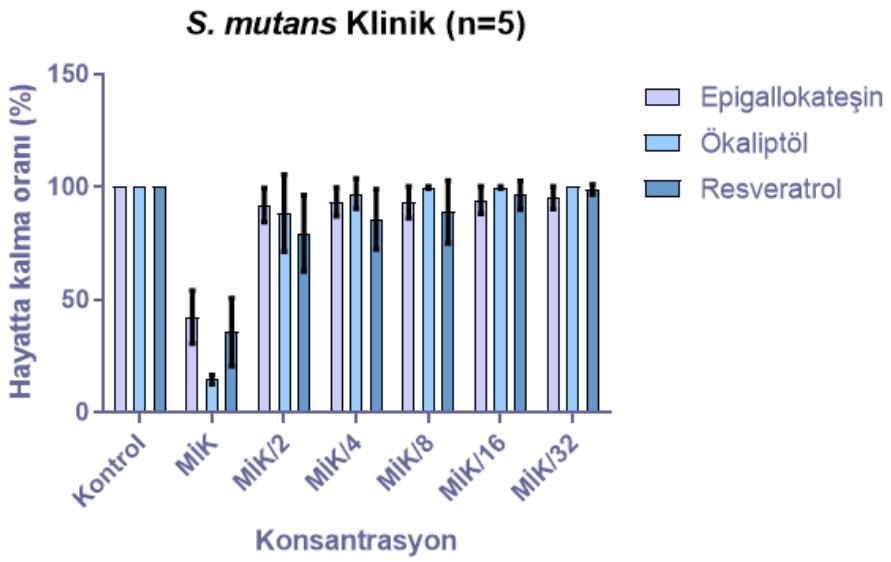
Şekil 4-3: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün biyofilm inhibisyon etkinlikleri

X ekseni: Kullanılan madde konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri ifade etmektedir.



Şekil 4-4: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borik asit ve sodyum boratın biyofilm inhibisyon etkinlikleri

X ekseni: Kullanılan madde konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri ise: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir.



Şekil 4-5: *S. mutans* klinik suşlarına karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün biyofilm inhibisyon etkinlikleri

X ekseni: Kullanılan madde konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri ise: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir.

4.3.2. Kombinasyon Halinde Biyofilm İnhibisyon Deneyleri

Bu deneyler, borlu bileşikler ve deneyde kullanılmak üzere seçilen antimikrobiyal etkili doğal maddelerin kombinasyon halinde biyofilm oluşumunu engelleyici etkinliklerini belirlemek üzere yapılmıştır. Borlu bileşik konsantrasyonları, tek başlarına inhibisyon deneylerinin sonuçları doğrultusunda MİK değerlerinin yarısı ve dörtte biri olacak şekilde seçilmiş olup, borik asit ve sodyum boratın bu konsantrasyonlarda tek başına *S. mutans* suşlarına karşı gösterdiği inhibisyon oranları, MİK/2 konsantrasyonda sırasıyla %55-58 ve %49-50, MİK/4'te ise %25-37 ve %29-34 olarak tespit edilmiştir. *C. albicans* için biyofilm inhibisyonu, kombinasyon deneylerinin sonucunda elde edilen verilere göre belirlenmiş olup borik asit ve sodyum borat için MİK/2'de sırasıyla %56-58 ve %61-63, MİK/4'te ise %36-40 ve %35-39 aralığında bulunmuştur.

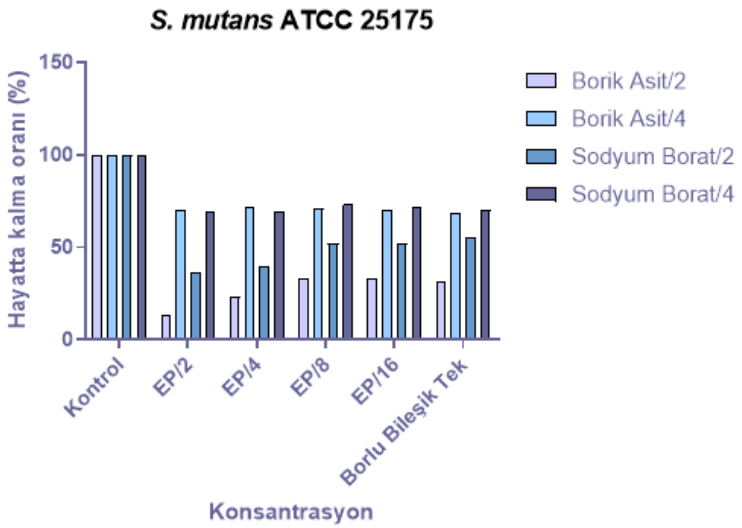
4.3.2.1. Borlu Bileşikler ile Epigallokateşin Gallat Kombinasyonları

Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4 değerlerine denk gelen 1250-625 µg/mL, ve 2000-1000 µg/mL konsantrasyonları ile epigallokateşin gallatın 78-9,6 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarının *S. mutans* ATCC 25175 ve klinik suşlarına karşı elde edilen biyofilm inhibisyon oranları Şekil 4-6 ve 4-7'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre *S. mutans*'ın standart suşuna karşı epigallokateşin gallat ve borlu bileşiklerin bir arada etkileri ile, borlu bileşiklerin tek başına olan etkileri kıyaslandığında, en yüksek inhibisyonun maddelerin MİK/2'lik konsantrasyonlarını barındıran kombinasyonlarda gerçekleştiği gözlemlenmiştir. Bu kombinasyonlar, borik asitin ve sodyum boratın tek başına oluşturduğu inhibisyondan %18-19 daha etkili bulunmuştur.

S. mutans klinik suşları üzerine, epigallokateşin gallatın özellikle MİK/2 oranında eklendiği, borik asit ve sodyum boratın MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarını içeren kombinasyonlar, borlu bileşiklerin tek başlarına oluşturdukları etkinliği %20-26 oranında arttırmıştır. Epigallokateşin gallatın MİK/4 konsantrasyonda eklendiği kombinasyonlarda ise %6-17 oranında etki artışı görülmektedir. Epigallokateşin gallatın Bölüm 4.1.2'de bildirilen kombinasyon sonuçlarında da klinik suşlar üzerinde borik asit ve sodyum boratla sinerjist etki göstermesi, bu sonuçları desteklemektedir.

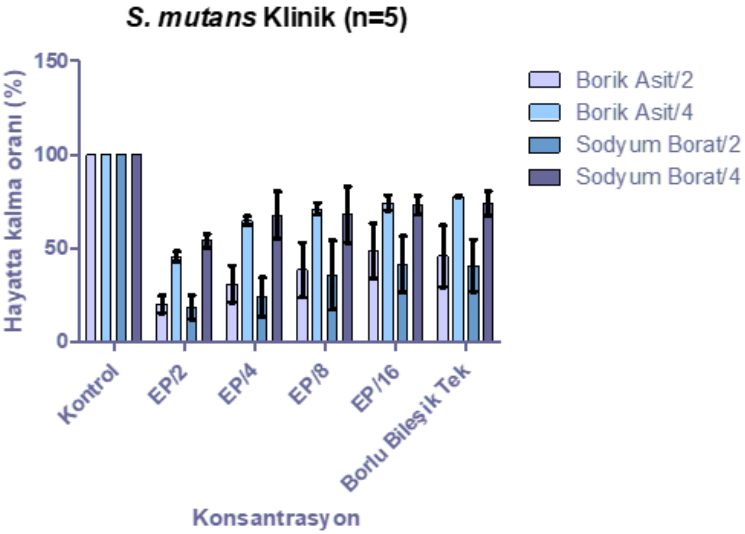
Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4 değerlerine denk gelen 800-400 µg/mL ve 625-312,5 µg/mL, epigallokateşin gallatın ise 750-93,75 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarının *C. albicans* ATCC 10231 ve klinik suşlarına karşı elde edilen biyofilm inhibisyon sonuçları Şekil 4-8 ve 4-9'da özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, *C. albicans* standart suşuna karşı borlu bileşikler ve epigallokateşin gallatın MİK/2'lik konsantrasyonı birlikte kullanıldığında, tek başlarına gösterdikleri etkiden %26 daha fazla inhibisyon meydana getirdikleri gözlenmiştir. Epigallokateşin gallatın MİK/4 değerinde ise bu artış borik asit için MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarında %15-21, sodyum borat için ise %4-15 oranında tespit edilmiştir. *C. albicans*'ın iki klinik suşuna karşı da benzer şekilde borlu bileşiklerin MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonları ile, epigallokateşin gallatın MİK/2 konsantrasyonları birlikte kullanıldığında biyofilm inhibisyon miktarlarının arttığı tespit edilmiştir. Borik asitin MİK/2 ve MİK/4 değerleri, epigallokateşin gallatın MİK/2 ve MİK/4 değerleri ile

kombine edildiğinde borik asitin tek başına kullanımına kıyasla %17-31, sodyum borata kıyasla ise %6-18 daha fazla inhibisyon sağlamıştır.



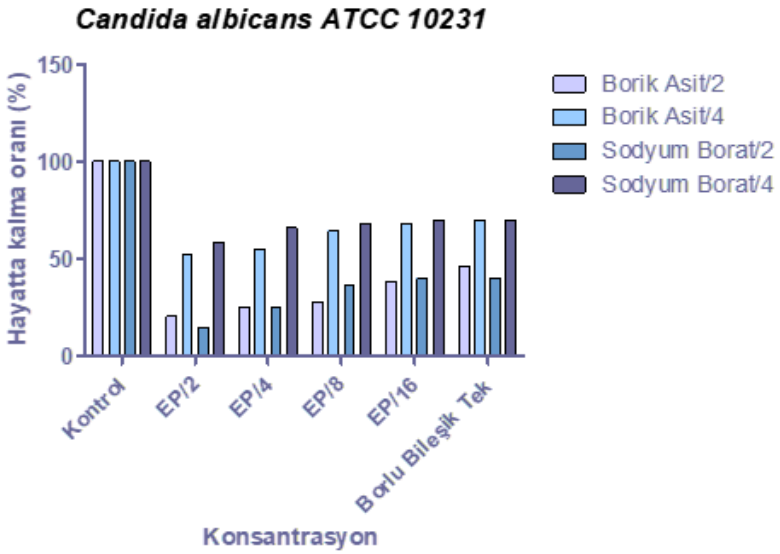
Şekil 4-6: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Epigallokateşin gallat konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



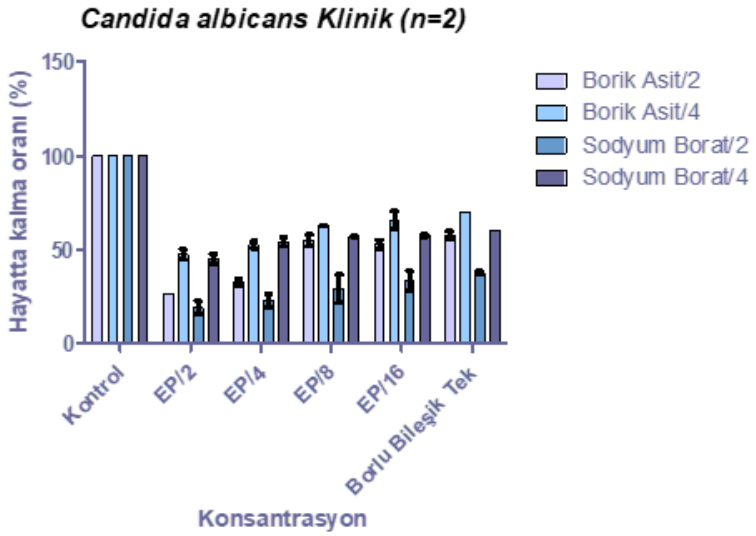
Şekil 4-7: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Epigallokateşin gallat konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



Şekil 4-8: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Epigallokateşin gallat konsantrasyonlarını, Y ekseni: *C. albicans* ATCC 10231'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



Şekil 4-9: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile epigallokateşin gallat kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

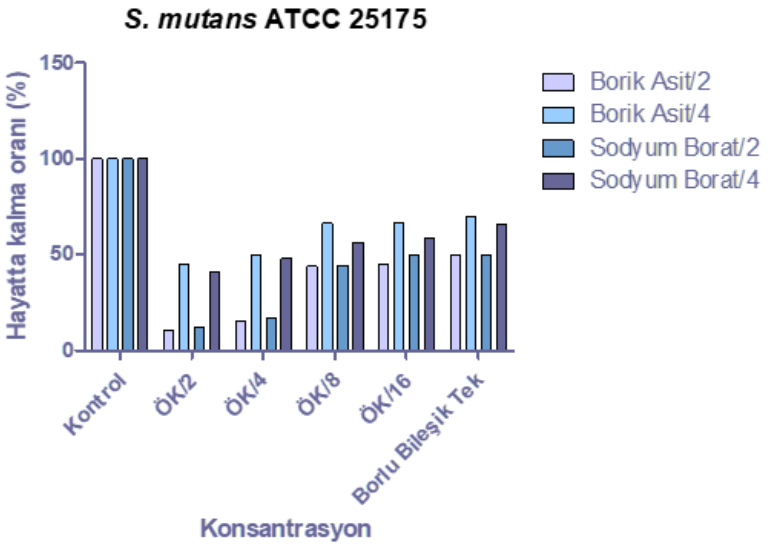
X ekseni: Epigallokateşin gallat konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 2 klinik *C. albicans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Hata çizgileri: klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.

4.3.2.2. Borlu Bileşikler ile Ökaliptol Kombinasyonları

Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4'lük sub-MİK değerlerine denk gelen 1250-625 µg/mL ve 2000-1000 µg/mL ile ökaliptolün 62,5-7,81 µg/mL'lik konsantrasyonları arasındaki kombinasyonlarının *S. mutans* ATCC 25175 ve klinik suşlarına karşı elde edilen biyofilm inhibisyon sonuçları Şekil 4-10, 4-11'de özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, *S. mutans* standart suşuna karşı kullanılan ökaliptöl konsantrasyonları hem borik asit hem de sodyum boratın MİK/2 ve MİK/4'teki biyofilm inhibisyon yeteneğini arttırmaktadır. Borik asitin MİK/2, ökaliptölün MİK/2 ve MİK/4'lük konsantrasyonlarıyla oluşturulan kombinasyonların etkisi, tek başına borik asitin gösterdiği inhibisyondan %35-39, sodyum boratın gösterdiği inhibisyondan ise %33-38 daha fazla etkiliyken, borlu bileşiklerin MİK/4'lük etkisine kıyasla ise yaklaşık %20-25'e varan inhibisyon artışları gözlenmiştir.

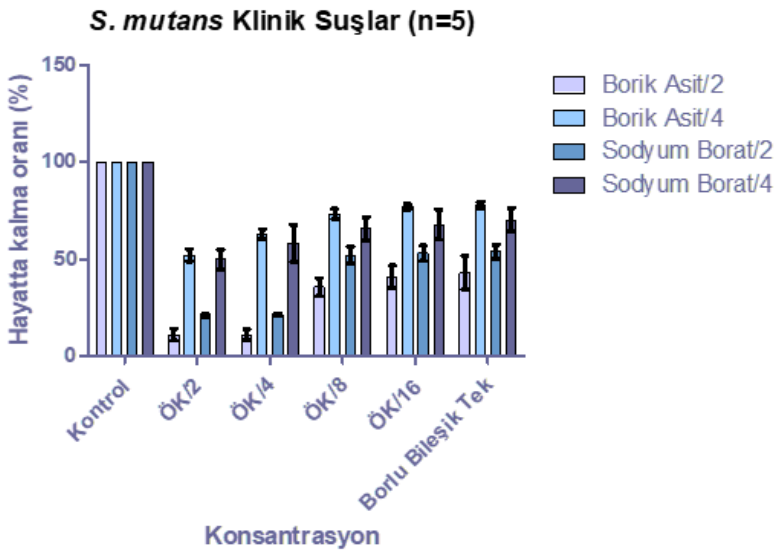
Benzer şekilde klinik suşlara ait sonuçlarda da özellikle borlu bileşiklerin MİK/2 ve ökaliptölün MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarında yapılan tüm kombinasyonların biyofilm inhibisyon etkisini %32-33 oranında arttırdığı, borlu bileşikler MİK/4 oranında kullanıldığında ise artış miktarının ökaliptölün MİK/2 değeri için %20-25, MİK/4 değeri için ise %12-14 kadar ölçüldüğü görülmektedir. Ökaliptölün Bölüm 4.1.2'de bildirilen kombinasyon sonuçlarında da borik asit ve sodyum boratla sinerjist etki göstermesi, bu sonuçları desteklemektedir.

Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4 değerlerine denk gelen 800-400 µg/mL ve 625-312,5 µg/mL ile ökaliptölün 250-31,25 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarının *C. albicans* ATCC 10231 ve klinik suşlarına karşı elde edilen sonuçları Şekil 4-12, 4-13'te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre, *C. albicans* standart suşuna karşı borlu bileşikler ve ökaliptölün tüm kombinasyonları %8-16 aralığında inhibisyon artışı göstermiştir. Benzer şekilde *C. albicans*'ın klinik suşlarına karşı da en yüksek inhibisyon borik asit ve ökaliptölün MİK/2'lik değerlerinde belirlenmiş olup, tüm kombinasyonlarda %10-17 miktarında etki artışı görülmüştür.



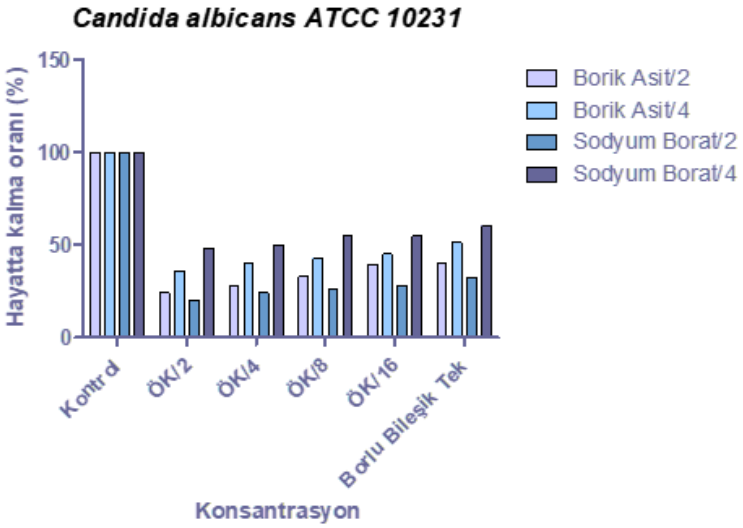
Şekil 4-10: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Ökaliptöl konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



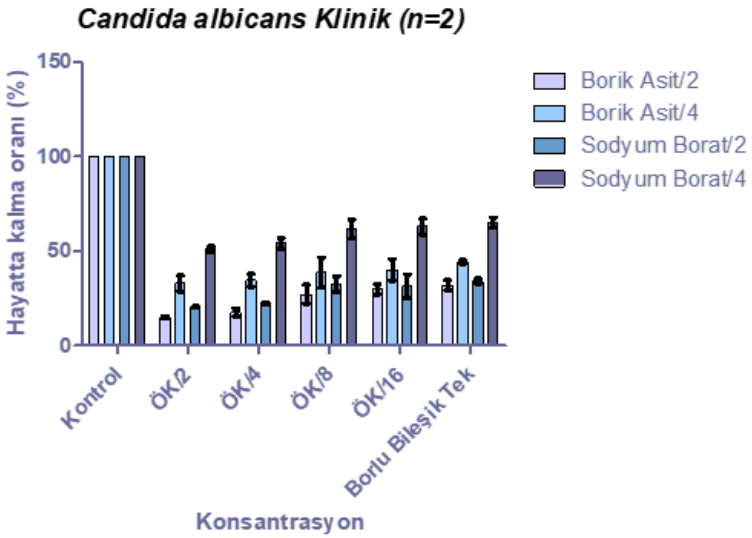
Şekil 4-11*: S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Ökaliptöl konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek Grubu: borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



Şekil 4-12: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Ökaliptöl konsantrasyonlarını, Y ekseni: *C. albicans* ATCC 10231'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Borlu Bileşik Tek grubu: borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



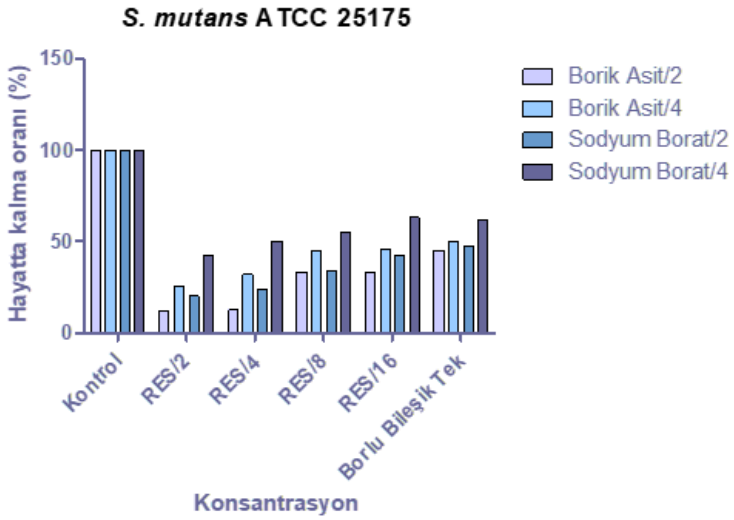
Şekil 4-13: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile ökaliptöl kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: ökaliptöl konsantrasyonlarını, Y ekseni: çalışılan 2 klinik *C. albicans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Hata çizgileri: klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek grubu: borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.

4.3.2.3. Borlu Bileşikler ile Resveratrol Kombinasyonları

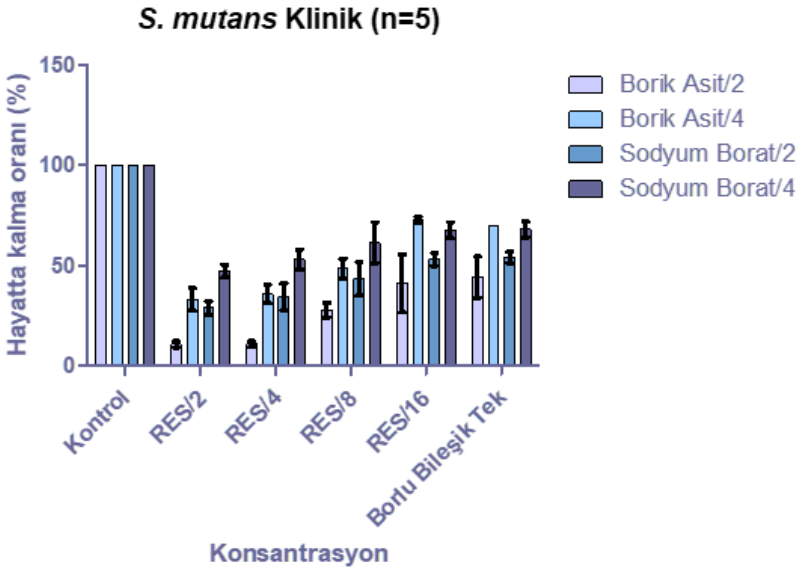
Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4'lük sub-MİK değerlerine denk gelen 1250-625 µg/mL ve 2000-1000 µg/mL ile resveratrolün 312,5-39 µg/mL arasındaki konsantrasyonlarının *S. mutans* ATCC 25175 ve klinik suşlarına karşı elde edilen biyofilm inhibisyon sonuçları Şekil 4-14 ve 4-15'te özetlenmiştir. Elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, *S. mutans* standart suşuna karşı kullanılan resveratrol konsantrasyonları hem borik asit hem de sodyum boratın biyofilm inhibisyonunu arttırmakta olup, bu etki hem MİK/2 hem de MİK/4 sonuçlarında net bir şekilde gözlemlenmektedir. Borik asit kombinasyonları %32'lik en yüksek etki artışını, resveratrol ile MİK/2 değerinde kombine edildiğinde göstermiştir. Sodyum borat ve resveratrolün MİK/4 değerlerinin yer aldığı kombinasyonda ise %12'lik etki artışı ölçülmüştür. *S. mutans* klinik suşlarına karşı resveratrolün borlu bileşiklerle bir arada olan etkisi de net bir şekilde gözlemlenmektedir. Borik asitin kombinasyonları genel olarak daha etkili olup, MİK/2 konsantrasyonundaki resveratrol ile birarada %33, MİK/4'lük resveratrol ile %20-28 oranında artış sağlamıştır. Sodyum borat için ise bu değerler %15-25 aralığındadır. Resveratrolün Bölüm 4.1.2'de gösterilen kombinasyon sonuçlarında da borik asit ve sodyum boratla sinerjist etki göstermesi, bu sonuçları desteklemektedir.

Borik asit ve sodyum boratın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4'lük sub-MİK değerlerine denk gelen 800-400 µg/mL ve 625-312,5 µg/mL ile resveratrolün 1500-187,5 µg/mL aralığındaki konsantrasyonlarının *C. albicans* ATCC 10231 ve klinik suşlarına karşı elde edilen sonuçları Şekil 4-16 ve 4-17'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre *C. albicans* standart suşuna karşı resveratrol tek başına kullanıldığında etkisi son derece düşük olmasına rağmen, borlu bileşiklerle kombinasyon halinde belirgin bir etki artışı gözlenmiştir. Çalışılan konsantrasyonlardaki borik asit kombinasyonlarında %16-20 arasında etki artışı görülürken, sodyum borat için bu artış %6-10 arasındadır. Benzer şekilde *C. albicans*'ın klinik suşlarına karşı da borik asit ve resveratrol kombinasyonları MİK/2 ve MİK/4'lük konsantrasyonlarda %12-21, sodyum borat ile ise %8-11 oranında etki artışı meydana getirmiştir.



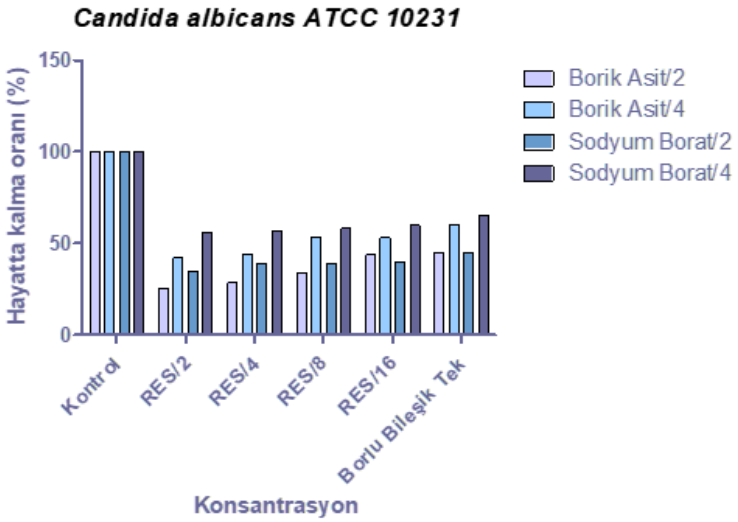
Şekil 4-14: *S. mutans* ATCC 25175 suşuna karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Resveratrol konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



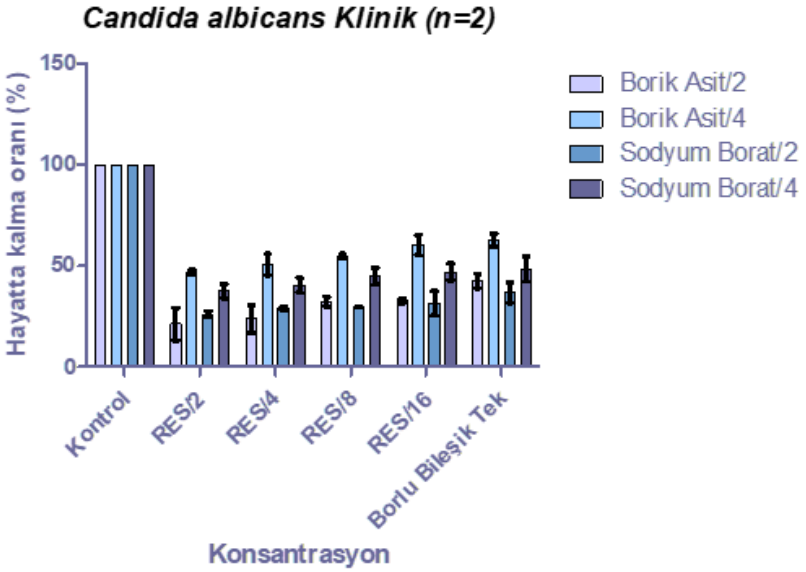
Şekil 4-15: *S. mutans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile resveratrolün kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Resveratrol konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek Grubu: borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



Şekil 4-16: *C. albicans* ATCC 10231 suşuna karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Resveratrolün konsantrasyonlarını, Y ekseni: *C. albicans* ATCC 10231'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.



Şekil 4-17: *C. albicans* klinik suşlarına karşı borlu bileşikler ile resveratrol kombinasyonlarının biyofilm inhibisyon etkileri

X ekseni: Resveratrol konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 2 klinik *C. albicans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları, Borlu Bileşik Tek Grubu: Borlu bileşikler tek başlarına kullanıldığında gösterdikleri etkiyi ifade etmektedir.

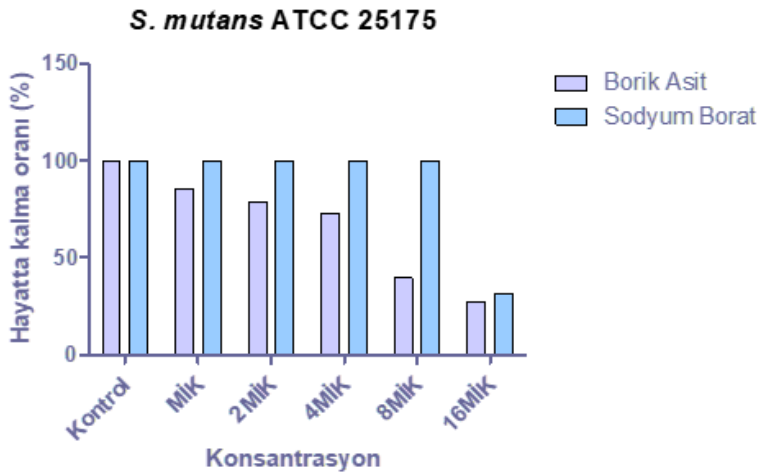
4.4. Olgun Biyofilm İnhibisyon Deneylerine ait Bulgular

Bu deneylerde borik asit ve sodyum boratın sırasıyla 2500-40.000 µg/mL ve 4000-64.000 µg/mL, doğal maddelerden ise epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün sırasıyla 156-2500 µg/mL, 125-2000 µL/mL ve 625-10.000 µg/mL arasındaki çözeltilerinin *S. mutans* ve *C. albicans*'ın 24 saatlik olgun biyofilmleri üzerine olan etkileri incelenmiştir. Sonuçların değerlendirilmesinde, kontrole kıyasla biyofilmdeki hücre sayısını en az %50 oranında azaltan konsantrasyonlar esas alınmıştır.

4.4.1. *S. mutans* Olgun Biyofilmlerine Etkiler

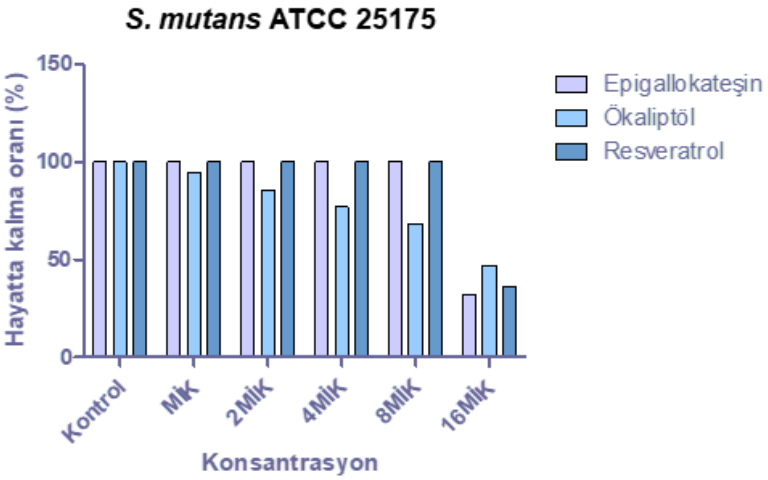
Çalışılan borlu ve doğal bileşiklerin *S. mutans* ATCC 25175 ve klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı olan etkilerine ait sonuçlar Şekil 4-18, 4-19, 4-20 ve 4-21'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre standart *S. mutans* suşu üzerine sodyum borat 16xMİK'te yok edici etki gösterirken, borik asit için bu oran 8xMİK olarak tespit edilmiştir. Doğal ürünlerde ise, hemen hemen tüm maddeler için olgun biyofilm inhibe edici konsantrasyon 16xMİK olarak gözlemlenmiş, sadece ökaliptölün etkisi 4xMİK'ten itibaren başlamış olmasına rağmen, yine en yüksek etki 16xMİK'de elde edilmiştir.

Klinik suşlar için elde edilen veriler de standart suş ile benzerlik göstermekte olup, borik asitin olgun biyofilm üzerindeki etkisi 4xMİK'den itibaren, sodyum boratın etkisi ise 16xMİK'te gözlemlenmiş, genel olarak borik asitin daha düşük konsantrasyonlarda daha iyi sonuç verdiği görülmüştür. Klinik suşlara karşı doğal maddelerden epigallokateşin gallat 16xMİK'de etki göstermeye başlamışken, resveratrol ve ökaliptöl için bu değer yaklaşık olarak 8xMİK olarak belirlenmiştir.



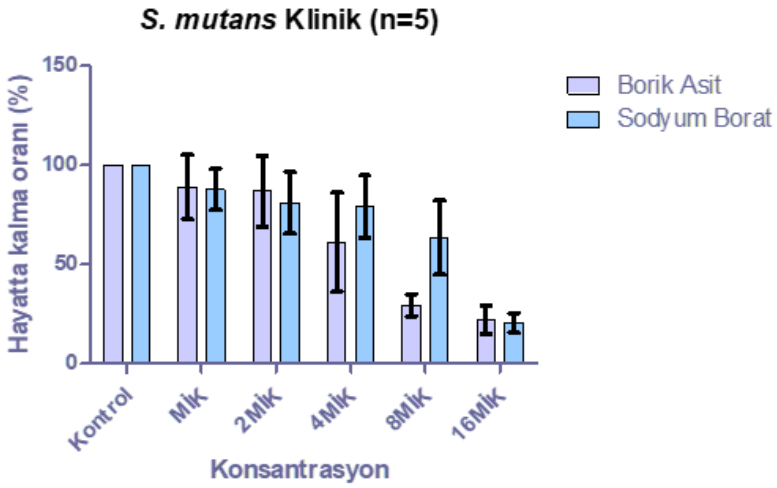
Şekil 4-18: *S. mutans* ATCC 25175 olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici etkileri

X ekseni: Borlu bileşiklerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri ifade etmektedir.



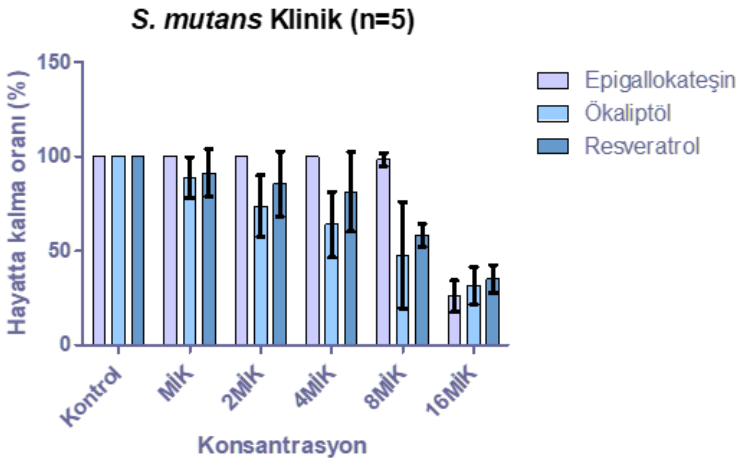
Şekil 4-19: *S. mutans* ATCC 25175 olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici etkileri

X ekseni: Doğal maddelerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: *S. mutans* ATCC 25175'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri ifade etmektedir.



Şekil 4-20: *S. mutans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici etkileri

X ekseni: Borlu bileşiklerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir



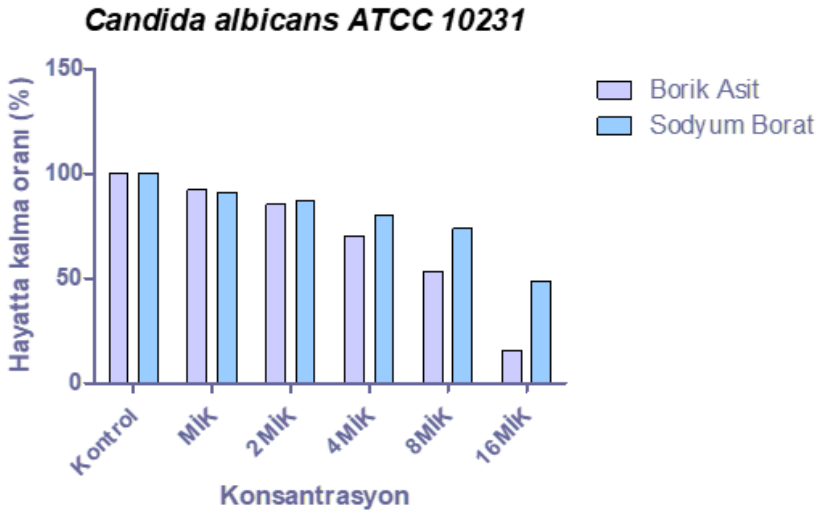
Şekil 4-21: *S. mutans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici etkileri

X ekseni: Doğal maddelerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 5 klinik *S. mutans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş bakterileri, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir.

4.4.2. *C. albicans*'ın Olgun Biyofilmlerine Etkiler

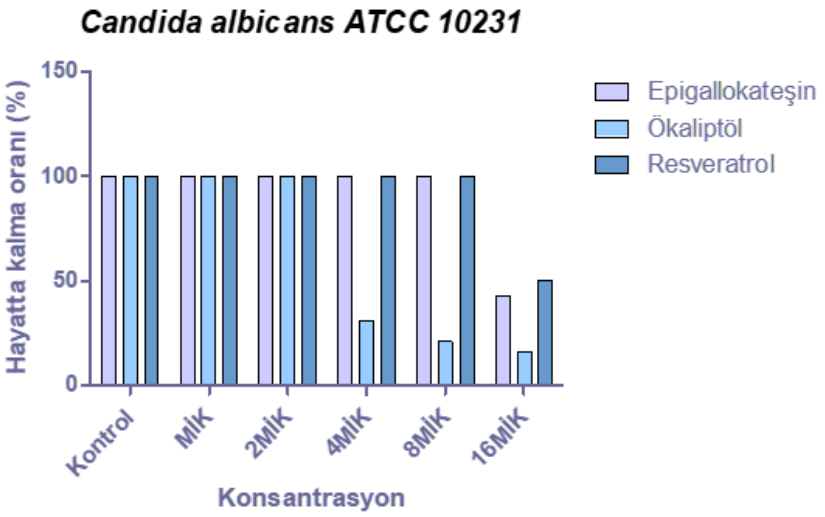
Çalışılan borlu ve doğal bileşiklerin *C. albicans* ATCC 10231 ve iki klinik suşuna karşı olan etkileri belirlenmiş, elde edilen sonuçlar Şekil 4-22, 4-23, 4-24 ve 4-25'te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre özellikle borik asit, 8xMİK'ten itibaren standart *C. albicans* suşuna ait olgun biyofilmi inhibe edici etki göstermeye başlamış olup, en etkili olduğu değer 16xMİK olarak belirlenmiştir. Sodyum boratın da en etkili olduğu değer 16xMİK olsa da deneylerde genel olarak borik asitin daha etkin olduğu görülmektedir. Doğal ürünler ile gerçekleştirilen deneylerde ise epigallokateşin gallat ve resveratrol 16xMİK'te etkili iken, ökaliptöl için bu değer yaklaşık 4xMİK olarak bulunmuştur. Tüm sonuçlara bakıldığında bileşiklerin en etkili oldukları değer 16xMİK olmuştur.

Standart suş sonuçları ile benzer şekilde, *C. albicans* klinik suşlarına karşı da borik asitin etkisi 2xMİK'ten itibaren başlamış olup, en etkili konsantrasyon her iki borlu bileşik için de 16xMİK olarak belirlenmiştir. Klinik suşlar üzerinde tekrarlanan deneylerde ise, ökaliptöl 2xMİK'ten itibaren olgun biyofilme etki etmeye başlamış ve 16xMİK'te maksimum verime ulaşılmıştır. Epigallokateşin gallat ve resveratrol için ise direkt olarak 16xMİK değerinde etki gözlemlenmeye başlamıştır.



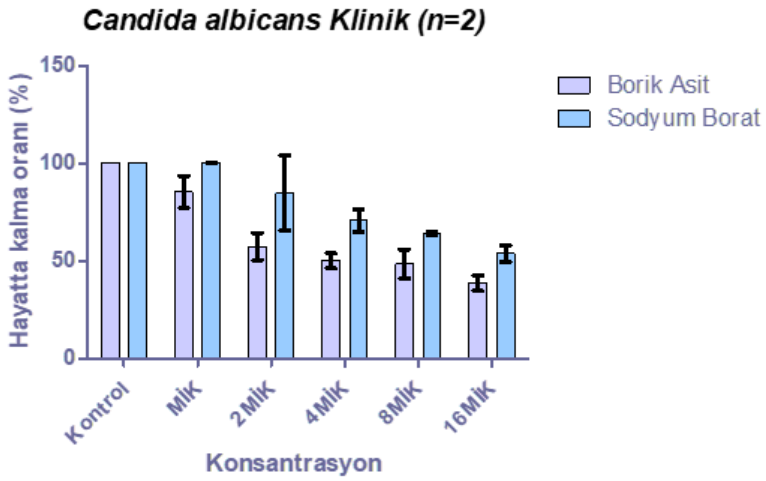
Şekil 4-22: *C. albicans* ATCC 10231 olgun biyofilmine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici etkileri

X ekseni: Borlu bileşiklerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: *C. albicans* ATCC 10231'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları ifade etmektedir.



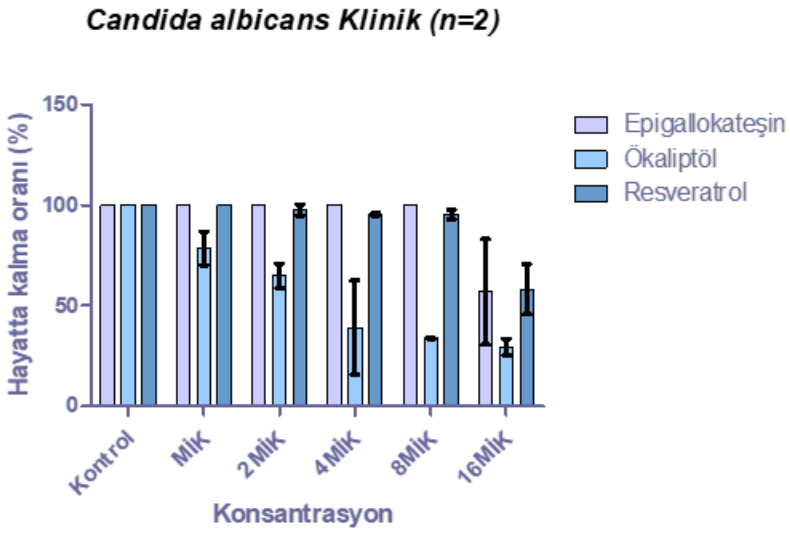
Şekil 4-23: *C. albicans* ATCC 10231 olgun biyofilmine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici etkileri

X ekseni: Doğal maddelerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: *C. albicans* ATCC 10231'in hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları ifade etmektedir.



Şekil 4-24: *C. albicans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici etkileri

X ekseni: Borlu bileşiklerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 2 klinik *C. albicans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir.



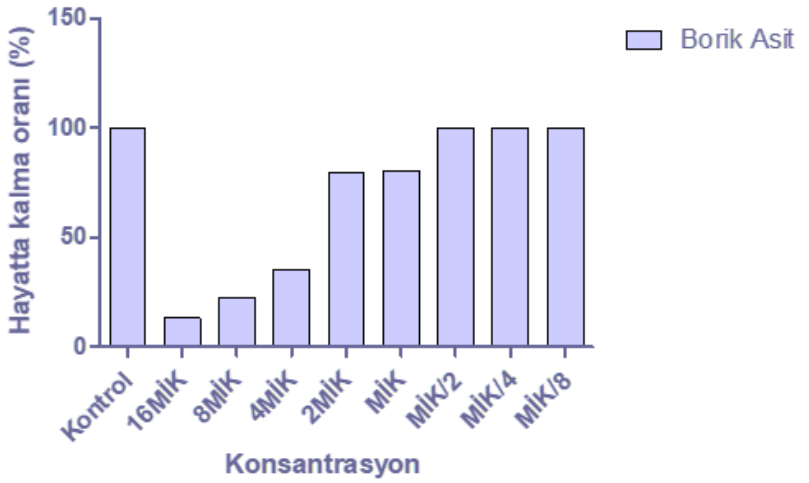
Şekil 4-25: *C. albicans* klinik suşlarının olgun biyofilmlerine karşı epigallokateşin gallat, ökaliptöl ve resveratrolün inhibe edici etkileri

X ekseni: Doğal maddelerin konsantrasyonlarını, Y ekseni: Çalışılan 2 klinik *C. albicans* suşunun ortalama hayatta kalma yüzdelerini, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş mayaları, Hata çizgileri: Klinik suşlar arasındaki farklılıkları ifade etmektedir.

4.5. Toksisite Deneylerine ait Bulgular

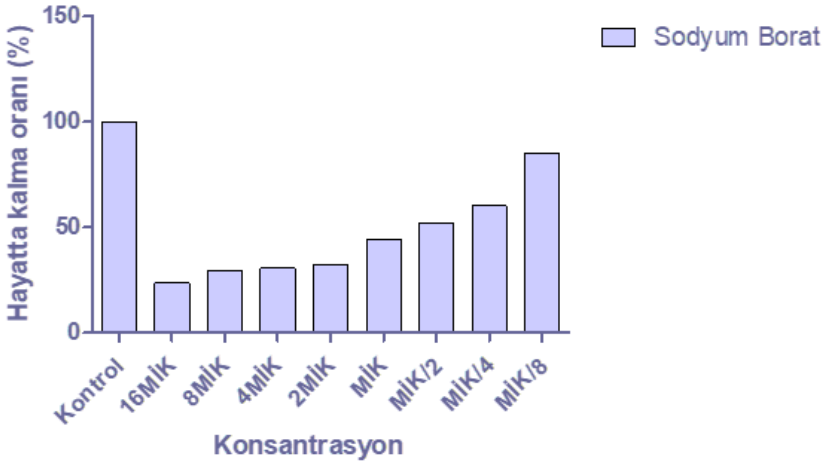
Çalışmada kullanılan maddelerin sitotoksik etkilerinin belirlenmesi amacıyla, insan ağız içi fibroblast hücreleri olan HGF-2 hücre hattı üzerinde in vitro sitotoksisite deneyleri yapılmış ve MTT yöntemi ile belirlenen sonuçlar Şekil 4-26, 4-27, 4-28, 4-29 ve 4-30'da özetlenmiştir. Elde edilen bu sonuçlara göre borik asit 10.006 µg/mL konsantrasyonundan itibaren (4xMİK) hücrelerin en az %50'si üzerinde toksik etki gösterirken, sodyum boratın ise CC50 değeri 653,6 µg/mL olarak ölçülmüş olup bu değer *S. mutans*'a karşı belirlenen MİK değerinden 6 kat daha düşük olarak belirlenmiştir.

Doğal maddelerle tekrarlanan toksisite deneylerinde epigallokateşin gallatın, deneylerde kullanılan MİK değeri olan 156 µg/mL ve hatta 2xMİK değeri olan 312 µg/mL'de toksik etki göstermediği gözlemlenmiştir. Ökaliptölün toksik etkisi, diğer maddelere oranla çok daha yüksek bulunmuş olup, güvenli dozun yaklaşık 31,25-62,5 µg/mL aralığında olduğu görülmüştür. Resveratrolün ise MİK değerine karşılık gelen 650 µg/mL'lik konsantrasyonda toksik olmadığı tespit edilmiştir.



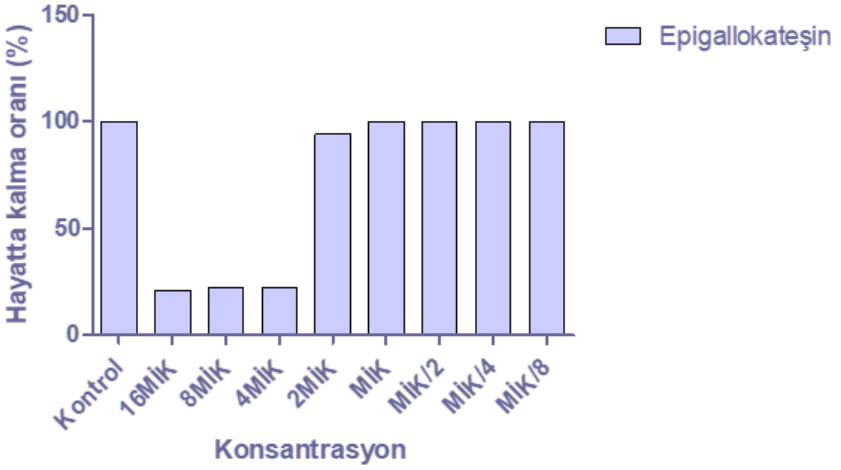
Şekil 4-26: HGF-2 hücreleri üzerinde borik asitin sitotoksisite grafiği

X ekseni: Borik asit konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir.



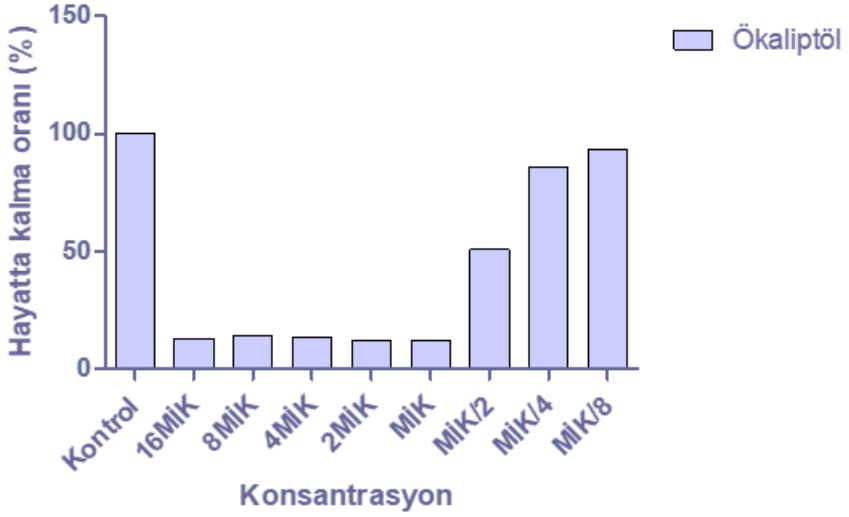
Şekil 4-27: HGF-2 hücreleri üzerinde sodyum boratın sitotoksisite grafiği

X ekseni: Sodyum borat konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir.



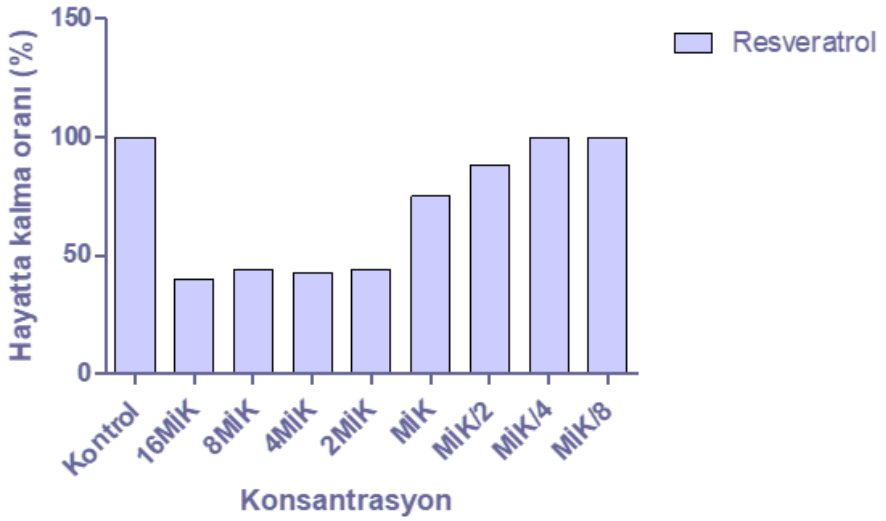
Şekil 4-28: HGF-2 hücreleri üzerinde epigallokateşin gallatın sitotoksisite grafiği

X ekseni: Epigallokateşin gallat konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir.



Şekil 4-29: HGF-2 hücreleri üzerinde ökaliptolün sitotoksisite grafiği

X ekseni: Ökaliptöl konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir



Şekil 4-30: HGF-2 hücreleri üzerinde resveratrolün sitotoksisite grafiği

X ekseni: Resveratrol konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir

4.6. Karışımın Hazırlanması ve Etkilerinin Belirlenmesine ait Bulgular

Çalışmada kullanılan borlu bileşikler ve etkinliklerine göre seçilen doğal maddelerin farklı konsantrasyonlarını içeren karışımlardan, şeffaf diş plaklarının temizlenmesinde kullanılabilecek, antimikrobiyal ve anti-biyofilm etkinliği bulunan ancak sitotoksik olmayan bir formülasyon hazırlanması hedeflenmiştir. Bu amaçla hazırlanan ve Tablo 3-3'te bildirilen karışımlardan antimikrobiyal etkinliği en fazla olanı seçilerek biyofilm inhibisyonu ile olgun biyofilmlere karşı etkinliği ve sitotoksisitesi belirlenmiştir.

4.6.1. En Etkili Karışımın Belirlenmesi

Hazırlanan sekiz ayrı karışımın mikrodilüsyon yöntemi ile belirlenen antimikrobiyal etkinliklerine ait sonuçlar Tablo 4-4'te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre, sekiz karışım arasından en etkili bulunan formülasyon, içeriğinde 78 µg/mL epigallokateşin gallat, 312,5 µg/mL resveratrol ve 31,25 µg/mL ökaliptöl içeren "Karışım 1" olmuştur. Bu değerler epigallokateşin gallat ve resveratrol için *S. mutans*'a karşı tek başlarına gösterdikleri MİK değerlerinin yarısına, ökaliptöl için ise 1/4'üne eşittir. Antimikrobiyal aktivite deneyi sonucunda en etkili bulunan "1" numaralı karışımın MİK değeri ise 1/2'lik seyreltmede elde edilmiş olup, içeriğinde borik asit,

resveratrol ve epigallokateşin gallatın tek başlarına olan MİK değerlerinin ¼'ü ve ökaliptölün MİK değerinin 1/8'i bulunmaktadır. Bu sonuçlar doğrultusunda hazırlanan karışımın MİK değeri veren 1/2'lik konsantrasyonu, deneylerde kullanılmak üzere 'düşük doz' olarak seçilmiştir. Olgun biyofilm eradikasyonu deneylerinde ise daha yüksek konsantrasyonlara ihtiyaç duyulacağı düşünülerek, Karışım 1'in 32 katlık konsantrasyonu, 'yüksek doz' olarak hazırlanmıştır. Bu değer epigallokateşin gallat ve resveratrol için tek başlarına gösterdikleri MİK değerlerinin 16 katı, ökaliptöl için ise 8 katına denk gelmekte olup, totalde karışımın yüksek ve düşük dozları arasında 64 katlık bir konsantrasyon farkı bulunmaktadır.

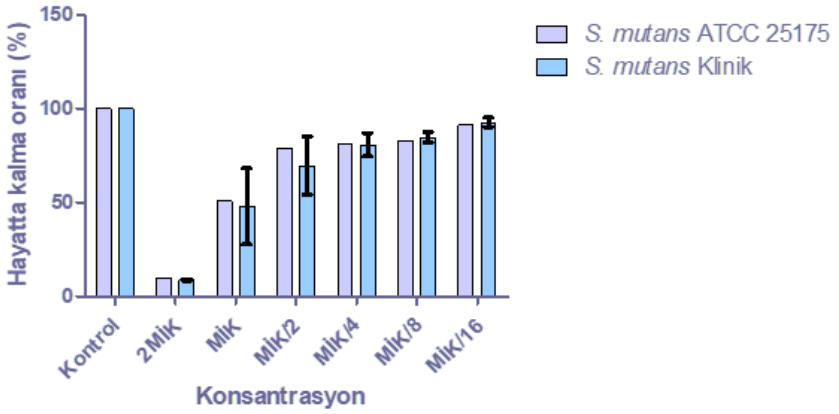
Tablo 4-4: Hazırlanan farklı karışımların *S. mutans* suşlarına karşı MİK değerleri

	MİK (Seyreltme Oranları)					
Maddeler	*S. mutans* ATCC 25175	*S. mutans* Klinik 1	*S. mutans* Klinik 2	*S. mutans* Klinik 3	*S. mutans* Klinik 4	*S. mutans* Klinik 5
Karışım 1	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2	1/2
Karışım 2	1	1	1	1	1	1
Karışım 3	1	1	2	1	2	1
Karışım 4	1	1	2	2	2	1
Karışım 5	1/2	1	1	1	1	1
Karışım 6	1	1	1	1	1	1
Karışım 7	1	1	1	1	1	1
Karışım 8	2	2	2	2	2	2

4.6.2. Karışımın Etkinliklerinin Belirlenmesi

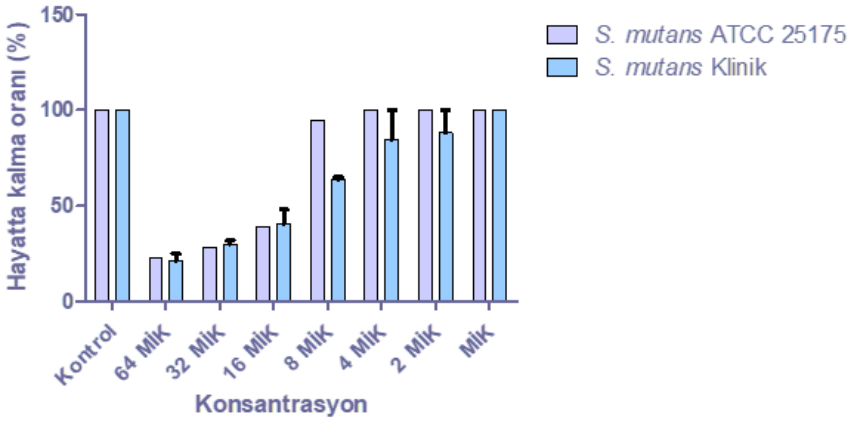
Antimikrobiyal aktivitesine göre seçilen "1" numaralı karışım ile yapılan biyofilm oluşumu inhibisyonu, olgun biyofilm inhibisyon ve sitotoksisite deneylerine ait sonuçlar sırasıyla Şekil 4-31, 4-32 ve 4-33'te özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre karışımın düşük doz olarak belirlenen MİK değerinde biyofilm oluşumunu inhibe edici etki de gözlemlenmiş olup, MİK/2 değerinde dahi özellikle klinik suşlar üzerinde etki görülmüştür. *S. mutans* olgun biyofilmlerine karşı inhibisyon deneylerinde standart suşa karşı karışım 16xMİK, klinik suşlara karşı ise yaklaşık 8xMİK konsantrasyonda

eradikasyon göstermektedir. Hazırlanan karışımın HGF-2 hücreleri üzerinde gerçekleştirilen sitotoksisite deneylerinde hücrelerin en az %50'sini öldüren değer yaklaşık 4xMİK olarak belirlenmiştir.



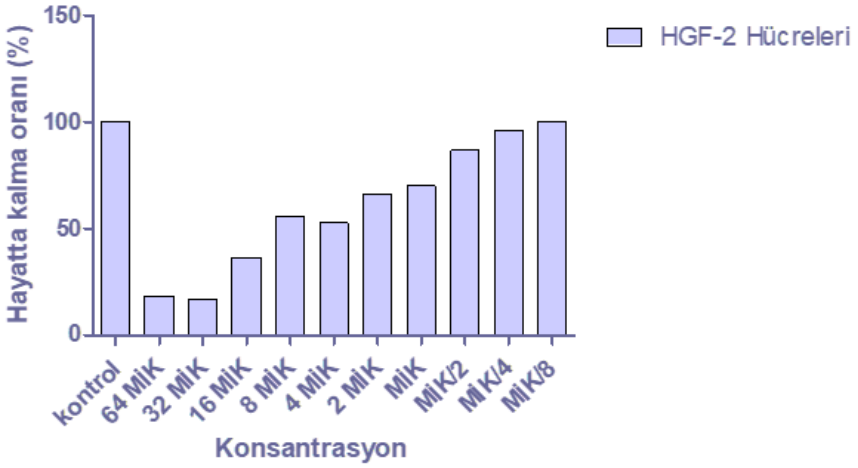
Şekil 4-31: Karışım 1'in, standart ve klinik *S. mutans* suşlarına karşı biyofilm oluşumu inhibisyonu

X ekseni: Karışım 1'in konsantrasyonlarını, Y ekseni: Biyofilmde hayatta kalan bakteri sayılarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş biyofilmi ifade etmektedir.



Şekil 4-32: Karışım 1'in, standart ve klinik *S. mutans* suşlarının olgun biyofilmleri üzerinde gösterdiği inhibe edici etkileri

X ekseni: Karışım 1'in konsantrasyonlarını, Y ekseni: Biyofilmde hayatta kalan bakteri sayılarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş biyofilmi ifade etmektedir.



Şekil 4-33: Karışım 1'in, HGF-2 hücreleri üzerinde gösterdiği sitotoksik etkiler

X ekseni: Karışımın farklı konsantrasyonlarını, Y ekseni: Hayatta kalan HGF-2 hücre miktarını, Kontrol: Herhangi bir antimikrobiyal ile muamele edilmemiş hücreleri ifade etmektedir.

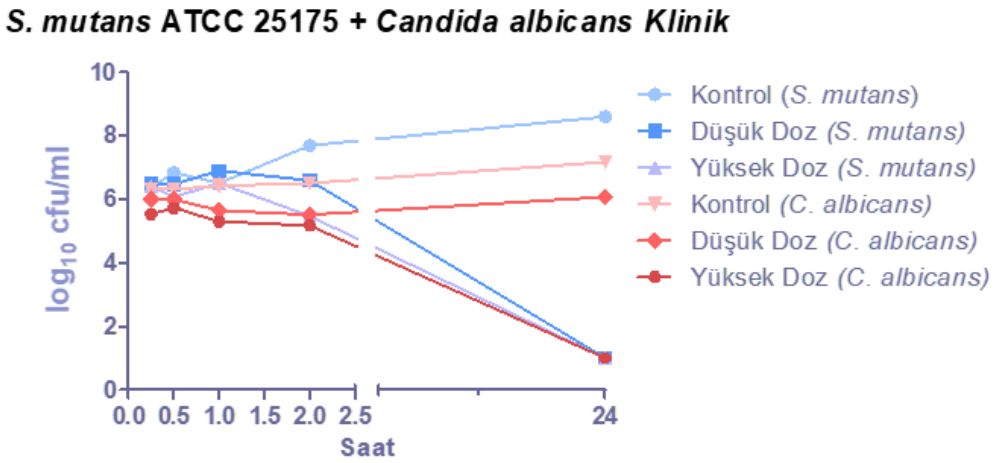
4.7. Karışım ile Zamana Bağlı Miks Biyofilm Eradikasyon Deneyine ait Bulgular

Önceki deneylerde elde edilen sonuçlara göre hazırlanan en etkili antimikrobiyal madde karışımının düşük ve yüksek dozlarının, şeffaf diş plakları üzerinde *S. mutans* ve *C. albicans*'ın birlikte oluşturduğu miks biyofilmlere karşı 15 dakika, 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 24 saat boyunca oluşturduğu etkilere ait sonuçlar Şekil 4-34, 4-35, 4-36, 4-37, 4-38 ve 4-39'da gösterilmiştir. Bu sonuçlara göre, standart *S. mutans*'ın klinik *C. albicans* suşu ile birlikte oluşturulan miks biyofilmine karşı etkileri genel olarak ikinci saatin sonunda kaydedilmiştir. Karışımın düşük dozu 24. saatte biyofilmdeki *C. albicans* sayısında azalmaya sebep olmamış ancak bir artış da gözlemlenmemiş, yüksek dozun uygulandığı grupta ise 4.54 log10'luk bir azalma ölçülmüştür. Buna karşılık karışımın her iki konsantrasyonunun da 24 saatlik temasın ardından biyofilmdeki *S. mutans* ATCC 25175 sayısında 5.40 log10'luk azalma sağladığı görülmektedir.

S. mutans'ın klinik suşları ile tekrarlanan deneylerde de genel olarak standart suşla benzer etkiler gözlenmiştir. Karışımın yüksek dozu 1, 2, 4 ve 5 no'lu klinik *S. mutans* suşları üzerinde 5.38, 4.88, 2.7, 1.85 log10'luk azalmalar göstermiş olup, sadece 3 numaralı suşa karşı etki görülmemiştir. Düşük doz için elde edilen en yüksek

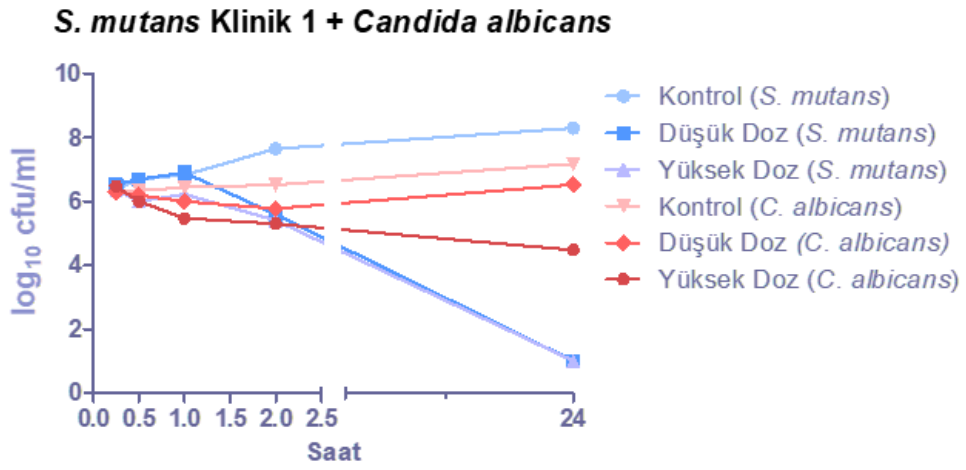
logaritmik azalma, 1 numaralı klinik suş için 5.54 ve 4 numaralı suş için 1.52 log10 olarak belirlenmiştir. Diğer klinik suşlar üzerinde ise düşük dozda etki görülmemiştir.

Hazırlanan karışımın miks biyofilmler içerisindeki *C. albicans* suşu üzerindeki etkileri incelendiğinde, yüksek dozdaki karışım ile elde edilen en yüksek eradikasyon oranı 2 log10'luk bir azalma olup, düşük dozdaki karışımın ise *C. albicans* sayısında anlamlı bir azalma meydana getirmediği görülmüştür. Çalışmada 1 numaralı *S. mutans* suşu ile hazırlanan miks biyofilmdeki dikkat çekici noktalardan biri, karışımın düşük dozu ile muamele edilen biyofilmdeki bakteri sayısının 1. saatin sonuna kadar azalma göstermesi ve ardından 2. saatin sonuna kadar da maya hücre sayısının artmasını engellemesidir. Ancak 24 saatlik sonuçta herhangi bir etki gözlenmemiştir. 2 numaralı suş ile hazırlanan biyofilmde ise, karışımın düşük dozu bir saat içerisinde bakteri sayısında azalmaya yol açmış, ancak ilerleyen zamanda etkinliğini kaybettiği görülmüştür. 3 numaralı klinik suşla gerçekleştirilen deneyde, en farklı sonuçlar kaydedilmiş olup, yüksek dozlu karışım *S. mutans* üzerinde ilk yarım saat içerisinde etki göstermiş olmasına rağmen birinci saatten itibaren bu etki ortadan kaybolmuştur. Gerçekleştirilen son miks biyofilm deneyinde ise yüksek konsantrasyonlu karışım, *C. albicans* suşu üzerinde yarım saatte etki göstermiş, ancak bu etki kısa süreli olmuş ve birinci saatte en düşük maya hücresi sayısına ulaşıldıktan sonra ikinci saatten itibaren yükseliş gözlemlenmiştir.



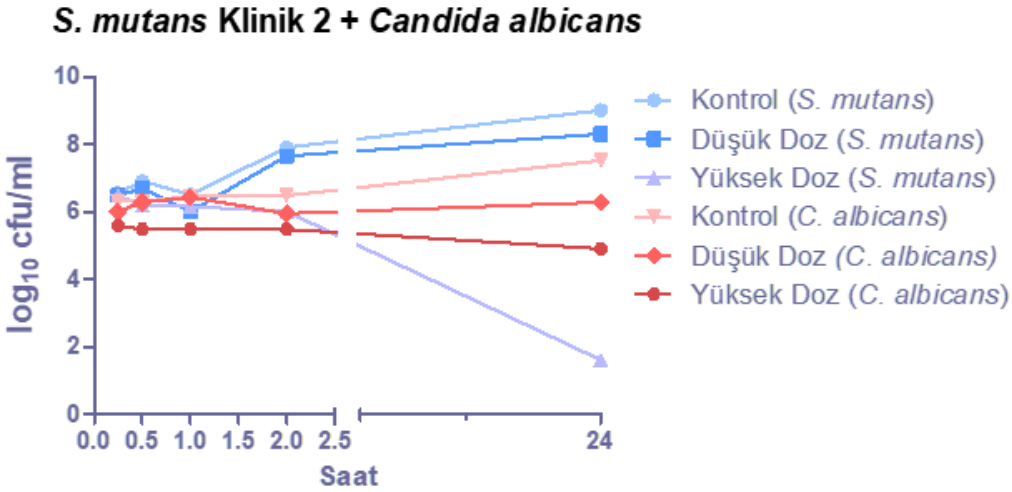
Şekil 4-34: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* ATCC 25175 standart suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.



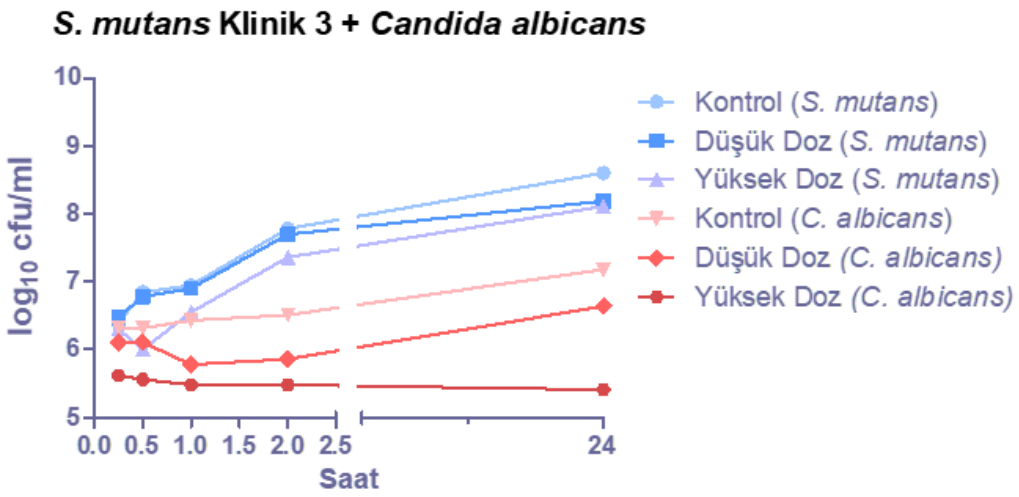
Şekil 4-35: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 1 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.



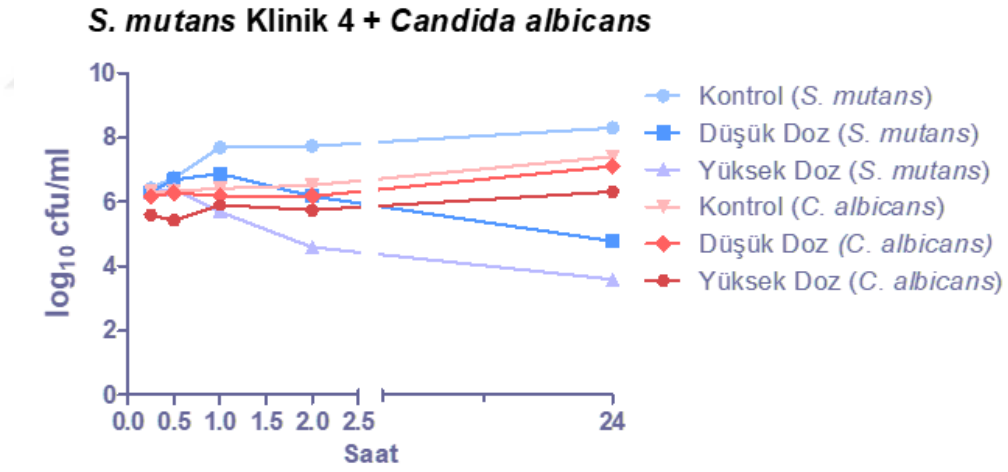
Şekil 4-36: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 2 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.



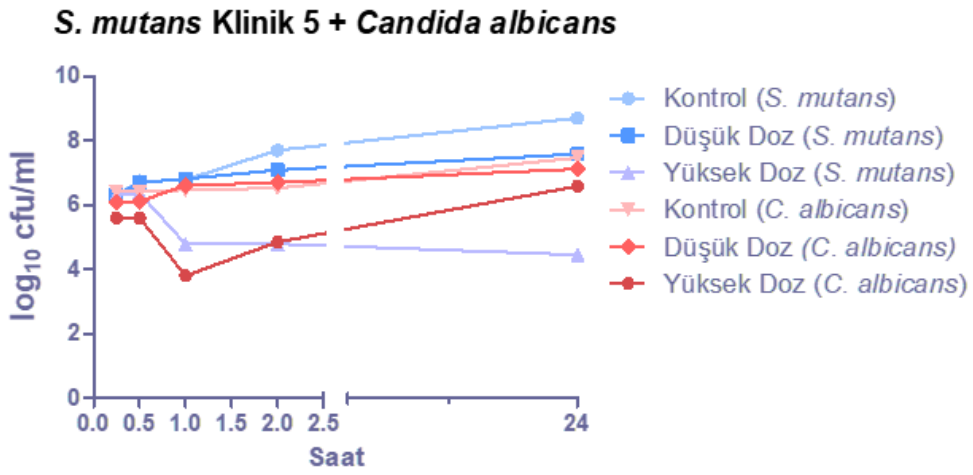
Şekil 4-37: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 3 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.



Şekil 4-38: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 4 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.

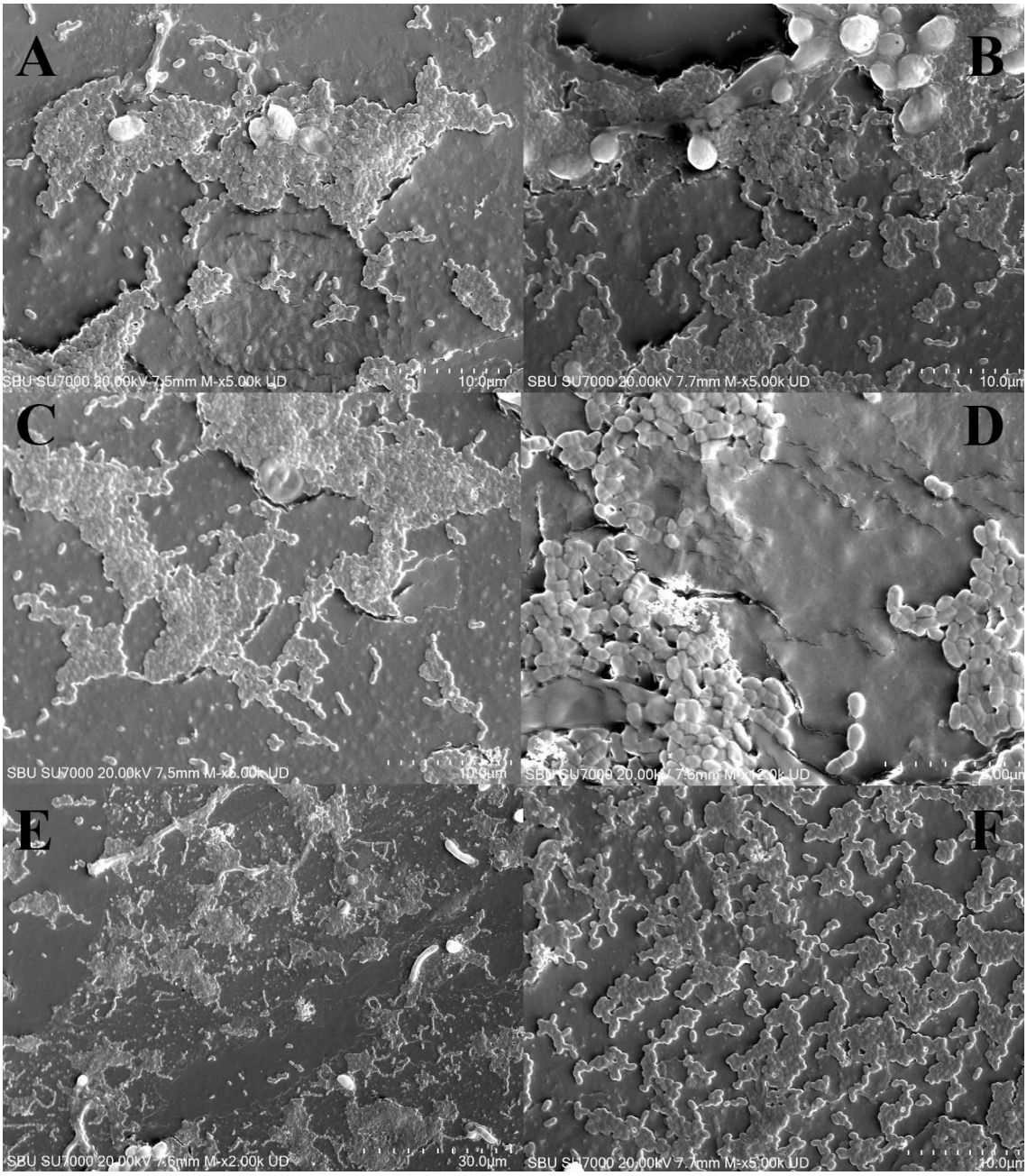


Şekil 4-39: Karışımın, şeffaf diş plağı üzerindeki *S. mutans* 5 numaralı klinik suşunun klinik *C. albicans* ile miks biyofilmine karşı zamana bağlı öldürme grafiği

X ekseni: Zamanı, Y ekseni: Miks biyofilm içerisinde canlı kalan mikroorganizma sayılarını ifade etmektedir.

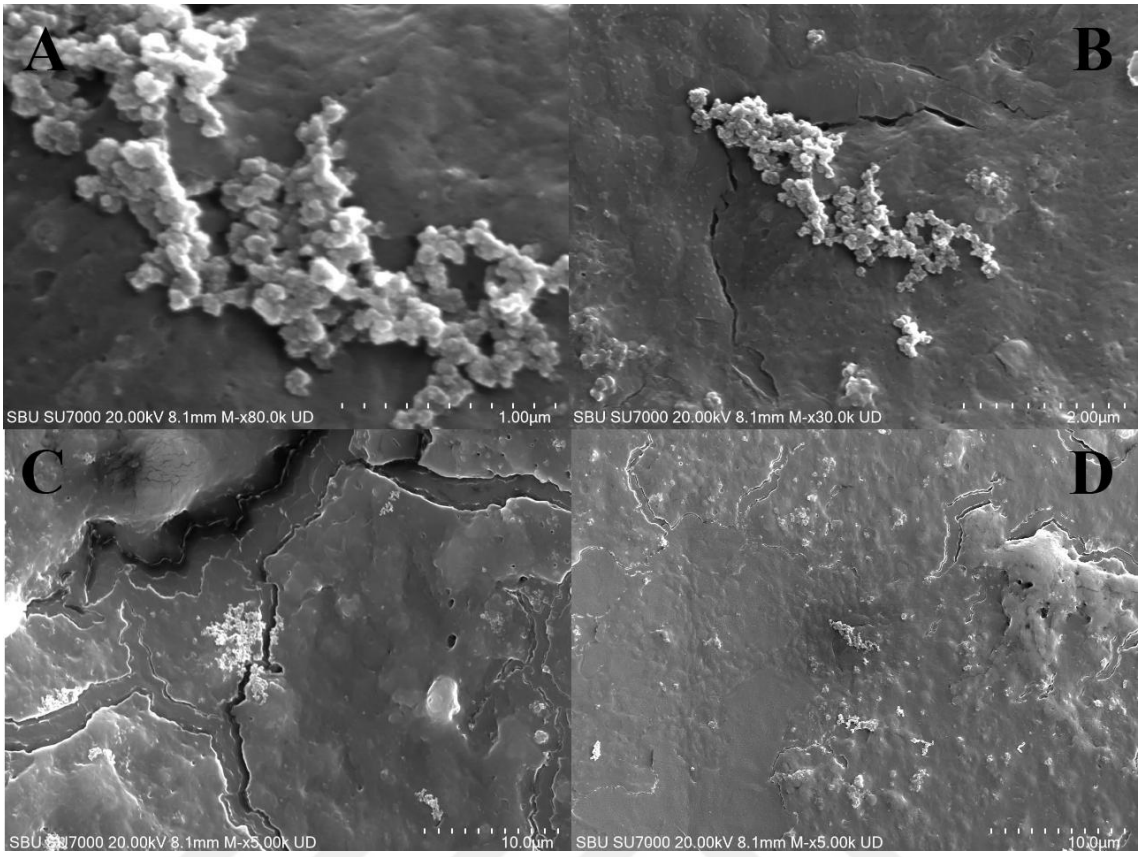
4.8. Taramalı Elektron Mikroskobu Görüntülenmesine ait Bulgular

Oluşturulan karışımın şeffaf diş plakları üzerindeki biyofilmlere olan etkisinin gözlenmesi amacıyla, Sağlık Bilimleri Üniversitesi DETAUM'dan hizmet alımı şeklinde yaptırılan SEM çekimlerinden elde edilen görüntüler Şekil 4-40 ve 4-41'de gösterilmiştir. Görüntülerde, kontrol olarak kullanılan şeffaf diş plakları üzerindeki hiçbir antimikrobiyal madde ile muamele edilmemiş 24 saatlik olgun miks biyofilm örneklerinde üzüm şekilli büyük yuvarlak yapılar *C. albicans*'ları göstermekte olup küçük yuvarlak şekiller *S. mutans* hücrelerini göstermektedir. Kontrol ile kıyaslandığında, deney grubunda yer alan ve 24 saat boyunca seçilen karışımın yüksek dozu ile muamele edilmiş biyofilmlerin canlı mikroorganizma sayılarındaki belirgin azalma, açıkça gözlenmekte olup şeffaf plaklar üzerinde herhangi bir bakteri ya da mantar hücresine rastlanmamış, buna karşılık dental plakların üzerinde oluşan çatlaklar net bir şekilde gözlemlenmiştir.



Şekil 4-40: Üzerinde Miks biyofilm oluşturulan şeffaf plakların SEM mikroskobu ile çekilen görüntüleri

E fotoğrafının büyütmesi: x2000, D fotoğrafının büyütmesi: x12.000, Diğer fotoğrafların büyütme oranı: x5000



Şekil 4-41: Üzerinde Miks biyofilm oluşturulan şeffaf plakların, yüksek dozlu karışım ile muamele edildikten sonra çekilen SEM görüntüleri

A fotoğrafının büyütmesi: x80.000, B fotoğrafı büyütmesi: x30.000, C ve D fotoğraflarının büyütmesi: x5000.

5. TARTIŞMA

Düzgün ve doğru şekilde sıralanmış dişlerle birlikte güzel bir gülüşe sahip olmak, tarih boyunca ve günümüzde de tüm toplumlardaki birçok kişinin isteğidir. Bireylerin dişlerindeki doğuştan gelen yapısal bozukluklar ya da dişeti hastalıkları gibi faktörler, ortodontik tedavileri zorunlu kılarken, bazı durumlarda da bireyler sahip oldukları estetik kaygılar sebebiyle çarpıklıkların düzeltilmesi için bu tedavileri tercih edebilmektedir. Ortodontik tedaviler, geleneksel anlamda 'diş teli tedavisi' olarak bilinmekte olup, yüksek oranda çocukluk çağında uygulansa da, çeşitli sebeplerden dolayı ilerleyen yaşlarda da uygulanabilmektedir. Ancak ilerleyen yaşla birlikte bireylerde diş teli tedavisine karşı bir ön yargı da gözlemlenmekte ve diş tellerinin görüntüsünden rahatsız olabileceklerini düşünen bireyler, farklı yöntemleri tercih etmekte olup, bu yöntemlerden bazıları; lingual (dil arkası) braketler, seramik braketler (beyaz renkli olmaları sebebiyle daha az belli olurlar) ve şeffaf diş plaklarıdır.

Şeffaf diş plaklarının en eski ve bilinen temsilcisi, Align Teknoloji tarafından 1998 yılında piyasaya sunulan Invisalign'dir (Wajekar ve ark. 2022). Piyasaya sürüldükleri hali ile sadece hafif vakalarda kullanılmaya başlanmış olsa da, zaman içinde gelişen yardımcı teknolojilerin de etkisiyle artık büyük kapanış bozukluklarında dahi kullanılmaktadırlar. Şeffaf diş plakları SmartTrack adı verilen, esnek ve dayanıklı, Bisfenol A (BPA) içermeyen bir termoplastik olan özel bir malzemeden yapılmaktadır. Geleneksel diş tellerinden farklı olarak Invisalign, her hastanın dişine göre özelleştirilir ve kullanımı sırasında neredeyse görünmezdir. SmartTrack malzemesi, dayanıklı olmasıyla öne çıkmakta olup bu dayanıklılıkları iki hafta kadar sürmektedir (Bräscher ve ark. 2016). Plakların kullanımı, günde en az 20-22 saat olmalıdır ve ağız hijyeni uygulamalarının dışında sadece yemek yerken çıkartılmaları gerekmektedir.

Şeffaf diş plaklarının uzun süreli kullanımı, plakların yüzeyinde mikro çatlaklara yol açabilmektedir. Diş plaklarının doğru şekilde temizlenmemesi ve yapıları gereği meydana gelen bu çatlaklar biyofilm oluşumu için uygun bir ortam yaratmakta olup, bu nedenle diş plaklarının üzerinde biyofilmlerin oluşabileceği, yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Pardo ve ark. 2024). Biyofilmler sabit bir yüzeye yapışmış mikroorganizmaların bir araya gelerek oluşturdukları yapışkan bir matriks ile çevrili mikrobiyal topluluklardır. Bu yapılardaki mikroorganizmalar, birbirleri ile uyum

içerisinde çalışarak işbirliği sağlayan kompleks bir sistemi oluşturup çevresel faktörlere karşı dirençlerini arttırmakta ve aynı zamanda çeşitli antimikrobiyal ajanlara da direnç gelişimine sebep olmaktadır.

Oral boşluk, biyofilm oluşması açısından incelendiğinde büyük bir potansiyel barındırmaktadır. Diş yüzeyleri, dişeti sınırları ve oral mukoza total anlamda sahip oldukları nemli ve pürüzlü yüzey sayesinde biyofilmlerin tutunması ve yaşam alanı oluşturmaları açısından önemlidir. Oral biyofilmler, doğal floranın bir elemanı olarak kabul edilmekte, ancak biyofilm dengesinin bozulması, *S. mutans* gibi bakterilerin baskın hale gelmesiyle birlikte çeşitli dişeti hastalıklarına ve diş çürüklerine yol açabilmektedir (Berger ve ark. 2018). Oral biyofilmlerin ayrıca pulmoner enfeksiyonlar başta olmak üzere çeşitli sistemik enfeksiyonların da gelişimine sebep olabildiği, yapılan çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (Pawlaczyk-Kamieńska ve ark. 2019). Örneğin, ağızda gelişen kronik bir enflamasyon, damar sertliği riskini ve insülin direncini arttırabilmekte, solunum yolu enfeksiyonlarına sebep olabilmekte ve gebelikte erken doğum, düşük doğum ağırlığı gibi riskleri arttırabilmektedir. Ayrıca kronik böbrek hastalıkları, prostat, kolon ve pankreas kanserleri, Alzheimer ve romatoid artrit gibi hastalıklarda da oral biyofilmler ve oluşturdukları metabolitlerin etkili olduğu bildirilmiştir (Kurtzman ve ark. 2022).

Diş çürükleri, oral boşluk ile ilişkili hastalıklar arasında en büyük öneme sahiptir ve oluşumunda çeşitli mikroorganizmalar rol oynamaktadır. Temelde bakterilerin ağızda bulunan şekerleri metabolize etmesinin ardından ortaya çıkan asitlerin rol aldığı bu oluşumda etken olarak *S. mutans* öne çıkmaktadır. *S. mutans*'ın fermantasyon sonucunda ürettiği laktik asit, ağız boşluğundaki pH'ı düşürerek ortamı asitleştirmekte ve mine demineralizasyonunu kolaylaştırmaktadır. Normal bir süreç olan demineralizasyon ve remineralizasyonun yüksek miktarda bulunan *S. mutans* metabolizması sebebiyle etkilenmesi, diş çürüklerine yol açmaktadır. Bireylerin ağız hijyenine önem vermemesi ve fermente olabilen karbonhidratlar açısından yüksek bir beslenme profili çizmesi de diş çürüklerinin oluşumuna katkı sağlamaktadır. *S. mutans,* diş çürüklerinin oluşumundaki öncü bakteri rolünü üstlenirken, uygun ortamın oluşturulmasını takiben Lactobacillus türleri de çürüğün ilerletilmesine yardımcı olmaktadır (Banas ve Drake 2018). Ayrıca ortamdaki *C. albicans* varlığının da *S.*

mutans'ın biyofilm oluşturma yeteneklerini destekleyici özelliklere sahip olduğu gösterilmiştir (Huffines ve Scoffield 2020).

Ağız hijyeninin doğru şekilde sağlanması, biyofilm kontrolünde temel rol oynamaktadır. Diş fırçalama ve diş ipi kullanımı, biyofilmin fiziksel olarak uzaklaştırılmasını sağlarken diş macunu ve gargara kullanımı da bu mekanik etkiye kimyasal katkı sağlamaktadır. Ancak kullanılan şeffaf diş plaklarının diş fırçası ile temizlenmesi, bu plaklar üzerinde oluşan biyofilmlerin ortadan kaldırılması konusunda yetersiz kalmaktadır. Şeffaf diş plaklarının dış yüzeyi uygun şekilde fırçalanabiliyor olsa da, iç yüzeyde dişlerin meydana getirdiği çıkıntıların tamamına fırçanın ulaşması mümkün olmamaktadır. Özellikle de diş çarpıklığına sahip bireylerin bu plakları kullandıkları göz önünde bulundurulduğunda, sadece diş fırçası kullanımının biyofilmleri temizlemede yeterli olamayacağı sonucuna varılmaktadır (Charavet ve ark. 2022).

Şeffaf diş plaklarının temizlenmesi için piyasada çeşitli ürünler bulunmakta olup, bunlar arasında yer alan efervesan tabletler, günümüzde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu tabletlerin içeriğinde bulunan kimyasallar mikroorganizmaları öldürürken, formülasyondaki bazı maddelerin çözünmesi sonucu oluşan gaz çıkışından kaynaklanan kabarcıklar da mekanik etki sunmaktadır. Yapılan çalışmalar şeffaf plakların temizlenmesinde en etkili yöntemin mekanik ve kimyasal yöntemleri birlikte kullanmak olduğunu savunmaktaysa da, her yöntemin kendisine ait olumsuzlukları bulunmaktadır. Örnek olarak efervesan tabletler, plak yüzeylerinde çözünmeyen kimyasal kalıntılar bırakabilmektedir (Kiatwarawut ve ark. 2022). Bu durum uzun vadede incelendiğinde biyofilm oluşumuna katkı sağlamakta ve dişeti iltihabına neden olabilmektedir. Ayrıca efervesan tabletlerin içerisinde bulunan sodyum perborat gibi güçlü temizleyici maddelerin, diş plağının yüzey yapısını bozma ve plağın şeffaflığına zarar verme gibi etkileri de bulunmaktadır. Tek başına efervesan tabletlerin kullanılması, bazı durumlarda biyofilmlerin tamamen temizlenmesinde yetersiz kalmakta ve plakların tam bir temizlikten geçmemesi de ağız kokusuna yol açabilmektedir. Diğer bir deyişle, şeffaf diş plaklarının temizlenmesinde mekanik temizlik hala bir zorunluluk gibi gözükse de, özellikle ortodontik tedavinin sıklıkla uygulandığı yaş grubu olan çocukluk çağında bunun tam olarak yapılabilmesi her zaman mümkün olamamaktadır. Bu nedenle, özellikle çocuklar için kullanılan efervesan

ürünlerin içeriklerine dikkat etmek ve mümkün olduğunca doğal maddeler kullanılarak hazırlanmış temizleme ürünlerini seçmek önem teşkil etmektedir.

Bu çalışmada; son yıllarda oldukça popüler hale gelen ortodontik şeffaf diş plaklarının üzerinde in vitro olarak biyofilm modeli oluşturulmuş ve bu biyofilmlerin temizlenmesinde kullanılması planlanan bor içerikli, doğal ürünlerle desteklenmiş bir kombinasyon elde edilmesi hedeflenmiştir. Çalışmanın planlanmasında diş çürüklerinin en sık karşılaşılan etkenlerinden kabul edilen bakteri olarak *S. mutans* temel alınmış olup, oral biyofilmlerde sıklıkla rastlanan bir maya olan *C. albicans* da miks biyofilm çalışmalarında kullanılmıştır.

Çalışmada hazırlanmak istenen karışım için temel alınan bor, hem endüstriyel hem de sağlık alanında önemli bir bileşik olup, dünya üzerindeki bilinen bor rezervlerinin yaklaşık %70'i Türkiye sınırlarında bulunmaktadır (Elevli ve ark. 2022). Bor bileşiklerinden biri olan borik asit ve sodyum borat (boraks), sıklıkla antiseptik özellikleri sebebiyle tıp alanında kullanılmaktadır. Çalışmada borlu bileşiklerden borik asit ve sodyum boratın antimikrobiyal etkinlikleri, mikrodilüsyon deneyleri ile belirlenmiştir. Standart ve klinik *S. mutans* suşları üzerinde gerçekleştirilen deneylerde borik asit 1250-5000 µg/mL, sodyum borat ise 4000-8000 µg/mL'de etkinlik göstermiştir. *S. aureus* ATCC 25923 suşu üzerinde gerçekleştirilen başka çalışmalarda borik asitin MİK değeri 3800 µg/mL, sodyum tetraborat için ise 23.800 µg/mL bulunmuş olup verilerimizle benzerlik göstermektedir (Yılmaz 2012). *C. albicans*'a karşı gerçekleştirilen deneylerde ise borik asit 800-1600 µg/mL'de etkili bulunmuş olup, sodyum borat için bu değer 1250 µg/mL olarak ölçülmüştür. Sonuçlar borik asit ile gerçekleştirilen diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (De Seta ve ark. 2009).

Borik asit bakteriler üzerindeki etkisini, bakteri hücre zarı yapısını bozmak suretiyle göstermektedir. *C. albicans* üzerindeki etki ise, oksidatif metabolizmayı inhibe etmesi ve hifal dönüşüm işlevlerini bozması olarak gösterilmektedir. Elde edilen sonuçlarda açıkça görülmekte olan, iki mikroorganizmaya karşı borlu bileşiklerin etkili olduğu konsantrasyon farklılığının nedeni olarak, bakteri ve maya hücrelerine karşı etki mekanizmalarının farklı oluşu düşünülmektedir (Estevez-Fregoso ve ark. 2021; Farfán-García ve ark. 2023).

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, yapılan literatür taramalarında *S. mutans*'a karşı olası aktivitesi bulunan doğal maddelerin antimikrobiyal etkinlikleri araştırılmıştır.

Çeşitli araştırmalarda *P. aeruginosa* üzerinde antimikrobiyal etkinlik gösteren askorbik asit; *B. cereus, E. coli* gibi bakterilere karşı etkili bulunan *C. asiatica* ekstraktı ve *E. coli* ve *S. aureus* gibi bakteriler üzerinde etkili olan sitrik asitin, çalışmamızda *S. mutans* üzerinde 10.000 µg/ml'ye kadar denenen konsantrasyonlarda herhangi bir aktivitesi görülmemiştir (Abdelraheem ve ark. 2022; Eliuz 2020; Wong ve Ramli 2021). Asit karakterli bu maddelerin *S. mutans* üzerinde etkisiz kalma nedeninin, bakterinin gelişmiş asit metabolizması olduğu düşünülmektedir. Ayrıca *C. asitica* çalışmasında kullanılan çözücünün aynı olmaması da öne çıkan farklılıklar arasındadır.

Çalışılan diğer doğal maddeler olan çay ağacı yağı, epigallokateşin gallat, mentol, öjanol, ökaliptöl, resveratrol, sinnamaldehit ve timolün, Tablo 4-1'da görüldüğü gibi 0.25-1250 µg/mL arasında değişen konsantrasyonlarda antimikrobiyal etkinlikleri olduğu görülmüştür. Elde edilen bu sonuçlar, aynı maddelerle yapılmış literatürdeki çalışmalar ile büyük oranda paralellik göstermekte olup, var olan farklılıkların ise çalışılan klinik suşların direnç özelliklerinden, çözücü farkından ve maddelerin elde edildikleri geniş bitki yelpazesinden kaynaklandığı düşünülmektedir (Han ve ark. 2021; S.T. Khan ve ark. 2017; Kong ve ark. 2022; Landeo-Villanueva ve ark. 2023; J. Li ve ark. 2020; Mahzoon ve ark. 2022; Ribeiro ve ark. 2018; Yanakiev 2020; S.-Y. Yang ve ark. 2023). Çalışmanın bu noktasında, özellikle yağ formunda bulunan ve viskozitesi oldukça yüksek olan çay ağacı yağı ile diğer maddelere kıyasla daha yüksek toksisite değerine sahip olan mentol deneylerden çıkartılmış, daha düşük MİK değerleri ve daha iyi çözünürlüğe sahip epigallokateşin gallat, öjanol, ökaliptöl, resveratrol, sinnemaldehit ve timol çalışmanın devamı için seçilmiştir.

Çalışmada kullanılmak üzere seçilen maddelerin *C. albicans* üzerindeki etkinlikleri incelendiğinde, ökaliptöl ve epigallokateşin gallat ile elde edilen MİK değerlerinin *S. mutans*'a karşı elde edilen değerlerden birkaç kat daha fazla olduğu, ancak resveratrolün anlamlı bir etkisi bulunmadığı görülmüştür. Benzer şekilde literatürde bulunan çalışmalarda da resveratrolün, *C. albicans* metabolizmasında önemli yolakları etkilememesi sebebiyle hali hazırda bir antifungal olarak kullanılmasının tercih edilmeyeceği belirtilmiştir (Collado-González ve ark. 2012). Ökaliptöl ve epigallokateşin gallat ile elde edilen sonuçlar ise diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir (Gupta ve ark. 2021; Ning ve ark. 2015).

Borik asit ve sodyum boratın, seçilen doğal maddelerle birarada kullanıldıklarında gösterdikleri etkinliklerin belirlenmesi amacıyla mikrodilüsyon checkerboard / dama tahtası yöntemi ile kombinasyon deneyleri gerçekleştirilmiştir. Bu deneyler sonucunda borik asitin epigallokateşin gallatla bir, ökaliptöl, resveratrol ve sinnamaldehit ile ikişer suşa karşı sinerjist etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Aynı deneyin sodyum borat ile tekrarında epigallokateşin gallatla bir, resveratrol ve sinnamaldehit ile yine ikişer suş üzerinde sinerjist etki görülmüştür. Timol ve öjenol ile hiçbir sinerjist etki gözlemlenmediğinden bu maddeler çalışmanın devamından çıkartılmışlardır. Öjenol ve timolün antimikrobiyal etkinlikleri genellikle hücre zarında meydana getirdikleri bozulmalar ile ortaya çıkmaktadır (Jafri ve ark. 2020; S.T. Khan ve ark. 2017). Benzer şekilde borik asitin etki mekanizması da hücre zarının yapısını bozduğundan, bu iki maddenin etki ettiği yolakların aynı yada benzer oluşunun, aralarında sinerjist bir etkileşim olmamasını açıkladığı düşünülmektedir.

Dama tahtası deneylerinde sinerjist etkili bulunan epigallokateşin gallat ve resveratrol, hücre zarına zarar vermelerinin yanı sıra bakteriyel enzimleri de inhibe etmekte, QS moleküllerini etkilemekte ve hücrenin yüzeylere yapışmasını engellemektedir. Bu özellikleri ile, borik asit tarafından zayıflatılan hücre zarına ek olarak resveratrol ve epigallokateşin gallat tarafından bakteri metabolizmasındaki diğer mekanizmalar da etkilenerek sinerjist etkinin ortaya çıktığı düşünülmektedir. Olası benzer bir etkileşim sonucu her ne kadar sinnamaldehit ile de sinerjist etki gözlenmiş olsa da, bu maddenin sahip olduğu viskoz yapının oluşturduğu çalışma güçlükleri nedeni ile deneylerin devamından çıkartılmıştır.

Çalışmada kullanılan *S. mutans* ve *C. albicans*'ın, diş yüzeylerinde biyofilm oluşturarak diş çürümesi ve periodontal hastalıklar gibi sağlık sorunlarına yol açabileceği ve biyofilm oluşumunun, özellikle farklı patojenler bir arada bulunduğunda daha karmaşık hale gelebileceği bilinmektedir (Zhou ve ark. 2018). Ancak farklı suşların biyofilm oluşturma potansiyelleri de değişkenlik gösterebilmekte olup, özellikle genetik ve biyolojik özellikleri iyi bilinen standart suşlar ile hasta örneklerinden izole edilen ve doğal özelliklerini sergileyen klinik suşlar birbirinden çok farklı özelliklere sahip olabilirler. Bu nedenle çalışmamızda kullandığımız mikroorganizmaların standart ve klinik suşlarının biyofilm kapasitelerini belirlemek, böylece biyofilm inhibisyon ve eradikasyon deneylerimizdeki dinamikleri doğru anlamak ve karşılaştırabilmek

amacıyla biyofilm oluşturma deneyleri yapılmışır. *S. mutans*'ın biyofilm oluşturma özelliklerinin incelenmesi amacıyla standart ve klinik suşlar, 24 kuyucuklu düz tabanlı mikroplakta incelenmiş ve tümünün kuvvetli biyofilm oluşturdukları gözlenmiştir. Aynı deney şeffaf diş plakları üzerinde de tekrarlanmış ve kristal viyole ile boyama sonucunda biyofilm oluşumu başarılı bir şekilde gösterilmiştir. Çalışmada kullanılan *C. albicans* suşları için de aynı deneme yapılmış ve en kuvvetli biyofilm oluşturan klinik suş ile *S. mutans* suşlarının uygun şartlar altında bir arada meydana getirdikleri miks biyofilmler, yine şeffaf diş plakları üzerinde gösterilmiştir. Miks biyofilmlerdeki mikroorganizma sayısının tespiti amacıyla, diş plağı üzerinde oluşturulan biyofilm FTS içerisinde sonikasyon ile parçalanmış, iyice karıştırılmış ve her iki mikroorganizmanın da uygun besiyerlerinde koloni sayımları yapılmıştır. Şeffaf plaklar üzerinde biyofilm oluşturma deneyi herhangi bir çalışmadan referans alınmamış olup, çalışma metodu deneyin ihtiyaçları doğrultusunda şekillendirilmiştir.

Biyofilm içerisinde bulunan mikroorganizmaların planktonik formda olanlara kıyasla çok daha dirençli oldukları bilinmekte olup bu durum gerek ortodontik tedavide, gerekse kliniklerde biyofilm ilişkili enfeksiyon hastalıkları ile mücadelede büyük güçlüklere yol açmaktadır. Çoğu zaman olgun biyofilmleri yok edebilmek için kullanılması gereken antimikrobiyal madde konsantrasyonları, toksisite nedeniyle hastaya verilemeyecek kadar yüksek dozlar gerektirmektedir (Ferreres ve ark. 2023). Bu nedenle anti-biyofilm stratejileri, olgun biyofilmleri yok etmeye çalışmak yerine, çok daha düşük dozlarda antimikrobiyal madde kullanılarak biyofilm oluşumunu henüz başlamadan inhibe etmek üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla çalışmamızda, antimikrobiyal özelliklerine göre seçilen maddelerin tek başlarına ve kombinasyon halinde, *S. mutans* biyofilm oluşumunu engelleme potansiyelleri incelenmiştir. Standart suşlara karşı maddelerin tek başlarına olan etkilerini incelediğimizde, borlu bileşiklerin genellikle MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarında etkili olduğu; doğal maddelerin de benzer şekilde çoğunlukla MİK değerlerinde etkili olduğu, ancak epigallokateşin gallatın MİK/2 konsantrasyonlarında da az miktarda etki gösterdiği gözlenmiştir. Deneyler klinik suşlar üzerinde tekrarlandığında, borlu bileşiklerin MİK değerlerinin yanısıra MİK/2 ve özellikle borik asidin MİK/4 değerinde de etki gösterdiği gözlemlenmiştir. Klinik suşlara karşı doğal maddelerin etkinlikleri incelendiğinde ise, özellikle resveratrolün MİK/2 ve MİK/4 değerlerinin az miktarda etki gösterdiği görülmüştür. Resveratrolün bu etkisinin, QS molekülleri üzerindeki inhibe edici

özelliği, asit üretimi ve asit töleransını moleküler boyutta etkilemesi ve bakteriyel EPS oluşumunu engellemesi ile açıklanabileceği düşünülmektedir (J. Li ve ark. 2020). Standart suş üzerinde MİK/2 değerinde de etki gösteren epigallokateşin gallatın, EPS sentezinden sorumlu GTFs enzimlerini inhibe ederek biyofilm oluşumuna engel olabildiği (X. Xu ve ark. 2012), yine MİK/2'de klinik suşlar üzerinde az miktarda etki gösteren ökaliptölün ise hücre zarının yapısını bozarak bakteriyel tutunma özelliğini bozucu özelliği ile etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir (Vijayakumar ve ark. 2020).

Çalışmanın bir sonraki aşamasında, dama tahtası yöntemi ile sinerjist etkili oldukları tespit edilen borlu bileşikler ve doğal ürünlerin bir arada biyofilm inhibisyon özellikleri incelenmiştir. Bu amaçla standart *S. mutans* suşu üzerinde gerçekleştirilen deneylerde, borlu bileşiklerin epigallokateşin gallatın farklı konsantrasyonları ile bir araya getirilmesi sonucunda, biyofilm inhibisyonunda az miktarda bir artış elde edilmiştir. Bu durum, dama tahtası yöntemiyle elde edilen ve sadece bir klinik suşa karşı sinerjist etki gözlenen sonuçlarla paralellik göstermektedir. Klinik suşlara karşı aynı kombinasyon incelendiğinde ise; sodyum borat başta olmak üzere borlu bileşiklerin MİK/2 değerleri ile epigallokateşin gallatın MİK/2 ve MİK/4 değerleri birararada kullanıldığında, tek başına borlu bileşiklere kıyasla yaklaşık %30 daha fazla inhibisyon meydana geldiği gözlemlenmiştir. Standart *C. albicans* suşuna karşı tekrarlanan deneylerde, borlu bileşiklerin MİK/2 değerleri ve epigallokateşin gallatın MİK/2 ve MİK/4 değerleri bir arada kullanıldıklarında etkili bulunmuştur. Klinik *C. albicans* suşlarına karşı elde edilen biyofilm inhibisyonunun ise, standart suşlar üzerindekinden biraz daha az olduğu görülmektedir. Bunun nedeninin, çalışılan klinik suşların farklı biyofilm oluşturma seviyelerine sahip olması ve ayrıca antimikrobiyal direnç paternlerinin farklılığından kaynaklanabileceği düşünülmektedir (Díaz-García ve ark. 2020).

S. mutans suşlarına karşı ökaliptöl ile gerçekleştirilen kombinasyon deneylerinde, ökaliptölün MİK/2 ve MİK/4 değerleri ile borlu bileşiklerin MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyondaki tüm kombinasyonlarının, kontrol grubuna kıyasla biyofilm inhibisyonunda daha etkili olduğu gözlenmiştir. Elde edilen sonuçlar dama tahtası yöntemi ile elde edilen sinerjist etkilerle de paralellik göstermektedir. Bu etkinin sebebi olarak yine ökaliptölün adezyonu engelleyici özelliğinin öne çıktığı düşünülmektedir.

Ökaliptöl ile borlu bileşiklerin birlikte ortaya çıkarttıkları etkide, klinik ve standart suşlar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiştir. *C. albicans*'a karşı olan etkiler incelendiğinde ise, gerek standart gerekse klinik suşlar için özellikle borik asitin ve ökaliptölün MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonları birbirleri ile kombine edildiğinde, borik asitin tek başına biyofilm inhibisyon etkisine kıyasla daha etkili oldukları gözlenmiştir.

Resveratrolün, borlu bileşiklerin MİK/2 ve MİK/4'lük konsantrasyonlarıyla kombinasyon halinde *S. mutans*'a karşı biyofilm inhibisyon deneylerinde, MİK/8'e kadar düşük konsantrasyonlarda dahi etkili olduğu gözlemlenmiştir. Özellikle borik asitin MİK/4 değeri ile resveratrolün MİK/4'lük kombinasyonunun oldukça etkili olduğu, sodyum boratın MİK/2 konsantrasyonunun ise sadece resveratrolün MİK/2'lik değeri ile birlikte, tek başına etkisine kıyasla daha güçlü inhibisyon sağladığı belirlenmiştir. Resveratrol ve borlu bileşiklerin meydana getirdikleri inhibisyonda, klinik ve standart suşlar arasında anlamlı bir farklılık görülmemiş olup, sonuçlar dama tahtası yöntemi ile tespit edilen sinerjist etkiler ile de uyumludur. *C. albicans* klinik ve standart suşlarına karşı da resveratrolün MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonları ile borlu bileşiklerin MİK/2 ve borik asit için MİK/4'lük değerleri ile kombinasyonlarının, tek başına olan etkilerine kıyasla daha fazla biyofilm inhibisyonu sağladığı görülmüştür. Bu durum, tek başına resveratrolün etki edemediği *C. albicans* için de göze çarpan bir durumdur. Borik asitin *C. albicans*'a karşı etki mekanizması tam olarak bilinmiyor olsa da, mitokondrial enzim aktivitesi ve enerji metabolizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir (Schmidt ve ark. 2018). Benzer şekilde, yapılan bir çalışmada da resveratrolün *C. albicans* üzerinde tek başına aktivitesi olmamasına rağmen, azol grubu antifungallerle kombine halde kullanıldığında biyofilm oluşumunu engellemede oldukça etkili olduğu belirtilmiştir (Wang ve ark. 2021).

Çalışılan maddelerin MİK ve sub-MİK değerlerinde, tek başlarına ve kombinasyon halinde *S. mutans* ve *C. albicans* biyofilmlerinin oluşumunu engelleme potansiyellerinin görülmesinin ardından, fiziksel bir bariyere sahip olan ve yok edilebilmeleri için çok daha yüksek antimikrobiyal madde konsantrasyonları gerektiren olgun biyofilmler üzerindeki etkinlikleri araştırılmıştır. Standart *S. mutans* suşuna karşı gerçekleştirilen deneylerde sodyum borat 16xMİK'in altında herhangi bir etkinlik göstermemiş olup, 16xMİK'de yaklaşık %70'lik bir inhibisyon sağlamıştır. Borik asitin ise, MİK değerinden itibaren gitgide artan bir inhibitör etki meydana getirdiği

gözlemlenmiş olup 8xMİK değerinde biyofilm kütlesinde %60'lık, 16xMİK değerinde ise %75 oranında azalma ölçülmüştür. Doğal maddelerle tekrarlanan deneylerde, epigallokateşin gallat ve resveratrol, sodyum borata benzer şekilde 16xMİK'de dramatik bir düşüşle %60-70'lik inhibisyon gerçekleştirmiş, ökaliptöl ise borik asitle benzer şekilde 2xMİK konsantrasyonundan itibaren biyofilm kütlesinde azalmalara yol açmış, en yüksek etki %55'lik bir inhibisyon ile yine 16xMİK'te ölçülmüştür.

Klinik suşların olgun biyofilmlerine karşı borlu bileşiklerin inhibe edici etkilerini araştırdığımızda, sodyum borat ve borik asit, konsantrasyon artışı ile doğru orantılı bir etki göstermiş olup, borik asitin 8xMİK değerinde %70'e varan dramatik bir etkinlik artışının ardından 16xMİK'de bu değer %80'e ulaşmıştır. Sodyum boratın maksimum etkinliği de benzer şekilde 16xMİK değerinde, %80'lik inhibisyon ile görülmüştür. *S. mutans*'ın klinik suşlarının oluşturduğu olgun biyofilmler üzerinde epigallokateşin gallat, standart suşla paralel şekilde sadece 16xMİK'de etki gösterirken, resveratrolün maksimum etkisi de 16xMİK'de görülmüş, ökaliptöl ile elde edilen sonuçlar ise yine standart suşla paralel bulunmuştur.

C. albicans'ın olgun biyofilmlerine karşı da borik asit ve sodyum borat, konsantrasyonla doğru orantılı olarak artan etkinlik göstermekle birlikte, özellikle borik asitin inhibe edici etkinliğinin çok daha fazla olduğu dikkat çekmektedir. Borik asit, standart *C. albicans* biyofilmi üzerine 8xMİK'de yaklaşık %40'lık, 16xMİK'de ise %85'e yakın bir inhibisyon göstermiştir. Bu değer, elde edilen olgun biyofilm inhibe edici etkiler arasında en yüksek olanıdır. Benzer bir etki ökaliptöl ve resveratrolün 16xMİK konsantrasyonları için de elde edilmiş ve ökaliptölün 4xMİK konsantrasyonu, *C. albicans* biyofilm kütlesi için ölçülen en dramatik düşüşe (%84) sebep olmuştur. Klinik *C. albicans* suşlarına karşı borlu bileşiklerle elde edilen biyofilm inhibe edici etkiler de, standart suşla paralellik göstermiş ve borik asit en etkili madde olarak bulunmuştur. Doğal maddelerin klinik suşlara olan etkisinin ise daha düşük olduğu görülmüş olup, bunun da klinik suşların oluşturdukları biyofilmlerin daha güçlü olması ve direnç paternlerinin farkı ile açıklanabileceği düşünülmektedir.

Ortodontik tedavide kullanılan şeffaf diş plakları, günde 20-22 saat kadar takıldığı ve sadece yemek yerken çıkartılmaları gerektiği bilindiğinden, bu plakları temizlemek üzere hazırlanması planlanan karışımın da bu yemek aralarındaki zamanlarda kullanılabilecek bir ürün olması planlanmıştır. İleriki dönemlerde patentli

bir ürüne dönüştürülmesi de planlanan karışımın kullanım planı olarak, şeffaf plakların yemek yerken çıkartılıp bir bardak suyun içerisinde, hazırlanan karışımla birlikte bekletilmesi ve yaklaşık bir yemek yeme süresinin ardından duru su ile çalkalanarak tekrar dişlerin üzerine yerleştirilmesidir. Bu kullanım şeması çerçevesinde, hazırlanan karışımın ağız epiteli ile direkt teması planlanmamasına rağmen, şeffaf plakların kullanıma bağlı olarak yüzeylerinde oluşabilecek mikro çatlakların içerisinde madde kalıntılarının bulunabileceği ve yeterince çalkalanmadan takılmaları durumunda oluşabilecek toksik etkiler ile bazı sağlık sorunlarına yol açabileceğinin göz ardı edilmemesi gerektiği düşünülmüştür. Bu nedenle, hazırlanan karışımın olası toksik etkilerinin tespit edilebilmesi amacıyla, ağız içi epitel hücreleri olan HGF-2 hücre hattı üzerinde, her bir maddenin farklı konsantrasyonları için sitotoksisite deneyleri gerçekleştirilmiştir. Deney sonucunda canlı kalan hücre sayısı, kontrol grubundaki sağlıklı hücrelerle kıyaslanarak, test edilen maddelerin hücrelerin %50'sinden fazlasının ölümüne yol açan konsantrasyonları olan CC50 değerleri, toksik dozlar olarak olarak belirlenmiştir. Hesaplanan CC50 değerleri GraphPad Prism programı kullanılarak borik asit, sodyum borat, epigallokateşin gallat, resveratrol ve ökaliptöl için sırasıyla; 10.006, 594.9, 653.6, 594.7 ve 22,4 olarak hesaplanmıştır. Bu değerler borik asit ve epigallokateşin gallat için 4xMİK, sodyum borat için MİK/4, resveratrol için MİK, ökaliptöl için ise MİK/4 konsantrasyonlarına denk gelmektedir.

Çalışmanın bu aşamasına kadar elde edilen bütün veriler birarada değerlendirildiğinde, hem *C. albicans*'a karşı tespit edilen etkili konsantrasyonlarının daha düşük olması, hem de sonuçta elde edilmek istenen ürünün asıl hedefinin *S. mutans* olması nedeniyle, hazırlanan karışımdaki madde konsantrasyonlarının belirlenmesinde *S. mutans*'a ait değerler esas alınmıştır. Borlu bileşiklerle yapılan deneyler dikkate alındığında, hemen hemen bütün çalışmalarda borik asit, sodyum borattan daha iyi sonuç göstermiştir. Çözünme özellikleri de denkleme eklendiğinde borik asit, karışımın temel borlu bileşiği olarak tercih edilmiştir. Karışıma eklenmek üzere doğal maddelerin değerlendirilmesinde, resveratrol ve epigallokateşin gallatın sırasıyla MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonları ile borik asitin MİK/2 ve MİK/4'lük konsantrasyonları kombine edilerek toplamda sekiz farklı karışım elde edilmiştir. Ökaliptölün ise, sahip olduğu yüksek toksisite sebebiyle, tasarlanan karışımlara sabit olarak MİK/4 konsantrasyonda katılmasına karar verilmiştir.

Karışımda kullanılan doğal ürünlerden resveratrol; üzüm, yer fıstığı ve dut gibi meyvelerden elde edilen polifenolik bir bileşiktir ve mikroorganizmaların elektron taşıma zinciri ve diğer enerji metabolizmalarını etkileyerek antimikrobiyal etkinlik göstermektedir (L.-X. Zhang ve ark. 2021). Bir diğer madde olan epigallokateşin gallat, yeşil çay kateşinlerinden en aktif olanıdır ve bakterilerin hücre zarlarını parçalayıp, çeşitli bakteriyel enzimleri inhibe etmektedir. Yapılan çalışmalarda özellikle *S. mutans*'a ait birçok enzimi etkilediği, bakterinin asidojenitesini ve asit direncini düşürdüğü, plak oluşumunu destekleyici tutunma gibi özelliklerine de engel olduğu gösterilmiştir (Kong ve ark. 2022). Ökaliptölün etki mekanizması incelendiğinde ise, bakteriler arası haberleşmenin temelini oluşturan QS molekül reseptörlerini bloke ettiği ve bu sebeple antimikrobiyal özellik kazandığı belirtilmiştir (Mączka ve ark. 2021).

Oluşturulan her bir karışımın standart ve klinik *S. mutans* suşları üzerindeki MİK değerlerinin belirlenmesi amacıyla bir kez daha mikrodilüsyon yöntemiyle antimikrobiyal etkinlik deneyleri yapılmış ve en etkili karşım olarak borik asit, epigallokateşin gallat ve resveratrolü MİK/2 değerlerinde, ökaliptölü ise MİK/4 değerinde içeren "Karışım 1" seçilmiştir. Bu Karışım 1'in MİK değerini oluşturan ½ oranında seyreltilmiş hali, 'düşük konsantrasyon' olarak adlandırılmış, karışımın 32 katı olan hali ise 'yüksek konsantrasyon' olarak kararlaştırılmıştır. Son durumda yüksek konsantrasyon içerisinde bulunan borik asit, resveratrol ve epigallokateşin gallat konsantrasyonları sırasıyla; 40.000, 10.000, ve 2.500 µg/mL olup, bu değerler maddelerin tek başlarına gösterdikleri MİK değerlerinin 16 katına denk gelmektedir. Düşük konsantrasyonun içeriğinde ise borik asit, epigallokateşin gallat ve resveratrol sırasıyla 625, 39 ve 156 µg/mL miktarda yer almış olup, bu değerler de *S. mutans* üzeriendeki tek başlarına olan MİK değerlerinin MİK/4 katına denk gelmektedir. Ökaliptöl yüksek konsantrasyonun içinde MİK değerinin 4 katı olan 500 µg/mL, düşük konsantrasyonun içinde ise MİK/8 değeri olan 15,62 µg/mL miktarında bulunmaktadır.

Hazırlanan karışımın düşük ve yüksek dozlarının etkinliklerinin belirlenmesi için bir kez daha biyofilm oluşum inhibisyonu ve olgun biyofilm inhibe edici etkinin belirlenmesi deneyleri yapılmıştır. Bu amaçla yapılan biyofilm oluşum inhibisyon deneylerinde, düşük konsantrasyonlu karışımla *S. mutans*'ın hem standart hem de klinik suşlarına karşı, kontrol grubu ile kıyaslandığında %50 oranında inhibisyon gözlenmiştir. Karışımın düşük dozunun iki katında ise bu değer yaklaşık %90'a ulaşmıştır.

Olgun biyofilm çalışmalarında ise, bu biyofilmlerin çok daha zor yok edileceği dikkate alınarak karışımın yüksek dozu hazırlanmış ve etkinlikleri incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, ilginç bir şekilde klinik suşlar üzerindeki etki, standart suşun olgun byofilmini inhibe etmek için gereken 16xMİK'lik değerden daha düşük konsantrasyonlara (8xMİK) tekabül etmektedir. Karışımın yüksek dozuna denk gelen bu konsantrasyon, hem klinik hem de standart suşların biyofilm kütlesinde yaklaşık %65'lik bir inhibisyon sağlamıştır.

Karışımın HGF-2 hücrelerine karşı sitotoksisite potansiyellerinin ölçülmesi amacıyla yapılan deneylerde karışımın düşük dozunun, kontrol hücreleri ile karşılaştırıldığında %30'luk bir toksisiteye yol açtığı, yüksek konsantrasyonunun (16xMİK) ise, hücrelerin %65'lik bir kısmını öldürdüğü görülmüştür. Bu durum, maddelerin tek başlarına oluşturdukları toksik dozlarını ifade eden CC50 değerleri ile paralellik göstermekte olup, karışımın yüksek dozu için tahmin edilebilen bir sonuçtur.

Çalışmanın son aşamasında, hazırlanan karşımın oral floranın en önemli diş çürüğü etkenlerinden *S. mutans* ve birlikte daha güçlü biyofilmler yaptıkları bilinen *C. albicans*'ın oluşturdukları miks biyofilmler üzerindeki etkileri incelenmiştir. Daha önce hastalar tarafından kullanılmış şeffaf diş plaklarının azı dişlerine tekabül eden ve nispeten daha kolay çalışma yüzeyi sağlayan kısımları kesilerek sonikatör yardımıyla üzerlerindeki kirlerden arındırılmış, alkol ile yıkanıp durulanmış ve ardından filtre kağıtları ile paketlenerek otoklavda steril hale getirilmişlerdir. Miks biyofilmlerin oluşturulması amacıyla besiyeri içerisine aseptik şartlar altında plak parçaları yerleştirilmiş, üzerlerine *S. mutans* ve *C. albicans* süspansiyonları eklenerek 24 saat boyunca inkübasyona bırakılmışlardır. Literatürde yer alan çeşitli çalışmalarda *S. mutans* ve *C. albicans* suşlarının miks biyofilmlerinin 96 kuyucuklu mikroplakta, camda ve akrilik resin yada hidroksiapatit vb yüzeylerde 24-48 saat aralığında oluşturulduğu görülmekle birlikte, şeffaf diş plakları üzerinde yapılmış başka çalışmaya rastlanmamıştır. Hazırlanan karışımın, sadece yemek yerken ve oral temizlik esnasında çıkartılan ortodontik şeffaf diş plaklarına kısa zamanda etki etmesi beklendiğinden, temas süreleri olarak farklı yeme alışkanlıklarını temsilen 15 dakika, 30 dakika, 1 saat ve 2 saat seçilmiş, ek olarak 24. saatte de örnekler alınmıştır. Her bir bakteri suşunun ayrı ayrı incelendiği bu eradikasyon deneyleri, gerek biyofimin oluşturulduğu yüzeyin

özgünlüğü gerekse maddelerin uygulandığı temas süreleri açısından da diğer çalışmalarla farklılık göstermektedir (Y. Li ve ark. 2023).

Şeffaf diş plakları üzerinde *S. mutans* standart suşu ve *C. albicans*'ın oluşturduğu miks biyofilme karşı gerçekleştirilen deneyler açıkça göstermektedir ki, karışımın düşük dozu ikinci saatten itibaren, yüksek dozu ise ilk saatten itibaren *S. mutans* sayısında yaklaşık 5-$\log_{10}$'luk bir düşüşe yol açmıştır. *C. albicans* açısından incelendiğinde ise yüksek doz, birinci saatten itibaren 5-$\log_{10}$'luk bir düşüşe yol açmış olup bu düşüş, benzer çalışmalarda yapılan olgun biyofilm deneylerinde kullanılan timol, öjenol ve tirozolün tek başlarına gösderdikleri etkiden daha yüksektir. Çalışmalarda yalnızca, tirozolün *C. albicans* üzerine tek başına olan etkisi 5-$\log_{10}$ olarak bizim kombinasyonlarımızdan daha yüksek değerde bildirilmiş olup, bu durumun tirozol deneylerinde kullanılan yüzeylerin farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Arias ve ark. 2016; Jafri ve ark. 2019; X. Li ve ark. 2019). Hazırlanan düşük dozlu konsantrasyon her ne kadar otuz dakikanın ardından sınırlı bir düşüşe sebep olsa da, 24. saatte kontrol grubu ile arasında sadece 1-$\log_{10}$'luk fark gözlenmesi, düşük dozlu karışımın *C. albicans* üzerinde anlamlı bir etki oluşturmadığını göstermektedir.

S. mutans'ın klinik suşlarıyla oluşturulan miks biyofilmlere karşı yapılan deneylerde, genel olarak standart suşla benzer sonuçlar elde edilmiş olup, özellikle yüksek dozlu karışımın birinci saatten itibaren biyofilmdeki *S. mutans* sayısında ≥4-$\log_{10}$'luk bir düşüşe yol açtığı görülmektedir. Düşük dozlu karışım ise bazı suşlara karşı benzer şekilde öldürücü etki gösterirken, diğer suşlara karşı ise daha sınırlı bir etki göstermiştir. Çalışılan suşlar arasında hazırlanan karışıma en dirençli olan üçüncü, en farklı duyarlılık paternine sahip olan ise ikinci suş olmuştur. Miks biyofilmin içerisinde yer alan *C. albicans*'a karşı karışımın yüksek dozu, biyofilmdeki bakteriye bağlı olarak değişen farklı bir etki şeması çizmiş olup, genellikle ilk saatin sonundan itibaren en fazla 2-$\log_{10}$'luk bir etki sağlarken, karışımın düşük dozunun ise *C. albicans*'a karşı etkisi yok denilebilecek kadar az bulunmuştur.

Çalışmanın son kısmında, elde edilen karışımın ortodontik şeffaf plaklar üzerindeki etkinliklerinin görsel olarak da ortaya konması amacıyla hizmet alımı ile SEM görüntülemeleri yaptırılmıştır. Bu görüntülerde, diş plaklarının üzerinde oluşturularak kontrol amacıyla kullanılan ve hiçbir antimikrobiyal madde ile muamele

edilmemiş olan miks biyofilmler net bir şekilde seçilebilmekte olup, bu biyofilmlerin içerisinde *S. mutans*'lar beklendiği gibi zincir şekilleri ile, *C. albicans* ise spesifik maya yapısında gözlemlenmektedir. Karışımın yüksek dozunun uygulandığı diş plaklarına ait görüntülerde ise, yine benzer büyütmeler kullanıldığı halde hiçbir mikroorganizma kalıntısı görülmemektedir. Çekimlerde elde edilen 80.000 büyütmeli görüntülerde mikroorganizma olmadıkları görülen yapılar hakkında daha ayrıntılı analiz gerekmekle birlikte, bunların karışım ya da biyofilmden arta kalan maddeler olabileceği düşünülmektedir. Ayrıca, karışımın uygulanmasının ardından çekilen bu görüntülerde plak üzerindeki çatlaklar da açıkça görülmekte olup bu çatlaklar, şeffaf plaklar üzerinde biyofilm oluşması için uygun yapıların bulunduğu varsayımını da desteklemektedir.

Miks biyofilmle yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar göstermektedir ki, hazırlanan karışımın yüksek konsantrasyonu, toplam altı *S. mutans* suşundan beşinde, düşük konsantrasyonu ise üçünde etkili olmuştur. Yüksek biyofilm oluşturma özelliğine göre seçilen ve balgamdan izole edilmiş olan klinik *C. albicans* suşunun sahip olduğu direnç faktörleri nedeniyle karışımdan çok fazla etkilenmediği düşünülmekle birlikte, *S. mutans* suşları ile hazırlanan miks biyofilmlerden dört tanesinde, yüksek dozlu karışım ile sayıca azaldığı görülmektedir. Düşük dozda ise bu suşa karşı etki hiçbir etki gözlemlenmemiştir. Bazı bitkilerin metanol ekstratları ile gerçekleştirilen bir çalışmada, kullanılan maddelerin *S. mutans* ve *C. albicans* suşları üzerinde eşit inhibisyon göstermediği görülmüş, *S. mutans* suşları %90 inhibe olurken, *C. albicans* için ise bu değerin %22 olarak ölçüldüğü bildirilmiştir (Choi ve ark. 2017).

Sonuç olarak, diş çürüklerinin temel sebepleri arasında gösterilen *S. mutans,* sahip olduğu asidojenite ve asite direnç faktörleri ile metabolizmal etkinliklerinin sonucu olarak diş minesini aşındırıcı laktik asit üretmektedir. Ortodontik diş plakları, diş dizilimlerini düzeltmek için kullanılan ürünlerdir ve uzun süreli kullanımları, yapılarında bozulmalara yol açarak onları oral flora elemanlarının tutunması için uygun bir hale getirmektedir. Bu çalışmada, *S. mutans* ve oluşturduğu biyofilmlere katkı sağladığı bilinen *C. albicans*'ın miks biyofilmleri, şeffaf diş plakları üzerinde oluşturulmuş ve çeşitli doğal maddelerle hazırlanan karışımın, bu biyofilmi temizlemedeki etkinliği incelenmiştir.

Borik asit, rezervlerinin büyük bir kısmı Türkiye'de bulunan önemli bir antiseptik ajandır. Çalışmanın temelinde kullanılacak etken madde olarak seçilmesinde

de bu özelliği üzerinde durulmuştur. Seçilen diğer doğal maddelerden resveratrol, özellikle bağışıklık sisteminin güçlendirilmesinde sıklıkla kullanılan bir ürün olup, epigallokateşin gallat ile birlikte sahip oldukları antimikrobiyal etkinlik nedeniyle seçilmişlerdir. Ökaliptöl ise, viskoz formuna rağmen, az miktarda dahi olsa karışıma dahil edilerek bir ağız bakım ürününün sahip olması gereken özelliklerden olan hoş koku ve ferahlatıcılığı sağlamıştır. Nihayetinde elde edilen karışım bu çalışmaya özel olup, yeni ve etkili bir ağız bakım ürününün temelinin atıldığı düşünülmektedir. İlerleyen çalışmalarda içerikteki maddelerin belirlenen konsantrasyonlarda bir araya getirilmesi ile toksik olmayan özgün bir formülasyon geliştirilerek efervesan forma getirilmesi ve patentlenmesi konusundaki çalışmalara devam edilecektir. Bu noktada özellikle vurgulamak isteriz ki; miks biyofilm çalışmaları ile şeffaf diş plakları üzerindeki olgun biyofilmlere karşı karışımımız 16xMİK konsantrasyonda denenerek yüksek bir etkinlik elde edilmiştir. Hazırlanacak olan ve günlük kullanıma uygun olması planlanan ürünün, ortodontik plaklar ilk alındığı andan itibaren düzenli olarak kullanılması durumunda, biyofilm inhibisyon deneylerinde de görüldüğü gibi, henüz biyofilm oluşmadan uygulanması ile plaklar üzerindeki biyofilmlerin muhtemelen hiç oluşmayacağı düşünülmekte ve hedeflenmektedir.

KAYNAKLAR

- Abdelraheem, W. M., Refaie, M. M. M., Yousef, R. K. M., Abd El Fatah, A. S., Mousa, Y. M., & Rashwan, R. (2022). Assessment of Antibacterial and Anti-biofilm Effects of Vitamin C Against Pseudomonas aeruginosa Clinical Isolates. *Frontiers in Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.847449
- Abranches, J., Zeng, L., Kajfasz, J. K., Palmer, S. R., Chakraborty, B., Wen, Z. T., Richards, V. P., Brady, L. J., & Lemos, J. A. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology Spectrum*, *6*(5). https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018
- Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., & Ferretti, J. J. (2002). Genome sequence of Streptococcus mutans UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(22), 14434-14439. https://doi.org/10.1073/pnas.172501299
- Alexa, V. T., Galuscan, A., Popescu, I., Tirziu, E., Obistioiu, D., Floare, A. D., Perdiou, A., & Jumanca, D. (2019). Synergistic/Antagonistic Potential of Natural Preparations Based on Essential Oils Against Streptococcus mutans from the Oral Cavity. *Molecules*, *24*(22), Article 22. https://doi.org/10.3390/molecules24224043
- Alotaibi, G. F., & Bukhari, M. A. (2021). Factors Influencing Bacterial Biofilm Formation and Development. *American Journal of Biomedical Science & Research*, *12*(6), 617.
- Altamura, S., Del Pinto, R., Pietropaoli, D., & Ferri, C. (2024). Oral health as a modifiable risk factor for cardiovascular diseases. *Trends in Cardiovascular Medicine*, *34*(4), 267-275. https://doi.org/10.1016/j.tcm.2023.03.003
- Andrighetti-Fröhner, C. R., Antonio, R. V., Creczynski-Pasa, T. B., Barardi, C. R. M., & Simões, C. M. O. (2003). Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by Chromobacterium violaceum. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *98*, 843-848. https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000600023
- Api, A. M., Belsito, D., Bhatia, S., Bruze, M., Calow, P., Dagli, M. L., Dekant, W., Fryer, A. D., Kromidas, L., La Cava, S., Lalko, J. F., Lapczynski, A., Liebler, D. C., Miyachi, Y., Politano, V. T., Ritacco, G., Salvito, D., Schultz, T. W., Shen, J., … Wilcox, D. K. (2016). RIFM fragrance ingredient safety assessment, Eugenol, CAS Registry Number 97-53-0. *Food and Chemical Toxicology*, *97*, S25-S37. https://doi.org/10.1016/j.fct.2015.12.013
- Aragão, M. G. B., Aires, C. P., & Corona, S. A. M. (2022). Effects of the green tea catechin epigallocatechin-3-gallate on Streptococcus mutans planktonic cultures and biofilms: Systematic literature review of in vitro studies. *Biofouling*, *38*(7), 687-695. https://doi.org/10.1080/08927014.2022.2116320
- Aragão, M. G. B., He, X., Aires, C. P., & Corona, S. A. M. (2024). Epigallocatechin gallate reduces the virulence of cariogenic *Streptococcus mutans* biofilm by affecting the synthesis of biofilm matrix components. *Archives of Oral Biology*, *164*, 105990. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2024.105990
- ARGIN, S., GÜLERİM, M., & ŞAHİN, F. (2019). Development of antimicrobial gelatin films with boron derivatives. *Turkish Journal of Biology*, *43*(1), 47-57. https://doi.org/10.3906/biy-1807-181

- Arias, L. S., Delbem, A. C. B., Fernandes, R. A., Barbosa, D. B., & Monteiro, D. R. (2016). Activity of tyrosol against single and mixed-species oral biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, *120*(5), 1240-1249. https://doi.org/10.1111/jam.13070
- Asma, S. T., Imre, K., Morar, A., Herman, V., Acaroz, U., Mukhtar, H., Arslan-Acaroz, D., Shah, S. R. A., & Gerlach, R. (2022). An Overview of Biofilm Formation–Combating Strategies and Mechanisms of Action of Antibiofilm Agents. *Life*, *12*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/life12081110
- Athar, M., Back, J. H., Tang, X., Kim, K. H., Kopelovich, L., Bickers, D. R., & Kim, A. L. (2007). Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicology and Applied Pharmacology*, *224*(3), 274-283. https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.12.025
- Austin, A., & Sunila, V. (2009). Antioxidant Potential of Eugenia jambolana Lam. Seeds. *Journal of Biological Sciences*, *9*. https://doi.org/10.3923/jbs.2009.894.898
- Azimi, S., Klementiev, A. D., Whiteley, M., & Diggle, S. P. (2020). Bacterial Quorum Sensing During Infection. *Annual Review of Microbiology*, *74*(Volume 74, 2020), 201-219. https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032020-093845
- Baker, J. L., & Edlund, A. (2019). Exploiting the Oral Microbiome to Prevent Tooth Decay: Has Evolution Already Provided the Best Tools? *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03323
- Baker, J. l., Faustoferri, R. c., & Quivey Jr, 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. https://doi.org/10.1111/omi.12162
- Balhaddad, A. A., & AlSheikh, R. N. (2023). Effect of eucalyptus oil on Streptococcus mutans and Enterococcus faecalis growth. *BDJ Open*, *9*(1), 1-5. https://doi.org/10.1038/s41405-023-00154-8
- Banas, J. A., & Drake, D. R. (2018). Are the mutans streptococci still considered relevant to understanding the microbial etiology of dental caries? *BMC Oral Health*, *18*(1), 129. https://doi.org/10.1186/s12903-018-0595-2
- Banavar Ravi, S., Nirupad, S., Chippagiri, P., & Pandurangappa, R. (2017). Antibacterial Effects of Natural Herbal Extracts on Streptococcus mutans: Can They Be Potential Additives in Dentifrices? *International Journal of Dentistry*, *2017*(1), 4921614. https://doi.org/10.1155/2017/4921614
- Barani-Sveçla, M., Buleshkaj, S., Barani-Sveçla, M., & Buleshkaj, S. (2024). Etiopathogenesis of Dental Caries. Içinde *Enamel and Dentin-Pulp Complex*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/intechopen.114225
- Barbosa, L. C. A., Filomeno, C. A., & Teixeira, R. R. (2016). Chemical Variability and Biological Activities of Eucalyptus spp. Essential Oils. *Molecules*, *21*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/molecules21121671
- Bascones-Martínez, A., Muñoz-Corcuera, M., Noronha, S., Mota, P., Bascones-Ilundain, C., & Campo-Trapero, J. (2009). Host defence mechanisms against bacterial aggression in periodontal disease: Basic mechanisms. *Medicina Oral, Patologia Oral Y Cirugia Bucal*, *14*(12), e680-685. https://doi.org/10.4317/medoral.14.e680
- Baur, J. A., Pearson, K. J., Price, N. L., Jamieson, H. A., Lerin, C., Kalra, A., Prabhu, V. V., Allard, J. S., Lopez-Lluch, G., Lewis, K., Pistell, P. J., Poosala, S., Becker, K. G., Boss, O., Gwinn, D., Wang, M., Ramaswamy, S., Fishbein, K. W., Spencer, R. G., … Sinclair, D. A. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature*, *444*(7117), 337-342. https://doi.org/10.1038/nature05354

- Baybekov, O., Stanishevskiy, Y., Sachivkina, N., Bobunova, A., Zhabo, N., & Avdonina, M. (2023). Isolation of Clinical Microbial Isolates during Orthodontic Aligner Therapy and Their Ability to Form Biofilm. *Dentistry Journal*, *11*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/dj11010013
- Ben Gassem, A. A. (2022). Does Clear Aligner Treatment Result in Different Patient Perceptions of Treatment Process and Outcomes Compared to Conventional/Traditional Fixed Appliance Treatment: A Literature Review. *European Journal of Dentistry*, *16*(2), 274-285. https://doi.org/10.1055/s-0041-1739441
- Benkovic, S. J., Baker, S. J., Alley, M. R. K., Woo, Y.-H., Zhang, Y.-K., Akama, T., Mao, W., Baboval, J., Rajagopalan, P. T. R., Wall, M., Kahng, L. S., Tavassoli, A., & Shapiro, L. (2005). Identification of Borinic Esters as Inhibitors of Bacterial Cell Growth and Bacterial Methyltransferases, CcrM and MenH. *Journal of Medicinal Chemistry*, *48*(23), 7468-7476. https://doi.org/10.1021/jm050676a
- Berger, D., Rakhamimova, A., Pollack, A., & Loewy, Z. (2018). Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High-Throughput*, *7*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/ht7030024
- Bernardi, S., Angelone, A. M., & Macchiarelli, G. (2022). Anatomy in dentistry: From the beginnings to contemporary reality. *Clinical Anatomy*, *35*(6), 711-722. https://doi.org/10.1002/ca.23869
- Boran, R., Baygar, T., Saraç, N., Ayrıkçil, S., Yılmaz, D., & Uğur, A. (2023). Antimicrobial, antifibrinolytic, enzyme inhibitory and wound healing properties of zinc borate. *Journal of Boron*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.30728/boron.1180847
- Bowen, W. H., & Koo, H. (2011). Biology of Streptococcus mutans- Derived Glucosyltransferases: Role in Extracellular Matrix Formation of Cariogenic Biofilms. *Caries Research*, *45*(1), 69-86. https://doi.org/10.1159/000324598
- Bräscher, A.-K., Zuran, D., Feldmann, R. E., & Benrath, J. (2016). Patient survey on Invisalign® treatment comparen the SmartTrack® material to the previous aligner material. *Journal of Orofacial Orthopedics / Fortschritte Der Kieferorthopädie*, *77*(6), 432-438. https://doi.org/10.1007/s00056-016-0051-3
- Bridier, A., & Briandet, R. (2022). Microbial Biofilms: Structural Plasticity and Emerging Properties. *Microorganisms*, *10*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/microorganisms10010138
- Buzalaf, M. A. R., Hannas, A. R., & Kato, M. T. (2012). Saliva and dental erosion. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, *20*(5), 493-502. https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000500001
- Cai, Z.-M., Peng, J.-Q., Chen, Y., Tao, L., Zhang, Y.-Y., Fu, L.-Y., Long, Q.-D., & Shen, X.-C. (2021). 1,8-Cineole: A review of source, biological activities, and application. *Journal of Asian Natural Products Research*, *23*(10), 938-954. https://doi.org/10.1080/10286020.2020.1839432
- Calderone, R. A., & Fonzi, W. A. (2001). Virulence factors of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, *9*(7), 327-335. https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7
- Carneiro, V. A., Furtado, E. de F., Silva, M. L., Silva, R. L., Fidelis, Q. C., & JÃºnior, F. E. A. C. (2019). Inhibition of Streptococcus mutans (ATCC 25175) biofilm formation on eugenol-impregnated surgical sutures. *African Journal of Microbiology Research*, *13*(9), 168-175. https://doi.org/10.5897/AJMR2018.9044
- Carvalho, M. F. N. N. (2022). Synthesis and Biological Activity of Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, *11*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/antibiotics11030337

- CELEBI, D., CELEBI, O., Başer, S., & Taghizadehghalehjoughi, A. (2023). Investigation of the antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of boron compounds in a Streptococcus mitis infection model on HepG2 liver cell. *Journal of Research in Pharmacy*, *27(6)*, 2277-2284. https://doi.org/10.29228/jrp.516
- Chacko, S. M., Thambi, P. T., Kuttan, R., & Nishigaki, I. (2010). Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chinese Medicine*, *5*(1), 13. https://doi.org/10.1186/1749-8546-5-13
- Charavet, C., Gourdain, Z., Graveline, L., & Lupi, L. (2022). Cleaning and Disinfection Protocols for Clear Orthodontic Aligners: A Systematic Review. *Healthcare*, *10*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/healthcare10020340
- Chauhan, A. K., Singh, S. P., Yadav, B., Khatri, S., & Husen, A. (2023). Chapter 6—Smart nanomaterials and control of biofilms. İçinde A. Husen & K. S. Siddiqi (Ed.), *Advances in Smart Nanomaterials and their Applications* (ss. 109-125). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99546-7.00001-X
- Choi, H.-A., Cheong, D.-E., Lim, H.-D., Kim, W.-H., Ham, M.-H., Oh, M.-H., Wu, Y., Shin, H.-J., & Kim, G.-J. (2017). *Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of the Methanol Extracts of Medicinal Plants against Dental Pathogens Streptococcus mutans and Candida albicans*. *27*(7), 1242-1248. https://doi.org/10.4014/jmb.1701.01026
- Clark, M. B., Slayton, R. L., SECTION ON ORAL HEALTH, Segura, A., Boulter, S., Clark, M. B., Gereige, R., Krol, D., Mouradian, W., Quinonez, R., Ramos-Gomez, F., Slayton, R. L., & Keels, M. A. (2014). Fluoride Use in Caries Prevention in the Primary Care Setting. *Pediatrics*, *134*(3), 626-633. https://doi.org/10.1542/peds.2014-1699
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (M100-S26). 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2000) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptbility Testing of Yeasts; Approved Standart M27-A NCCLS, Wayne, Pennsylvania.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antifungal susceptibility testing of yeasts (M27-S4). 2023
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2023). M100: Performance standards for antimicrobial susceptibility testing (33rd ed.). Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Collado-González, M., Guirao-Abad, J. P., Sánchez-Fresneda, R., Belchí-Navarro, S., & Argüelles, J.-C. (2012). Resveratrol lacks antifungal activity against Candida albicans. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(6), 2441-2446. https://doi.org/10.1007/s11274-012-1042-1
- Coskun, H. S., Kehribar, L., Surucu, S., Aydin, M., Mahirogullari, M., Coşkun, H. S., Sr, L. K., Surucu, S., Aydın, M., & Mahiroğulları, M. (2022). Antibacterial Effects of Sodium Borate and Calcium Borate Based Polymeric Coatings for Orthopedic Implants. *Cureus*, *14*. https://doi.org/10.7759/cureus.22173
- Costa Oliveira, B. E., Ricomini Filho, A. P., Burne, R. A., & Zeng, L. (2021). The Route of Sucrose Utilization by Streptococcus mutans Affects Intracellular Polysaccharide Metabolism. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.636684
- Cui, X., Jin, Y., Hofseth, A. B., Pena, E., Habiger, J., Chumanevich, A., Poudyal, D., Nagarkatti, M., Nagarkatti, P. S., Singh, U. P., & Hofseth, L. J. (2010). Resveratrol

Suppresses Colitis and Colon Cancer Associated with Colitis. *Cancer Prevention Research*, *3*(4), 549-559. https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-09-0117

- Çelikezen, F. Ç., & Şahin, İ. H. (2023). Investigation of Antimicrobial and Antifungal Effects of Some Boron Compounds. *Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Dergisi*, *12*(3), Article 3. https://doi.org/10.17798/bitlisfen.1197472
- da Silva, F. F. M., Monte, F. J. Q., de Lemos, T. L. G., do Nascimento, P. G. G., de Medeiros Costa, A. K., & de Paiva, L. M. M. (2018). Eugenol derivatives: Synthesis, characterization, and evaluation of antibacterial and antioxidant activities. *Chemistry Central Journal*, *12*(1), 34. https://doi.org/10.1186/s13065-018-0407-4
- Das, B. C., Nandwana, N. K., Das, S., Nandwana, V., Shareef, M. A., Das, Y., Saito, M., Weiss, L. M., Almaguel, F., Hosmane, N. S., & Evans, T. (2022). Boron Chemicals in Drug Discovery and Development: Synthesis and Medicinal Perspective. *Molecules*, *27*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/molecules27092615
- de Almeida, M. R., de Almeida, R. R., Conti, A. C. de C. F., Navarro, R. de L., Correa, G. de O., de Oliveira, C. A., & Oltramari, P. V. P. (2006). Long-term stability of an anterior open-bite malocclusion treated in the mixed dentition: A case report. *Journal of Applied Oral Science: Revista FOB*, *14*(6), 470-475. https://doi.org/10.1590/s1678-77572006000600015
- de Carvalho, F. G., Silva, D. S., Hebling, J., Spolidorio, L. C., & Spolidorio, D. M. P. (2006). Presence of mutans streptococci and Candida spp. In dental plaque/dentine of carious teeth and early childhood caries. *Archives of Oral Biology*, *51*(11), 1024-1028. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2006.06.001
- de Cássia da Silveira E Sá, R., Lima, T. C., da Nóbrega, F. R., de Brito, A. E. M., & de Sousa, D. P. (2017). Analgesic-Like Activity of Essential Oil Constituents: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(12), 2392. https://doi.org/10.3390/ijms18122392
- De Seta, F., Schmidt, M., Vu, B., Essmann, M., & Larsen, B. (2009). Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of Candida vaginitis. The Journal of antimicrobial chemotherapy, 63(2), 325–336. https://doi.org/10.1093/jac/dkn486
- de Oliveira, J. R., de Jesus, D., Figueira, L. W., de Oliveira, F. E., Pacheco Soares, C., Camargo, S. E. A., Jorge, A. O. C., & de Oliveira, L. D. (2017). Biological activities of Rosmarinus officinalis L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Experimental Biology and Medicine*, *242*(6), 625-634. https://doi.org/10.1177/1535370216688571
- de Oliveira, R. V. D., Bonafé, F. S. S., Spolidorio, D. M. P., Koga-Ito, C. Y., de Farias, A. L., Kirker, K. R., James, G. A., & Brighenti, F. L. (2020). Streptococcus mutans and Actinomyces naeslundii Interaction in Dual-Species Biofilm. *Microorganisms*, *8*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020194
- de Vos, W. M., Tilg, H., Van Hul, M., & Cani, P. D. (2022). Gut microbiome and health: Mechanistic insights. *Gut*, *71*(5), 1020-1032. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2021-326789
- Deshmukh, A. S., & Shelke, P. R. D. and S. J. (2019). Estimation of Antibacterial activity of Crude Extracts of Thevetia Peruviana. *International Journal of Microbiology and Current Research*, *1*(1), 23-25. https://doi.org/10.18689/ijmr-1000104
- Díaz-García, J., Arendrup, M. C., Cantón, R., García-Rodríguez, J., Gómez, A., Gómez, E., Orden, B., Parisi, G., Pemán, J., Posteraro, B., Sanguinetti, M., Da Matta, D. A., Colombo, A. L., Muñoz, P., Sánchez-Carrillo, C., Guinea, J., & Escribano, P. (2020).

Candidemia Candida albicans clusters have higher tendency to form biofilms than singleton genotypes†. Medical mycology, 58(7), 887–895. https://doi.org/10.1093/mmy/myaa002

- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(9), 881-890. https://doi.org/10.3201/eid0809.020063
- Dosler, S., & Karaaslan, E. (2014). Inhibition and destruction of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by antibiotics and antimicrobial peptides. *Peptides*, *62*, 32-37. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.021
- Dosler, S., Karaaslan, E., & Alev Gerceker, A. (2016). Antibacterial and anti-biofilm activities of melittin and colistin, alone and in combination with antibiotics against Gram-negative bacteria. Journal of Chemotherapy, 28(2), 95–103. https://doi.org/10.1179/1973947815Y.0000000004
- Dutt, Y., Dhiman, R., Singh, T., Vibhuti, A., Gupta, A., Pandey, R. P., Raj, V. S., Chang, C.-M., & Priyadarshini, A. (2022). The Association between Biofilm Formation and Antimicrobial Resistance with Possible Ingenious Bio-Remedial Approaches. *Antibiotics*, *11*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/antibiotics11070930
- El Othmany, R., Zahir, H., Ellouali, M., & Latrache, H. (2021). Current Understanding on Adhesion and Biofilm Development in Actinobacteria. *International Journal of Microbiology*, *2021*, 6637438. https://doi.org/10.1155/2021/6637438
- El-Batal, A. I., El-Sayyad, G. S., Al-Hazmi, N. E., & Gobara, M. (2019). Antibiofilm and Antimicrobial Activities of Silver Boron Nanoparticles Synthesized by PVP Polymer and Gamma Rays Against Urinary Tract Pathogens. *Journal of Cluster Science*, *30*(4), 947-964. https://doi.org/10.1007/s10876-019-01553-4
- Elevli, B., Yaman, İ., & Laratte, B. (2022). Estimation of the Turkish Boron Exportation to Europe. *Mining*, *2*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/mining2020009
- Eliopoulos, G. and Moellering Jr., R.C. (1996) Antimicrobial Combinations. In: Lorian, V., Ed., Antibiotics in Laboratory Medicine, the Williams & Wilkins Co., Baltimore, 330-396.
- Eliuz, E. (2020). Antimicrobial activity of citric acid against Escherichia coli, Staphylococcus aureus and Candida albicans as a sanitizer agent. *Eurasian Journal of Forest Science*, *8*(3), Article 3. https://doi.org/10.31195/ejejfs.787021
- Engel, A.-S., Kranz, H. T., Schneider, M., Tietze, J. P., Piwowarcyk, A., Kuzius, T., Arnold, W., & Naumova, E. A. (2020). Biofilm formation on different dental restorative materials in the oral cavity. *BMC Oral Health*, *20*(1), 162. https://doi.org/10.1186/s12903-020-01147-x
- Estevez-Fregoso, E., Farfán-García, E. D., García-Coronel, I. H., Martínez-Herrera, E., Alatorre, A., Scorei, R. I., & Soriano-Ursúa, M. A. (2021). Effects of boron-containing compounds in the fungal kingdom. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *65*, 126714. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2021.126714
- Falsetta, M. L., Klein, M. I., Colonne, P. M., Scott-Anne, K., Gregoire, S., Pai, C.-H., Gonzalez-Begne, M., Watson, G., Krysan, D. J., Bowen, W. H., & Koo, H. (2014). Symbiotic Relationship between Streptococcus mutans and Candida albicans Synergizes Virulence of Plaque Biofilms In Vivo. *Infection and Immunity*, *82*(5), 1968-1981. https://doi.org/10.1128/iai.00087-14
- Farfán-García, E. D., Kilic, A., García-Machorro, J., Cuevas-Galindo, M. E., Rubio-Velazquez, B. A., García-Coronel, I. H., Estevez-Fregoso, E., Trujillo-Ferrara, J. G., & Soriano-Ursúa, M. A. (2023a). Chapter 58—Antimicrobial (viral, bacterial, fungal, and parasitic) mechanisms of action of boron-containing compounds. İçinde D.

Bagchi, A. Das, & B. W. Downs (Ed.), *Viral, Parasitic, Bacterial, and Fungal Infections* (ss. 733-754). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-85730-7.00026-6

- Featherstone, J. (2008). Dental caries: A dynamic disease process. *Australian Dental Journal*, *53*(3), 286-291. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x
- Ferreres, G., Ivanova, K., Ivanov, I., & Tzanov, T. (2023). Nanomaterials and Coatings for Managing Antibiotic-Resistant Biofilms. *Antibiotics*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020310
- Fozo, E. M., & 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. https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.929-936.2004
- Frencken, J. E., Peters, M. C., Manton, D. J., Leal, S. C., Gordan, V. V., & Eden, E. (2012). Minimal intervention dentistry for managing dental caries – a review: Report of a FDI task group*. *International Dental Journal*, *62*(5), 223-243. https://doi.org/10.1111/idj.12007
- Friedman, M., Henika, P. R., Levin, C. E., Mandrell, R. E., & Kozukue, N. (2006). Antimicrobial Activities of Tea Catechins and Theaflavins and Tea Extracts against *Bacillus cereus*†. *Journal of Food Protection*, *69*(2), 354-361. https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.2.354
- Galeotti, N., Di Cesare Mannelli, L., Mazzanti, G., Bartolini, A., & Ghelardini, C. (2002). Menthol: A natural analgesic compound. *Neuroscience Letters*, *322*(3), 145-148. https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02527-7
- Gavilanes-Martínez, M. A., Coral-Garzón, A., Cáceres, D. H., & García, A. M. (2021). Antifungal activity of boric acid, triclosan and zinc oxide against different clinically relevant Candida species. *Mycoses*, *64*(9), 1045-1052. https://doi.org/10.1111/myc.13302
- Ghannoum, M. A. (2000). Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical Microbiology Reviews*, *13*(1), 122-143, table of contents. https://doi.org/10.1128/CMR.13.1.122
- Gow, N. A. R., van de Veerdonk, F. L., Brown, A. J. P., & Netea, M. G. (2012). Candida albicans morphogenesis and host defence: Discriminating invasion from colonization. *Nature Reviews Microbiology*, *10*(2), 112-122. https://doi.org/10.1038/nrmicro2711
- Gracco, A., Mazzoli, A., Favoni, O., Conti, C., Ferraris, P., Tosi, G., & Guarneri, M. P. (2009). Short-term chemical and physical changes in invisalign appliances. *Australian Orthodontic Journal*, *25*(1), 34-40.
- Gupta, P., Pruthi, V., & Poluri, K. M. (2021). Mechanistic insights into Candida biofilm eradication potential of eucalyptol. *Journal of Applied Microbiology*, *131*(1), 105-123. https://doi.org/10.1111/jam.14940
- Hacioglu, M., Oyardi, O., Bozkurt-Guzel, C., & Savage, P. B. (2020). Antibiofilm activities of ceragenins and antimicrobial peptides against fungal-bacterial mono and multispecies biofilms. The Journal of antibiotics, 73(7), 455–462. https://doi.org/10.1038/s41429-020-0299-0
- Hajishengallis, G., Krauss, J. L., Liang, S., McIntosh, M. L., & Lambris, J. D. (2012). Pathogenic microbes and community service through manipulation of innate immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *946*, 69-85. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0106-3_5

- Hall, D. G. (2005). Structure, Properties, and Preparation of Boronic Acid Derivatives. Overview of Their Reactions and Applications. Içinde *Boronic Acids* (ss. 1-99). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/3527606548.ch1
- Hall, M. J., Middleton, R. F., & Westmacott, D. (1983). The fractional inhibitory concentration (FIC) index as a measure of synergy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *11*(5), 427-433. https://doi.org/10.1093/jac/11.5.427
- Han, S., Abiko, Y., Washio, J., Luo, Y., Zhang, L., & Takahashi, N. (2021). Green Tea-Derived Epigallocatechin Gallate Inhibits Acid Production and Promotes the Aggregation of Streptococcus mutans and Non-Mutans Streptococci. *Caries Research*, *55*(3), 205-214. https://doi.org/10.1159/000515814
- Hashemabadi, D., Liavali, M. H., Kaviani, B., Mousavi, M., Keyghobadi, S., & Zahiri, S. (2014). Effect of nano-silver and boric acid on extending the vase life of cut rose (Rosa hybrida L.). *Journal of Environmental Biology*, *35*(5), 833-838.
- He, Z., Huang, Z., Jiang, W., & Zhou, W. (2019). Antimicrobial Activity of Cinnamaldehyde on Streptococcus mutans Biofilms. *Frontiers in Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02241
- Hernandez-Patlan, D., Solis-Cruz, B., Pontin, K. P., Latorre, J. D., Baxter, M. F. A., Hernandez-Velasco, X., Merino-Guzman, R., Méndez-Albores, A., Hargis, B. M., Lopez-Arellano, R., & Tellez, G. (2018). Evaluation of a Solid Dispersion of Curcumin With Polyvinylpyrrolidone and Boric Acid Against Salmonella Enteritidis Infection and Intestinal Permeability in Broiler Chickens: A Pilot Study. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01289
- Higgins, E. L., Payne, S., & Ulrich, S. (2018). Towards the Evaluation of Quorum Sensing Signal Synthase Inhibitors. *The FASEB Journal*, *32*(S1), 796.11-796.11. https://doi.org/10.1096/fasebj.2018.32.1_supplement.796.11
- Hoen, B., & Duval, X. (2013). Clinical practice. Infective endocarditis. *The New England Journal of Medicine*, *368*(15), 1425-1433. https://doi.org/10.1056/NEJMcp1206782
- Hoyer, L. L., Green, C. B., Oh, S.-H., & Zhao, X. (2008). Discovering the secrets of the Candida albicans agglutinin-like sequence (ALS) gene family—A sticky pursuit. *Medical Mycology*, *46*(1), 1-15. https://doi.org/10.1080/13693780701435317
- Hrast, M. (2022). Design and Preparation of Antimicrobial Agents. *Antibiotics*, *11*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics11121778
- Huang, R., Li, M., & Gregory, R. L. (2011). Bacterial interactions in dental biofilm. *Virulence*, *2*(5), 435-444. https://doi.org/10.4161/viru.2.5.16140
- Huang, Y., Qin, F., Li, S., Yin, J., Hu, L., Zheng, S., He, L., Xia, H., Liu, J., & Hu, W. (2022). The mechanisms of biofilm antibiotic resistance in chronic rhinosinusitis: A review. *Medicine*, *101*(49), e32168. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000032168
- Huffines, J. T., & Scoffield, J. A. (2020). Disruption of Streptococcus mutans and Candida albicans synergy by a commensal streptococcus. *Scientific Reports*, *10*(1), 19661. https://doi.org/10.1038/s41598-020-76744-5
- Hutchings, M. I., Truman, A. W., & Wilkinson, B. (2019). Antibiotics: Past, present and future. *Current Opinion in Microbiology*, *51*, 72-80. https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008
- Imlay, J. A. (2013). The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: Lessons from a model bacterium. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(7), 443-454. https://doi.org/10.1038/nrmicro3032

- Jafri, H., Banerjee, G., Khan, M. S. A., Ahmad, I., Abulreesh, H. H., & Althubiani, A. S. (2020). Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of Candida albicans and Streptococcus mutans. *AMB Express*, *10*(1), 185. https://doi.org/10.1186/s13568-020-01123-2
- Jafri, H., Khan, M. S. A., & Ahmad, I. (2019). In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of Candida albicans and Streptococcus mutans. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, *54*, 206-213. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.005
- Jakubovics, N. S., Goodman, S. D., Mashburn-Warren, L., Stafford, G. P., & Cieplik, F. (2021). The dental plaque biofilm matrix. *Periodontology 2000*, *86*(1), 32-56. https://doi.org/10.1111/prd.12361
- James, P., Worthington, H. V., Parnell, C., Harding, M., Lamont, T., Cheung, A., Whelton, H., & Riley, P. (2017). Chlorhexidine mouthrinse as an adjunctive treatment for gingival health. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, *3*(3), CD008676. https://doi.org/10.1002/14651858.CD008676.pub2
- Jiang, X., Feng, K., & Yang, X. (2015). In vitro Antifungal Activity and Mechanism of Action of Tea Polyphenols and Tea Saponin against Rhizopus stolonifer. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, *25*(4), 269-276. https://doi.org/10.1159/000430866
- Jiang, Y., Geng, M., & Bai, L. (2020). Targeting Biofilms Therapy: Current Research Strategies and Development Hurdles. *Microorganisms*, *8*(8), Article 8. https://doi.org/10.3390/microorganisms8081222
- Jubair, N., R., M., Fatima, A., Mahdi, Y. K., & Abdullah, N. H. (2022). Evaluation of Catechin Synergistic and Antibacterial Efficacy on Biofilm Formation and acrA Gene Expression of Uropathogenic E. coli Clinical Isolates. *Antibiotics*, *11*(9), Article 9. https://doi.org/10.3390/antibiotics11091223
- Kajfasz, J. K., Ganguly, T., Hardin, E. L., Abranches, J., & Lemos, J. A. (2017). Transcriptome responses of Streptococcus mutans to peroxide stress: Identification of novel antioxidant pathways regulated by Spx. *Scientific Reports*, *7*(1), 16018. https://doi.org/10.1038/s41598-017-16367-5
- Kamarehei, F., Mehdiabadi, M., & Naderi, F. (2022). Antibacterial effects of natural compounds on biofilm formation of Streptococcus mutans. *Clinical and Experimental Dental Research*, *8*(6), 1426-1433. https://doi.org/10.1002/cre2.673
- Kamatou, G. P. P., Vermaak, I., Viljoen, A. M., & Lawrence, B. M. (2013). Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties. *Phytochemistry*, *96*, 15-25. https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2013.08.005
- Kamiya, R. U., Taiete, T., & Gonçalves, R. B. (2011). Mutacins of Streptococcus mutans. *Brazilian Journal of Microbiology*, *42*, 1248-1258. https://doi.org/10.1590/S1517-83822011000400001
- Kaplan, J. B. (2010). Biofilm dispersal: Mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *Journal of Dental Research*, *89*(3), 205-218. https://doi.org/10.1177/0022034509359403
- Khan, F., Pham, D. T. N., Oloketuyi, S. F., & Kim, Y. M. (2020). Antibiotics Application Strategies to Control Biofilm Formation in Pathogenic Bacteria. Current pharmaceutical biotechnology, 21(4), 270–286. https://doi.org/10.2174/1389201020666191112155905
- Khan, S. T., Khan, M., Ahmad, J., Wahab, R., Abd-Elkader, O. H., Musarrat, J., Alkhathlan, H. Z., & Al-Kedhairy, A. A. (2017). Thymol and carvacrol induce

autolysis, stress, growth inhibition and reduce the biofilm formation by Streptococcus mutans. *AMB Express*, *7*(1), 49. https://doi.org/10.1186/s13568-017-0344-y

- Khatoon, Z., McTiernan, C. D., Suuronen, E. J., Mah, T.-F., & Alarcon, E. I. (2018). Bacterial biofilm formation on implantable devices and approaches to its treatment and prevention. *Heliyon*, *4*(12), e01067. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e01067
- Kiatwarawut, K., Rokaya, D., & Sirisoontorn, I. (2022). Antimicrobial Activity of Various Disinfectants to Clean Thermoplastic Polymeric Appliances in Orthodontics. *Polymers*, *14*(11), Article 11. https://doi.org/10.3390/polym14112256
- Kim, D., Sengupta, A., Niepa, T. H. R., Lee, B.-H., Weljie, A., Freitas-Blanco, V. S., Murata, R. M., Stebe, K. J., Lee, D., & Koo, H. (2017). Candida albicans stimulates Streptococcus mutans microcolony development via cross-kingdom biofilm-derived metabolites. *Scientific Reports*, *7*(1), 41332. https://doi.org/10.1038/srep41332
- Kolenbrander, P. E., Palmer, R. J., Rickard, A. H., Jakubovics, N. S., Chalmers, N. I., & Diaz, P. I. (2006). Bacterial interactions and successions during plaque development. *Periodontology 2000*, *42*, 47-79. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00187.x
- Kong, C., Zhang, H., Li, L., & Liu, Z. (2022). Effects of green tea extract epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on oral disease-associated microbes: A review. *Journal of Oral Microbiology*, *14*(1), 2131117. https://doi.org/10.1080/20002297.2022.2131117
- Koo, H., Falsetta, M. L., & Klein, M. I. (2013). The exopolysaccharide matrix: A virulence determinant of cariogenic biofilm. *Journal of Dental Research*, *92*(12), 1065-1073. https://doi.org/10.1177/0022034513504218
- Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I., & 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. https://doi.org/10.1128/jb.01649-09
- Kramer, A., & Splieth, C. (2022). Health promotion through structured oral hygiene and good tooth alignment. *GMS Hygiene and Infection Control*, *17*, Doc08. https://doi.org/10.3205/dgkh000411
- Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). Competition and Coexistence between Streptococcus mutans and Streptococcus sanguinis in the Dental Biofilm. *Journal of Bacteriology*, *187*(21), 7193-7203. https://doi.org/10.1128/jb.187.21.7193-7203.2005
- Krukiewicz, K., Kazek-Kęsik, A., Brzychczy-Włoch, M., Łos, M. J., Ateba, C. N., Mehrbod, P., Ghavami, S., & Shyntum, D. Y. (2022). Recent Advances in the Control of Clinically Important Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/ijms23179526
- Krzyściak, W., Kościelniak, D., Papież, M., Jurczak, A., & Vyhouskaya, P. (2017). Methods of Biotyping of Streptococcus mutans Species with the Routine Test as a Prognostic Value in Early Childhood Caries. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2017*(1), 6859543. https://doi.org/10.1155/2017/6859543
- Kurtzman, G. M., Horowitz, R. A., Johnson, R., Prestiano, R. A., & Klein, B. I. (2022). The systemic oral health connection: Biofilms. *Medicine*, *101*(46), e30517. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000030517
- Landeo-Villanueva, G. E., Salazar-Salvatierra, M. E., Ruiz-Quiroz, J. R., Zuta-Arriola, N., Jarama-Soto, B., Herrera-Calderon, O., Pari-Olarte, J. B., & Loyola-Gonzales, E. (2023). Inhibitory Activity of Essential Oils of Mentha spicata and Eucalyptus globulus on Biofilms of Streptococcus mutans in an In Vitro Model. *Antibiotics*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020369

- Lata, M., Sharma, D., Deo, N., Tiwari, P. K., Bisht, D., & Venkatesan, K. (2015). Proteomic analysis of ofloxacin-mono resistant Mycobacterium tuberculosis isolates. *Journal of Proteomics*, *127*(Pt A), 114-121. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.07.031
- Lee, S., Razqan, G. S. A., & Kwon, D. H. (2017). Antibacterial activity of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) and its synergism with β-lactam antibiotics sensitizing carbapenem-associated multidrug resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Phytomedicine*, *24*, 49-55. https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.11.007
- Lemos, J. A., & Burne, R. A. (2008). A model of efficiency: Stress tolerance by Streptococcus mutans. *Microbiology*, *154*(11), 3247-3255. https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/023770-0
- Lemos, J. A., Palmer, S. R., Zeng, L., Wen, Z. T., Kajfasz, J. K., Freires, I. A., Abranches, J., & Brady, L. J. (2019). The Biology of Streptococcus mutans. *Microbiology Spectrum*, *7*(1), 10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018. https://doi.org/10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018
- Leung, A., Tsoi, H., & Yu, J. (2015). Fusobacterium and Escherichia: Models of colorectal cancer driven by microbiota and the utility of microbiota in colorectal cancer screening. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, *9*(5), 651-657. https://doi.org/10.1586/17474124.2015.1001745
- Li, H., Zhou, J., Zhou, Y., Chen, J., Gao, F., Xu, Y., & Gao, X. (2020). Automatic and Interpretable Model for Periodontitis Diagnosis in Panoramic Radiographs. Içinde A. L. Martel, P. Abolmaesumi, D. Stoyanov, D. Mateus, M. A. Zuluaga, S. K. Zhou, D. Racoceanu, & L. Joskowicz (Ed.), *Medical Image Computing and Computer Assisted Intervention – MICCAI 2020* (ss. 454-463). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-59713-9_44
- Li, H.-C., Yashiki, S., Sonoda, J., Lou, H., Ghosh, S. K., Byrnes, J. J., Lema, C., Fujiyoshi, T., Karasuyama, M., & Sonoda, S. (2000). Green Tea Polyphenols Induce Apoptosis in vitro in Peripheral Blood T Lymphocytes of Adult T-Cell Leukemia Patients. *Japanese Journal of Cancer Research*, *91*(1), 34-40. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2000.tb00857.x
- Li, J., Wu, T., Peng, W., & Zhu, Y. (2020). Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of Streptococcus mutans. *BMC Microbiology*, *20*(1), 99. https://doi.org/10.1186/s12866-020-01761-3
- Li, L., Li, Z.-W., Yin, Z.-Q., Wei, Q., Jia, R.-Y., Zhou, L.-J., Xu, J., Song, X., Zhou, Y., Du, Y.-H., Peng, L.-C., Kang, S., & Yu, W. (2014). Antibacterial activity of leaf essential oil and its constituents from Cinnamomum longepaniculatum. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, *7*(7), 1721-1727.
- Li, X., Yin, L., Ramage, G., Li, B., Tao, Y., Zhi, Q., Lin, H., & Zhou, Y. (2019). Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by Streptococcus mutans and Candida albicans. *MicrobiologyOpen*, *8*(12), e937. https://doi.org/10.1002/mbo3.937
- Li, Y., Huang, S., Du, J., Wu, M., & Huang, X. (2023). Current and prospective therapeutic strategies: Tackling Candida albicans and Streptococcus mutans cross-kingdom biofilm. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1106231
- Lin, Y., Chen, J., Zhou, X., & Li, Y. (2021). Inhibition of Streptococcus mutans biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. *Critical*

Reviews in Microbiology, *47*(5), 667-677. https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1915959

- Liu, Q., Meng, X., Li, Y., Zhao, C.-N., Tang, G.-Y., & Li, H.-B. (2017). Antibacterial and Antifungal Activities of Spices. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/ijms18061283
- Loesche, W. J. (1986). Role of Streptococcus mutans in human dental decay. *Microbiological Reviews*, *50*(4), 353-380. https://doi.org/10.1128/mr.50.4.353-380.1986
- Lu, Y., Lin, Y., Li, M., & He, J. (2023). Roles of Streptococcus mutans-Candida albicans interaction in early childhood caries: A literature review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *13*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1151532
- Lynnerup, N., & Klaus, H. D. (2019). Chapter 4 - Fundamentals of Human Bone and Dental Biology: Structure, Function, and Development. İçinde J. E. Buikstra (Ed.), *Ortner's Identification of Pathological Conditions in Human Skeletal Remains (Third Edition)* (ss. 35-58). Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809738-0.00004-1
- Lyon, G. J., & Novick, R. P. (2004). Peptide signaling in *Staphylococcus aureus* and other Gram-positive bacteria. *Peptides*, *25*(9), 1389-1403. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2003.11.026
- Ma, Q., Pan, Y., Chen, Y., Yu, S., Huang, J., Liu, Y., Gong, T., Zou, J., & Li, Y. (2021). Acetylation of glucosyltransferases regulates Streptococcus mutans biofilm formation and virulence. *PLOS Pathogens*, *17*(12), e1010134. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010134
- Mączka, W., Duda-Madej, A., Górny, A., Grabarczyk, M., & Wińska, K. (2021). Can Eucalyptol Replace Antibiotics? *Molecules*, *26*(16), Article 16. https://doi.org/10.3390/molecules26164933
- Mahzoon, T., Koraei, P., Tavakol, O., Gholami, M., & Barfi, A. (2022). Effect of Limonene, Camphor and Menthol on Cariogenic Oral Pathogens. *Pakistan Journal of Medical and Health Sciences*, *16*(1), 706-709. https://doi.org/10.53350/pjmhs22161706
- Malcangi, G., Patano, A., Morolla, R., De Santis, M., Piras, F., Settanni, V., Mancini, A., Di Venere, D., Inchingolo, F., Inchingolo, A. D., Dipalma, G., & Inchingolo, A. M. (2023). Analysis of Dental Enamel Remineralization: A Systematic Review of Technique Comparisons. *Bioengineering*, *10*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/bioengineering10040472
- Marchesan, J. T., Byrd, K. M., Moss, K., Preisser, J. S., Morelli, T., Zandona, A. F., Jiao, Y., & Beck, J. (2020). Flossing Is Associated with Improved Oral Health in Older Adults. *Journal of Dental Research*, *99*(9), 1047-1053. https://doi.org/10.1177/0022034520916151
- Marchese, A., Barbieri, R., Coppo, E., Orhan, I. E., Daglia, M., Nabavi, S. F., Izadi, M., Abdollahi, M., Nabavi, S. M., & Ajami, M. (2017). Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. *Critical Reviews in Microbiology*, *43*(6), 668-689. https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225
- Marquis, R. (1995). Oxygen metabolism, oxidative stress and acid-base physiology of dental plaque biofilms. *Journal of Industrial Microbiology*, *15*(3), 198-207. https://doi.org/10.1007/BF01569826

- Marsh, P. D., Head, D. A., & Devine, D. A. (2015). Dental plaque as a biofilm and a microbial community—Implications for treatment. *Journal of Oral Biosciences*, *57*(4), 185-191. https://doi.org/10.1016/j.job.2015.08.002
- Matsui, R., & Cvitkovitch, D. (2010). Acid Tolerance Mechanisms Utilized by Streptococcus Mutans. *Future Microbiology*, *5*(3), 403-417. https://doi.org/10.2217/fmb.09.129
- Metwalli, K. H., Khan, S. A., Krom, B. P., & Jabra-Rizk, M. A. (2013). Streptococcus mutans, Candida albicans, and the Human Mouth: A Sticky Situation. *PLOS Pathogens*, *9*(10), e1003616. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616
- Mohamed, N. E. S., El-Masry, R. A., Awad, A. E., & Badr, H. A. (2019). CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF Codiaeum variegatum LEAVES. *Zagazig Journal of Agricultural Research*, *46*(4), 1133-1140. https://doi.org/10.21608/zjar.2019.47093
- Morrison, A. G., Sarkar, S., Umar, S., Lee, S. T. M., & Thomas, S. M. (2023). The Contribution of the Human Oral Microbiome to Oral Disease: A Review. *Microorganisms*, *11*(2), 318. https://doi.org/10.3390/microorganisms11020318
- Moye, Z. D., Zeng, L., & Burne, R. A. (2014). Fueling the caries process: Carbohydrate metabolism and gene regulation by Streptococcus mutans. *Journal of Oral Microbiology*, *6*. https://doi.org/10.3402/jom.v6.24878
- Moynihan, P., & Petersen, P. E. (2004). Diet, nutrition and the prevention of dental diseases. *Public Health Nutrition*, *7*(1A), 201-226. https://doi.org/10.1079/phn2003589
- Nagavi-alhoseiny, A. A., Torshabi, M., Rasoulianboroujeni, M., Tayebi, L., & Tabatabaei, F. S. (2019). Effect of sodium chloride on gene expression of *Streptococcus mutans* and zeta potential of demineralized dentin. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, *9*(1), 1-4. https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2018.08.002
- Naglik, J. R., Challacombe, S. J., & Hube, B. (2003). Candida albicans Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *67*(3), 400-428. https://doi.org/10.1128/mmbr.67.3.400-428.2003
- National Committee for Clinical Laboratory Standards, & Barry, A. L. (1999). Methods for determining bactericidal activity of antimicrobial agents: approved guideline (Vol. 19, No. 18). Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards.
- Niedzielski, A., Chmielik, L. P., & Stankiewicz, T. (2021). The Formation of Biofilm and Bacteriology in Otitis Media with Effusion in Children: A Prospective Cross-Sectional Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *18*(7), Article 7. https://doi.org/10.3390/ijerph18073555
- Ning, Y., Ling, J., & Wu, C. D. (2015). Synergistic effects of tea catechin epigallocatechin gallate and antimycotics against oral *Candida* species. *Archives of Oral Biology*, *60*(10), 1565-1570. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.07.001
- Odds, F. C. (2003). Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *52*(1), 1. https://doi.org/10.1093/jac/dkg301
- Oz, M., El Nebrisi, E. G., Yang, K.-H. S., Howarth, F. C., & Al Kury, L. T. (2017). Cellular and Molecular Targets of Menthol Actions. *Frontiers in Pharmacology*, *8*. https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00472
- Pardo, A., Signoriello, A., Zangani, A., Messina, E., Gheza, S., Faccioni, P., Albanese, M., & Lombardo, G. (2024). Home Biofilm Management in Orthodontic Aligners: A

Systematic Review. *Dentistry Journal*, *12*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/dj12100335

- Park, B. J., Taguchi, H., Kamei, K., Matsuzawa, T., Hyon, S.-H., & Park, J.-C. (2011). In Vitro Antifungal Activity of Epigallocatechin 3-O-Gallate against Clinical Isolates of Dermatophytes. *Yonsei Medical Journal*, *52*(3), 535-538. https://doi.org/10.3349/ymj.2011.52.3.535
- Patel, T., Ishiuji, Y., & Yosipovitch, G. (2007). Menthol: A refreshing look at this ancient compound. *Journal of the American Academy of Dermatology*, *57*(5), 873-878. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.04.008
- Pawlaczyk-Kamieńska, T., Borysewicz-Lewicka, M., Śniatała, R., Batura-Gabryel, H., & Cofta, S. (2019). Dental and periodontal manifestations in patients with cystic fibrosis—A systematic review. *Journal of Cystic Fibrosis*, *18*(6), 762-771. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.11.007
- Peairs, A., Dai, R., Gan, L., Shimp, S., Rylander, M. N., Li, L., & Reilly, C. M. (2010). Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) attenuates inflammation in MRL/lpr mouse mesangial cells. *Cellular & Molecular Immunology*, *7*(2), 123-132. https://doi.org/10.1038/cmi.2010.1
- Pereira, W. A., Pereira, C. D. S., Assunção, R. G., da Silva, I. S. C., Rego, F. S., Alves, L. S. R., Santos, J. S., Nogueira, F. J. R., Zagmignan, A., Thomsen, T. T., Løbner-Olesen, A., Krogfelt, K. A., da Silva, L. C. N., & Abreu, A. G. (2021). New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards Escherichia coli and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice. *Biomolecules*, *11*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/biom11020302
- Pouget, C., Dunyach-Remy, C., Pantel, A., Schuldiner, S., Sotto, A., & Lavigne, J.-P. (2020). Biofilms in Diabetic Foot Ulcers: Significance and Clinical Relevance. *Microorganisms*, *8*(10), Article 10. https://doi.org/10.3390/microorganisms8101580
- Puig-Herreros, C., Sanz, J. L., García-Bernal, D., Rodríguez-Lozano, F. J., Murcia, L., Forner, L., Ghilotti, J., Oñate-Sánchez, R. E., & López-García, S. (2024). Comparative Cytotoxicity of Menthol and Eucalyptol: An In Vitro Study on Human Gingival Fibroblasts. *Pharmaceutics*, *16*(4), Article 4. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics16040521
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015). Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, *7*(4), 493-512. https://doi.org/10.4155/fmc.15.6
- Ramage, G., Saville, S. P., Thomas, D. P., & López-Ribot, J. L. (2005). Candida Biofilms: An Update. *Eukaryotic Cell*, *4*(4), 633-638. https://doi.org/10.1128/ec.4.4.633-638.2005
- Rather, M. A., Gupta, K., & Mandal, M. (2021). Microbial biofilm: Formation, architecture, antibiotic resistance, and control strategies. *Brazilian Journal of Microbiology: [Publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, *52*(4), 1701-1718. https://doi.org/10.1007/s42770-021-00624-x
- Rauha, J.-P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kähkönen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., & Vuorela, P. (2000). Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *56*(1), 3-12. https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00218-X
- Ribeiro, M., Malheiro, J., Grenho, L., Fernandes, M. H., & Simões, M. (2018). Cytotoxicity and antimicrobial action of selected phytochemicals against planktonic and sessile Streptococcus mutans. *PeerJ*, *6*, e4872. https://doi.org/10.7717/peerj.4872

- Rosen, T. (2012). Green tea catechins: Biologic properties, proposed mechanisms of action, and clinical implications. *Journal of Drugs in Dermatology: JDD*, *11*(11), e55-60.
- Rossini, G., Parrini, S., Castroflorio, T., Deregibus, A., & Debernardi, C. L. (2015). Efficacy of clear aligners in controlling orthodontic tooth movement: A systematic review. *The Angle Orthodontist*, *85*(5), 881-889. https://doi.org/10.2319/061614-436.1
- Rouzi, M., Zhang, X., Jiang, Q., Long, H., Lai, W., & Li, X. (2023a). Impact of Clear Aligners on Oral Health and Oral Microbiome During Orthodontic Treatment. *International Dental Journal*, *73*(5), 603-611. https://doi.org/10.1016/j.identj.2023.03.012
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2017). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, *9*(1), 522. https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372
- Safari, R., & Yousefi, Z. (2010). Study of Clostridium botulinum by Various Formulations of Salt and Preservatives in Persian Caviar. *Environmental Justice*, *3*(1), 27-32. https://doi.org/10.1089/env.2009.0026
- Salmerón-Valdés, E. N., Cruz-Mondragón, A. C., Toral-Rizo, V. H., Jiménez-Rojas, L. V., Correa-Prado, R., Lara-Carrillo, E., Morales-Valenzuela, A. A., Scougall-Vilchis, R. J., López-Flores, A. I., Hoz-Rodriguez, L., & Velásquez-Enríquez, U. (2022). Mechanical Properties and Antibacterial Effect on Mono-Strain of Streptococcus mutans of Orthodontic Cements Reinforced with Chlorhexidine-Modified Nanotubes. *Nanomaterials*, *12*(17), Article 17. https://doi.org/10.3390/nano12172891
- Santos, F. A., & Rao, V. S. N. (2000). Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytotherapy Research*, *14*(4), 240-244. https://doi.org/10.1002/1099-1573(200006)14:4<240::AID-PTR573>3.0.CO;2-X
- Santos, V. R. D., Valdez, R. M. A., Danelon, M., Souza, J. A. S., Caiaffa, K. S., Delbem, A. C. B., & Duque, C. (2021). Effect of S. mutans combinations with bifidobacteria/lactobacilli on biofilm and enamel demineralization. *Brazilian Oral Research*, *35*, e030. https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2021.vol35.0030
- Schmidt, M., Tran-Nguyen, D., & Chizek, P. (2018). Influence of boric acid on energy metabolism and stress tolerance of *Candida albicans*. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, *49*, 140-145. https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2018.05.011
- Schneider-Rayman, M., Steinberg, D., Sionov, R. V., Friedman, M., & Shalish, M. (2021). Effect of epigallocatechin gallate on dental biofilm of Streptococcus mutans: An in vitro study. *BMC Oral Health*, *21*(1), 447. https://doi.org/10.1186/s12903-021-01798-4
- Schubert, D. M. (2015). Boric Oxide, Boric Acid, and Borates. Içinde *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry* (ss. 1-32). John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/14356007.a04_263.pub2
- Scott, R. S., Veinot, A. J., Stack, D. L., Gormley, P. T., Khuong, B. N., Vogels, C. M., Masuda, J. D., Baerlocher, F. J., MacCormack, T. J., & Westcott, S. A. (2018). Synthesis, reactivity, and antimicrobial properties of boron-containing 4-ethyl-3-thiosemicarbazide derivatives. *Canadian Journal of Chemistry*, *96*(10), 906-911. https://doi.org/10.1139/cjc-2018-0108
- See, A. S., Salleh, A. B., Bakar, F. A., Yusof, N. A., Abdulamir, A. S., & Heng, L. Y. (2010). Risk and Health Effect of Boric Acid. *American Journal of Applied Sciences*, *7*(5), 620-627. https://doi.org/10.3844/ajassp.2010.620.627

- Seydibeyoglu, M. ozgur, Caka, M., Ulucan-karnak, F., Onak, G., Uzel, A., Özyıldız, F., & Karaman, O. (2021). Bone Cement Formulation with Reduced Heating of Bone Cement Resin. *Journal of Boron*, *6*(2), Article 2. https://doi.org/10.30728/boron.835919
- Shanker, E., & Federle, M. J. (2017). Quorum Sensing Regulation of Competence and Bacteriocins in Streptococcus pneumoniae and mutans. *Genes*, *8*(1), Article 1. https://doi.org/10.3390/genes8010015
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K., & Hashemi, A. (2019). Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *Journal of Cellular Physiology*, *234*(9), 14689-14708. https://doi.org/10.1002/jcp.28225
- Sharma, D., Kumar, B., Lata, M., Joshi, B., Venkatesan, K., Shukla, S., & Bisht, D. (2015). Comparative Proteomic Analysis of Aminoglycosides Resistant and Susceptible Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates for Exploring Potential Drug Targets. *PloS One*, *10*(10), e0139414. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139414
- Sharma, D., Lata, M., Singh, R., Deo, N., Venkatesan, K., & Bisht, D. (2016). Cytosolic Proteome Profiling of Aminoglycosides Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates Using MALDI-TOF/MS. *Frontiers in Microbiology*, *7*, 1816. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01816
- Sharma, D., Misba, L., & Khan, A. U. (2019). Antibiotics versus biofilm: An emerging battleground in microbial communities. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, *8*, 76. https://doi.org/10.1186/s13756-019-0533-3
- Sharma, S., Mohler, J., Mahajan, S. D., Schwartz, S. A., Bruggemann, L., & Aalinkeel, R. (2023). Microbial Biofilm: A Review on Formation, Infection, Antibiotic Resistance, Control Measures, and Innovative Treatment. *Microorganisms*, *11*(6), Article 6. https://doi.org/10.3390/microorganisms11061614
- Siddharth, T., Sridhar, P., Vinila, V., & Tyagi, R. D. (2021). Environmental applications of microbial extracellular polymeric substance (EPS): A review. *Journal of Environmental Management*, *287*, 112307. https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.112307
- Silva, M. F. da, Ramos, V. S., Carvalho, Z. M. C. de, & Tavares, M. I. B. (2024). BIBLIOGRAPHIC REVIEW OF THE APPLICATION OF CINNAMALDEHYDE AS A DRUG IN DENTISTRY. *REVISTA FOCO*, *17*(2), e4452-e4452. https://doi.org/10.54751/revistafoco.v17n2-075
- Silva de Araujo Figueiredo, C., Gonçalves Carvalho Rosalem, C., Costa Cantanhede, A. L., Abreu Fonseca Thomaz, É. B., & Fontoura Nogueira da Cruz, M. C. (2017). Systemic alterations and their oral manifestations in pregnant women. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, *43*(1), 16-22. https://doi.org/10.1111/jog.13150
- Silva, M., Caro, V., Guzmán, C., Perry, G., Areche, C., & Cornejo, A. (2020). Chapter 1—α-Synuclein and tau, two targets for dementia. İçinde Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in Natural Products Chemistry* (C. 67, ss. 1-25). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819483-6.00001-1
- Souza, L. R., Oliveira, M. V. M., Basile, J. R., N.Souza, L., Souza, A. C. R., Haikal, D. S., De-Paula, A. M. B., Souza, L. R., Oliveira, M. V. M., Basile, J. R., N.Souza, L., Souza, A. C. R., Haikal, D. S., & De-Paula, A. M. B. (2015). Anatomical and Physiopathological Aspects of Oral Cavity and Oropharynx Components Related to Oropharyngeal Dysphagia. Içinde *Seminars in Dysphagia*. IntechOpen. https://doi.org/10.5772/60766

- Srinivasan, R., Santhakumari, S., Poonguzhali, P., Geetha, M., Dyavaiah, M., & Xiangmin, L. (2021). Bacterial Biofilm Inhibition: A Focused Review on Recent Therapeutic Strategies for Combating the Biofilm Mediated Infections. *Frontiers in Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.676458
- Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2020). Risk factors for chronic biofilm-related infection associated with implanted medical devices. *Clinical Microbiology and Infection*, *26*(8), 1034-1038. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.02.027
- Sudbery, P., Gow, N., & Berman, J. (2004). The distinct morphogenic states of Candida albicans. *Trends in Microbiology*, *12*(7), 317-324. https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.05.008
- Svensäter, G., & Bergenholtz, G. (2004). Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, *9*(1), 27-36. https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2004.00112.x
- Sybiya Vasantha Packiavathy, I. A., Agilandeswari, P., Musthafa, K. S., Karutha Pandian, S., & Veera Ravi, A. (2012). Antibiofilm and quorum sensing inhibitory potential of *Cuminum cyminum* and its secondary metabolite methyl eugenol against Gram negative bacterial pathogens. *Food Research International*, *45*(1), 85-92. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.10.022
- Şenel, S. (2021). An Overview of Physical, Microbiological and Immune Barriers of Oral Mucosa. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(15), Article 15. https://doi.org/10.3390/ijms22157821
- Tektas, S., Thurnheer, T., Eliades, T., Attin, T., & Karygianni, L. (2020). Initial Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Aligner Materials. *Antibiotics*, *9*(12), Article 12. https://doi.org/10.3390/antibiotics9120908
- Ten Cate, M, J. (2013). Contemporary perspective on the use of fluoride products in caries prevention. *British Dental Journal*, *214*(4), 161-167. https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2013.162
- Thi, M. T. T., Wibowo, D., & Rehm, B. H. A. (2020). Pseudomonas aeruginosa Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), Article 22. https://doi.org/10.3390/ijms21228671
- Thorn, C. R., Howell, P. L., Wozniak, D. J., Prestidge, C. A., & Thomas, N. (2021). Enhancing the therapeutic use of biofilm-dispersing enzymes with smart drug delivery systems. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *179*, 113916. https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.113916
- Tjandrawinata, R., Widyarman, A., & Liliany, D. (2019). Effectiveness of Eugenia caryophyllus in toothpaste against oral microbial in the saliva of healthy subjects in Indonesia. *Scientific Dental Journal*, *3*, 56. https://doi.org/10.4103/SDJ.SDJ_11_19
- Tomé-Carneiro, J., Larrosa, M., González-Sarrías, A., Tomás-Barberán, F. A., García-Conesa, M. T., & Espín, J. C. (2013). Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence. *Current Pharmaceutical Design*, *19*(34), 6064. https://doi.org/10.2174/13816128113199990407
- Topka-Bielecka, G., Dydecka, A., Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-Derived Depolymerases against Bacterial Biofilm. *Antibiotics*, *10*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175
- Trombetta, D., Castelli, F., Sarpietro, M. G., Venuti, V., Cristani, M., Daniele, C., Saija, A., Mazzanti, G., & Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *49*(6), 2474-2478. https://doi.org/10.1128/aac.49.6.2474-2478.2005

- Usai, F., & Di Sotto, A. (2023). trans-Cinnamaldehyde as a Novel Candidate to Overcome Bacterial Resistance: An Overview of In Vitro Studies. *Antibiotics*, *12*(2), Article 2. https://doi.org/10.3390/antibiotics12020254
- Utchariyakiat, I., Surassmo, S., Jaturanpinyo, M., Khuntayaporn, P., & Chomnawang, M. T. (2016). Efficacy of cinnamon bark oil and cinnamaldehyde on anti-multidrug resistant Pseudomonas aeruginosa and the synergistic effects in combination with other antimicrobial agents. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, *16*(1), 158. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1134-9
- Vestergaard, M., & Ingmer, H. (2019). Antibacterial and antifungal properties of resveratrol. *International Journal of Antimicrobial Agents*, *53*(6), 716-723. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.015
- Vijayakumar, K., Manigandan, V., Jeyapragash, D., Bharathidasan, V., Anandharaj, B., & Sathya, M. (2020). Eucalyptol inhibits biofilm formation of Streptococcus pyogenes and its mediated virulence factors. *Journal of Medical Microbiology*, *69*(11), 1308-1318. https://doi.org/10.1099/jmm.0.001253
- Vingtdeux, V., Giliberto, L., Zhao, H., Chandakkar, P., Wu, Q., Simon, J. E., Janle, E. M., Lobo, J., Ferruzzi, M. G., Davies, P., & Marambaud, P. (2010). AMP-activated Protein Kinase Signaling Activation by Resveratrol Modulates Amyloid-β Peptide Metabolism *. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(12), 9100-9113. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.060061
- Wajekar, N., Pathak, S., & Mani, S. (2022). Rise & review of invisalign clear aligner system. *IP Indian Journal of Orthodontics and Dentofacial Research*, *8*(1), 7-11. https://doi.org/10.18231/j.ijodr.2022.002
- Walle, T. (2011). Bioavailability of resveratrol. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1215*(1), 9-15. https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2010.05842.x
- Wang, J., Zhang, X., Gao, L., Wang, L., Song, F., Zhang, L., & Wan, Y. (2021). The synergistic antifungal activity of resveratrol with azoles against Candida albicans. *Letters in Applied Microbiology*, *72*(6), 688-697. https://doi.org/10.1111/lam.13458
- Warreth, A. (2023). Dental Caries and Its Management. *International Journal of Dentistry*, *2023*(1), 9365845. https://doi.org/10.1155/2023/9365845
- Willis, J. R., & Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*, *8*(2), 308. https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308
- Wong, J. X., & Ramli, S. (2021). Antimicrobial activity of different types of *Centella asiatica* extracts against foodborne pathogens and food spoilage microorganisms. *LWT*, *142*, 111026. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111026
- Wu, J., Yang, Q., Jiang, X., Fan, Y., Zhang, Y., & Huang, R. (2020). Oxyresveratrol promotes biofilm formation, cell attachment and aggregation of Streptococcus gordonii in the presence of sucrose. *FEMS Microbiology Letters*, *367*(12), fnaa090. https://doi.org/10.1093/femsle/fnaa090
- Xia, N., Daiber, A., Förstermann, U., & Li, H. (2017). Antioxidant effects of resveratrol in the cardiovascular system. *British Journal of Pharmacology*, *174*(12), 1633-1646. https://doi.org/10.1111/bph.13492
- Xiu, W., Shan, J., Yang, K., Xiao, H., Yuwen, L., & Wang, L. (2021). Recent development of nanomedicine for the treatment of bacterial biofilm infections. View, 2(1), 20200065. https://doi.org/10.1002/viw.20200065
- Xiao, J., Klein, M. I., Falsetta, M. L., Lu, B., Delahunty, C. M., Iii, J. R. Y., Heydorn, A., & Koo, H. (2012). The Exopolysaccharide Matrix Modulates the Interaction

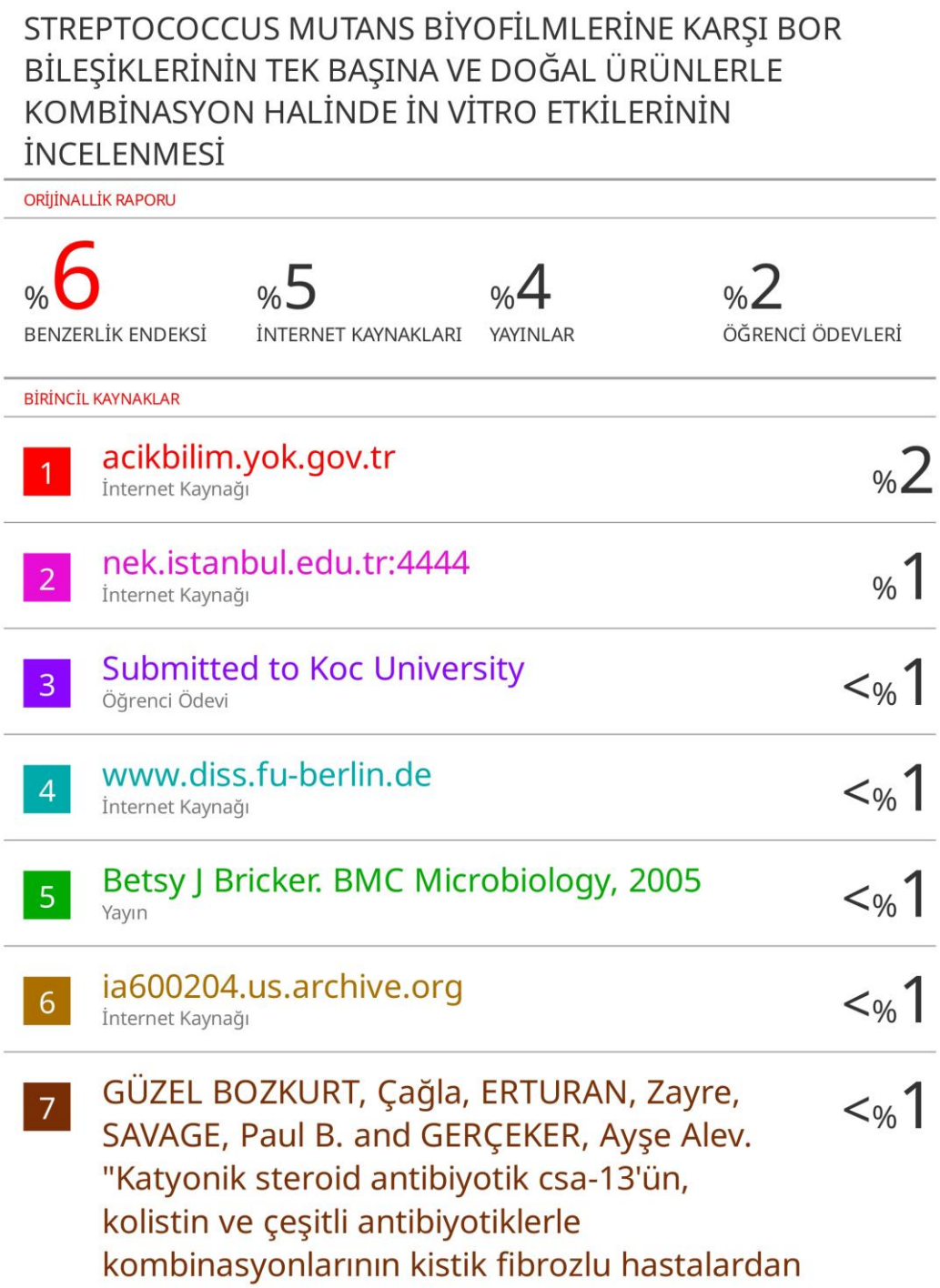
between 3D Architecture and Virulence of a Mixed-Species Oral Biofilm. *PLOS Pathogens*, *8*(4), e1002623. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002623

- Xu, J.-S., Li, Y., Cao, X., & Cui, Y. (2013). The effect of eugenol on the cariogenic properties of Streptococcus mutans and dental caries development in rats. *Experimental and Therapeutic Medicine*, *5*(6), 1667-1670. https://doi.org/10.3892/etm.2013.1066
- Xu, X., Zhou, X. D., & Wu, C. D. (2012). Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. *Archives of Oral Biology*, *57*(6), 678-683. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.10.021
- Yaacob, M., Worthington, H. V., Deacon, S. A., Deery, C., Walmsley, A. D., Robinson, P. G., & Glenny, A.-M. (t.y.). *Powered versus manual toothbrushing for oral health—Yaacob, M - 2014 | Cochrane Library*. Geliş tarihi 03 Kasım 2024, gönderen https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD002281.pub3/full
- Yanakiev, S. (2020). Effects of Cinnamon (Cinnamomum spp.) in Dentistry: A Review. *Molecules*, *25*(18), Article 18. https://doi.org/10.3390/molecules25184184
- Yang, L., Zhan, C., Huang, X., Hong, L., Fang, L., Wang, W., & Su, J. (2020). Durable Antibacterial Cotton Fabrics Based on Natural Borneol-Derived Anti-MRSA Agents. *Advanced Healthcare Materials*, *9*(11), 2000186. https://doi.org/10.1002/adhm.202000186
- Yang, S.-Y., Lee, S.-H., Park, O.-B., An, H.-R., Yu, Y.-H., Hong, E.-B., Kang, K.-H., & Koong, H.-S. (2023). Antibacterial Effects of Tea Tree Oil and Mastic Oil to *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Hygiene Science*, *23*(1), 51-59. https://doi.org/10.17135/jdhs.2023.23.1.51
- Yardımcı, B. K., Mollaoğlu, Z., Altıntaş, F., & Güler, A. (2023). Investigation of Dependency of Boric Acid and Lithium Metaborate Induced Yeast Toxicity on the Expressions of Antioxidative and Apoptotic Genes. *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, *10*(1), 545-554. https://doi.org/10.1080/2314808X.2023.2238373
- Yassir, Y. A., McIntyre, G. T., & Bearn, D. R. (2021). Orthodontic treatment and root resorption: An overview of systematic reviews. *European Journal of Orthodontics*, *43*(4), 442-456. https://doi.org/10.1093/ejo/cjaa058
- YILMAZ, M. (2012). Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. *Turkish Journal of Medical Sciences*, *42*(8), 1423-1429. https://doi.org/10.3906/sag-1205-83
- Zari, A. T., Zari, T. A., & Hakeem, K. R. (2021). Anticancer Properties of Eugenol: A Review. *Molecules*, *26*(23), Article 23. https://doi.org/10.3390/molecules26237407
- Zeng, L., & Burne, R. A. (2013). Comprehensive Mutational Analysis of Sucrose-Metabolizing Pathways in Streptococcus mutans Reveals Novel Roles for the Sucrose Phosphotransferase System Permease. *Journal of Bacteriology*, *195*(4), 833-843. https://doi.org/10.1128/jb.02042-12
- Zhang, B., Zhao, M., Tian, J., Lei, L., & Huang, R. (2022). Novel antimicrobial agents targeting the Streptococcus mutans biofilms discovery through computer technology. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1065235
- Zhang, K., Li, X., Yu, C., & Wang, Y. (2020). Promising Therapeutic Strategies Against Microbial Biofilm Challenges. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*. https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00359
- Zhang, L.-X., Li, C.-X., Kakar, M. U., Khan, M. S., Wu, P.-F., Amir, R. M., Dai, D.-F., Naveed, M., Li, Q.-Y., Saeed, M., Shen, J.-Q., Rajput, S. A., & Li, J.-H. (2021).

Resveratrol (RV): A pharmacological review and call for further research. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *143*, 112164. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112164

- Zhang, M., Liu, X., Xie, Y., Zhang, Q., Zhang, W., Jiang, X., & Lin, J. (2020). Biological Safe Gold Nanoparticle-Modified Dental Aligner Prevents the Porphyromonas gingivalis Biofilm Formation. *ACS Omega*, *5*(30), 18685-18692. https://doi.org/10.1021/acsomega.0c01532
- Zhang, O. L., Niu, J. Y., Yin, I. X., Yu, O. Y., Mei, M. L., & Chu, C. H. (2023). Bioactive Materials for Caries Management: A Literature Review. *Dentistry Journal*, *11*(3), Article 3. https://doi.org/10.3390/dj11030059
- Zhang, Q., Ma, Q., Wang, Y., Wu, H., & Zou, J. (2021). Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in Streptococcus mutans. *International Journal of Oral Science*, *13*(1), 1-8. https://doi.org/10.1038/s41368-021-00137-1
- Zheng, X., Zhang, Y., Li, Q., Liu, Y., Wang, X., Yang, B., Zhu, G., Zhou, C., Gao, Y., & Liu, Z. (2019). Effects of 1,8-cineole on neuropathic pain mediated by P2X2 receptor in the spinal cord dorsal horn. *Scientific Reports*, *9*(1), 7909. https://doi.org/10.1038/s41598-019-44282-4
- Zhou, Y., Millhouse, E., Shaw, T., Lappin, D. F., Rajendran, R., Bagg, J., Lin, H., & Ramage, G. (2018). Evaluating Streptococcus mutans Strain Dependent Characteristics in a Polymicrobial Biofilm Community. *Frontiers in Microbiology*, *9*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01498

İNTİHAL RAPORU İLK SAYFASI



STREPTOCOCCUS MUTANS BİYOFİLMLERİNE KARŞI BOR BİLEŞİKLERİNİN TEK BAŞINA VE DOĞAL ÜRÜNLERLE KOMBİNASYON HALİNDE İN VİTRO ETKİLERİNİN İNCELENMESİ

ORİJİNALLİK RAPORU

%6	%5	%4	%2
BENZERLİK ENDEKSİ	İNTERNET KAYNAKLARI	YAYINLAR	ÖĞRENCİ ÖDEVLERİ

BİRİNCİL KAYNAKLAR

1	acikbilim.yok.gov.tr İnternet Kaynağı	%2
2	nek.istanbul.edu.tr:4444 İnternet Kaynağı	%1
3	Submitted to Koc University Öğrenci Ödevi	<%1
4	www.diss.fu-berlin.de İnternet Kaynağı	<%1
5	Betsy J Bricker. BMC Microbiology, 2005 Yayın	<%1
6	ia600204.us.archive.org İnternet Kaynağı	<%1
7	GÜZEL BOZKURT, Çağla, ERTURAN, Zayre, SAVAGE, Paul B. and GERÇEKER, Ayşe Alev. "Katyonik steroid antibiyotik csa-13'ün, kolistin ve çeşitli antibiyotiklerle kombinasyonlarının kistik fibrozlu hastalardan	<%1