TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ŞEKER ALKOLLERİNİN FİSSÜR ÖRTÜCÜLER ÜZERİNDE OLUŞAN BİYOFİLME ETKİLERİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

SAMYELİ SARIHAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. FİGEN EREN
PEDODONTİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL - 2024

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KONSANTRASYONLARDAKİ ŞEKER ALKOLLERİNİN FİSSÜR ÖRTÜCÜLER ÜZERİNDE OLUŞAN BİYOFİLME ETKİLERİNİN *İN VİTRO* OLARAK DEĞERLENDİRİLMESİ

SAMYELİ SARIHAN
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DOÇ. DR. FİGEN EREN
PEDODONTİ 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 çalışması ile elde edilmemiş 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.

Samyeli SARIHAN

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince değerli bilgi ve deneyimlerini paylaşarak bana her zaman yol gösteren, tez çalışmamın hayata geçmesini sağlayan, hoşgörü ve anlayışıyla her zaman yanımda olan, güler yüzlülüğü ve cana yakınlığıyla benim için bir hocadan ötesi olan değerli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Figen EREN'e,

Bilimsel yenilikleri takip etmemizi sağlayan ve vizyonumuzu genişleten, her türlü soruyu çekinmeden sorabildiğim ve her sorumu sabırla yanıtlayan Sayın Prof. Dr. Betül KARGÜL'e,

Pedodonti doktora eğitimini en iyi şekilde almamız için çalışan, hem teorik hem klinik anlamda bana sayısız katkıları olan değerli hocam Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Ali MENTEŞ' e,

Tez sürecimi gerçekleştirmemde büyük emeği olan, teknik bilgisiyle desteğini her zaman hissettiğim, tezimin ve yayınımın gerçekleşmesi konusunda bana sonsuz destekleri olan, yoğun çalışma tempolarına rağmen bana her zaman destek olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Nursen TOPÇUOĞLU'na,

Tez çalışmamda elde edilen görüntülerin değerlendirilmesinde çok emeği olan, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan Dr. Dt. Merve Yıldırım ÜÇÜNCÜ'ye,

Tez çalışmam sayesinde tanıştığım tez sürecimde yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Yeditepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Senem Selvi KUVVETLİ'ye,

Mesleki tecrübelerini paylaşarak bana katkı sağlayan ve her zaman kapılarını açan hocalarım Prof. Dr. Sertaç PEKER, Prof. Dr. Başak DURMUŞ, Prof. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU, Doç. Dr. Ahu YILMAZ, Dr. Öğr. Üyesi Ecem AKBEYAZ ŞİVET ve Dr. Öğr. Üyesi Betül ŞEN YAVUZ'a,

Tez çalışmama 'TDK-2023-11029' proje numarası ile finansal katkılarından dolayı Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığına,

Doktora eğitim sürecim boyunca her koşulda desteklerini hissettiğim, beraber başladığım için kendimi hep şanslı saydığım, bolca güzel anı ve kahkaha biriktirdiğim sevgili arkadaşlarım Dr. Dt. Nur KODAMAN DOKUMACIGİL, Dt. Ezgi KAZANCI ÖZTUNA, Dt. Esra OK ve Dt. Damla KAHVECİLER TOY ve birbirimize destek olup güzel anılar biriktirdiğim tüm asistan arkadaşlarıma,

Hayattaki en büyük şansım olarak gördüğüm, kızları olmaktan gurur duyduğum, sonsuz sevgi ve destekleri için teşekkürlerimi kelimelerle ifade edemeyeceğim, bana her zaman fazlasıyla inanan ve güvenen, onlarsız olmazdı dediğim canımdan çok sevdiğim annem Mine SARIHAN ve babam Murat SARIHAN'a

Doğduğu andan itibaren hayatımda varlığını şükürle karşıladığım, her adımını gururla ve sevgiyle izlediğim, bana her zaman küçük bir kardeş gibi değil de bir abi gibi güç ve huzur veren canım kardeşim Batuhan SARIHAN'a,

Her anımda sevgisini ve korumasını hissettiğim, ilk öğretmenim canım dedem Mehmet Ali BULUT'a,

Attığım her adımı benim için kolaylaştıran, asla pes etmeme izin vermeyen sonsuz bir destekle hep yanımda olan, bitmeyen sakinliği, sonsuz anlayışı ve hayal bile edemeyeceğim sevgisiyle her anımdaki en büyük desteğim Taylan ÇELİK'e

Tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından '**Farklı Konsantrasyonlardaki Şeker Alkollerinin Fissür Örtücüler Üzerinde Oluşan Biyofilme Etkilerinin *İn Vitro* Olarak Değerlendirilmesi**' başlıklı doktora tez projesi olarak 'TDK-2023-11029' numaralı proje kodu ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR LİSTESİ i

TABLO LİSTESİ iii

ŞEKİL LİSTESİ iv

1. ÖZET 1

2. SUMMARY 2

3. GİRİŞ ve AMAÇ 3

4. GENEL BİLGİLER 4

4.1. Diş Çürüğü 4

4.2. Mikrobiyal Dental Plak 5

4.3. Mikrobiyal Dental Plağı Oluşturan Mikroorganizmalar 7

4.3.1. Streptokoklar 7

4.3.1.1. *Streptococcus mutans* grubu 7

4.3.2. *Scardovia wiggsiae* 9

4.4. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Faktörler 10

4.5. Çürük Önleyici Yöntemler 11

4.5.1. Mekanik mikrobiyal dental plak kontrolü 12

4.5.1.1. Diş fırçası kullanımı 12

4.5.1.2. Arayüz temizleyicileri kullanımı 13

4.5.2. Kimyasal mikrobiyal dental plak kontrolü 13

4.5.2.1. Fluorid uygulamaları 13

4.5.2.2. Şeker alkolleri 15

4.5.2.2.1. Ksilitol yapısı ve özellikleri 15

4.5.2.2.2. Eritritol yapısı ve özellikleri 17

4.6. Çocuk Diş Hekimliğinde Fissür Örtücüler 19

4.6.1. Rezin yapılı fissür örtücüler 21

4.6.2. Cam iyonomer yapılı fissür örtücüler 23

4.7. Dental Biyofilm Özelliklerini Belirlemede Kullanılan Mikroskobik Yöntemler 23

4.7.1. Işık mikroskobu 24

4.7.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) 24

4.7.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM).....24

5. GEREÇ ve YÖNTEM 26

5.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi / Şeker Alkollerinin Hazırlanması 26

5.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması 27

5.3. Farklı Şeker Alkolü Konsantrasyonları ile Bakteriyel Üremenin Değerlendirilmesi 29

5.4. Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşumu ve Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi 30

5.4.1. Disklerin hazırlığı.....30

5.4.2. Yapay tükürük hazırlanması.....33

5.4.3. Biyofilm deneyi.....33

5.4.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) görüntülemesi ve değerlendirmesi.....35

5.4.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi ve değerlendirmesi.....37

5.5. İstatiksel Analiz.....38

6. BULGULAR.....39

6.1. Bakteri Üreme Eğrilerinin Değerlendirilmesi 39

6.1.1. Bakterilerin çeşitli konsantrasyonlarda üremelerinin karşılaştırılması.....39

6.1.2. Farklı konsantrasyon gruplarında bakteri üremelerinin karşılaştırılması.....46

6.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ve COMSTAT Yazılımı Kullanarak Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Değerlendirilmesi 50

6.3. Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Görüntülenmesi 63

6.4. Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi.....67

7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....70

8. KAYNAKLAR.....87

9. ÖZGEÇMİŞ .....

10. BİLİMSEL FAALİYETLER.....96

KISALTMALAR LİSTESİ

BHI	:	Brain Heart Infusion (Beyin Kalp İnfüzyonu)
CFU/ml	:	Coloni Forming Unit/ Mililitre (koloni/mililitre)
CLSM	:	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop
CO_2	:	Karbondioksit
H_2	:	Hidrojen
N_2	:	Azot
g/kg	:	Gram/kilogram
ml	:	Mililitre
g/L	:	Gram/Litre
^oC	:	Celcius (Derece)
Ort	:	Ortalama
PBS	:	Phosphate Buffered Saline (Fosfat Tampon Solüsyonu)
pH	:	Power of Hydrogen
SEM	:	Taramalı Elektron Mikroskobu
SS	:	Standart Sapma
S. cricetus	:	*Streptococcus cricetus*
S. downei	:	*Streptococcus downei*
S. ferus	:	*Streptococcus ferus*
S. macaceu	:	*Streptococcus macaceu*
S. mutans	:	*Streptococcus mutans*
S. sobrinus	:	*Streptococcus sobrinus*
ŞEÇÇ	:	Şiddetli Erken Çocukluk Çağı Çürükleri
TEM	:	Transmisyon elektron mikroskobu
Ca^{+2}	:	Kalsiyum
GSFA	:	General Standard for Food Additives
DMF	:	Çürük, çekilmiş diş, dolgu
RMCİ	:	Rezin Modifiye Cam İyonomer

PMKR	:	Poliasit Modifiye Kompozit Rezin
BİS-GMA	:	Bis-phenol A Glycidyl Methacrylate
ADA	:	American Dental Association
µl	:	Mikrolitre
µm	:	Mikrometre
nm	:	Nanometre
USA	:	United States of America (Amerika Birleşik Devletleri)

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Oral streptokok grupları.....7

Tablo 2. *Streptococcus mutans* sınıflaması.....8

Tablo 3. Bakteri türü, konsantrasyon ve zamanın absorbans değerleri üzerindeki ortak etkisinin değerlendirilmesi 39

Tablo 4. Farklı bakteri türlerinde konsantrasyon gruplarında absorbans düzeylerinin başlangıca (0.saat) göre olan değişimlerinin değerlendirilmesi 40

Tablo 5. Farklı bakteri türlerinde konsantrasyona göre başlangıç saatine (0. saat) göre 1. saat, 2. saat, 4. saat, 6. saat ve 24. saat absorbans değişim düzeylerinin değerlendirilmesi.....43

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda bakteri türlerine göre başlangıç saatine (0. saat) göre 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeylerinin değerlendirilmesi.....46

Tablo 7. Farklı çözelti ve materyallerin biyokütle ($\mu m^3/\mu m^2$) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 50

Tablo 8. Farklı çözelti ve materyallerin biyokütle ($\mu m^3/\mu m^2$) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 51

Tablo 9. Farklı çözelti ve materyallerin biyofilm ortalama kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 55

Tablo 10. Farklı çözelti ve materyallerin ortalama kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 56

Tablo 11. Farklı çözelti ve materyallerin maksimum kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 59

Tablo 12. Farklı çözelti ve materyallerin maksimum kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi 60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Diş çürüğü oluşumunda risk faktörleri (https://www.haleonhealthpartner.com/tr-tr/oral-health/conditions/enamel-wear/causes-and-mechanisms/).....5

Şekil 2. Diş fırçası çeşitleri ve farklı fırça başlıkları.....12

Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan çözeltiler.....26

Şekil 4. İnkübasyon sonrası *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547) 27

Şekil 5. Maya özütü, Hemin, Yeast ve Vitamin K eklenmiş BHI Broth.....28

Şekil 6. Bakterilerin seyreltilmesi 28

Şekil 7. 96 kuyucuklu steril doku kültürü plakalarına öncelikle çözeltilerin ardından bakteri süspansiyolarının eklenmesi.....29

Şekil 8. Mikroplaka Elisa Absorbans Okuyucu (MS4-MaxiRead96, MaxiLab Biotechnology) 29

Şekil 9. İçerisinde *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) bulunan çözeltilerde 24 saatlik üreme sonucu bulanık görünüm 30

Şekil 10. Hidroksiapatit diskler.....30

Şekil 11. Clinpro (3M ESPE, USA) fissür örtücü.....31

Şekil 12. Fuji Triage (GC Dental, Tokyo, Japan) kapsül form fissür örtücü 31

Şekil 13. D-Light Duo (GC, Tokyo, Japan) ışın cihazı.....32

Şekil 14. Hidrojen peroksit gaz plazma yöntemi ile ayrı ayrı paketlerde steril edilmiş diskler 32

Şekil 15. Hazırlanan diskler üzerine yapay tükürük eklenmesi 33

Şekil 16. Yapay tükürük uygulanmış disklerin çalkalayıcı üzerine yerleştrilmesi 34

Şekil 17. Disklerin PBS ile durulanması ve 48 kuyucuklu plakalara yerleştirilmesi.....34

Şekil 18. 48 kuyucuklu steril plakalara, çözelti ve bakteri süspansiyonlarının ilave edilmesi 34

Şekil 19. Karıştırıcıya alınan disklerin 24 saat inkübasyon sonrası yeni kuyucuklara yerleştirilmesi 35

Şekil 20. LIVE/DEAD Baclight Kit hazırlanması ve diskler üzerine eklenmesi.....35

Şekil 21. Boya solüsyonu ilavesi tamamlanan örneklerin alüminyum folyo ile kapatılması...36

Şekil 22. Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) (Leica CLSM, Heidelberg, Almanya) 36

Şekil 23. SEM analizi için ayrılan 18 diskin %4 formalde bekletilmesi 37

Şekil 24. Taramalı Elektron Mikroskobu (Zeiss EVO MA10, Germany) 37

Şekil 25. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)'nin 6 farklı çözeltide 24 saatlik üreme eğrileri 42

Şekil 26. 6 farklı çözelti içerisinde *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)'nin 24 saatlik üremelerinin karşılaştırılması 49

Şekil 27. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre biyokütlesi ($\mu m^3/\mu m^2$) 54

Şekil 28. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre ortalama biyofilm kalınlığı (μm) 58

Şekil 29. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre maksimum biyofilm kalınlığı (μm) 62

Şekil 30. 6 farklı solüsyonda Hidroksiapatit materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri 64

Şekil 31. 6 farklı solüsyonda Clinpro materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri 65

Şekil 32. 6 farklı solüsyonda Fuji Triage materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri 66

Şekil 33. Hazırlanan disklerin yüzeylerinde oluşan üçlü biyofilmin x3000 büyütmede elde edilen SEM görüntüleri 68

Şekil 34. Hazırlanan disklerin yüzeylerinde oluşan üçlü biyofilmin x5000 büyütmede elde edilen SEM görüntüleri 69

1. ÖZET

Tezin başlığı : Farklı konsantrasyonlardaki şeker alkollerinin fissür örtücüler üzerinde oluşan biyofilme ekilerinin in vitro olarak değerlendirilmesi

Öğrencinin Adı Soyadı : Samyeli Sarıhan

Danışmanın Adı Soyadı : Doç. Dr. Figen Eren

Programın Adı : Pedodonti Doktora Programı

Amaç: Bu çalışmanın amacı, çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ksilitol ve eritritolün önemli karyojenik bakterilerden olan *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)'nin üremeleri üzerine ve bu bakterilerin çeşitli yüzeyler üzerinde oluşturdukları biyofilme etkilerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: %10 eritritol, %10 ksilitol, %5 ksilitol+%5 eritritol karışımı, %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol karışımı , %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol karışımı şeklinde şeker alkollerini içeren 5 çalışma grubu ve %5 sükroz içeren kontrol grubu oluşturulmuştur. Bakterilerin 6 farklı solüsyon içerisindeki 0.saat, 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saatlerdeki üremeleri sonucundaki absorbans değerleri 630 nm Mikroplaka Elisa Absorbans Okuyucu (MS4-MaxiRead96, MaxiLab Biotechnology) kullanılarak ölçülmüştür. Daha sonra bu bakterilerin hidroksiapatit diskler ile rezin ve cam iyonomer içerikli fissür örtücülerden hazırlanan diskler üzerinde oluşturdukları üçlü biyofilm değerlendirilmiştir. Örnekler üzerinde oluşan biyofilmin kalınlığı, biyokütlesi vb. özellikler konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile belirlenmiştir.

Bulgular: İlk olarak bakterilerin 24 saat boyunca üremeleri incelenmiş ve hem ksilitol hem de eritritol, *S. mutans, S. sobrinus ve S. wiggsiae*'nin üremesini önemli ölçüde engellemiştir. 5 ksilitol+%5 eritritol kombinasyonun da önemli inhibitör etkileri olduğu, %5 sükroz grubunun ise diğer gruplara kıyasla sürekli olarak daha yüksek üreme oranları gösterdiği bulunmuştur. Yüzeyler üzerinde oluşan üçlü biyofilm özellikleri değerlendirildiğinde ise, en düşük biyokütle ve biyofilm kalınlığının %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol içeren bileşimde olduğu görülmüştür. Ayrıca cam iyonomer yüzeylerde biyofilm oluşumu, hidroksiapatit ve rezin bazlı yüzeylere göre daha düşük bulunmuştur.

Sonuç: Hem ksilitol hem de eritritol, önemli karyojenik bakterilerin üremesini etkili bir şekilde engellemektedir. Ayrıca bu şeker alkollerinin farklı oranlarda kombine kullanımının ağızdaki farklı bakteri türleri ve suşlarına karşı daha etkili olabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Eritritol, ksilitol, fissür örtücüler, *S. mutans, S. sobrinus*

2. SUMMARY

Title of Thesis: In vitro evaluation of the effects of different sugar alcohol concentrations on the biofilm formed on fissure sealants

Student Name, Surname: Samyeli Sarıhan

Supervisor Name : Doç. Dr. Figen Eren

Program Name : Pedodontics PhD Program

Objective: The aim of this study was to evaluate the effects of xylitol and erythritol, prepared at various concentrations, on the growth of the key cariogenic bacteria *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), and *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547), as well as on the biofilm formed by these bacteria on different surfaces.

Materials and Methods: 5 study groups containing sugar alcohols as 10% erythritol, 10% xylitol, 5% xylitol+5% erythritol mixture, 7,5% xylitol+2,5% erythritol mixture, 2,5% xylitol+7,5% erythritol mixture and a control group containing 5% sucrose were formed. The absorbance values of the bacteria at 0, 1, 2, 4, 6 and 24 hours of growth in 6 different solutions were measured using a 630 nm Microplate Elisa Absorbance Reader (MS4-MaxiRead96, MaxiLab Biotechnology). Then, the triple biofilm formed by these bacteria on hydroxyapatite disks and disks prepared from resin and glass ionomer fissure sealants were evaluated. The thickness, biomass, etc. of the biofilm formed on the samples were determined by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and scanning electron microscopy (SEM).

Results: Initially, the bacterial growth over a 24-hour period was examined, and both xylitol and erythritol were found to significantly inhibit the growth of *S. mutans*, *S. sobrinus*, and *S. wiggsiae*. The combination of 5% xylitol+5% erythritol group also showed significant inhibitory effects, while the 5% sucrose group consistently showed higher growth rates compared to the other groups. When the characteristics of the triple biofilm formed on the surfaces were evaluated, it was found that the lowest biomass and biofilm thickness were found in the group containing 2,5% xylitol+7,5% erythritol. In addition, biofilm formation on glass ionomer surfaces was found to be lower than on hydroxyapatite and resin-based surfaces.

Conclusion: Both xylitol and erythritol effectively inhibit the growth of important cariogenic bacteria. It also suggests that the combined use of these sugar alcohols in different ratios may be more effective against different bacterial species and strains in the mouth.

Keywords: Erythritol, xylitol, fissure sealants, *S. mutans, S. sobrinus*

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Bu tez çalışmasında; çeşitli konsantrasyonlardaki şeker alkollerinin, karyojenik bakterilerin üreme hızına ve bu karyojenik bakterilerin hidroksiapatit ve fissür örtücü yüzeyler üzerinde ölü ve canlı hücrelerin oluşturduğu biyofilmin kütlesine, ortalama ve maksimum kalınlığına etkileri incelenmiştir.

Günümüzde aşırı şeker tüketimiyle ilgili birçok olumsuz sağlık koşulunun bir sonucu olarak, düşük glisemik indeksleri ve kalorileri nedeniyle tatlandırıcılar, sükroz için uygun bir alternatif olmuştur. Bu tatlandırıcılardan şeker alkolleri; sükroza oranla oldukça az kaloriye sahip olmaları ve düşük karyojeniteye sahip olmaları veya hiç karyojenik olmamaları nedeniyle sıklıkla tercih edilmektedir (Zumbe ve ark., 2001).

5 karbonlu bir şeker alkolü olan ksilitol, bazı sebze ve meyvelerde bulunan doğal bir şekerdir. Tatlandırma gücü sükroz ile aynıdır. Glisemik indeksi 12, kalori değeri 2,4 kcal/g dır. Ağız içerisinde ferahlık hissi veren ksilitol, şekersiz sakızlarda da tatlandırıcı olarak bulunmaktadır. *Streptococcus mutans* üremesini ve asit üretimini inhibe eder. Klinik çalışmalar ayrıca ksilitolün plaktaki *Streptococcus mutans* sayısını, plak miktarını ve çocuklarda çürük insidansını azalttığını göstermiştir (Ly ve ark., 2006). 4 karbonlu bir şeker alkolü olan eritritolün de çürük önleyici olduğu öne sürülmüştür. Eritritol kavun, armut, üzüm gibi meyvelerde ve ayrıca mantar ve balda bulunan bir şeker alkolüdür. Glukoz ve sakkarozdan bir tür maya ile fermentasyon yoluyla endüstriyel olarak elde edilir. Sükrozun % 70'i kadar tatlıdır. Glisemik indeksi 0, kalori değeri 0,2 kcal/g dır (Bornet ve ark., 1996).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde, ksilitol kullanımıyla ilgili in vivo ve in vitro çalışma sayısının oldukça fazla olduğu, ancak eritritol ile ilgili yapılan çalışmaların sınırlı kaldığı gözlenmiştir (Burt, 2006). Çalışmamızda standart steril hidroksiapatit örnekler ve çocuk diş hekimliğinde oldukça önemli bir yere sahip olan fissür örtücü materyallerden hazırlanan örnekler yüzey olarak kullanılmıştır. Bu materyaller ve seçilmiş olan karyojenik bakteriler çeşitli konsantrasyonlarda hazırlanan ksilitol, eritritol ve sükroz çözeltileri içinde incelenmiştir. Hazırlanan çeşitli konsantrasyonlardaki eritritol ve ksilitol çözeltileri karışım halinde de kullanılarak karyojenik bakteriler üzerine sinerjistik ve tek başına kullanımlarının etkileri karşılaştırılmıştır. In vitro olarak gerçekleştirdiğimiz bu tez çalışmamızda test edilen izolatların seçili diş malzemeleri üzerinde ve tatlandırıcıların etkisi altında biyofilm oluşturma yeteneği (biyokütle, biyofilm kalınlığı, taramalı elektron mikroskobunda biyofilm oluşum analizi) değerlendirilmiştir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Diş Çürüğü

Diş çürüğü, diş plağındaki bakterilerin karbonhidratları fermante etmesiyle oluşan asitlerin etkisiyle, özellikle laktik asidin diş dokularını yerel olarak bozmasıyla meydana gelen bir enfeksiyon hastalığıdır (Touger-Decker & Van Loveren, 2003).

Günümüzde bulaşıcı ve enfeksiyöz bir hastalık olarak kabul edilen çürüğün temelinde; dişlerin organik matriks ile inorganik kalsiyum fosfat kristalleri arasındaki elektrostatik bağların, H+ iyonları tarafından bozulması yatar. Bu süreç, kristal yıkımıyla başlar ve sonuç olarak diş dokusunda mikro, makro düzeyinde madde kaybı ve kavitasyon gelişimiyle devam eden geri dönüşümsüz bir patolojik değişime yol açar (Aoba, 2004).

Diş çürüğü, demineralizasyon ile remineralizasyon arasındaki kimyasal dengeye bağlı olarak tanımlanabilen bir enfeksiyon hastalığıdır. Eğer demineralizasyon remineralizasyona üstün gelirse, diş çürüğü gelişir. Ağızdaki mikroorganizmalar, biyofilm içinde metabolik olarak aktiftirler. Bazı bakteriler, diyet yolu ile alınan karbonhidratları (örneğin sükroz ve glikoz) fermante edebilir. Bu fermantasyona bağlı olarak asit üretilir ve plak pH değeri kısa sürede 5 altına düşüş gösterir. pH değerinde tekrar eden bu düşüşler ise dişin yüzeyinde demineralizasyona yol açar. Açığa çıkan asit, tükürük tarafından nötralize edilir; böylece pH yeniden yükselir ve mineraller geri kazanılır. Bu süreç ise remineralizasyon olarak adlandırılır. Bu açıklamadan anlaşılacağı gibi, çürük olgusu yaygın bir doğal süreçtir. Biyofilm oluşumu ve biyofilmin metabolik aktivitesi engellenemese de, hastalık durumu kontrol altına alınabilir ve başlangıçtaki, klinik olarak lezyon oluşumu gözlenmeyen bu süreç durdurulabilir; böylece gelecekte çürük lezyon oluşumu inaktif hale getirilebilir (Kidd & Fejerskov, 2016).

Günümüzde çürük oluşumu ile ilgili yaygın yaklaşım, çürük lezyonlarının tek yönlü demineralizasyondan ziyade, bir dizi demineralizasyon ve remineralizasyon olayının sonucu oluştuğudur. Özellikle plak bileşimindeki periyodik değişiklikler, diş-plak arasındaki demineralizasyon ve remineralizasyon döngüsü ile ilişkilidir (Gao ve ark., 2001).

Diş çürüğü oluşumu için belirli risk faktörlerinin bir araya gelmesi gerekir. Bunlar arasında mikroflora (diş yüzeyinde yerleşen asidojenik bakteriler), konak (tükürük kalitesi ve miktarı, diş yapısının kalitesi), diyet (özellikle nişasta, sukroz gibi fermante edilebilir karbonhidrat alımı) ve zaman (diş plağındaki bakteriler yoluyla üretilen inorganik asitlerin diş ile temas süresi) yer alır (Axelsson, 2000).

Şekil 1. Diş çürüğü oluşumunda risk faktörleri (https://www.haleonhealthpartner.com/tr-tr/oral-health/conditions/enamel-wear/causes-and-mechanisms/)

4.2. Mikrobiyal Dental Plak

İlk kez 1882' de Witzel tarafından bakterilerin, periodontal hastalıkların nedeni olduğu öne sürülmüştür. Miller 1890 yılında, ağız mikrobiyatasındaki bakterileri sınıflandırarak bu mikroorganizmaların diş çürüklerine ve periodontal hastalıklara neden olduğunu belirtmiştir. Mikrobiyal dental plak, konak ve mikroorganizmalar tarafından üretilen polimerlerle oluşan, diş yüzeyinde doğal olarak ortaya çıkan bir yapıdır (Leach ve ark., 1989).

Mikrobiyal dental plak, içerisinde yaklaşık 700-800 farklı türde mikroorganizma barındıran bir biyofilm tabakasıdır. Bu tabaka bakteri, protozoa, virüs, mikoplazma gibi birçok tür içermektedir (Kinane, 2001).

Mikrobiyal dental plak oluşumu üç aşamada incelenir:

- İlk evre, diş fırçalama sonrası diş yüzeyinin ince bir film tabakası olan pelikıl ile kaplanması olarak tanımlanır. Pelikılın içinde; müsin, tükürük glikoproteinleri, immunoglobulinler ve çeşitli mineraller bulunur. Kalınlık olarak 0,05-1µ arasında değişen pelikıl, oral kavitedeki çeşitli yapıların kurumasını önleyerek bir koruyucu bariyer oluşturur ve mikroorganizmaların bu bariyer sayesinde diş yüzeyine tutunmalarını kolaylaştırır.
- İkinci aşama, mikroorganizmaların pelikıla göç etmesi ve diş yüzeyine yapışmasıyla başlar. Bakteriler*, Streptococcus* ve *Actinomyces* gibi gram pozitif aerob türlerdir ve diş yüzeyine tutunmayı sağlayan fimbriya yüzey yapısına sahiptirler.
- Üçüncü aşamada, çeşitli mikroorganizmaların kolonizasyonu ile biyofilm oluşmaya başlar. Mikrokoloni gelişimi ve bakterilerin birbirlerine tutunmasıyla biyofilm kalınlığı artışı meydana gelir. Zaman geçtikçe, biyofilm yapısı karmaşıklaşır ve ortam gram negatif anaerobik bakteriler açısından daha elverişli bir hale gelir. Bu aşamada, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* vb. ikincil yığılım oluşturan mikroorganizmalar, pelikıl içerisinde bulunmakta olan diğer mikroorganizmalara tutunabilirler (Quirynen ve ark., 2006).

Diş yüzeyindeki biyofilm tabakasına ağız mikrobiyatasındaki mikroorganizmaların yapışması ile dental plak meydana gelir. Biyofilm oluşumu, zamandan ve genetik kontrol altında olan proteinlerin ekspresyonundaki değişimlerden etkilenir. Karbonhidrat metabolizması ürünleri olan formik, laktik, asetik ve propionik asitler üreten karyojenik mikroorganizmalar, bu asitlerin varlığıyla pH değerini, kritik seviye olan 5,5 ve altına düşürürler. Bu durum minedeki hidroksiapatit kristallerinin demineralize olması ve böylece diş dokularının proteolitik yıkımıyla sonuçlanır (Strużycka, 2014).

Streptococcus mutans ve diğer streptokoklar, *Lactobacillus ve Actinomyces* gibi mikroorganizmalar bu süreç boyunca önemli bir rol oynarlar. Dental biyofilm; aktif ve dinamik bir metabolik yapıdır. Biyofilmin pH değeri devamlı bir şekilde değişir, bu da mine yüzeyinde demineralizasyon ve remineralizasyon olaylarını tetikler. Sağlıklı koşullar altında bu süreçler denge içerisindedir ve mine dokusunda kalıcı bir hasar oluşturmaz (Strużycka, 2014).

4.3. Mikrobiyal Dental Plağı Oluşturan Mikroorganizmalar

4.3.1. Streptokoklar

Streptokoklar, oval ve yuvarlak şekilli, tek tek veya ikişer ikişer bir araya gelmiş, uzun ya da kısa zincirler oluşturan, katalaz negatif, gram pozitif ve kok şekilli mikroorganizmalardır (Samaranayake, 2002).

Streptokoklar, fakültatif anaerob, genelde 2 μm' den küçük, glikozu heksoz difosfat yoluyla fermante ederek laktik asit üreten, hareketsiz ve sporsuz bakterilerdir. Mezofilik özellik gösterirler ve 18-40°C arasında çoğalma gösterirler. Streptokoklar; biyokimyasal yapıları, üreme özellikleri, antijenik yapıları ve hemoliz özelliklerine göre laktik, viridans, piyojen ve enterokoklar olarak sınıflandırılırlar (Whiley & Beighton, 1998).

Oral streptokoklar ise insandaki oral mikrobiyatanın %30-%60' ını oluşturmaktadır. Yüksek antimikrobiyal duyarlılığa ve düşük patojeniteye sahiptirler. Oral streptokoklar, dört ana grupta incelenirler (Whiley & Beighton, 1998) (Tablo 1).

Tablo 1. Oral streptokok grupları

MUTANS GRUBU	MİLLERİ GRUBU	ORALİS GRUBU	SALİVARİUS GRUBU
Streptococcus mutans	*Streptococcus anginosus*	*Streptococcus sanguis*	*Streptococcus salivarius*
Streptococcus sobrinus	*Streptococcus intermedius*	*Streptococcus parasanguis*	*Streptococcus vestibularis*
Streptococcus ferus	*Streptococcus constellatus*	*Streptococcus mitis*	
Streptococcus macacae		*Streptococcus oralis*	
Streptococcus cricetus		*Streptococcus gordonii*	
Streptococcus rattus			
Streptococcus downei			

4.3.1.1. *Streptococcus mutans* grubu

Streptococcus mutans, 1924 yılında ilk kez Kilian Clarke adlı bir araştırmacı tarafından çürük lezyonlar üzerinden izole edilerek tanımlanmıştır. Bu araştırmacı, dişteki derin dentin çürükleri

üzerinde minik zincirler oluşturmuş coccobasillere rastlamış ve bu coccobasillere *Streptococcus mutans* adını vermiştir (Clarke, 1924).

Streptococcus mutans grubu; mutasyona uğramış streptokok formudur ve hücre duvarlarında bulunan karbonhidrat yapıdaki antijenlerin serolojik spesifitesine bakılarak sekiz farklı serotipe ayrılmıştır. Bu serotipler; *S. mutans, S. macacae, S. sobrinus, S. downei, S. rattus, S. cricetus, ve S. ferustur* (Tablo 2) (Marsh & Martin, 2001).

Tablo 2. *Streptococcus mutans* sınıflaması

TÜR	SEROTİP	KONAK TİPİ
Streptococcus mutans	*S. mutans serotipleri c,e*	İnsan
Streptococcus sobrinus	*S. mutans serotipleri d*	İnsan
Streptococcus cricetus	*S. mutans serotip a*	İnsan
Streptococcus downei	*S. mutans serotip h*	Maymun
Streptococcus macacae		Maymun
Streptococcus rattus	*S. mutans serotip b*	İnsan ve Kemirgen
Streptococcus ferus		Rat

İnsanlarda yapılmış olan birçok epidemiyolojik çalışmanın sonucuna göre, çürük lezyonlarda en yoğun ve yaygın olarak bulunan, bu nedenle de çürüğün oluşumunda ana etiyolojik faktörlerden biri olarak kabul gören mikroorganizmalardır. *Streptococcus mutans,* hem asitlere karşı toleranslı hem de asidojeniktirler (Berkowitz, 2006). Bu bakteriler, hem çocuk hem erişkin mine çürüklerinde, yaşlı bireylerde kök yüzey çürüklerinde ve erken çocukluk çağı çürüklerinde primer patojen olarak kabul edilmiştir (Jyoti ve ark., 2009). Ayrıca, sükrozdan laktik asitlerin üretimi sonucu hidroksiapatit yapısının çözünmesiyle diş yüzeyinden kalsiyumun ayrılmasına ve dental dokuların zayıflamasına sebep olmaktadırlar. Bu bakteri türünün üremesi için özel şartlara ihtiyacı yoktur, sadece belirli vitaminlere ihtiyaç duyarlar. Amonyak nitrojen kaynağı olarak kullanılmaktadır ve sulfonamidlerin ağızdaki diğer streptokoklar için inhibisyon etkisi göstermediği bildirilmiştir (Tanzer ve ark., 2001).

Marsh ve Martin' in yaptığı çalışmada, *Streptococcus mutans'* ın düşük pH ortamlarında yaşayabildiği ve yüksek oranda yapışkan, çözünmeyen ve hücre dışı glukan plak matriksi oluşturduğu ve böylece pelikıl yüzeyine yapışarak plak birikimine katkı sağladığı belirtilmiştir (Marsh & Martin, 2001).

4.3.2. *Scardovia wiggsiae*

Scardovia wiggsiae (wiggs'i.ae.) anaerobik mikrobiyolojiye önemli katkılarda bulunan Amerikalı mikrobiyolog Lois Wiggs' in anısına adanmıştır. Bu bakteri, Bifidobacteriaceae ailesinin bir üyesidir ve insan ağız boşluğundan 5 suşu izole edilmiştir. Gram (+), spor oluşturmayan ve hareketsiz olan *S. wiggsiae*; fruktoz, galaktoz, glukoz gibi şekerleri fermente edebilirken, dekstran, mannitol, sorbitolü fermente edemez. Laktoz fermantasyonu ise değişkenlik gösterebilir. Düşük miktarda laktik asit, yüksek miktarda asetik asit üretebilen asidojen bakterilerdir (Downes ve ark., 2011).

Kültür kullanımıyla gerçekleştirilen şiddetli erken çocukluk çağı çürükleri (ŞEÇÇ) mikrobiyota araştırmalarında, özellikle *S. mutans* ve diğer streptokok türleriyle *Lactobacillus, Actinomyces* ve *Veillonella* türlerine odaklanılmıştır. Ancak moleküler yöntemlerin kullanılması, çürükle ilişkili yeni bakteri türlerinin tanımlanmasına olanak sağlamıştır. Özellikle *S. wiggsiae* gibi yeni tanımlanan bakterilerin, çürükle ilişkili mikrobiyal kompleksin önemli bir parçası olduğu düşünülmektedir (Jenkinson, 2011).

Kanasi ve arkadaşları, türe özgü bir inceleme yaparak Bifidobacteriaceae türlerinin ŞEÇÇ ile güçlü bir ilişkisi olduğunu belirlemiştir (Kanasi ve ark., 2010). Kaur ve çalışma arkadaşları ise tükürük Bifidobacteriaceae seviyelerinin yüksek olmasının çocuklardaki artmış tükürük aktivitesiyle ilişkili olduğunu bulmuştur (Kaur ve ark., 2013). Scardovia filotipi, dentin çürüğü mikrobiyota çalışmalarında tanımlanmıştır ve daha sonra bu bakteri grubu çocuklardaki oklüzal çürüklerden izole edilmiştir (Mantzourani ve ark., 2009).

Tanner ve arkadaşları, 40 çürüksüz ve 40 ŞEÇÇ' li çocuk üzerinde yapılan kültür ve moleküler inceleme sonuçlarında*, S. mutans* ve *S. wiggsiae*' nin ŞEÇÇ ile yüksek düzeyde ilişkili olduğunu bulmuşlardır (Tanner ve ark., 2011).

Ayrıca, ŞEÇÇ' de *Bifidobacteriaceae* ve *S. mutans* arasında güçlü bir ilişki olduğunu ve *S. mutans*' ın tespit edilmediği SEÇÇ' li vakalarda *bile S. wiggsiae*' nin izole edildiğini bildirmişlerdir (Tanner ve ark., 2011). Tanner ve ekibi, *S. mutans*' ın varlığından ya da yokluğundan bağımsız olarak *S. wiggsiae*' nin beyaz nokta lezyonlarında ilişkili olduğunu bulmuştur (Tanner ve ark., 2012).

Torlakovic ve çalışma arkadaşları, başlangıç mine lezyonlarında *Scardovia* türlerinin dental plak mikrobiyotasının etkili bir üyesi olduğunu ve özellikle *S. wiggsiae'* nin lezyonların şiddetini arttırarak çürük gelişiminde etkili olduğunu belirtmişlerdir (Torlakovic ve ark., 2012).

Çocuklarda enfekte pulpalarda da *S. wiggsiae* tespit edilmiş ve derin dentin çürüğünün ilerlemesinde etkili olan mikrobiyal kompleksin önemli bir parçası olabileceği düşünülmüştür (Tanner, 2015). Ledezma-Rasillo ve ekibi, nekrotik süt dişi pulpasında yüksek oranda *S. wiggsiae* kültür edildiğini bildirmişlerdir (Ledezma-Rasillo ve ark., 2010).

4.4. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Faktörler

Diş çürüğü, biyolojik ve psikososyal etkileşimlerle şekillenen, genetik ve çevresel faktörlerin bir sonucudur. Son 30 yılda düşüş göstermiş olsa da hâlâ çocuklar ve yetişkinler için yaygın bir sağlık sorunudur. Diş yüzeyinin bakteri plağı ile kaplanmasıyla çürük oluşumu başlar. Ardından, plağın içindeki asidojenik mikroorganizmalar karbonhidratları fermente ederek asit üretirler. Bu asitler, mine ve dentin yüzeylerinden Ca ve PO_4 minerallerini çözerek demineralizasyon sürecini başlatır (Featherstone, 2000). Tedavi edilmezse bu yavaş ilerleyen süreç, kronik enfeksiyona yol açabilir ve sonunda diş kaybına ve alveoler kemik kaybına neden olabilir (Topaloğlu, 2009).

Plağın asit üretebilmesi için, fermente edilebilir karbonhidratların belirli bir süre diş yüzeyinde bulunması gerekir. Plaktaki bakteriler bu karbonhidratlardan besin sağlar ve böylece ekstrasellüler polisakkarit sentezi gerçekleşir. Kompleks yapıdaki karbonhidratlar ağız içerisinde tam anlamıyla sindirilmediği için kısmen zararlıdır; ancak düşük molekül ağırlıklı olanlar plak içine kolayca difüze olarak bakteriler tarafından hızlı bir şekilde metabolize edilebilir. Plaktaki asit belirli bir süre boyunca kalır ve normal pH değerine geri dönmesi 30-60 dakika sürer. pH değerinin başlangıçtaki değerlere kademeli olarak dönmesi, bu asitlerin plak yüzeyinden uzaklaşmasıyla gerçekleşir. Karbonhidratların sık ve tekrarlayan kullanımı, plak pH değerini düşük tutarak dişlerde demineralizasyona sebep olur. Glikoz ile yapılan çalkalama işleminden sonra, plak pH değerindeki değişim belirli bir zaman aralığında grafik olarak gösterilebilir. Bu grafik, 'Stephan eğrisi' olarak adlandırılır. Sükrozdan sentezlenen ekstrasellüler polisakkaritler, fruktoz, glikoz veya laktozdan sentezlenenlere oranla daha hızlı sentezlenir. Bu nedenle, diğer tüm şekerler de zararlı olmasına rağmen, sükroz içlerinden en karyojenik olanıdır. Aynı zamanda sükrozun en çok tüketilen şeker olması, diş çürüğü için önemli bir etkendir (Kidd & Fejerskov, 2016).

Stephan ve ark., ağızda sükroz veya fermente edilebilir karbonhidratları içeren bir gıdanın tüketilmesinden 3-5 dakika sonra mine ve dentin yüzeyi için plak pH değerlerinin sırasıyla 5,5-6 'nın altına düştüğünü belirtmişlerdir. Bu kritik pH değerinin altındaki durumlarda demineralizasyon süreci başlar ve devamı, oral pH değerinin bu düşük seviyede ne kadar

kalacağına bağlıdır. pH seviyesinin kontrol edilmesi ise tükürük miktarı ve tükürüğün içeriğiyle ilişkilidir (Stephan, 1940).

Sükroz ekstraselüler polisakkarit ve asitlerin üretimi için önemli bir substrattır ve kolaylıkla diş plağı içerisine yayılır. Karyojenik streptokoklar sükrozdan başlangıç adezyonu sağlamadan sorumlu olan glukanı üretirler. Glukan plak oluşumu için beslenme kaynağı ve matriks görevi görür. Diş çürüğü oluşumunda sükrozun sık alımı ve yapışkan yapısı etkilidir. Tüketilen sükroz konsantrasyonu, mine dış yüzeyi ile temas süresini belirler. Glikoz ve fruktoz da karyojeniktir ancak sükrozdan daha az etkilidir. Düşük karyojeniteye sahip doğal ve yapay şeker alternatifleri, sakızlar ve çocuk gıdalarında kullanılabilir (Seneviratne ve ark., 2011).

Zaura ve Ten Cate, ara öğünlerde alınan şekerin dişlere daha büyük zarar verdiğini belirtmişlerdir. Çürük lezyonlarının oluşumunda, şeker miktarından ziyade yapışkanlık derecesinin önemli olduğu kanıtlanmıştır (Zaura & Ten Cate, 2004).

Dişlerin çürüğe karşı dayanıklılığı, kişinin yaşına ve alışkanlıklarına bağlı olarak değişir. Genetik yatkınlığın da çürük oluşumu üzerinde etkisi olduğu bilinmektedir. Yiyeceklerin sindirimi sırasında asidojenik potansiyeli belirleyen konak faktörleri arasında; tükürük kalsiyum-fosfat konsantrasyonu, tükürük viskozitesi ve akış hızı, çürüğe elverişli bölgelerdeki plak varlığı ve yapısı, diş anatomisi, mine yapısı ve plaktaki fluorid içeriği, emme, çiğneme, yutkunma şekli, salınan iyonların tamponlama kapasitesi bulunmaktadır (Frostell, 1980).

Tükürüğün mekanik temizleme etkisi, yiyecek artıklarını ve ağızdaki serbest mikroorganizmaları uzaklaştırmada önemlidir. Tükürük, diş plağındaki bakterilerin oluşturdukları asitleri nötürleyen güçlü bir tamponlama kapasitesine sahiptir. İçerisindeki kalsiyum ve fosfat iyonları, beyaz nokta lezyonlarının remineralizasyonuna katkıda bulunur. Diş plağında bulunan bakterilerin ürettiği asitlerin dişle temas süresi de çürük oluşumunda kritiktir. Diş yüzeyi temizlendikten sonraki 48 saat içinde etkin temizlenmemiş bölgelerde mikrobiyal dental plak birikimi oluşmaya başlar (Samaranayake, 2002).

4.5. Çürük Önleyici Yöntemler

Diş plağı, biyofilm kontrolü için kritik bir adımdır ve hastaların günlük olarak gerçekleştirdikleri mekanik diş temizliğini etkili ve düzenli bir şekilde yapmaları, diş ve diş eti sağlığını korumanın en etkili yollarından biridir (Perry, 2006).

4.5.1. Mekanik mikrobiyal dental plak kontrolü

Genellikle profesyonel plak temizliği dışında, bireylerin evde rahatlıkla uygulayabileceği diş fırçaları, ara yüz temizleyicileri ve irrigasyon araçları da yaygın olarak kullanılmaktadır (Perry, 2006).

4.5.1.1. Diş fırçası kullanımı

Diş fırçası; boyut, şekil, fırça kıllarının düzeni, sertlik gibi özellikler bakımından değişiklik gösterir. İdeal bir diş fırçası, ağız içinde tüm bölgelere kolayca ulaşabilmeli ve etkili bir şekilde temizlik sağlamalıdır. Fırça seçiminde, kullanım rahatlığı ve işlevsellik iki temel faktördür. İdeal bir fırça; küçük başlı, düz saplı, 10,3 mm uzunluğunda ve 0,3 mm çapında naylon kıllarla donatılmış olmalıdır. Kılların uçları yuvarlatılmış olup, 2-4 sıra demetli ve her sıradaki kıllar eşit aralıklarla dizilmelidir. Çocuklar için ise daha küçük başlı, ince kıllı (0,1 mm çapında) ve daha kısa (8,7 mm uzunluğunda) fırçalar önerilir (Perry, 2006).

Yumuşak kıllı fırçalar daha esnektir ve kullanımları daha kolaydır; diş ve diş eti birleşimini, diş eti oluğunu daha etkin temizleyerek aproksimal bölgelere rahatça ulaşım sağlar. Sert kıllı fırçaların yanlış endikasyon ve şekillerde kullanılması, daha fazla diş eti çekilmesine neden olabilir. Diş eti çekilmelerinde, diş fırçalarının kullanım şekilleri ile macunların aşındırıcı özellikler, kıl sertliğinden daha belirleyicidir. Yanlış diş fırçalama alışkanlıkları; diş eti çekilmelerine, diş eti çizgisinde kama şeklindeki defektlere, ağrılı ülserlere yol açabilir. Günlük kullanımda, titreşimli-dönme teknolojisine sahip şarj edilebilir elektrikli diş fırçaları da önerilebilmektedir (Zimmer ve ark., 1999) (Şekil 2).

Şekil 2. Diş fırçası çeşitleri ve farklı fırça başlıkları

4.5.1.2. Arayüz temizleyicileri kullanımı

Diş fırçasıyla dişlerin yalnızca dört yüzeyinin (vestibül, palatinal, lingual ve oklüzal) temizlenmesi, ağız hijyeni açısından yeterli değildir. Dişler arasındaki temasların çok sıkı olduğu veya aralıkların oldukça dar olduğu durumlarda, dental plak etkin bir şekilde uzaklaştırılamaz. Tüm bu sebeplerden; diş ipi, plastik veya tahta kürdanlar, arayüz fırçaları gibi araçlar interdental bölgelerin temizliği için tavsiye edilmektedir (Perry, 2006).

4.5.2. Kimyasal mikrobiyal dental plak kontrolü

Bireylerin gün içerisindeki oral hijyen rutininde, mekanik olarak gerçekleştirdikleri plak kontrolüne ek olarak antimikrobiyal kemoterapötiklerin kullanılması, plak kontrolünü sağlamada ve gingivite karşı korunmada etkinliği artırır. Kullanılan antimikrobiyal etkili kimyasal maddeler, mikroorganizmaların çoğalma (logaritmik) fazı üzerinde etkilidir. Kimyasal maddelerin kullanımı farklı taşıyıcılar aracılığıyla gerçekleştirilebilir. Diş macunları, spreyler, gargaralar, vernikler ve sakızlar bu taşıyıcıların başlıcaları arasındadır. Gargara çözeltileri ve diş macunları bunlar arasında en yaygın olarak kullanılanlardır (Inglehart & Tedesco, 1995).

4.5.2.1. Fluorid uygulamaları

Fluorid, ağız sağlığı için gereken eser elementlerden biridir. Dünya Sağlık Örgütü' nün yürüttüğü çalışmalarda, birçok ülkede dental sağlık durumu DMF (çürük, çekilmiş diş, dolgu) indeks kullanımı ile incelenmiştir. Beslenme alışkanlıklarındaki değişikliklerle ortaya çıkan artan orandaki diş sağlığı problemlerine, koruyucu diş hekimliği uygulamalarının önemli bir çözüm olabileceği belirtilmiştir. 20. yüzyılın ilk yarısında ABD' de suya fluorid eklenmesiyle diş çürüğü oranlarının % 50 azaldığı gösterilmiş, bu da fluoridin önemini vurgulamıştır. Yapılan çalışmalarda; suya fluorid ilavesi, fluorid içerikli diş macunları, yüzeyel etkili fluorid jel uygulamaları ve fluorid içerikli tabletlerin kullanımıyla diş çürüme oranlarında belirgin ölçüde düşüşler görülmüştür (Kiinzel, 1993).

Fluoridin, diş çürüğü oluşumunu engelleyici özelliklere sahip olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur. Fluoridin çürük önleyici etkisi çeşitli yollarla gerçekleşir. Fluorid, diş üzerinde hem yüzeyel hem de sistemik yollarla etki gösterir (Groeneveld ve ark., 1990).

Fluorid; hidroksiapatiti (HA) daha az çözünür hale getirerek, mine çözünürlüğünü azaltır ve mineye yapısına katılarak mineral yapısını değiştirir. Bu, fluoridin mine üzerindeki etkisidir.

Fluorid ayrıca diş plağı üzerine de etki eder. Diş plağını direkt etkileyerek plak içerisindeki mikroorganizmaların asit oluşturmalarını engeller (GÜRGAN ve ark.).

Mine dış yüzeyinde ve mine içerisindeki fluorid iyonları, mine dokusunu güçlendirerek yapıyı sadece diş çürüğüne karşı daha dirençli hale getirmez, aynı zamanda mikroorganizmaların oluşturduğu asitlerden kaynaklanan erken dönemdeki diş çürüklerinin onarımını ve bu çürüklerin remineralizasyonunu da teşvik eder (GÜRGAN ve ark.).

Remineralizasyon için gerekli olan fluorid iyonları; fluoridli su, diş macunu, fluoridli tablet kullanımı, ağız gargarası ve jeller gibi diğer fluoridli ürünlerden ve fluoridle zenginleştirilmiş tuz, süt vb. elde edilir. Çürükten maksimum korunma ise fluoridin diş oluşumunun tüm aşamalarına sistemik olarak katılması ve diş ağız içerisine sürdükten sonra dişe yüzeyel etkiyle sağlanır. Dentin içindeki fluorid konsantrasyonu genellikle mineden daha yüksektir (Hargreaves, 1992).

Günümüzde, fluoridin diş sürmeden önceki etkisinin sistemik olarak, diş sürdükten sonraki etkinin ise daha çok topikal uygulamalar yoluyla gerçekleştiği kabul edilmektedir. Diş sürdükten sonra, diş plağıyla temasta bulunan tükürükteki fluorid seviyelerinin 0,1-2 ppm oranında olmasıyla birlikte HA kristallerindeki fluorid konsantrasyonunda artış olduğu belirlenmiştir (Çildir, 2006). İlk temas ya da tükürükteki bir miktar salgıyla birlikte ağız içi sıvıda bulunan görece düşük orandaki fluorid konsantrasyonu; mineyi remineralize ederek plak içerisindeki fluorid içeren minerallerin depolanmasını artırır. Ayrıca asidik ortamda, mine üzerinde fluorid içerikli apatit kristal oluşumunu hızlandırır böylece minenin demineralizasyonu yavaşlatır (HC, 1990).

Fluorid, antikaryojenik etkileriyle şu özellikleri göstermektedir: HA 'nın hidroksil içeren gruplarını fluoroapatit oluşturarak değiştirir. Fluoroapatit, asit içerisinde daha az çözünür bir hale gelir. Mine ve dentin üzerindeki başlangıç çürük lezyonlarının remineralizasyonunun gerçekleşmesine yardımcı olur. Plak metabolizmasına katılıp, bakterilerin zar geçirgenliklerini azaltır, glikolizisi düşürür, intrasellüler polisakkaritlerin sentezini inhibe eder (Øgaard, 1990). Topikal uygulanan fluorid, diş sağlığını desteklemek için profesyonel ve bireysel uygulamalar olarak iki temel yöntemle gerçekleştirilir. Profesyonel uygulamalar arasında diş hekimleri tarafından sağlanan fluorid içerikli çeşitli vernikler, jeller, solüsyonlar, profilaksi patları ve kontrollü fluorid salımı yapan sistemler bulunur. Bu yöntemler, diş kliniğinde yapılan düzenli kontroller sırasında profesyonelce uygulanır ve genellikle diş hekimi tarafından önerilir. Bireysel uygulamalar ise bireylerin kendi kendine uyguladığı yöntemlerdir. Bu kategoriye

fluorid içeren gargaralar, diş ipleri ve diş macunları gibi ürünler dahildir. Bu ürünler, günlük ağız bakım rutinlerinin bir parçası olarak evde kolayca kullanılabilir (Øgaard, 1990).

4.5.2.2. Şeker alkolleri

Günümüzde sükrozun yerine kullanılmakta olan şeker alkolleri polioller, polialkoller veya polihidrik alkoller olarak da isimlendirilmektedir. Kimyasal olarak ise keton veya aldehit gruplarının, bir hidroksil grubu ile yer değiştirmesiyle oluşan sakkarit türevleridir (Bhise & Kaur, 2013). Molekül içerisinde bulunan sakkarit birim sayılarına göre sınıflandırılırlar. Ksilitol, mannitol ve sorbitol sırasıyla ksiloz, mannoz ve glikozdan türetilmiş monosakkaritlerdir (Zumbe ve ark., 2001).

Doğal olarak bazı meyve ve sebzelerde az miktarda bulunurlar. Ticari olarak da glikoz, mannoz ve ksiloz hidrojenasyonu ile üretilmektedirler. Laktitol ve maltitol de sırasıyla laktoz ve maltoz hidrojenasyonundan üretilmiş disakkaritlerdir (Zumbe ve ark., 2001).

4.5.2.2.1. Ksilitol yapısı ve özellikleri

Ksilitol, sükroza benzer tatlılıkta beş karbonlu şeker alkolüdür. İnsan vücudunda glikoz metabolizması sırasında ara bir ürün olarak oluşur ve birçok meyve ve sebzede de doğal olarak bulunur (Pepper, 2001).

En yüksek kayısıda %1 oranında bulunurken, çilekte, marulda ve kırmızı böğürtlende de bulunabilir. Ksilitol, ilk olarak maya ve deniz yosunlarından elde edilmiştir. Günümüzde ksilitolün üretimi kimyasal, katı-sıvı ekstraksiyon ve biyoteknolojik üretim olarak üç farklı yöntemle yapılmaktadır (Aminoff, 1978).

Ticari olarak ise kimyasal yolla elde edilmektedir ve bitkilerden ksiloz eldesini takiben hidrojenasyon işlemi uygulanarak üretilmektedir. Bu işlem için kullanılmakta olan bitki materyalleri; mısır koçanı, kayın gibi sert ağaçlar, pamuk kabuğu, fındık ve saman kabukları, yulaf ve şeker pancarı posasıdır (Artık ve ark., 1993).

Ksilitol ($C_5H_{12}O_5$), beş karbonlu doğal bir şeker alkolüdür ve şeker alkolleri içerisinde tatlılık bakımından en tatlı olandır. Sükroza benzer bir tatlılık derecesine sahip olup, suda kolayca çözünür ve sorbitolden 2, mannitolden ise 3 kat daha tatlıdır. Bununla birlikte, sükroza kıyasla %40 daha az kalori içerir. Ksilitol, diğer şeker alkolleriyle birlikte kullanıldığında mükemmel bir tat sinerjisi oluşturur. Ayrıca, ağız içerisine alındığında çözünmesi sırasında endotermik reaksiyon oluşur ve böylece ferahlık hissi verir (Aminoff, 1978).

Ksilitol, sağlıklı bireylerde insüline bağımlı olmaksızın karaciğer ve kırmızı kan hücrelerinde glikoz-6-fosfata metabolize edilir. Glikoza dönüşümü oldukça yavaş olduğundan, kan glukozu ve insülin düzeyleri kademeli olarak artar. İnsülin eksikliğinde, ksilitol şeker yerine kullanılabilir. Düşük enerji içeriği ve daha az termojenik etkileri nedeni ile diyabetikler tarafından çekici bir alternatif olarak kabul edilir (Chen ve ark., 2010).

Ksilitolün diyabet hastaları için uygunluğu, sağlıklı bireyler ve diyabet hastalarının katıldığı birkaç kronik ve subkronik çalışmada incelenmiştir. Ksilitol, diyabet hastalarında ağız yoluyla alındığında bile kandaki glukoz seviyesinde herhangi bir artışa neden olmamıştır. Plazma insülin seviyesinde de belirgin bir değişiklik gözlenmemiştir (Pepper, 2001).

Ksilitol, ağız diş sağlığını olumsuz etkilemeyen en etkili tatlandırıcılardan biridir. Diş plağında bulunan önemli mikroorganizmalar tarafından fermente edilemeyen ksilitol, non-karyojenik olarak kabul edilir. Ksilitol içeren sakız kullanımı sırasında plak ve tükürük pH seviyeleri artar, çürük oluşumu engellenirken, *Streptococcus mutans* gibi mikroorganizmaların sayısı azalır (Toors, 1992).

Ksilitol, bakteri hücrelerinde ksilitol 5 fosfata dönüşerek şeker metabolizmasındaki enzimleri inhibe eder, bu da ksilitolün *Streptococcus mutans'* ların glikozdan asit üretimini engellemesine neden olur. Ayrıca ksilitol, diğer şekerlerin bulunduğu ortamlarda bile *Streptococcus mutans'* ın gelişimini önler (Mäkinen ve ark., 2001).

Ksilitolün düzenli kullanımı; diş plağının asidojenik etkisini azaltırken, mineral içeriğini arttırır. Ksilitol içeren sakızların, ağız kuruluğu nedeniyle yüksek çürük riskli hastalarda çürüğü önleme etkisi olduğu belirlenmiştir (Toors, 1992).

Ksilitolün insan sağlığına birçok faydası olmasına rağmen, aşırı tüketimi, sindirilemeyen kısımları kalın bağırsakta fermantasyona yol açarak gaz, kramp ve ishal gibi semptomlara neden olabilir (Winkelhausen ve Kuzmanova, 1998). Diyabetik ve sağlıklı gönüllülerle yapılan çok sayıda çalışma, yüksek dozlarda alımın (günlük 200g' a kadar) bile tolere edilebildiğini göstermiştir (Pepper, 2001).

4.5.2.2.2. Eritritol yapısı ve özellikleri

Eritritol, dört karbonlu bir şeker alkolü (poliol) olup, poliol ailesinin (örneğin, sorbitol, ksilitol) tipik özelliklerine sahiptir. Bu özellikler arasında, asidik ve alkali ortamlarda görece yüksek stabilite, ısıya karşı yüksek stabilite, sükroza yakın tatlılık, sükrozla karşılaştırıldığında düşük kalori, güvenilirlik, non karyojenik potansiyel , düşük glikemik indeks ve gıda üretiminde dolgu maddesi olarak uygunluk bulunur (O'Donnell & Kearsley, 2012).

Eritritol, diğer tüm şeker alkollerinden farklı olarak fermantasyon yoluyla ticari olarak üretilir (Bornet ve ark., 1996). Eritritolün, şekerin yaklaşık olarak %60-80' i kadar tatlılık sağladığı rapor edilmiş, hiçbir kalori katkısı olmaması (nonkalorik) ve iyi tolere edilmesi (iyi sindirilebilir) nedeniyle kan glukozu ve insulin seviyeleri üzerinde herhangi bir etkisi olmadığı bildirilmiştir (Bornet ve ark., 1996).

Eritritol tüketimiyle ilişkilendirilmiş herhangi bir olumsuz etki bulunmadığını bildiren çok sayıda toksikoloji ve güvenlik çalışması bulunmaktadır. Bu kanıtların bir araya gelmesi, eritritolün yiyecekler içerisinde tüketiciler tarafından geniş ürün yelpazesinde kullanımının genel olarak kabul edilmesine önemli katkılarda bulunmuştur (Munro ve ark., 1998).

Eritritolün beslenme ve teknoloji alanındaki faydalarının yanı sıra, ağız ve diş sağlığına olan çeşitli etkileri de gösterilmiştir. Eritritolün karyojenik olmadığı, ilk olarak 1992' de bir grup araştırmacı tarafından sıçanlarda belirlenmiştir (Kawanabe ve ark., 1992). Eritritolün diş çürüklerine etkilerini araştıran çalışmaların, eritritol üretimiyle ilgili buluşların ve eritritolün metabolik etkilerine dair kapsamlı güvenlik sonuçlarının elde edilmesinin ardından, gerçek dünyada tüketiciye yavaş yavaş giriş yapmasıyla dikkat çekmiştir. Fizyolojik olarak kabul edilebilir şeker alkolü tatlandırıcıların sayısının sınırlı olması, eritritolün bu palete hoş bir ekleme olarak kabul edilmesine neden olmuştur (Kawanabe ve ark., 1992).

Eritritolün detaylı bir güvenlik değerlendirmesi Ekim 1996' da Regulatory Toxicology and Pharmacology (Cilt 24, Sayı 2) dergisinde yayınlanmıştır. Bu güvenlik incelemesine dahil edilen 15 yayın, eritritolün iyi tolere edildiğini ve daha büyük miktarlarda alındıktan sonra dahi toksikolojik olarak herhangi bir anlamlı etki oluşturmadığını göstermiştir (Bornet ve ark., 1996).

Tetzloff ve arkadaşlarının sindirim tolerans çalışmaları, ağız yoluyla alınan eritritolün güvenliğini doğrulamıştır; günde 1 g/kg dozda kullanılan eritritolün, insanlar tarafından tekrarlanan dozlarda kullanımı iyi tolere edilmiştir (Tetzloff ve ark., 1996). Erişkinlerde, en şiddetli koşullarda bile, boş mideye 15 dakika içinde içilen bir içecekte tek seferlik alınan 0,7 g/kg eritritol dozu, laksasyona neden olmamıştır (Storey ve ark., 2007) ve aynı koşullar altında 4-6 yaş arası çocuklarda da etki göstermemiştir (Jacqz-Aigrain ve ark., 2015). Karşılaştırma yapmak gerekirse, aynı koşullar altında ksilitolün erişkinlerde laksatif etki göstermediği doz yaklaşık olarak 0,3 g/kg olarak bulunmuştur. Ağız diş sağlığı ürünleri aracılığıyla eritritol maruziyetinin, insanlarda iyi tolere edilen dozunun günde 0,1 g/kg civarında olduğu tahmin edilmektedir (Storey ve ark., 2007).

Eritritol, gıdalarda hacim tatlandırıcısı olarak kullanılan en yeni şeker alkolü türüdür. Diğer tüm şeker alkollerinden birçok açıdan farklıdır. Eritritol, tetritol tipinde olduğu için en küçük moleküler boyuta sahiptir ve fermantasyon yoluyla ticari olarak üretilen ilk şeker alkolüdür. Eritritol; mikroorganizmalarda, alglerde, fermente gıdalarda, likenlerde, mantarlarda, birçok meyve ve sebzede, hayvan ve insan dokularında küçük miktarlarda bulunduğu için hayvanlar ve insanlar tarafından yıllardır tüketilmektedir (Bornet ve ark., 1996).

Eritritol tüketildiğinde, diğer tüm şeker alkollerinden (sorbitol ve ksilitol de dahil olmak üzere) hızlı bir şekilde ve neredeyse tamamen ince bağırsaktan emilir, metabolize edilmez ve değişmeden idrardan atılır (Bornet ve ark., 1996). Tüketilen eritritolün yaklaşık olarak yalnızca %10' u kalın bağırsağa ulaşabilir. Yüksek sistemik biyoyararlanımı, diyabet hastalarının sağlığı açısından da ek faydaları ile ilişkilendirilmiştir. Arteriyel sertliği azaltarak damar endotel fonksiyonunu iyileştirdiği belirlenmiştir (Boesten ve ark., 2015).

Tatlı tadı ve yüksek sindirim toleransı sayesinde eritritol, gıdalarda şeker yerine güvenli şekilde kullanılmakta ve tüketilen gıdaların kalorisini de önemli ölçüde azaltmaktadır. Bugüne kadar yapılan tüm diş ve oral biyolojik çalışmalar, eritritolün çürük oluşturmadığını göstermiştir. Eritritol, ağız diş sağlığına uygun ürünlerde, tatlılarda ve içeceklerde tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır. Eritritol, 50' den fazla ülkede gıdalarda kullanım için onaylanmıştır ve *Codex Alimentarius*'un GSFA listesine (General Standard for Food Additives) 968 INS numarası ile dahil edilmiştir (Boesten ve ark., 2015).

Eritritolün çürük oluşturmadığına dair ilk araştırmalar 1990 yılında sıçanlarda ve kısa süre sonra 1996 yılında insanlarda yapılmıştır (Boesten ve ark., 2015; Goossens & Gonze, 1996; Kawanabe, 1990). Öncü çalışmalar, eritritolün *S. mutans* (a-h serotipleri) gibi çürük oluşturan bakteri türlerinin üremesini, laktik asit üretimini ve plak oluşumunu sınırladığını göstermiştir. Eritritolün, bakterilerin üreme ortamlarında %2-4 seviyelerinde dahi bulunduğunda, polisakkarid oluşturan oral streptokokların yapışmasını azalttığı bildirilmiştir (Ghezelbash ve ark., 2012).

Çoğu in vitro çalışma; eritritolün mikrobiyal üreme ve yapışmayı inhibe etme etkisinin, ksilitol ile karşılaştırıldığında benzer olduğunu göstermiştir (Runnel ve ark., 2013). Bu; diş çürüğü üzerinde eritritol, ksilitol ve sorbitol ile formüle edilmiş şekerlemelerin etkilerini araştıran 6 aylık insan çalışmasındaki bulgularla uyumludur (Mäkinen ve ark., 2005). Eritritol, ksilitol ve sorbitol ile formüle edilmiş şekerlemelerin etkilerini karşılaştıran ve 485 çocukta yapılan 3 yıllık bir çürük çalışmasında, sadece eritritol içerikli şekerleme tüketen çocuk grubunda dental plakta azalma olduğu, ksilitol veya sorbitol grubunda ise herhangi bir etkinin olmadığı gösterilmiştir (Runnel ve ark., 2013). Bu çürük çalışmasında, eritritol grubunda, sorbitol ve ksilitol grubuna kıyasla daha düşük bir çürük gelişimi olduğu ve bu etkinin deneyin sonlandırılmasından 3 yıl sonra bile devam ettiği gösterilmiştir (Honkala ve ark., 2014). Toplam üç yayında bildirilen sonuçlar, eritritolün ksilitol ve sorbitol ile karşılaştırıldığında daha yüksek etkinliğe sahip bir çürük önleyici aktiviteye sahip olduğunu göstermektedir.

4.6. Çocuk Diş Hekimliğinde Fissür Örtücüler

Koruyucu ve önleyici tedaviler kapsamında yapılan fluorid uygulamaları, çürük prevalansında önemli ölçüde azalmaya sebep olmuştur. Ancak yapılan çalışmalar, dişlerin düz yüzeylerinde sağlanan başarının pit ve fissür çürüklerinde görülmediğini ortaya koymuştur. Bireysel ağız bakımı ve fluorid uygulamaları, pit ve fissür çürüklerinin önlenmesinde tek başına yeterli değildir. Bu nedenle araştırmacılar, bu soruna özel tedavi yöntemleri geliştirmeye yönlendirilmiştir. Bu kapsamda, pit ve fissürlerde besin artığı birikimini engellemek için pit ve fissür örtücülerin kullanımı gündeme gelmiştir (Charbeneau, 1982).

Hunter, 18. yüzyılın başlarında, molar dişlerin okluzal yüzeylerinde bulunan çukur ve fissürlerin uygun materyallerle kapatılmasının, bu bölgede oluşabilecek çürüklerin önlenmesini sağlayabileceğini öne sürmüştür (Lee ve ark., 1972). 1895 yılında Wilson, pit ve fissürlerin çürükten korunma için simanla kapatılmasını önermiştir. Bodecker ise 1929' da daha invaziv bir yöntem önermiştir. İlk olarak, diş yüzeyindeki fissürleri sond yardımıyla temizleyerek

içlerine oksifosfat siman uygularken daha sonra "profilaktik odontotomi" adı verilen alternatif bir teknik sunarak, derinleşen fissürleri mekanik genişletip temizlenebilirliğini kolaylaştırmayı hedeflemiştir (Bädecker, 1929).

Günümüzde fissür örtücü materyallerin geliştirilmesi, fosforik asit kullanılarak pürüzlendirilmiş mine dokusuna restoratif rezinlerin daha kuvvetli tutunabileceği keşfine dayanmaktadır. 1955' te Buonocore tarafından yapılan ilk çalışmalarda, asitle pürüzlendirmenin mine üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu tekniğin uygulandığı ilk fissür örtücü materyaller, 1960'lı yılların ortalarında siyanoakrilat materyaliyle yapılmıştır (Buonocore, 1955). Ancak siyanoakrilatlar, mukoza ve deri yüzeyinde toksik etkilere sahip olmaları ve ağız sıvılarında çözünme eğilimleri nedeniyle fissür örtücü materyal olarak uzun süre popüler kalamamışlardır. Fissür örtücü materyal olarak polikarboksilat siman ve poliüretan türevleri de kullanılmış, ancak akışkanlıklarının düşük olması ve yetersiz aşınma dirençleri nedeniyle bu materyaller de fazla ilgi görmemiştir (Craig & Power, 1997).

Fissür örtücü materyal olarak kullanımı önerilen diğer bir materyal ise cam iyonomer simanlardır. Dişlere fizikokimyasal bir yolla bağlanabilen bir materyal olarak Wilson ve Kent tarafından geliştirilen ve tanıtılan cam iyonomer, 1970'li yıllarda Wilson ve Mclean tarafından formüle edilmiştir. Fluorid içermesi nedeniyle çürüğe karşı dişleri daha dirençli bir hale getirebilen bu materyal, fissür örtücü olarak ilk kez Mclean ve Wilson tarafından kullanılmıştır (Mclean, 1994).

Cam iyonomer yapılı materyallerin geliştirilmesinin hemen ardından, bu materyallerin içerisine olumsuzluklarını ortadan kaldırmak amacıyla rezin ilave edilmiş ve böylece hibrit iyonomerler olarak adlandırılan rezin modifiye cam iyonomer (RMCİ) ve poliasit modifiye kompozit rezin (PMKR) materyalleri ortaya çıkarılmıştır. Her iki materyalden de, günümüzde halen kullanılan fissür örtücüler üretilmiştir (Pinkham ve ark., 1994).

Rezin materyaller üzerinde gerçekleşen bir dizi çalışmanın ardından, 1960' larda restoratif tedaviler için oldukça uygun olan bis-phenol A glycidyl methacrylate (BIS-GMA) rezinler geliştirilmiştir. Amerikan Dişhekimleri Birliği (ADA), fissür örtücü materyalleri değerlendirmiş ve BIS-GMA rezinlerin 1983'te fissür örtücü amacıyla kullanımını onaylamıştır (Pinkham ve ark., 1994).

BIS-GMA rezinler, minenin asitlenmesinin ardından kuvvetli bir şekilde mineye tutunur ve böylece fissür içerisine mükemmel şekilde uyum sağlar. Fissür örtücü uygulandıktan sonra ise yükseklik oluşturmazlar (Pinkham ve ark., 1994).

Günümüzde polimerizasyon tipleri, rezin yapılı fissür örtücüler arasında en önemli farkı oluşturmaktadır. Başlangıçta yalnızca ultraviyole ışık yardımıyla polimerize olan fissür örtücü materyaller üretilmiştir. Bu grup birinci jenerasyon fissür örtücüler olarak adlandırılmıştır. İkinci jenerasyon fissür örtücüler otopolimerizandır. Bu grupta baz ve katalizör karıştırılarak kimyasal olarak polimerizasyon gerçekleştirilir. Son olarak yalnızca görünür ışıkla polimerize olan fissür örtücüler üçüncü jenerasyondur (Eronat, 1995).

4.6.1. Rezin yapılı fissür örtücüler

Günümüzde en yaygın olarak tercih edilen fissür örtücü materyali BIS-GMA polimerleridir. Bisfenol A içeren organik bir molekülle monofonksiyonel epoksit olan glisidil metakrilat reaksiyonuyla oluşur. Metakrilat gruplarıyla epoksit yer değiştirerek polimerize edilebilen bir hibrit molekül oluşturur. Oluşan bu molekül yüksek molekül ağırlığında renksiz bir likittir. Çoğu restoratif reçine materyalinin (kompozit) ana bileşenini BIS-GMA rezinler oluşturmaktadır. Temel fark, asitlenmiş mine yüzeyine ve pit ve fissürlere daha iyi tutunabilmesi için kompozit reçinenin daha akışkan bir yapıda olmasıdır. Bu özellik, materyalin diş dokularına daha iyi tutunmasına ve retansiyona katkı sağlar. Materyalin daha akışkan bir yapıda olması için rezine, 1/3 oranında metil metakrilat (MMA) monomeri eklenir (Bowen, 1982).

BIS-GMA rezinlerin polimerizasyonu farklı yöntemlerle gerçekleşir. Rezin fissür örtücüler polimerizasyon türlerine göre; birinci, ikinci ve üçüncü jenerasyon olarak sınıflandırılır. Birinci jenerasyon sertleşme işlemini 320 nm dalga boyundaki ultraviyole (UV) ışığıyla tamamlar. UV ışığının retinaya zarar verici olması ve aynı zamanda dalga boyundaki düzensizliklerin materyaldeki tutunma özelliklerini olumsuz yönde etkilemesi sebebiyle, kısa süre içerisinde bu yöntemden vazgeçilmiştir (Eronat, 1995).

İkinci jenerasyon otopolimerizan fissür örtücüler olarak adlandırılır. Fissür örtücüler içerisindeki bu grup iki bileşenden oluşur. İlk bileşen BIS-GMA ve başlatıcı olarak da benzoil peroksit içerirken, ikinci bileşen BIS-GMA ve %5 oranında organik amin bir hızlandırıcı içerir. İki bileşen düz zeminde karıştırılarak diş yüzeyine uygulanır. Karıştırma işleminden sonra gerçekleşen reaksiyon ekzotermiktir, ancak kullanılan miktar sınırlı olduğu için ortaya çıkan ısı zararlı değildir. Bu işlem diğer reaksiyonlar gibi ısıya duyarlıdır, bu nedenle karıştırma işleminden hemen sonra uygulamaya geçilmelidir. Karıştırma sırasında hava kabarcıklarının materyale karışmamasına özen gösterilmelidir. Hava kabarcıkları materyale karışırsa, uygulamadan sonra fissür örtücüde pürüzler ve çukurlar oluşabilir (Eronat, 1995).

Otopolimerizan tipteki fissür örtücülerin görünür ışıkla polimerize olanlara kıyasla klinik başarılarının farklı olmadığı bildirilmiş olsa da, görünür ışıkla polimerize olan fissür örtücülerin otopolimerizanlara göre; çalışma süresinin uzun olması, manüplasyonun kolay olması, viskozitesinin sabit kalması ve mine yüzeyine daha homojen bir şekilde yayılabilmesi gibi avantajları bulunmaktadır. Bu nedenle, otopolimerizan fissür örtücülerin kullanımı kısa sürede popülerliğini kaybetmiştir (Eronat, 1995).

Üçüncü jenerasyondaki fissür örtücüler, görünür ışık ile polimerize olanlardır. Bu malzemelerin ana maddesi 170 nm dalga boyundaki ışık ile aktive olan aromatik keton ve diketonlardır. Çevrede bulunan diğer ışık kaynakları da bu materyalleri fazlasıyla etkiledikleri için uygulama anında reflektörün kapatılması tavsiye edilmektedir. Işık kaynağı ve fissür örtücü materyal arasındaki uzaklık 1–2 mm kadar olmalıdır. Malzeme, ışık kaynağının 20 saniye boyunca tutulmasıyla sertleşir. Polimerizasyonu sağlayan ışık kaynağının dalga boyu, görünür ışık ile aynı spektrumdadır ancak monokromatik ışık kaynağı kullanıldığından yine de göze zararlıdır. Bu nedenle hekimi ve hastayı koruması için turuncu renk bir gözlük kullanılmalıdır. Materyalin sertleşmesi tamamlandıktan sonra, diş yüzeyinde kalan artık monomerlerin uzaklaştırılması için malzeme, nemli bir pamuk pelet ile silinmelidir (Pinkham, 1994).

Rezin içerikli fissür örtücü materyallerin klinik uygulamalarının ve takiplerinin rahat yapılabilmesi için şeffaf, opak ve renkli seçenekler üretilmiştir. Renkli ve opak olanların klinik takibinin daha kolay olduğu bildirilirken, şeffaf olanların altında çürük oluşumu açısından daha kontrollü bir izleme sağladığı bildirilmiştir. Bu tip fissür örtücülerin benzer başarı oranları sunduğu da rapor edilmiştir (Heifetz ve ark., 2004).

Polimerizasyon sırasında büzülmenin azaltılması ve aşınma direncinin artırılması amacıyla doldurucu maddelerin fissür örtücülere eklenmesi önerilmiştir. Kuvars, cam ve porselen gibi malzemeler, doldurucu olarak kullanılabilir. Ağırlık olarak %40 doldurucu içeren fissür örtücülerin, doldurucu içermeyenlere kıyasla kopma, germe, sıkışma, elastik modül ve su emilimi açısından daha etkili olduğu birçok in vitro çalışmada gösterilmiştir (Heifetz ve ark., 2004).

Fissür örtücülerin içine doldurucu eklenmesiyle materyalin akıcılığının azalacağı ve dolayısıyla fissür ayrıntılarına iyi nüfuz etmeyeceği endişesi ortaya çıksa da, yapılan araştırmalarda, doldurucu içeren fissür örtücü materyallerin diğerlerine kıyasla fissürlere penetrasyonunda önemli farklılıklar olmadığı belirlenmiştir. Ancak, fissür örtücülerin içerdikleri doldurucuların,

fissür ayrıntılarına daha iyi nüfuz etmesi ve kırılma dayanımının yeterli olabilmesi için ağırlıkça % 30–65 oranında olması gerektiği belirtilmiştir (Welbury ve ark., 2004).

4.6.2. Cam iyonomer yapılı fissür örtücüler

Cam iyonomerler, yapılarında bulunan fluoroalüminosilikat camından fluorid kaynağını alırlar. Bu materyallerin; sertleştikten sonra uzun süre fluorid salabilme özelliği, diş dokularına fizikokimyasal yolla bağlanabilme yeteneği ve nem kontaminasyonuna rezin esaslı materyaller kadar hassas olmama özellikleri bilinmektedir (Mount, 2002).

Tüm bu olumlu özelliklerinden dolayı cam iyonomer simanlar, koruyucu diş hekimliği uygulamalarında da kullanılmaktadır. Bu nedenle bu materyaller fissür örtücü olarak da kullanılmıştır. (örneğin; Fuji III, Fuji VII GC, Ketac Bond 3M Espe) (Mount, 2002).

RMCİ simanlar yapı anlamında cam iyonomerlere rezin esaslı materyallerden daha yakınlardır. Cam iyonomer simanlarda olduğu gibi, yapılarında bulunan fluoroalüminosilikat camı RMCİ simanlarda salınan fluoridin kaynağını oluşturur (Mount, 2001). Cam iyonomer simanlardan fiziksel olarak daha iyi bir materyal olan RMCİ simanların fissür örtücü olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Bu amaçla farklı sertleşme tiplerine ve çeşitli markalara sahip RMCİ esaslı materyaller fissür örtücü olarak klinik koşullarda denenmiştir (örneğin; Photac Fil ,Vitremer 3M Espe, Fuji II LC GC, VariGlass VLC) (Attar ve Önen 2000).

1990' ların başlarında PMKR esaslı fissür örtücüler geliştirilmiştir. RMCİ fissür örtücülerden sonra geliştirilen bu materyal de içeriğindeki cam doldurucudan fluorid kaynağını almaktadır. Diş yüzeyine uygulandıktan sonra materyalin su ile temasa geçmesiyle fluor salınımı başlar. PMKR materyaller yapı olarak RMCİ ve cam iyonomerlerden çok rezin içerikli kompozit materyallere daha yakındır. Bu materyallerin fluor salınımı ve geliştirilmiş olan fiziksel özellikleri sayesinde fissür örtücü amacıyla kullanılabilecek daha akıcı formları üretilmiş olup günümüzde çeşitli firmalar tarafından kullanıma sunulmuştur (örneğin; Dyract Seal, Dyract Flow Dentsply/Caulk, Compoglass F Filtek, F 2000 3M Espe) (Nicholson, 2007).

4.7. Dental Biyofilm Özelliklerini Belirlemede Kullanılan Mikroskobik Yöntemler

Dental biyofilmlerin değerlendirilmesinde; mikroorganizmaların türü, sayısı ve canlılığı gibi karakteristik özellikleri belirlemek amacı ile çeşitli yöntemler kullanılır (Kishen & Haapasalo, 2012).

4.7.1. Işık mikroskobu

Işık mikroskobu, *in vitro* örneklerin veya histolojik kesitlerin biyofilm incelemesi için temel bir tekniktir. Ucuz, basit kullanımlı, hazır ve hızlı bir yöntemdir (Kishen & Haapasalo, 2012).

4.7.2. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM)

SEM, biyofilm yapılarını incelemek için kullanılan bir mikroskop tekniğidir. Görüntü almak için hızlandırılan elektronların örnek üzerine gönderilmesine dayanır. İncelenen materyalin iletken olması gerektiğinden, yüzeyler 20–1000 nm kalınlığında Au veya C ile kaplanır (Wood ve ark., 2000).

SEM, hassasiyeti 0,05 nm' ye kadar olan detayları algılayabilir ve 5X – 300.000X büyütme sağlar. Bu büyütme derecesi nedeniyle çok küçük alanlar incelenebilir (Foschi ve ark., 2004).

TEM' de örneklerin hazırlanma süreci oldukça karmaşıktır ve bir dizi uzun laboratuvar aşamasını içerir. Bununla birlikte TEM' in yüksek çözünürlüğü, bazı kısıtlamalara rağmen biyofilm çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir araştırma yöntemi haline gelmiştir (Mohammadi ve ark., 2013).

4.7.3. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM)

Bakteriyel biyofilmlerin özellikleri; TEM, SEM, ışık mikroskobu ve atomik kuvvetlerin ölçümü gibi farklı teknikler kullanılarak incelenmiştir (Badet ve ark., 2008).

Biyofilm kalınlığı kriyoembran kullanılarak ölçülmüş, ardından biyofilm kesitleri alınarak mikroskobik incelemeler yapılmıştır. Ayrıca son yıllarda, hücre yapısını temiz bir şekilde görüntüleyen ve biyofilmin yapısını etkilemeden daha derin katmanlarını tarayabilen CLSM, biyofilm yapılarının analizinde tercih edilen bir yöntemdir (Badet ve ark., 2008).

Kalın mikrobiyolojik örneklerin detaylı görselleştirilmesi için CLSM kullanılır. Bu yöntem, klasik faz kontrastı veya floresan mikroskobinin yetersiz kaldığı durumlarda etkilidir. Biyofilm içindeki hücrelerin floresan boyalarla belirlenmesi ile hücrelerin üç boyutlu yapısının incelenmesi için de kullanılabilir. CLSM' nin en önemli avantajlarından biri, tek plandan gelen ışığı toparlayabilmesidir (Badet ve ark., 2008).

Optiklerin verimli kullanımı için lazer ışını objektife yönlendirilir. Bu ışın, x-y yansıtma mekanizmasıyla tarama ışınına dönüştürülür ve floresan işaretli örnek üzerindeki bir noktaya objektif lensi aracılığıyla odaklanır. Yansıtılan lazer ışığı ve örnekten yayılan floresan ışığı, aynı objektif tarafından dikroik ayna ile bir fotodedektör üzerine odaklanır (Auschill ve ark., 2002).

Floresan ışık, fotomultiplier tüpe gönderildiği sırada yansıtılan ışık dikroik ayna ile ayrılır. Konfokal açıklık, örnekten yayılan floresan ışığın toplanmasını sağlar, böylece odaklanan noktanın çevresinden yayılan ışık azaltılır. Bu şekilde, tarama yapılan örnek yüksek çözünürlüklü olarak görüntülenmiş olur. CLSM x, y, z yönlerinde katmanlar halinde tarama yapar ve bilgisayar ortamında üç boyutlu görüntüler elde edilmiş olur. CLSM diş hekimliğinde, daha çok sert mineral yüzeylerin incelemesiyle ilişkilendirilmiştir. Ancak günümüzde, bu mikroskop türü dental araştırmalarda ağız içi biyofilmlerin değerlendirilmesi için de kullanılmaktadır (Auschill ve ark., 2002).

CLSM ile yapılan taramalarda mikroorganizma canlılığını değerlendirmek için, SYTO 9 ve Propidium iodide içeren LIVE/DEAD BacLight Viability Kit *(Molecular Probe, Eugene, OR*) yaygın olarak kullanılmakta olan bir boya kombinasyonudur. Bu boya kombinasyonu, floresan moleküller içerir ve bu şekilde hücre membran bütünlüğünü test eder (Kishen & Haapasalo, 2010).

SYTO 9, yeşil renk floresan yayarak canlı hücrelere nüfuz ederken, maksimum ışık emisyonu 500 nm' de gerçekleşir. Propidium iodide ise kırmızı renk floresan yayarak hücre membranında hasar görmüş olan veya ölmüş hücrelere nüfuz eder ve maksimum ışık emisyonu 635 nm' de olur. Bu sayede mikroskop altında biyofilmin içerisindeki canlı hücreler yeşil, ölü hücreler ise kırmızı floresan yayarlar (Kishen & Haapasalo, 2010).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Çalışma Gruplarının Belirlenmesi / Şeker Alkollerinin Hazırlanması

Farklı konsantrasyonlarda şeker alkollerinin çalışmaya dahil edilen karyojenik bakteriler üzerindeki etkisini belirleyebilmek için; %10 ksilitol (Sigma, St. Louis, MO, ABD), %10 eritritol (Sigma, St. Louis, MO, ABD), %5 ksilitol+%5 eritritol karışımı, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol karışımı, %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol karışımı şeklinde şeker alkollerini içeren 5 çalışma grubu oluşturulmasına karar verilmiştir. Bu gruba ek olarak %5 sükroz içeren kontrol grubu da 6. grup olarak belirlenmiştir. Çalışma grupları şu şekildedir;

Grup A: %10 ksilitol

Grup B: %10 eritritol

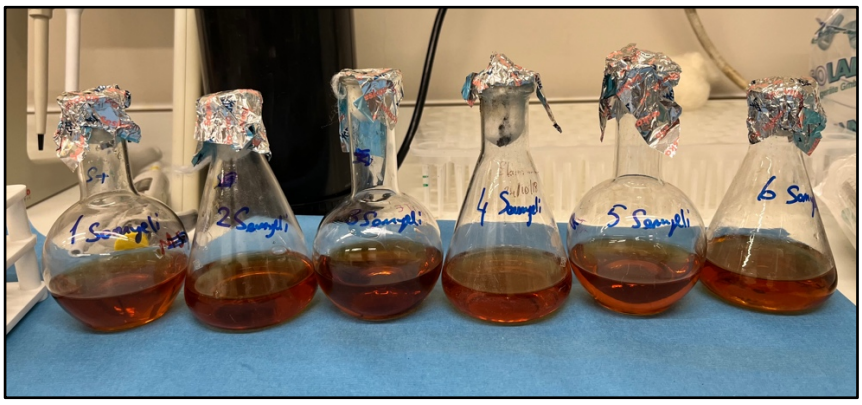
Grup C: %5 ksilitol + %5 eritritol karışımı

Grup D: %2,5 ksilitol + %7,5 eritritol karışımı

Grup E: 7,5 ksilitol + %2,5 eritritol karışımı

Grup F: %5 sükroz (Kontrol)

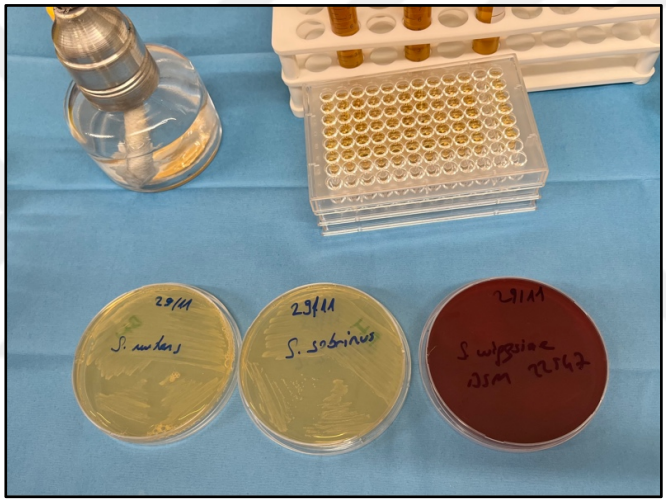
Farklı konsantrasyonlardaki şeker alkolleri, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı' nda hazırlanmıştır. İstenilen konsantrasyonlarda hazırlanan şeker alkolü çözeltileri ve kontrol grubu olarak kullanılan sükroz, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı' nda filtrasyon yoluyla sterilize edilip, beyin-kalp infüzyon (BHI) buyyonuna eklenerek hazırlanmıştır (Şekil 3).



Şekil 3. Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan çözeltiler

5.2. Bakteri Süspansiyonlarının Hazırlanması

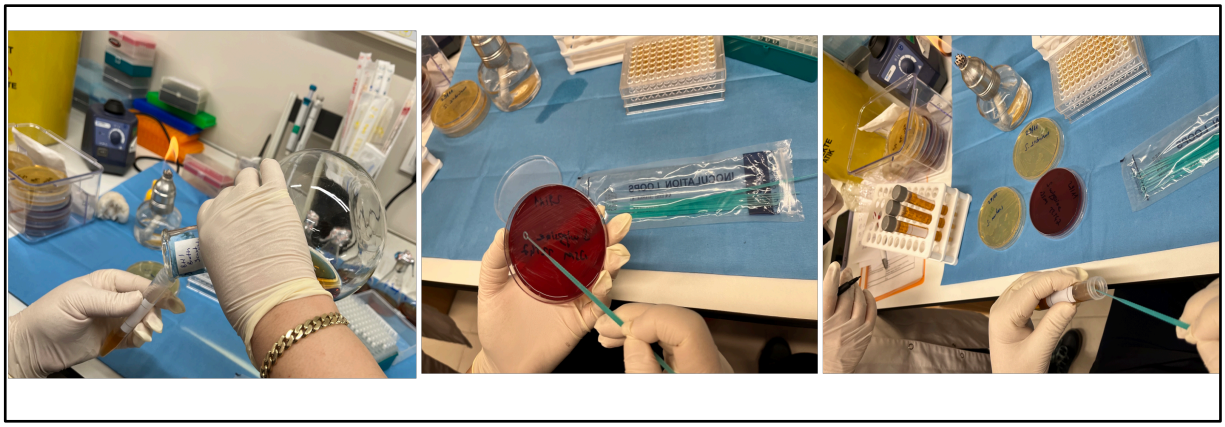
Çalışmada *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547) tip suşları kullanılmıştır. Suşlar, İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı' nda bulunan stok bakteri koleksiyonundan elde edilmiştir. *Scardovia wiggsiae*; %5 koyun kanı, 5 mg/mL hemin ve 5 mg/mL Vitamin K eklenmiş Brucella Agar' da (Merck KGaA, DE), *Streptoccoccus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* ise Beyin-Kalp İnfüzyonu (BHI) Agar' da (Merck) anaerop kavanozunda anaerop ortam zarfı (BD GasPak EZ, US) ile oluşturulan % 80 N_2, % 10 CO_2 ve %10 H_2' li anaerop ortamda 37°C'vde 48 saat inkübe edilmiştir (Şekil 4).



Şekil 4. İnkübasyon sonrası *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)

Bakteri süspansiyonları inkübasyon sonrası oluşan kolonilerden 0,5 MF bulanıklık tüpüne (10^8 CFU/ml) göre maya özütü, Hemin ve Vitamin K eklenmiş BHI buyyon besiyerinde hazırlanmış ve 100 kat seyreltilmiştir (Nihai konsantrasyon;10^6 CFU/ml) (Şekil 5, 6).

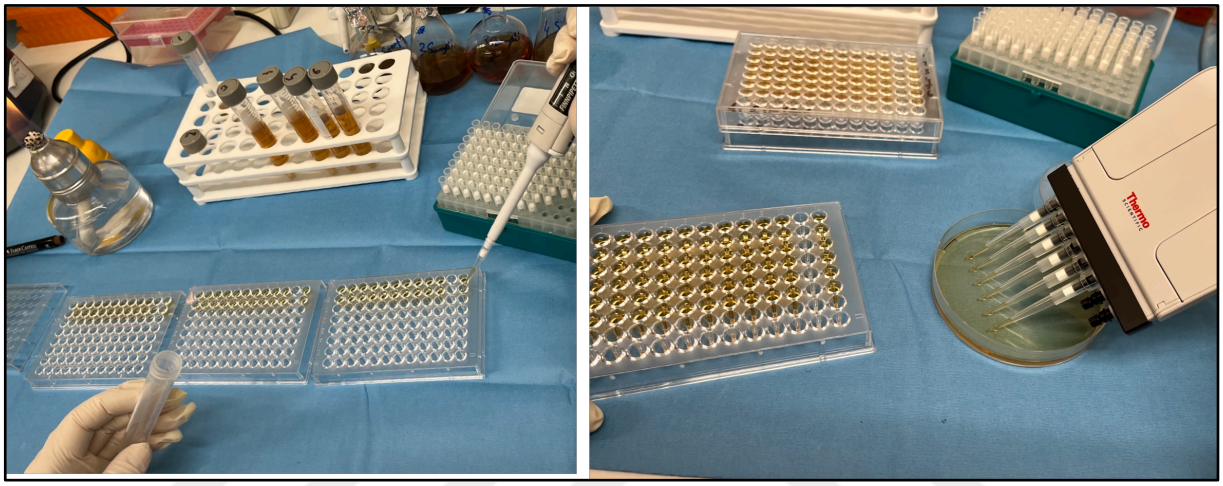
Şekil 5. Maya özütü, Hemin, Yeast ve Vitamin K eklenmiş BHI Buyyon



Şekil 6. Bakterilerin seyreltilmesi

5.3. Farklı Şeker Alkolü Konsantrasyonları ile Bakteriyel Üremenin Değerlendirilmesi

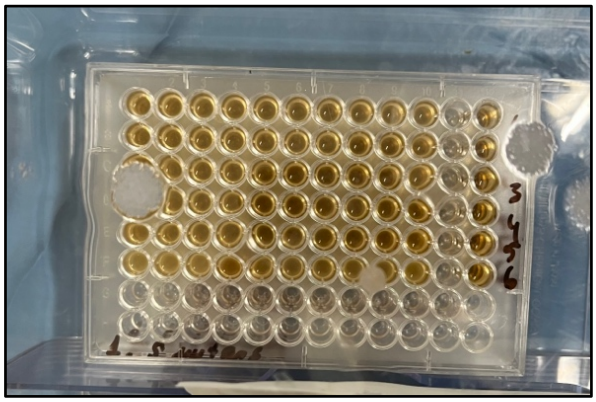
Her bakteri türü için ayrı olmak koşuluyla 96 kuyucuklu steril doku kültürü plakaları (Greiner, Sigma–Aldrich) kullanılmıştır. Plakalarda bulunan 12 sıra kuyucuktan her bir çözelti grubu için 11 kuyucuk kullanılmış, 1 kuyucuk boş bırakılmıştır. İlk 10 kuyucuğa 180 µl hazırlanan çözeltiler ve ardından 20 µl bakteri süspansiyonu eklenmiş, 11. kuyucuk tamamen boş bırakılmış, 12. kuyucuğa ise yalnızca hazırlanan çözeltiler eklenerek kontrol grubu olarak kullanılmıştır (Şekil 7).



Şekil 7. 96 kuyucuklu steril doku kültürü plakalarına önce çözeltilerin, ardından bakteri süspansiyolarının eklenmesi

0. saat (başlangıç saati), 1. saat, 2. saat, 4. saat, 6.s aat ve 24. saatlerde Microplate Elisa Absorbance Reader (MS4-MaxiRead96, MaxiLab Biotechnology) ile 630 nm' de absorbans değerleri her bakteri için ayrı ayrı ölçülmüştür (Şekil 8, 9).

Şekil 8. Mikroplaka Elisa Absorbans Okuyucu (MS4-MaxiRead96, MaxiLab Biotechnology)



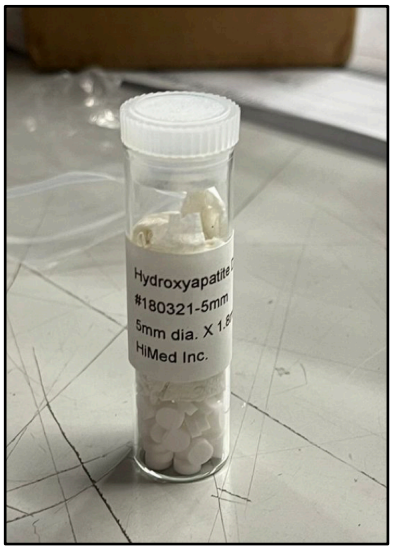
Şekil 9. İçerisinde *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) bulunan çözeltilerde 24 saatlik üreme sonucu bulanık görünüm

5.4. Restoratif Materyallerde Biyofilm Oluşumu ve Canlı Bakteri Sayısının Belirlenmesi

5.4.1. Disklerin hazırlığı

Çalışmada farklı yüzeyleri temsil eden üç tip disk (hidroksiapatit (HA), rezin ve cam iyonomer içerikli fissür örtücüler) kullanılmıştır. Rezin bazlı ve cam iyonomer içerikli fissür örtücüler üretici talimatlarına göre hazırlanmıştır.

Hazır steril şekilde bulunan 48 adet 5 mm çapında, 1,8 mm kalınlığındaki standart hidroksiapatit (HAD40, Himed, USA) örnekler satın alınarak biyofilm çalışmalarında herhangi bir cila işlemi uygulanmadan kullanılmıştır (Şekil 10).



Şekil 10. Hidroksiapatit diskler

Rezin bazlı fissür örtücü örnekler (Clinpro, 3M ESPE, USA) 5 mm çapında 1,8 mm kalınlığında silikon kalıplara yerleştirilip üzerine cam lameller ile basınç uygulandıktan sonra ışık aleti (GC D-Light Duo LED Curing Light , Tokyo, Japan) ile 20 sn polimerize edilmşitir. Daha sonra örneklerin diğer tarafından ek 10 sn ışık daha verilmiştir. Toplam 48 adet rezin bazlı disk elde edilmiştir (Şekil 11).

Şekil 11. Clinpro (3M ESPE, USA) fissür örtücü

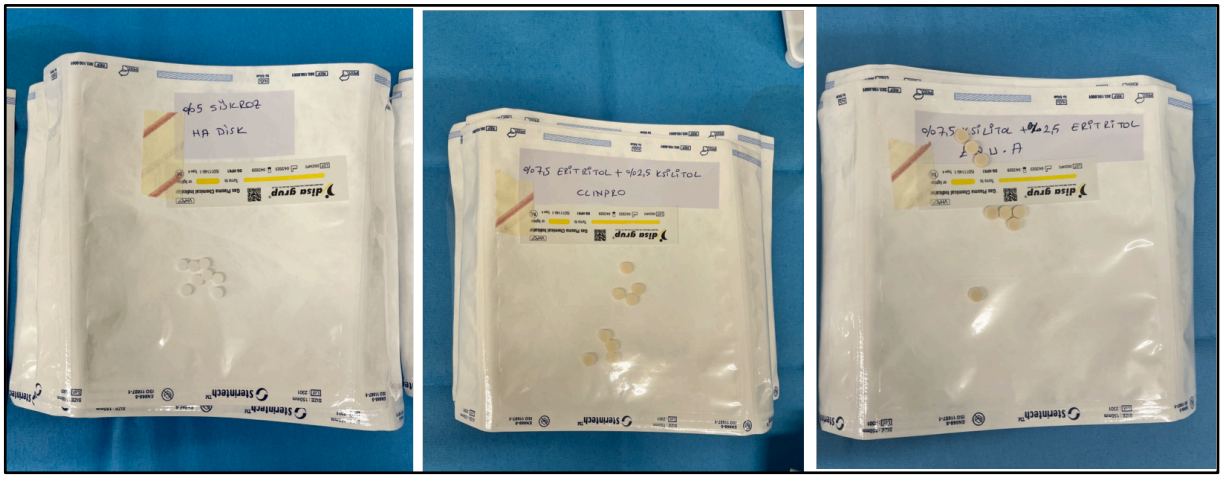
Kapsül formunda bulunan cam iyonomer örnekler (Fuji Triage, GC Dental, Tokyo, Japan) vibratör ile (Silamat S5, Vivadent, Amerika) 10 sn karıştırıldıktan sonra kapsül tabancasına (GC capsule applier, Tokyo, Japan) yerleştirilip altına mylar strip konan 5 mm çapında 1,8 mm yüksekliğinde silikon kalıplara yerleştirilip üzerine yine mylar strip ve cam lameller ile basınç uygulandıktan sonra sertleşmesi için 2 dk 30 sn bekletilmiştir. Toplam 48 adet cam iyonomer disk elde edilmiştir (Şekil 12).

Şekil 12. Fuji Triage (GC Dental, Tokyo, Japan) kapsül form fissür örtücü

Sertleşmesi tamamlanan örneklere prospektüse uygun olarak cila yapılmayıp iki yüzüne de yüzey örtücü (Fuji Coat, Japan) uygulandıktan sonra ışık aleti (GC D-Light Duo LED Curing Light , Japan) ile 20 sn polimerize edilmiştir (Şekil 13).

Şekil 13. D-Light Duo (GC, Tokyo, Japan) ışın cihazı

Her çalışma grubunda biyofilm oluşumunu izleyebilmek için 8 adet HA disk, 8 adet Clinpro (Rezin bazlıfissür örtücü disk) ve 8 adet Fuji Triage (Cam iyonomer fissür örtücü disk) kullanılmıştır. Gruplardaki 8 diskten 1' i SEM ile değerlendirilmek üzere ayrılmış, kalan 7 disk ise CLSM ile incelenmiştir. Çalışmamızda 6 farklı çözelti bulunması nedeniyle 48 adet HA disk, 48 adet Clinpro disk ve 48 adet Fuji Triage disk olmak üzere toplam 144 adet disk kullanılmıştır. Hazırlanan materyaller, rezin ve cam iyonomerin tam polimerizasyonuna izin vermek için oksijenin azaltıldığı nemli ağız ortamını taklit eden koşullar altında 37°C' de 24 saat boyunca saklanmıştır. Hazırlanan örnekler, hidrojen peroksit gaz plazma sterilizasyon yöntemi kullanılarak sterilize edilmiştir (Şekil 14).



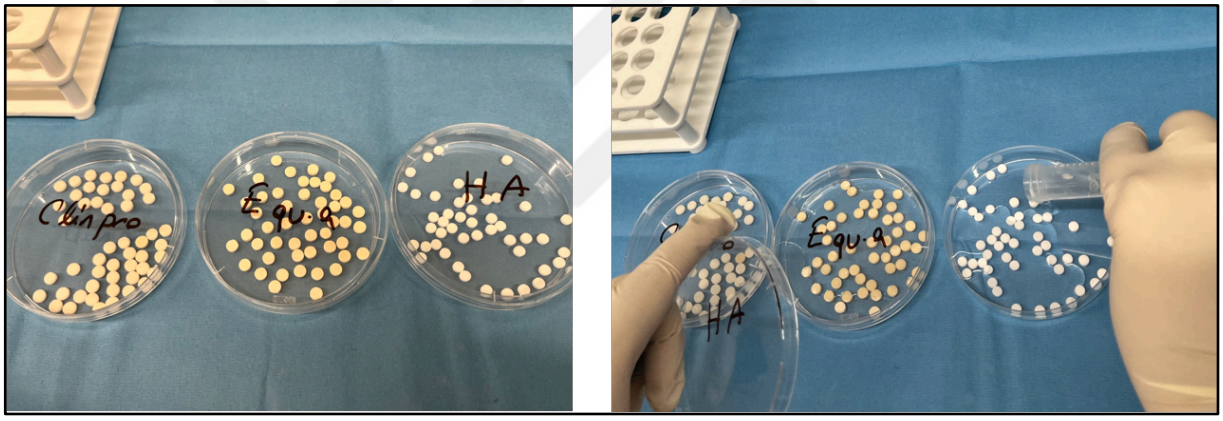
Şekil 14. Hidrojen peroksit gaz plazma yöntemi ile ayrı ayrı paketlerde steril edilmiş diskler

5.4.2. Yapay tükürük hazırlanması

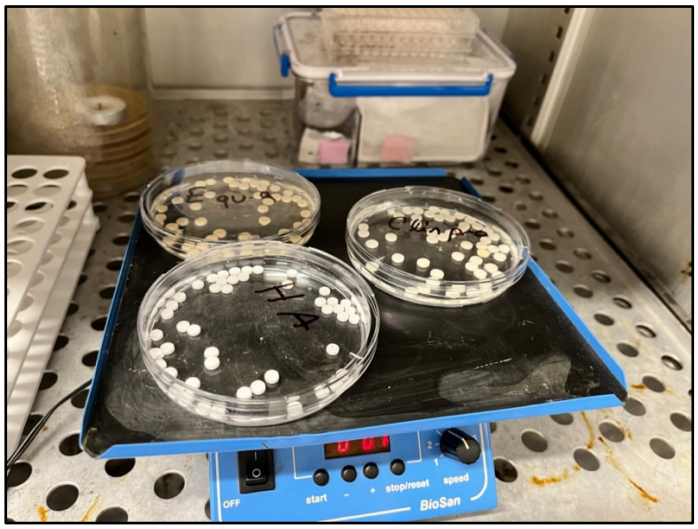
Laboratuvarda, Pratten ve ark. (1998) formülüne göre yapay tükürük hazırlandı. Bu formül, 1 g/L Lab-lemco tozu, 2 g/L maya ekstresi, 5 g/L proteoz pepton, 2,5 g/L domuz mide mukusu, 0,35 g/L sodyum klorür, 0,2 g/L kalsiyum klorür ve 0,2 g/L potasyum klorür içermektedir. Otoklavlama işleminden sonra 1,25 mL %40' lık üre çözeltisi eklendi. Tükürük ikamesinin pH değeri 7' ye ayarlandı. Daha sonra steril bir kaba 0,22 µm' lik filtreden süzüldü (Pratten ve ark., 1998).

5.4.3. Biyofilm deneyi

In vitro biyofilm deneyi için 48 kuyucuklu steril doku kültürü plakaları (Greiner, Sigma–Aldrich) kullanılmıştır. Fissür örtücü materyaller ile hazırlanan diskler ve satın alınan steril HA diskler üzerine 500 ul hazırlanan yapay tükürük eklenmiş ve bir çalkalayıcıda 37°C' de bir saat süreyle inkübe edilmiştir (Şekil 15, 16).

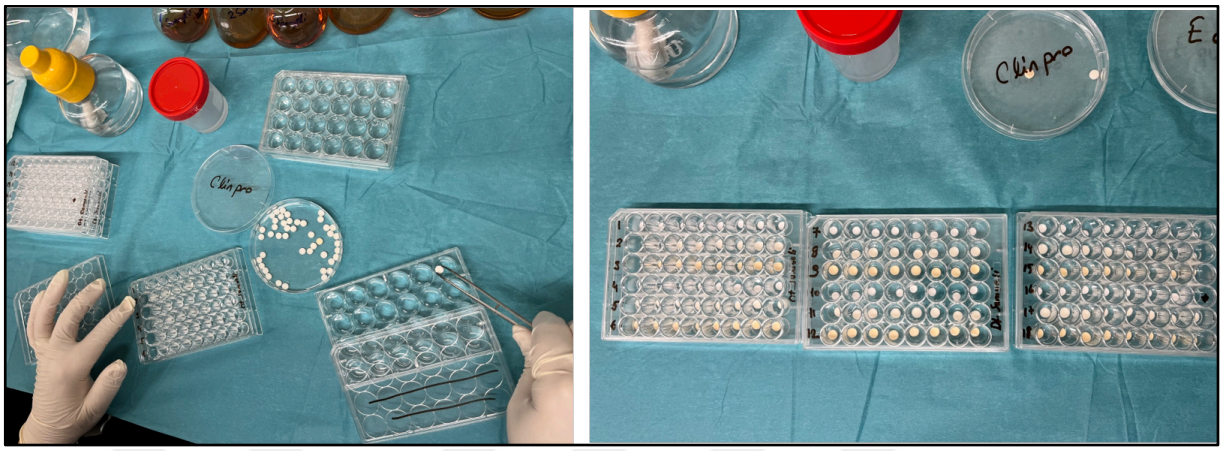


Şekil 15. Hazırlanan diskler üzerine yapay tükürük eklenmesi



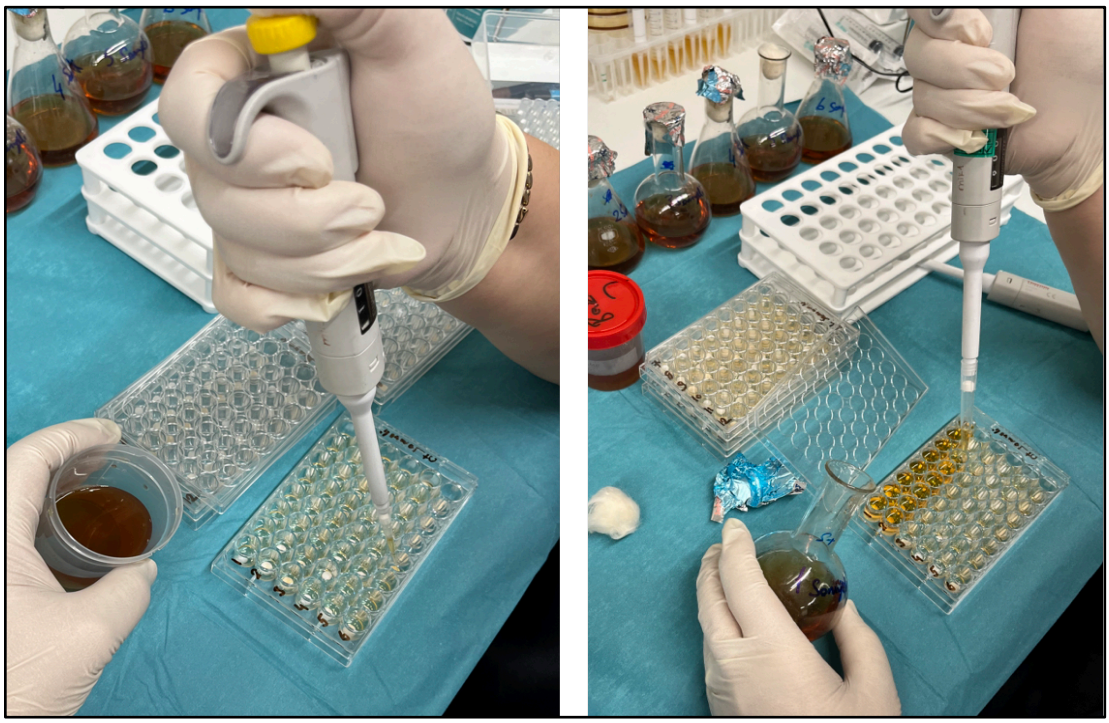
Şekil 16. Yapay tükürük uygulanmış disklerin çalkalayıcı üzerine yerleştrilmesi

İnkübasyondan sonra tükürükteki diskler fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonu ile durulanmıştır (Şekil 17).



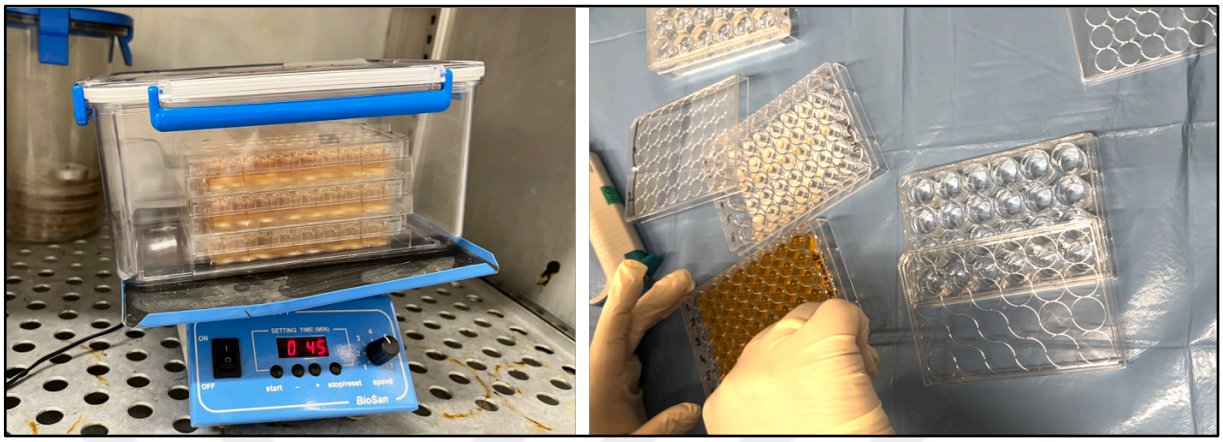
Şekil 17. Disklerin PBS ile durulanması ve 48 kuyucuklu plakalara yerleştirilmesi

48 kuyucuklu steril doku kültürü plakalarına yerleştirilen disklere 1,6 ml 6 ayrı çözelti ve 200 µl eşit miktarda karıştırılan bakteri süspansiyonu ilave edilmiştir (Şekil 18).



Şekil 18. 48 kuyucuklu steril plakalara, çözelti ve bakteri süspansiyonlarının ilave edilmesi

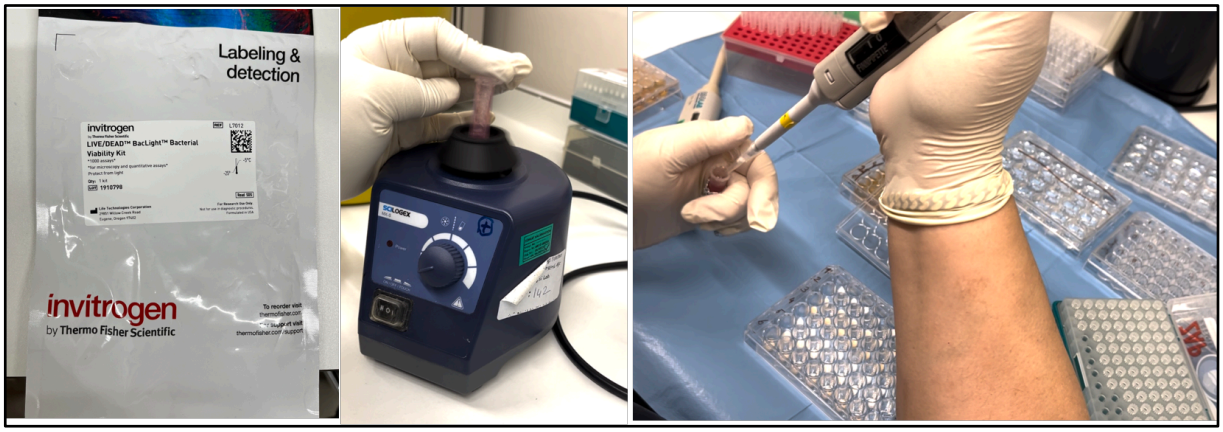
48 kuyucuklu steril doku kültürü plakaları anaerop ortamda ve 37°C' de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra diskler 2 ml PBS ile yıkanmış ve yeni kuyucuklara yerleştirilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19. Karıştırıcıya alınan disklerin 24 saat inkübasyon sonrası yeni kuyucuklara yerleştirilmesi

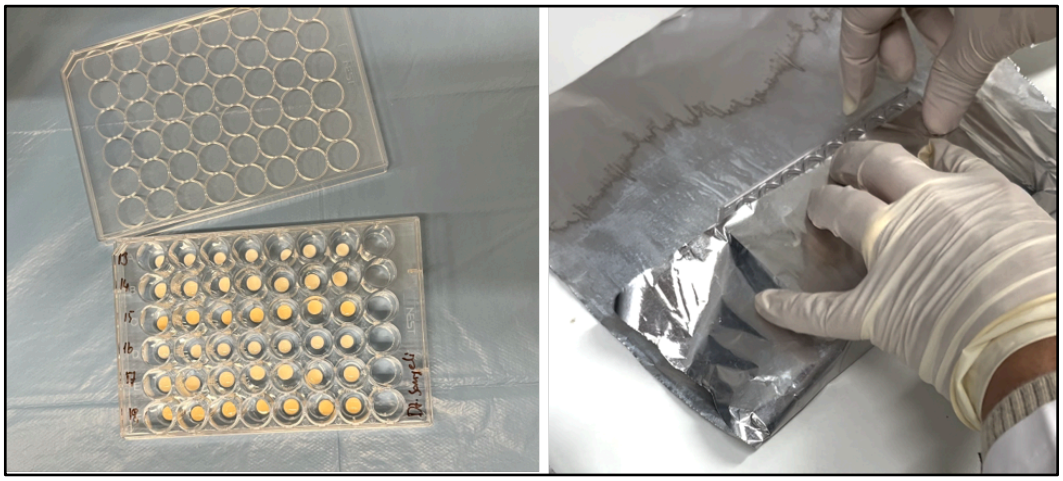
5.4.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) görüntülemesi ve değerlendirmesi

18 gruptan 126 disk, her gruptan 7 örnek, lazer taramalı mikroskop altında değerlendirilmek üzere ayrılmıştır. Diskler 48 kuyucuklu steril doku kültürü plakalarına (Greiner, Sigma–Aldrich) alınmış ve 20 µl LIVE/DEAD Baclight Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) boya solüsyonu eklenmiştir (Şekil 20).



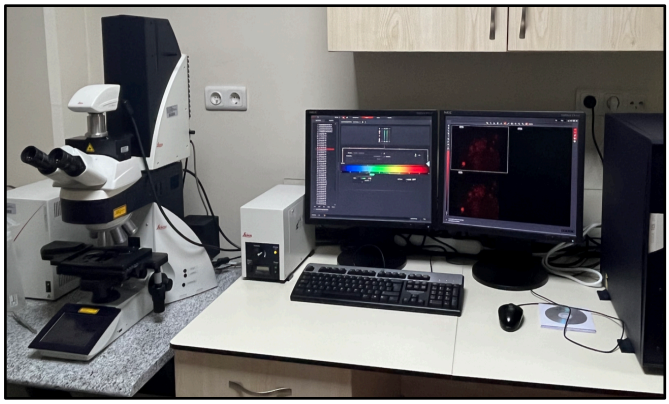
Şekil 20. LIVE/DEAD Baclight Kit hazırlanması ve diskler üzerine eklenmesi

Örneklerin bulunduğu plakalar alüminyum folyo ile kapatılarak karanlıkta 15 dakika oda sıcaklığında bekletilmiş ve incelemeye gönderilinceye kadar buzdolabında 4°C' de saklanmıştır (Şekil 21).



Şekil 21. Boya solüsyonu ilavesi tamamlanan örneklerin alüminyum folyo ile kapatılması

Örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü' nde bulunan konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) (Leica CLSM, Heidelberg, Almanya) ve 488 ve 532 nm dalga boyunda 10' luk büyütmede optik lensler yardımıyla her diskin üç farklı noktasından görüntüler elde edilmiştir. Her numunenin üç farklı noktası ayrı ayrı görüntülenmiş ve her noktanın bir dizi fotoğrafı, bakteriyel canlılık durumu kırmızı ve yeşil renk olarak gösterilmiştir. Örneklerin yüzeyindeki canlı-ölü bakterilerin biyokütle, kalınlık ile ilgili görüntüleri COMSTAT yazılımı (μm, μm3/μm2) kullanılarak ölçülmüştür (Şekil 22).

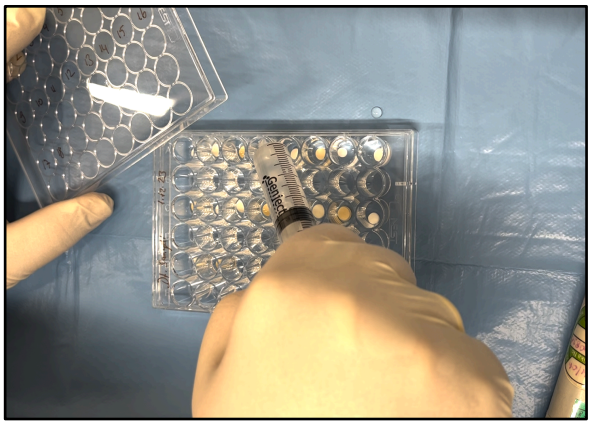


Şekil 22. Konfokal lazer tarama mikroskobu (CLSM) (Leica CLSM, Heidelberg, Almanya)

5.4.5. Taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntülemesi ve değerlendirmesi

18 gruba ait birer disk 48 kuyucuklu doku kültürü plakalarına yerleştirilmiştir. Üzerine % 4'lük formolden 1 ml eklenmiş ve etrafı parafilm ile kaplanarak SEM ile görüntülenmek üzere hazırlanmıştır.

Biyofilmi fikse etmek için örnekler 40 dakika %4 formolde bekletilmiştir (Şekil 23). Su ile yıkandıktan sonra derecelenmiş (%50, %75, %90 ve 2x%100 seride) etilen glikol ile kurutulmuştur. Kurutulan örnekler Marmara Üniversitesi Teknoloji Fakültesi Elektrik-Elektronik Mühendisliği Bölümü Biyomedikal Görüntüleme ve Tanı Sistemleri Laboratuvarı' nda bulunan kaplama cihazında 15 nm altın ile kaplanmıştır. Daha sonra SEM cihazı (Zeiss EVO MA10, Germany) ile 20 kV' da, 3000x ve 5000x büyütmede incelenmiştir (Şekil 24).



Şekil 23. SEM analizi için ayrılan 18 diskin %4 formalde bekletilmesi

Şekil 24. Taramalı Elektron Mikroskobu (Zeiss EVO MA10, Germany)

5.5. İstatiksel Analiz

Bakteri üreme eğrilerinin değerlendirildiği ilk çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanılmıştır. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken absorbans düzeylerinin değerlendirilmesinde parametreler normal dağılım gösterdiğinden iki yönlü tekrarlanan Anova testi, post hoc Bonferroni test ve Tukey Test kullanılmıştır. 0. saate göre absorbans değişimleri normal dağılım göstermediğinden gruplar arası karşılaştırmalarda Kruskal Wallis testi, post hoc olarak Dunn's test kullanılmıştır. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

Fissür örtücü ve Hidroksiapatit diskler üzerinde oluşan karyojenik biyofilmin konfokal lazer taramalı mikroskop ile değerlendirildiği ikinci çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiştir. Çalışma verileri değerlendirilirken parametreler normal dağılım gösterdiğinden farklı çözelti ve materyallerin biyokütle, ortalama kalınlık ve maksimum kalınlık düzeyleri üzerinde etkisinin değerlendirilmesinde iki yönlü Anova testi (two way ANOVA), post hoc Tukey test kullanılmıştır. Anlamlılık $p<0,05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

6. BULGULAR

6.1. Bakteri Üreme Eğrilerinin Değerlendirilmesi

6.1.1. Bakterilerin çeşitli konsantrasyonlarda üremelerinin karşılaştırılması

Tablo 3. Bakteri türü, konsantrasyon ve zamanın absorbans değerleri üzerindeki ortak etkisinin değerlendirilmesi

	Type III Sum of Squares	**df**	**Mean Square**	**F**	**p**
Zaman	5,485	5	1,097	8973,854	0,001*
Zaman * Bakteri	2,432	10	0,243	1989,242	0,001*
Zaman * Konsantrasyon	1,359	25	0,054	444,616	0,001*
Zaman * Bakteri * Konsantrasyon	0,842	50	0,017	137,73	0,001*

Two-way Repeated Measures ANOVA Test **p<0,05*

Absorbans değerleri iki yönlü tekrarlanan Anova testi ile değerlendirildiğinde;

Absorbans değerlerinin zamana göre değişimi istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,001; p<0,05).

Bakteri-zaman, konsantrasyon-zaman ve bakteri-konsantrasyon-zaman etkileşiminin absorbans değerleri üzerindeki ortak etkisi istatistiksel olarak anlamlıydı (p:0,001; p<0,05) (Tablo 3) .

Tablo 4. Farklı bakteri türlerinde konsantrasyon gruplarında absorbans düzeylerinin başlangıca (0.saat) göre olan değişimlerinin değerlendirilmesi

		Grup A	Grup B	Grup C	Grup D	Grup E	Grup F
Bakteri	**Absorbans**	**Ort±SS**	**Ort±SS**	**Ort±SS**	**Ort±SS**	**Ort±SS**	**Ort±SS**
S. mutans (ATCC 25175)	0.saat	0,107±0,003	0,110±0,003	0,112±0,006	0,110±0,006	0,109±0,004	0,103±0,008
	1.saat	0,107±0,003	0,108±0,003	0,113±0,005	0,109±0,006	0,109±0,004	0,104±0,008
	2.saat	0,109±0,003	0,112±0,003	0,114±0,005	0,111±0,006	0,110±0,004	0,109±0,007
	4.saat	0,117±0,003	0,121±0,004	0,121±0,006	0,122±0,007	0,117±0,004	0,120±0,007
	6.saat	0,133±0,004	0,137±0,004	0,137±0,007	0,145±0,008	0,134±0,006	0,144±0,008
	24.saat	0,294±0,005	0,283±0,010	0,295±0,008	0,316±0,007	0,293±0,006	0,630±0,021
	0-1.saat p	1,000	0,336	1,000	1,000	0,993	0,001*
	0-2.saat p	0,016*	1,000	1,000	0,014*	1,000	0,001*
	0-4.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
	0-6.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
	0-24.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
S. sobrinus (ATCC 33478)	0.saat	0,111±0,003	0,130±0,006	0,120±0,007	0,117±0,004	0,118±0,003	0,108±0,005
	1.saat	0,114±0,004	0,200±0,042	0,214±0,038	0,234±0,047	0,220±0,045	0,119±0,009
	2.saat	0,118±0,004	0,137±0,004	0,153±0,027	0,218±0,059	0,170±0,044	0,123±0,006
	4.saat	0,126±0,004	0,146±0,005	0,132±0,009	0,135±0,005	0,129±0,003	0,172±0,007
	6.saat	0,135±0,004	0,156±0,005	0,138±0,009	0,151±0,005	0,137±0,003	0,230±0,008
	24.saat	0,304±0,009	0,518±0,018	0,421±0,018	0,48±0,023	0,300±0,010	0,768±0,015
	0-1.saat p	0,059	0,008*	0,001*	0,001*	0,001*	0,042*
	0-2.saat p	0,001*	0,001*	0,150	0,005*	0,067	0,001*
	0-4.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
	0-6.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
	0-24.saat p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
S. wiggsiae (DSM 22547)	0.saat	0,106±0,004	0,127±0,009	0,116±0,006	0,112±0,005	0,115±0,004	0,103±0,003
	1.saat	0,109±0,004	0,129±0,010	0,119±0,007	0,114±0,006	0,118±0,005	0,104±0,003
	2.saat	0,110±0,004	0,132±0,011	0,119±0,008	0,114±0,007	0,118±0,005	0,105±0,002
	4.saat	0,111±0,005	0,132±0,011	0,121±0,009	0,116±0,007	0,119±0,006	0,107±0,002
	6.saat	0,111±0,005	0,132±0,010	0,120±0,009	0,113±0,008	0,118±0,007	0,108±0,003
	24.saat	0,133±0,016	0,146±0,011	0,136±0,018	0,128±0,010	0,133±0,015	0,141±0,004
	0-1.saat p	0,022*	0,072	0,013*	0,484	0,732	0,272
	0-2.saat p	0,005*	0,024*	0,015*	0,434	1,000	0,081
	0-4.saat p	0,003*	0,010*	0,007*	0,143	1,000	0,001*
	0-6.saat p	0,009*	0,005*	0,033*	1,000	1,000	0,001*
	0-24.saat p	0,007*	0,001*	0,003*	0,001*	0,048*	0,001*

Bonferroni Test **p<0,05*

***Streptococcus mutans (ATCC 25175)* bakterisinde;**

Grup A'da başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saatte,

Grup B ve Grup C'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saat ve 2.saatte,

Grup D'de başlangıç (0. saat) absorbans düzeyine göre 1.saatte,

Grup E'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saat ve 2.saatte anlamlı bir değişim görülmezken ($p>0,05$)

Grup F'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre tüm saatlerde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

***Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* bakterisinde;**

Grup A'da başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saatte,

Grup C'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 2.saatte,

Grup E'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 2.saatte anlamlı bir değişim görülmezken ($p>0,05$),

Grup B, Grup D ve Grup F'de başlangıç (0. saat) absorbans düzeyine göre tüm saatlerde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$).

***Scardovia wiggsiae (DSM 22547)* bakterisinde;**

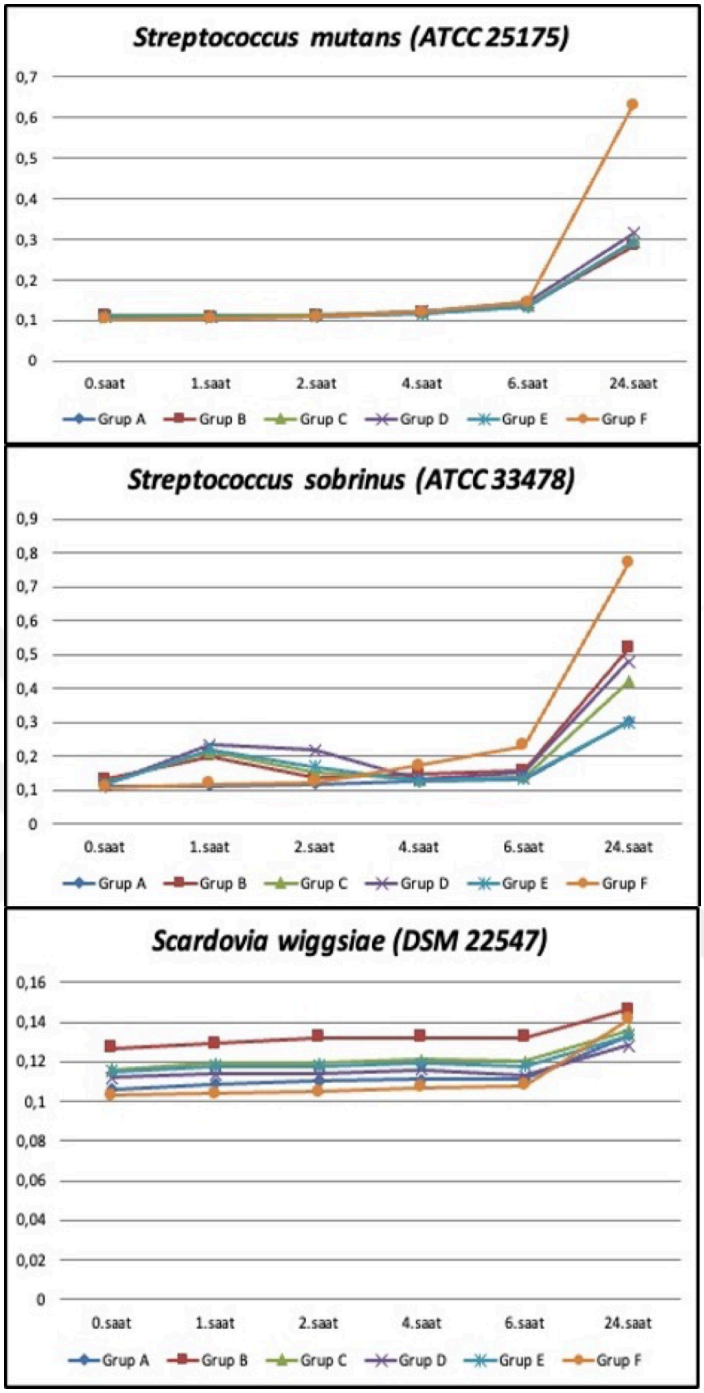
Grup B'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saatte,

Grup D'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 6.saatte,

Grup E'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 6.saatte,

Grup F'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre 1.saat ve 2.saatte anlamlı bir değişim görülmezken ($p>0,05$),

Grup A'da ve Grup C'de başlangıç (0.saat) absorbans düzeyine göre tüm saatlerde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$) (Tablo 4, Şekil 25).



Şekil 25. *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)'nin 6 farklı çözeltide 24 saatlik üreme eğrileri

Tablo 5. Farklı bakteri türlerinde konsantrasyona göre başlangıç saatine (0. saat) göre 1. saat, 2. saat, 4. saat, 6. saat ve 24. saat absorbans değişim düzeylerinin değerlendirilmesi

		1. saat absorbans değişim miktarı	**2. saat absorbans değişim miktarı**	**4. saat absorbans değişim miktarı**	**6. saat absorbans değişim miktarı**	**24. saat absorbans değişim miktarı**
Bakteri	**Konsantrasyon**	**Ort±SS (medyan)**	**Ort±SS (medyan)**	**Ort±SS (medyan)**	**Ort±SS (medyan)**	**Ort±SS (medyan)**
S. mutans	Grup A	0±0,001 (0)	0,002±0,001 (0,002)	0,01±0,001 (0,01)	0,026±0,002 (0,025)	0,187±0,005 (0,187)
	Grup B	-0,002±0,002 (-0,002)	0,001±0,002 (0,002)	0,010±0,003 (0,01)	0,027±0,003 (0,027)	0,173±0,008 (0,171)
	Grup C	0,001±0,003 (0,001)	0,001±0,002 (0)	0,009±0,002 (0,009)	0,025±0,004 (0,023)	0,183±0,007 (0,182)
	Grup D	-0,001±0,001 (-0,001)	0,001±0,001 (0,001)	0,012±0,002 (0,011)	0,035±0,004 (0,034)	0,206±0,004 (0,206)
	Grup E	-0,001±0,001 (-0,001)	0,001±0,001 (0)	0,008±0,002 (0,008)	0,025±0,004 (0,024)	0,184±0,006 (0,182)
	Grup F	0,002±0,001 (0,002)	0,006±0,001 (0,006)	0,018±0,002 (0,018)	0,041±0,005 (0,041)	0,528±0,019 (0,530)
	p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
S. sobrinus	Grup A	0,004±0,003 (0,003)	0,007±0,002 (0,007)	0,015±0,002 (0,015)	0,025±0,003 (0,024)	0,194±0,009 (0,194)
	Grup B	0,070±0,042 (0,089)	0,007±0,003 (0,007)	0,016±0,004 (0,015)	0,026±0,004 (0,026)	0,387±0,017 (0,388)
	Grup C	0,094±0,040 (0,111)	0,033±0,032 (0,022)	0,012±0,003 (0,011)	0,018±0,004 (0,017)	0,301±0,015 (0,303)
	Grup D	0,117±0,045 (0,133)	0,102±0,057 (0,132)	0,018±0,004 (0,018)	0,035±0,004 (0,035)	0,363±0,019 (0,365)
	Grup E	0,102±0,044 (0,115)	0,052±0,043 (0,054)	0,011±0,001 (0,011)	0,019±0,001 (0,019)	0,182±0,008 (0,185)
	Grup F	0,011±0,009 (0,009)	0,015±0,002 (0,015)	0,063±0,003 (0,063)	0,122±0,005 (0,122)	0,660±0,013 (0,661)
	p	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*	0,001*
S. wiggsiae	Grup A	0,003±0,002 (0,003)	0,004±0,003 (0,004)	0,005±0,003 (0,005)	0,005±0,003 (0,005)	0,027±0,016 (0,022)
	Grup B	0,002±0,002 (0,002)	0,004±0,003 (0,005)	0,005±0,003 (0,005)	0,005±0,003 (0,005)	0,018±0,004 (0,02)
	Grup C	0,003±0,002 (0,003)	0,003±0,003 (0,003)	0,005±0,005 (0,005)	0,004±0,005 (0,003)	0,020±0,016 (0,015)
	Grup D	0,002±0,002 (0,001)	0,002±0,003 (0,002)	0,004±0,004 (0,004)	0,001±0,005 (0,002)	0,016±0,007 (0,015)
	Grup E	0,003±0,003 (0,002)	0,003±0,005 (0,002)	0,003±0,006 (0,002)	0,003±0,006 (0)	0,018±0,014 (0,012)
	Grup F	0,001±0,001 (0,001)	0,003±0,002 (0,003)	0,004±0,002 (0,005)	0,005±0,002 (0,005)	0,038±0,004 (0,038)
	p	0,214	0,251	0,436	0,065	0,001*

Kruskal Wallis test *$p<0,05$

***Streptococcus mutans (ATCC 25175)* bakterisinde;**

Konsantrasyon grupları arasında başlangıç saatine (0.saat) göre; 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

Grup F'nin 1.saat absorbans değişim düzeyi, Grup B ($p=0,001$), Grup D ($p=0,006$) ve Grup E'den ($p:0,008$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti.

Grup F'nin 2.saat absorbans değişim düzeyi tüm gruplardan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup F'nin 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyi; Grup A, Grup B, Grup C ve Grup E'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup D'nin 4.saat absorbans değişim düzeyi Grup E'den ($p=0,018$),

Grup D'nin 6.saat absorbans değişim düzeyi; Grup C ($p=0,002$) Grup E'den ($p=0,007$),

Grup D'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, Grup B ($p:0,001$) ve Grup C'den ($p=0,024$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

***Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* bakterisinde;**

Konsantrasyon grupları arasında başlangıç saatine (0.saat) göre; 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

Grup A'nın 1.saat absorbans değişim düzeyi, Grup C ($p=0,002$), Grup D ($p=0,001$) ve Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü ($p<0,05$).

Grup D'nin 2.saat absorbans değişim düzeyi, Grup A ($p=0,001$) ve Grup B'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup D'nin 4.saat absorbans değişim düzeyi, Grup C ($p=0,019$) ve Grup E'den ($p=0,002$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup D'nin 6.saat absorbans değişim düzeyi, Grup C ($p=0,001$) ve Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup D'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup F'nin 4.saat ve 6.saat absorbans değişim düzeyi; Grup A, Grup B, Grup C ve Grup E'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup F'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, Grup A ($p=0,001$), Grup C ($p=0,002$) ve Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

Grup B'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, Grup A ($p=0,003$) ve Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$).

***Scardovia wiggsiae (DSM 22547)* bakterisinde;**

Konsantrasyon grupları arasında başlangıç saatine (0.saat) göre 1.saat, 2.saat, 4.saat ve 6.saat absorbans değişim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Konsantrasyon grupları arasında başlangıç saatine (0.saat) göre 24.saat absorbans değişim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

Grup F'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, Grup B ($p=0,005$), Grup C ($p=0,007$), Grup D ($p=0,003$) ve Grup E'den ($p=0,001$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p<0,05$) (Tablo 5).

6.1.2. Farklı konsantrasyon gruplarında bakteri üremelerinin karşılaştırılması

Tablo 6. Farklı konsantrasyonlarda bakteri türlerine göre başlangıç saatine (0. saat) göre 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeylerinin değerlendirilmesi

Konsantrasyon	Absorbans Değişimi	*Streptococcus mutans* Ort±SS (medyan)	*Streptococcus sobrinus* Ort±SS (medyan)	*Scardovia wiggsiae* Ort±SS (medyan)	*p*
Grup A	1.saat	0±0,001 (0)	0,004±0,003 (0,003)	0,003±0,002 (0,003)	0,001*
	2.saat	0,002±0,001 (0,002)	0,007±0,002 (0,007)	0,004±0,003 (0,004)	0,001*
	4.saat	0,01±0,001 (0,01)	0,015±0,002 (0,015)	0,005±0,003 (0,005)	0,001*
	6.saat	0,026±0,002 (0,025)	0,025±0,003 (0,024)	0,005±0,003 (0,005)	0,001*
	24.saat	0,187±0,005 (0,187)	0,194±0,009 (0,194)	0,027±0,016 (0,022)	0,001*
Grup B	1.saat	-0,002±0,002 (-0,002)	0,07±0,042 (0,089)	0,002±0,002 (0,002)	0,001*
	2.saat	0,001±0,002 (0,002)	0,007±0,003 (0,007)	0,004±0,003 (0,005)	0,001*
	4.saat	0,01±0,003 (0,01)	0,016±0,004 (0,015)	0,005±0,003 (0,005)	0,001*
	6.saat	0,027±0,003 (0,027)	0,026±0,004 (0,026)	0,005±0,003 (0,005)	0,001*
	24.saat	0,173±0,008 (0,171)	0,387±0,017 (0,388)	0,018±0,004 (0,02)	0,001*
Grup C	1.saat	0,001±0,003 (0,001)	0,094±0,04 (0,111)	0,003±0,002 (0,003)	0,001*
	2.saat	0,001±0,002 (0)	0,033±0,032 (0,022)	0,003±0,003 (0,003)	0,001*
	4.saat	0,009±0,002 (0,009)	0,012±0,003 (0,011)	0,005±0,005 (0,005)	0,007*
	6.saat	0,025±0,004 (0,023)	0,018±0,004 (0,017)	0,004±0,005 (0,003)	0,001*
	24.saat	0,183±0,007 (0,182)	0,301±0,015 (0,303)	0,02±0,016 (0,015)	0,001*
Grup D	1.saat	-0,001±0,001 (-0,001)	0,117±0,045 (0,133)	0,002±0,002 (0,001)	0,001*
	2.saat	0,001±0,001 (0,001)	0,102±0,057 (0,132)	0,002±0,003 (0,002)	0,001*
	4.saat	0,012±0,002 (0,011)	0,018±0,004 (0,018)	0,004±0,004 (0,004)	0,001*
	6.saat	0,035±0,004 (0,034)	0,035±0,004 (0,035)	0,001±0,005 (0,002)	0,001*
	24.saat	0,206±0,004 (0,206)	0,363±0,019 (0,365)	0,016±0,007 (0,015)	0,001*
Grup E	1.saat	-0,001±0,001 (-0,001)	0,102±0,044 (0,115)	0,003±0,003 (0,002)	0,001*
	2.saat	0,001±0,001 (0)	0,052±0,043 (0,054)	0,003±0,005 (0,002)	0,001*
	4.saat	0,008±0,002 (0,008)	0,011±0,001 (0,011)	0,003±0,006 (0,002)	0,004*
	6.saat	0,025±0,004 (0,024)	0,019±0,001 (0,019)	0,003±0,006 (0)	0,001*
	24.saat	0,184±0,006 (0,182)	0,182±0,008 (0,185)	0,018±0,014 (0,012)	0,001*
Grup F	1.saat	0,002±0,001 (0,002)	0,011±0,009 (0,009)	0,001±0,001 (0,001)	0,001*
	2.saat	0,006±0,001 (0,006)	0,015±0,002 (0,015)	0,003±0,002 (0,003)	0,001*
	4.saat	0,018±0,002 (0,018)	0,063±0,003 (0,063)	0,004±0,002 (0,005)	0,001*
	6.saat	0,041±0,005 (0,041)	0,122±0,005 (0,122)	0,005±0,002 (0,005)	0,001*
	24.saat	0,528±0,019 (0,53)	0,66±0,013 (0,661)	0,038±0,004 (0,038)	0,001*

Kruskal Wallis Test **p<0,05*

Tüm konsantrasyon gruplarında bakteriler arasında başlangıç saatine (0.saat) göre; 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p<0,05).

A konsantrasyon grubunda;

S. mutans'ın 1.saat absorbans değişim düzeyi, *S. sobrinus* (p=0,004) ve *S. wiggsiae*'den (p=0,002) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

*S. mutans'*ın 2.saat absorbans değişim düzeyi, *S. sobrinus'*dan (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

S. sobrinus'un 4.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* (p=0,022) ve *S. wiggsiae*'den (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. wiggsiae'nin 6.saat ve 24.saatte absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'dan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

B konsantrasyon grubunda;

S. sobrinus'un 1.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* (p=0,001) ve *S. wiggsiae'den* (p=0,022) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. sobrinus'un 2.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans'tan* (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. sobrinus'un 4.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae'den* (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. wiggsiae'nin 6.saat ve 24.saatte absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. sobrinus'dan* istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

S. mutans'ın 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. sobrinus'dan* (p=0,033) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

C konsantrasyon grubunda;

S. sobrinus'un 1.saat ve 2.saatteki absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. wiggsiae'den* istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. sobrinus'un 4.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae'den* (p=0,005) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. wiggsiae'nin 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. sobrinus'dan* istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

S. mutans'ın 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. sobrinus'dan* (p=0,033) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

D konsantrasyon grubunda;

*S. sobrinus'*un 1.saat, 2.saat ve 4.saatte absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. wiggsiae'*den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. mutans'ın 4.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae*'den (p=0,048) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. wiggsiae'nin 6.saat ve 24.saatte absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. sobrinus*'dan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

S. sobrinus'un 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans'*tan (p=0,033) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

E konsantrasyon grubunda;

S. sobrinus'un 1.saat ve 2.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* ve *S. wiggsiae*'den istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. sobrinus'un 4.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae'den* (p=0,003) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

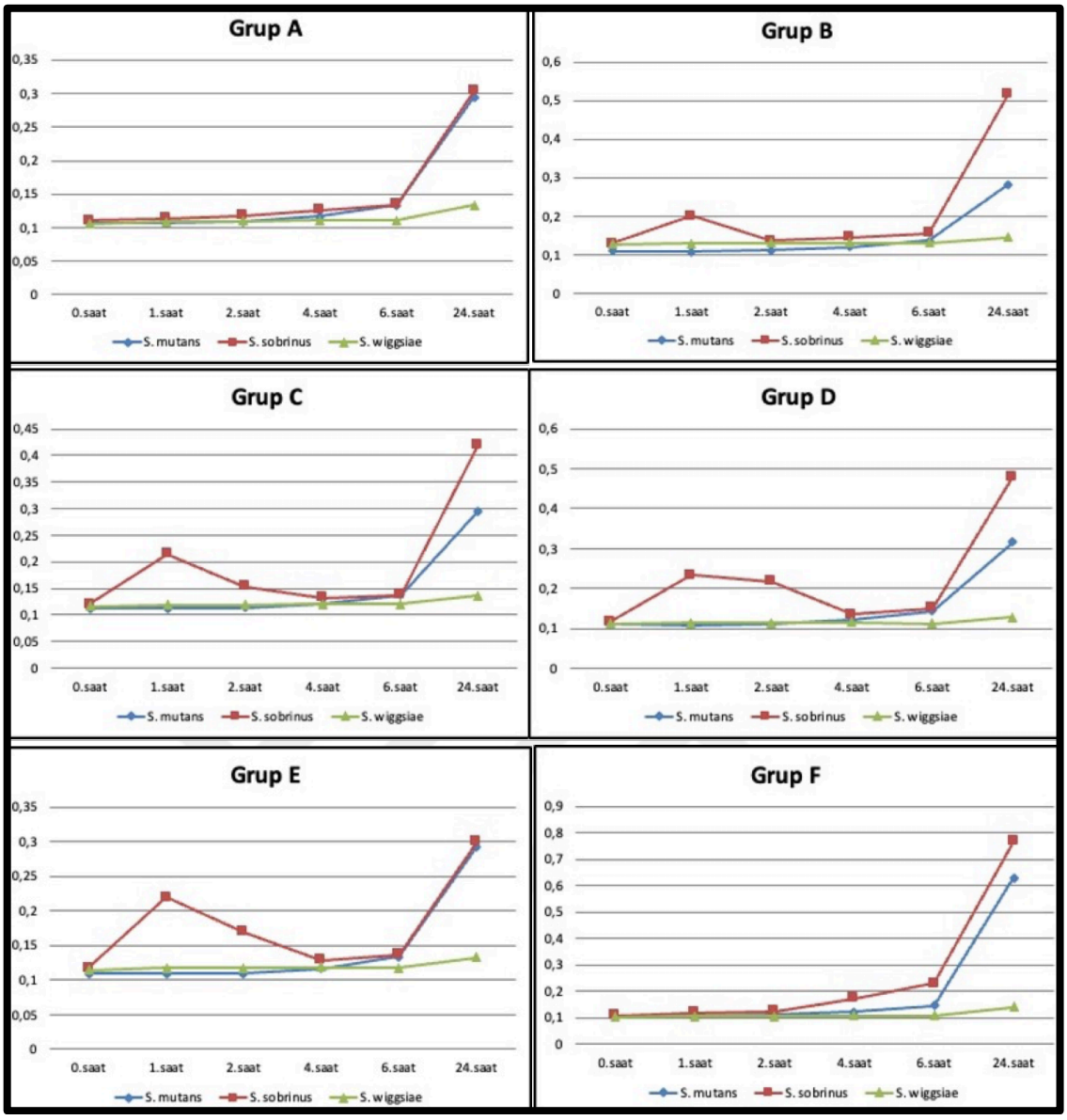
S. mutans'ın 6.saat absorbans değişim düzeyi, *S. sobrinus* (p=0,035) ve *S. wiggsiae*'den (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05). *S. sobrinus*'un 6.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae*'den (p=0,031) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. wiggsiae'nin 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* (p=0,001) ve *S. sobrinus*'dan (p=0,015) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşüktü (p<0,05).

F konsantrasyon grubunda;

S. sobrinus'un 1.saat, 2.saat, 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. mutans* (p=0,002) ve *S. wiggsiae'den* (p=0,001) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05).

S. mutans'ın 4.saat, 6.saat ve 24.saat absorbans değişim düzeyi, *S. wiggsiae'den* istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p<0,05) (Tablo 6, Şekil 22).



Şekil 26. 6 farklı çözelti içerisinde *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547)'nin 24 saatlik üremelerinin karşılaştırılması

6.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ve COMSTAT Yazılımı Kullanarak Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Değerlendirilmesi

Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus ve *Scardovia wiggsiae* tarafından hidroksiapatit, rezin esaslı fissür örtücü ve cam iyonomer fissür örtücü yüzeylerde oluşan üçlü biyofilmin biyokütlesi, ortalama kalınlığı ve maksimum kalınlığı analiz edilmiştir. Farklı solüsyonlar ve materyaller arasında üçlü biyofilm özelliklerinde önemli farklılıklar gözlenmiş ve ksilitol ve eritritolün biyofilm inhibisyonundaki etkinliği vurgulanmıştır.

Tablo 7. Farklı çözelti ve materyallerin biyokütle ($\mu m^3/\mu m^2$) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Biyokütle ($\mu m^3/\mu m^2$)	**Source**	**Type III Sum of Squares**	**df**	**Mean Square**	**F**	***p***
Ölü hücre	Çözelti	301378,2	5	60275,65	53,093	0,001*
	Materyal	35772,05	2	17886,02	15,755	0,001*
	Çözelti * Materyal	53909,43	10	5390,943	4,749	0,001*
Canlı hücre	Çözelti	308110,6	5	61622,12	52,685	0,001*
	Materyal	15436,94	2	7718,47	6,599	0,002*
	Çözelti * Materyal	54600,5	10	5460,05	4,668	0,001*
Toplam hücre	Çözelti	1211083	5	242216,7	63,081	0,001*
	Materyal	96034,2	2	48017,1	12,505	0,001*
	Çözelti * Materyal	201175,3	10	20117,53	5,239	0,001*

Two-way ANOVA Test *$p<0,05$

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

Materyaller arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,05$).

Çözelti ve materyalin ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi üzerindeki ortak etkisi de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,001$; $p<0,05$) (Tablo 7).

Tablo 8. Farklı çözelti ve materyallerin biyokütle (µm³/µm²) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Biyokütle		**Hidroksiapatit**	**Rezin esaslı FÖ**	**Cam iyonomer FÖ**	
(µm³/µm²)		**Ort±SS**	**Ort±SS**	**Ort±SS**	***p***
Ölü hücre	%10 Ksilitol	137,75±26,54	135,29±33,67	128,01±35,91	0,599
	%10 Eritritol	111,85±31,86	145,86±35,99	114,65±25,89	0,001*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	95,08±27,41	134,99±38,3	97,97±27,76	0,001*
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	78,22±35,98	141,58±49,2	89,09±28,63	0,001*
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	118,03±30,09	123,66±51,01	112,92±36,44	0,688
	%5 Sükroz	194,87±31,01	178,28±24,65	193,11±19,56	0,077
	p	0,001*	0,001*	0,001*	
Canlı hücre	%10 Ksilitol	146,57±34,95	123,5±32,89	124,3±32,88	0,048*
	%10 Eritritol	118,02±25,76	144,06±27,68	114,79±30,67	0,002*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	88,92±36,84	124,73±46,46	90,58±35,02	0,007*
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	74,53±45,14	115,73±46,27	81,5±32	0,005*
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	125,83±34,24	112,75±44,69	96,55±26,41	0,036*
	%5 Sükroz	174,64±26,39	171,25±19,28	192,46±20,32	0,006*
	p	0,001*	0,001*	0,001*	
Toplam hücre	%10 Ksilitol	284,32±59,38	258,79±56,47	252,31±57,1	0,173
	%10 Eritritol	229,87±48,97	289,93±58,74	229,44±53,98	0,001*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	184±60,32	259,72±80,49	188,55±60,02	0,001*
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	152,75±78,24	257,32±88.94	170,59±56,45	0,001*
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	243,86±61,15	236,4±83,77	209,46±54,31	0,230
	%5 Sükroz	369,5±56,1	349,54±33,42	385,57±37,96	0,033*
	p	0,001*	0,001*	0,001*	

Two-way ANOVA Test *$p<0,05$

<u>Hidroksipatit materyali kullanıldığında;</u>

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,001; p<0,05).

%5 sükroz kullanıldığındaki ölü hücre ve toplam hücre düzeyi, diğer tüm çözeltilerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti (p=0,001; p<0,05).

%10 ksilitol kullanıldığındaki ölü hücre düzeyi, %5 ksilitol+%5 eritritol (p=0,001) ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol (p=0,001) çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

%10 eritritol kullanıldığındaki ölü hücre düzeyi, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol (p=0,007) çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

%5 sükroz kullanıldığındaki canlı hücre düzeyi, %10 ksilitol hariç ($p>0,05$) diğer tüm çözeltilerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p=0,001$; $p<0,05$).

%2,5 ksilitol+%7,5 eritritol kullanıldığındaki canlı hücre ve toplam hücre düzeyi; %10 ksilitol, %10 eritritol, %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol ve %5 sükroz çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

%5 ksilitol+%5 eritritol kullanıldığındaki canlı hücre ve toplam hücre düzeyi; %10 ksilitol, %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol ve %5 sükroz çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Rezin esaslı fissür örtücü materyal kullanıldığında;

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

%5 sükroz kullanıldığındaki ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi; %10 ksilitol, %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Diğer çözeltiler arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Cam iyonomer fissür örtücü materyal kullanıldığında;

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

%5 sükroz kullanıldığındaki ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi diğer tüm çözeltilerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksekti ($p=0,001$; $p<0,05$).

%10 ksilitol kullanıldığındaki ölü hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi; %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

%10 ksilitol kullanıldığındaki canlı hücre biyokütle düzeyi; %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

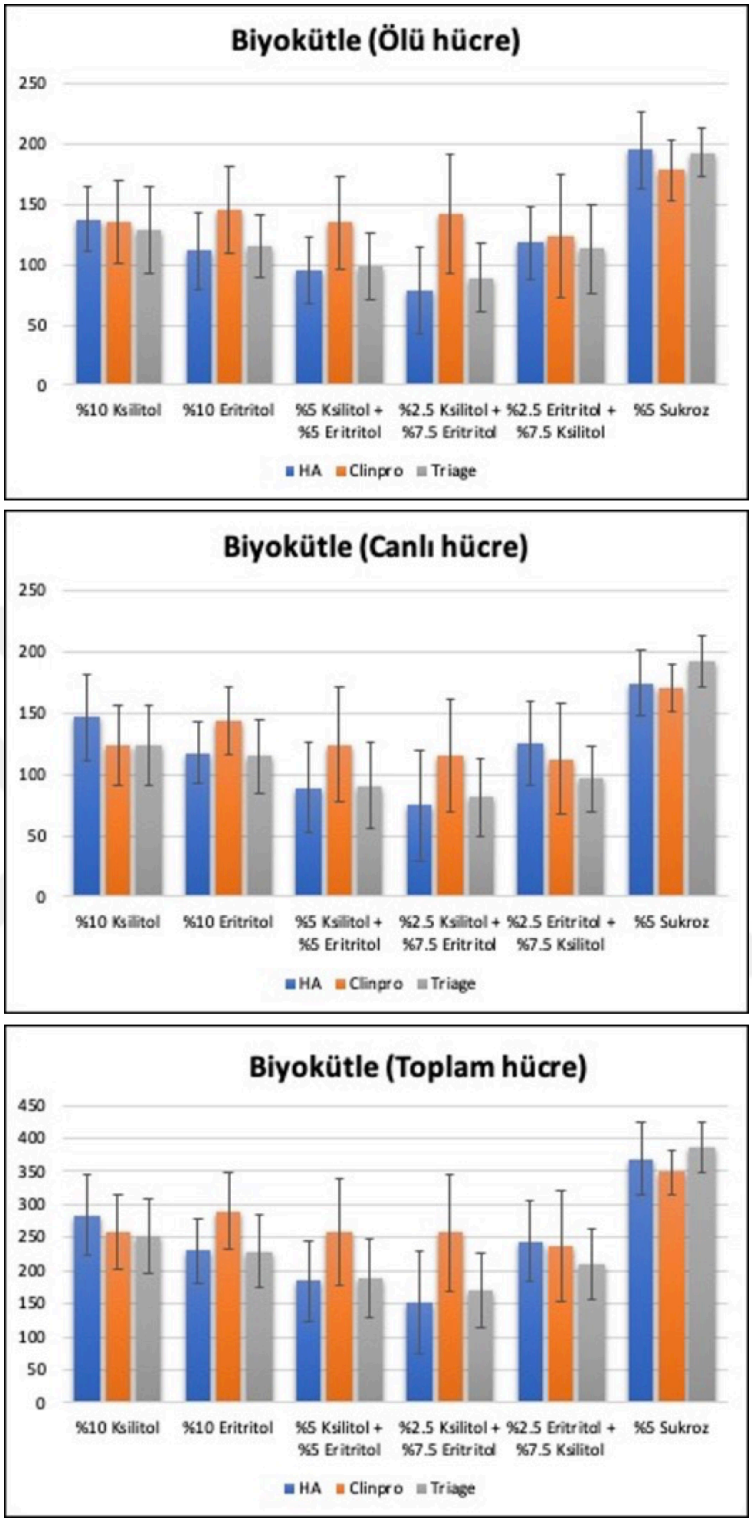
%10 eritritol kullanıldığındaki canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Materyaller arasında;

%10 eritritol, %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol çözeltisinde ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,05$).

%10 eritritol, %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol çözeltilerinde rezin esaslı fissür örtücü materyalin ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre biyokütle düzeyi; hidroksipatit ve cam iyonomer fissür örtücü materyalden anlamlı şekilde yüksekti ($p<0,05$).

Diğer çözeltiler için materyaller arasında biyokütle düzeyleri açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($p>0,05$) (Tablo 8, Şekil 27).



Şekil 27. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre biyokütlesi ($\mu m^3/\mu m^2$)

Tablo 9. Farklı çözelti ve materyallerin biyofilm ortalama kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Ortalama kalınlık (µm)	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Ölü hücre	Çözelti	84945,87	5	16989,17	11,72	0,001*
	Materyal	4107,348	2	2053,674	1,417	0,244
	Çözelti * Materyal	44492,03	10	4449,203	3,069	0,001*
Canlı hücre	Çözelti	72706,76	5	14541,35	10,416	0,001*
	Materyal	623,844	2	311,922	0,223	0,800
	Çözelti * Materyal	45722,63	10	4572,263	3.275	0,001*
Toplam hücre	Çözelti	313649,4	5	62729,88	11,354	0,001*
	Materyal	7824,422	2	3912,211	0,708	0,493
	Çözelti * Materyal	176683,5	10	17668,35	3,198	0,001*

Two-way ANOVA Test **p<0,05*

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,05$).

Materyaller arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,244$; $p>0,05$).

Çözelti ve materyalin ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyi üzerindeki ortak etkisi de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p<0,05$) (Tablo 9).

Tablo 10. Farklı çözelti ve materyallerin ortalama kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Ortalama kalınlık (µm)		Hidroksiapatit	Rezin esaslı FÖ	Cam iyonomer FÖ	
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	*p*
Ölü hücre	%10 Ksilitol	210,9±40,7	209,16±26,93	186,23±34,63	0,042*
	%10 Eritritol	179,6±29,75	209,8±20,85	187,82±29,75	0,002*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	202,96±15,51	189,88±45,52	183,31±46,03	0,249
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	147,87±69,17	184,88±50,15	181,52±42,05	0,062
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	203,45±34,24	177,35±59,43	190,94±31,33	0,160
	%5 Sükroz	215,22±24,4	226,73±19,48	222,84±12,14	0,155
	p	0,001*	0,001*	0,001*	
Canlı hücre	%10 Ksilitol	204,06±36,15	197,15±33,7	180,12±36,43	0,087
	%10 Eritritol	177,94±27,93	206,84±13,83	180,75±31,89	0,001*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	199,18±14,07	179,72±42,02	175,34±47,06	0,097
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	145,03±68,16	168,57±50,27	178,3±36,71	0,124
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	195,98±32,86	170,53±59,93	182,1±28,39	0,163
	%5 Sükroz	201,01±25,83	211,59±18,49	219,02±13,68	0,018*
	p	0,001*	0,001*	0,001*	
Toplam hücre	%10 Ksilitol	414,96±76,1	406,31±58,6	366,34±69,33	0,056
	%10 Eritritol	357,54±56,52	416,63±29,1	368,57±60,28	0,001*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	402,14±25,78	369,6±86,45	358,65±92,53	0,154
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	292,9±137,06	353,46±99,86	359,81±77,57	0,093
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	399,44±66,36	347,88±118,16	373,05±58,4	0,155
	%5 Sükroz	416,23±49,76	438,32±37,12	441,86±25,35	0,075
	p	0,001*	0,001*	0,001*	

Two-way ANOVA Test *$p<0,05$

<u>Hidroksiapatit materyali kullanıldığında;</u>

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p=0,001$; $p<0,05$).

%2,5 ksilitol+%7,5 eritritol kullanıldığındaki ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyi; %10 ksilitol, %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol ve %5 sükroz çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

%10 eritritol kullanıldığındaki ölü hücre ortalama kalınlık düzeyi, %5 sükroz çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü ($p<0,05$).

Diğer çözeltiler arasında anlamlı bir farklılık yoktu ($p>0,05$).

Rezin esaslı fissür örtücü materyal kullanıldığında;

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,001; p<0,05).

%5 sükroz kullanıldığındaki ölü hücre ortalama kalınlık düzeyi, %5 ksilitol+%5 eritritol (p=0,040), %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol, %10 ksilitol (p:0,012) ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol (p=0,002) çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

%5 sükroz kullanıldığındaki canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyi, %2,5 ksilitol+%7.5 eritritol %10 ksilitol ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

%10 eritritol kullanıldığındaki canlı hücre ortalama kalınlık düzeyi, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol %10 ksilitol (p=0,028) ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol (p=0,043) çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

Cam iyonomer fissür örtücü materyal kullanıldığında;

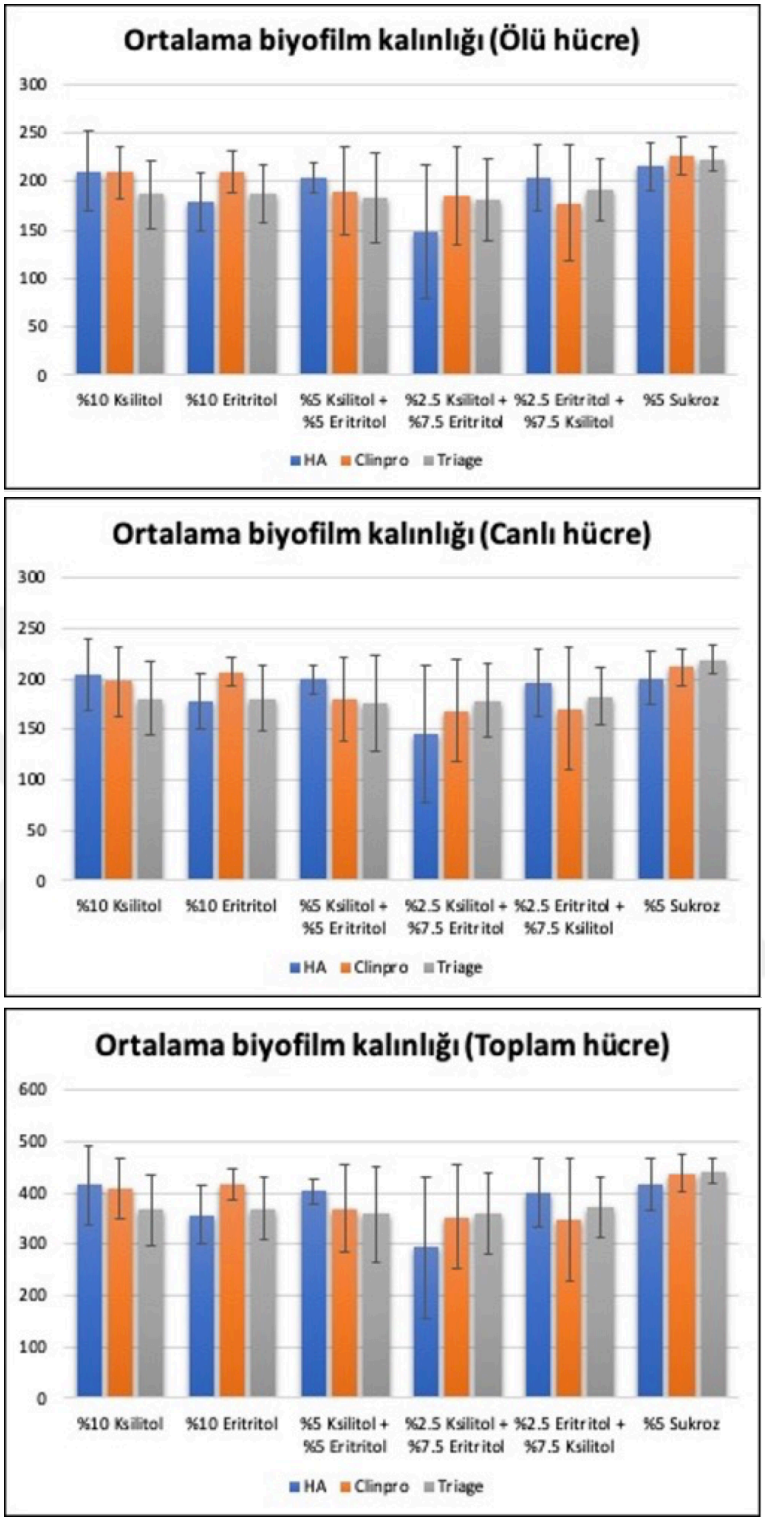
Çözeltiler arasında ortalama kalınlık ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,001; p<0,05).

%5 sükroz kullanıldığındaki ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyi, diğer tüm şeker alkolü çözeltilerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

Materyaller arasında;

%10 ksilitol çözeltisinde ölü hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,042; p<0,05). Cam iyonomer fissür örtücü materyalin ölü hücre ortalama kalınlık düzeyi, hidroksiapatit (p=0,041) ve rezin esaslı fissür örtücü (p=0,048) materyallerinden anlamlı şekilde düşüktü (p<0,05).

%10 eritritol çözeltisinde materyaller arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı. Rezin esaslı fissür örtücü materyalin ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre ortalama kalınlık düzeyi; hidroksiapatit ve cam iyonomer fissür örtücü materyallerinden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05) (Tablo 10, Şekil 28).



Şekil 28. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre ortalama biyofilm kalınlığı (µm)

Tablo 11. Farklı çözelti ve materyallerin maksimum kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Maksimum kalınlık (µm)	Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Ölü hücre	Çözelti	6650,988	5	1330,198	3,862	0,002*
	Materyal	23,725	2	11,862	0,034	0,966
	Çözelti * Materyal	10137,53	10	1013,753	2,943	0,001*
Canlı hücre	Çözelti	4628,052	5	925,61	1,897	0,094
	Materyal	790,199	2	395,099	0,81	0,446
	Çözelti * Materyal	11966,11	10	1196,611	2,452	0,008*
Toplam hücre	Çözelti	21130,07	5	4226,013	2,993	0,012*
	Materyal	1073,066	2	536,533	0,38	0,684
	Çözelti * Materyal	39955,19	10	3995,519	2,829	0,002*

Two-way ANOVA Test **p<0,05*

Çözeltiler arasında ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı ($p<0,05$).

Çözeltiler arasında canlı hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p=0,094$; $p>0,05$).

Materyaller arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık yoktu ($p>0,05$).

Çözelti ve materyalin ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyi üzerindeki ortak etkisi de istatistiksel olarak anlamlıydı ($p=0,001$; $p<0,05$) (Tablo 11).

Tablo 12. Farklı çözelti ve materyallerin maksimum kalınlık (µm) değerleri üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi

Maksimum Kalınlık (µm)		Hidroksiapatit	Rezin esaslı FÖ	Cam iyonomer FÖ	
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS	*p*
Ölü hücre	%10 Ksilitol	252,93±9,24	252,05±9,42	245,86±8,11	0,025*
	%10 Eritritol	251,16±9,5	252,93±9,24	252,05±9,42	0,830
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	260,01±0	249,9±11,1	252,05±11,1	0,001*
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	229,05±54,57	244,97±13,92	249,39±24,62	0,157
	%2,5 Eritritol + %7.5 Ksilitol	254,7±10,41	240,55±36,43	252,93±9,24	0,094
	%5 Sükroz	244,09±6,66	251,16±9,5	242,32±4,05	0,001*
	p	0,001*	0,186	0,052	
Canlı hücre	%10 Ksilitol	243,2±5,59	245,86±8,11	242,32±7,14	0,244
	%10 Eritritol	243,2±5,59	252,05±9,42	244,97±7,47	0,001*
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	253,82±8,97	239,67±28,11	237,9±40,95	0,161
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	227,28±41,49	231,71±34,56	247,62±28,37	0,153
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	244,09±12,16	229,94±44,14	247,62±8,97	0,088
	%5 Sükroz	240,55±4,05	241,43±0	241,43±0	0,374
	p	0,001*	0,062	0,632	
Toplam hücre	%10 Ksilitol	496,13±11,95	497,9±15,11	488,17±13,32	0,053
	%10 Eritritol	494,37±12,43	504,98±17,24	497,02±14,27	0,061
	%5 Ksilitol + %5 Eritritol	513,82±8,97	489,06±35,88	489,94±49,65	0,046*
	%2,5 Ksilitol + %7,5 Eritritol	456,34±94,62	476,68±45,24	497,02±52,17	0,159
	%2,5 Eritritol + %7,5 Ksilitol	498,79±20,59	470,49±76,42	500,56±16,06	0,072
	%5 Sükroz	484,64±5,59	492,6±9,5	483,75±4,05	0,001*
	p	0,001*	0,062	0,488	

Two-way ANOVA Test **p<0,05*

<u>Hidroksiapatit materyali kullanıldığında;</u>

Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,001; p<0,05).

%2,5 ksilitol+%7,5 eritritol kullanıldığındaki ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyi; %10 ksilitol, %10 eritritol, %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü (p<0,05).

%2,5 ksilitol+%7,5 eritritol kullanıldığındaki canlı hücre maksimum kalınlık düzeyi; %5 ksilitol+%5 eritritol (p=0,001), %2,5 eritritol+%7,5 ksilitol (p=0,042) çözeltilerinden anlamlı şekilde düşüktü (p<0,05).

Rezin esaslı fissür örtücü ve cam iyonomer fissür örtücü materyal kullanıldığında;

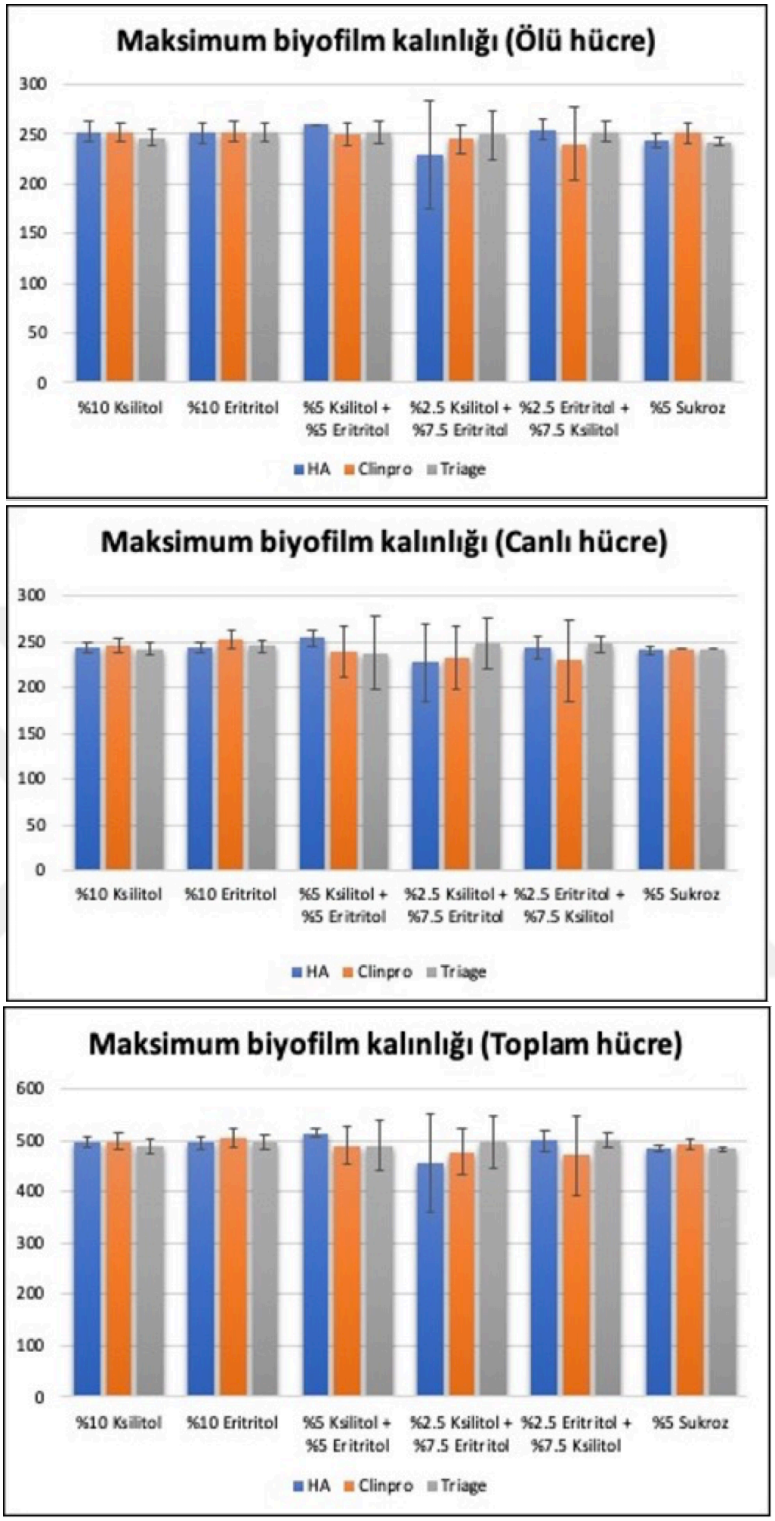
Çözeltiler arasında ölü hücre, canlı hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yoktu (p>0,05).

Materyaller arasında;

%10 ksilitol çözeltisinde ölü hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p=0,025; p<0,05). Cam iyonomer fissür örtücü materyalin ölü hücre maksimum kalınlık düzeyi; hidroksiapatit (p=0,034) ve rezin esaslı fissür örtücü (p=0,042) materyallerden anlamlı şekilde düşüktü (p<0,05).

%5 ksilitol+%5 eritritol çözeltisinde materyaller arasında ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p<0,05). Hidroksiapatit materyalinin ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyi; Rezin esaslı fissür örtücü ve Cam iyonomer materyallerden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05).

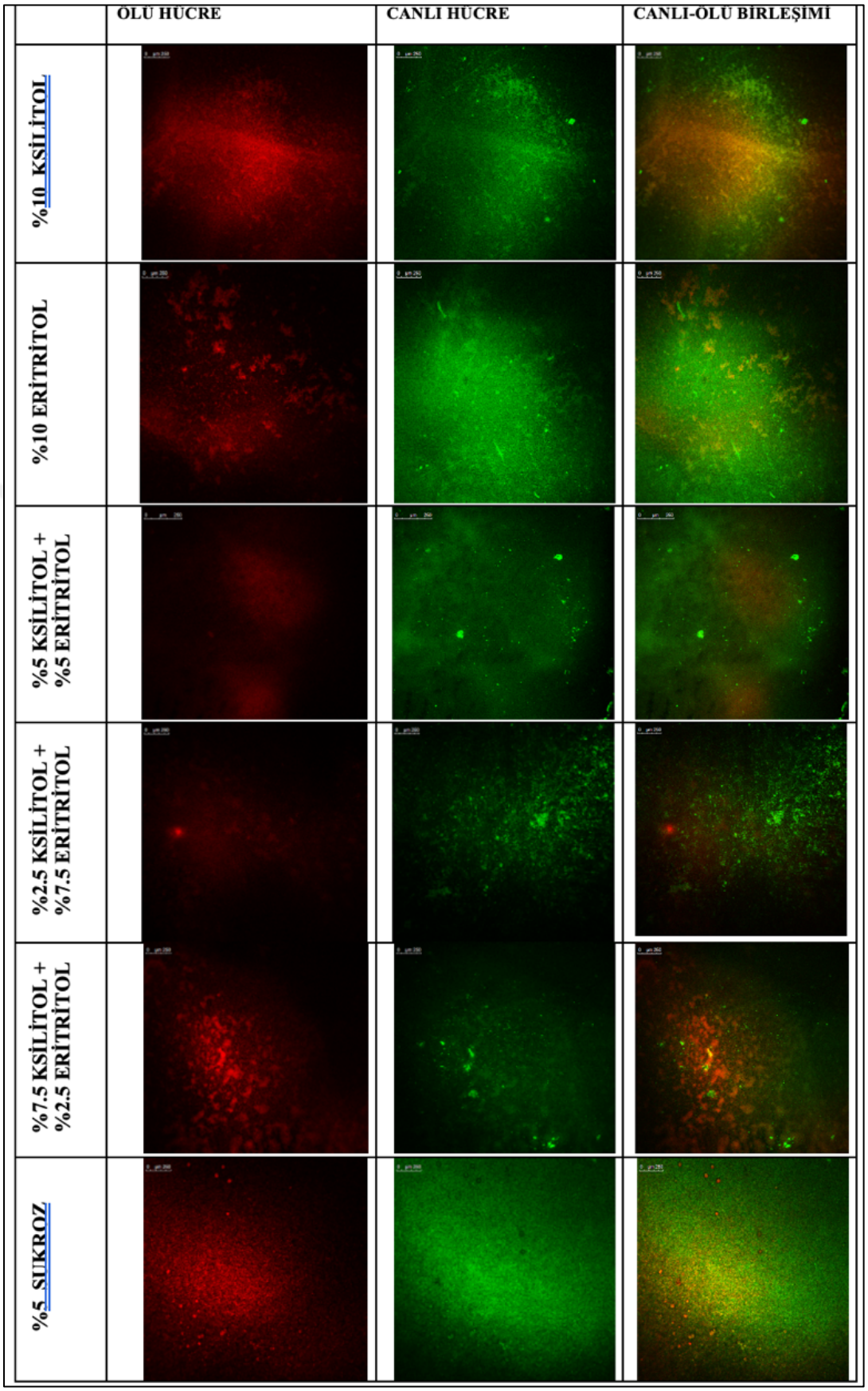
%5 sükroz çözeltisinde materyaller arasında ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyleri açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık vardı (p<0,05). Rezin esaslı materyalin ölü hücre ve toplam hücre maksimum kalınlık düzeyi, hidroksiapatit (p=0,006) ve cam iyonomer içerikli (p=0,001) materyallerden anlamlı şekilde yüksekti (p<0,05) (Tablo 12, Şekil 29).



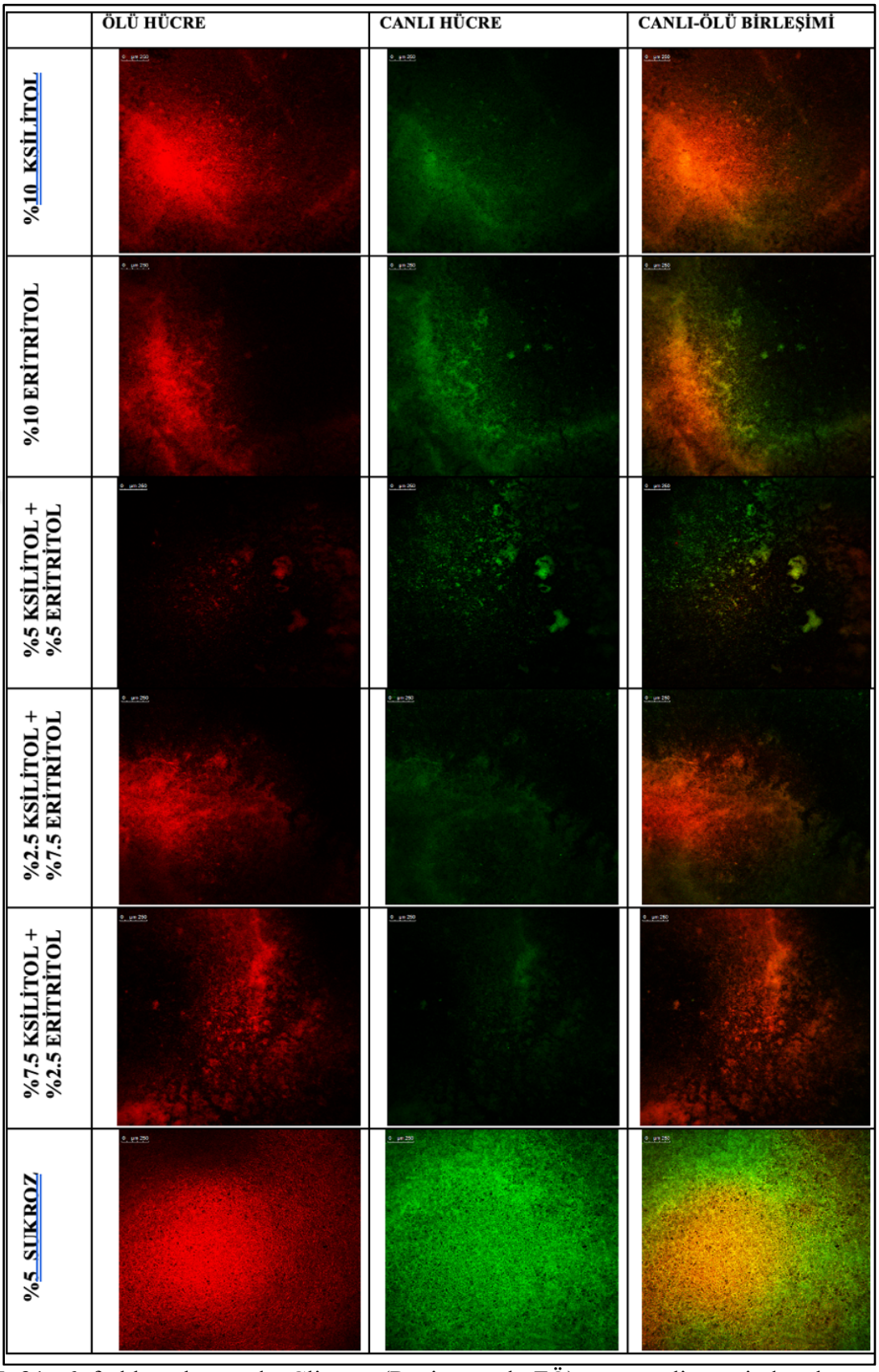
Şekil 29. 6 farklı çözelti ve 3 farklı materyal üzerinde oluşan üçlü biyofilmdeki ölü, canlı ve toplam hücre maksimum biyofilm kalınlığı (µm)

6.3. Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) ile Görüntülenmesi

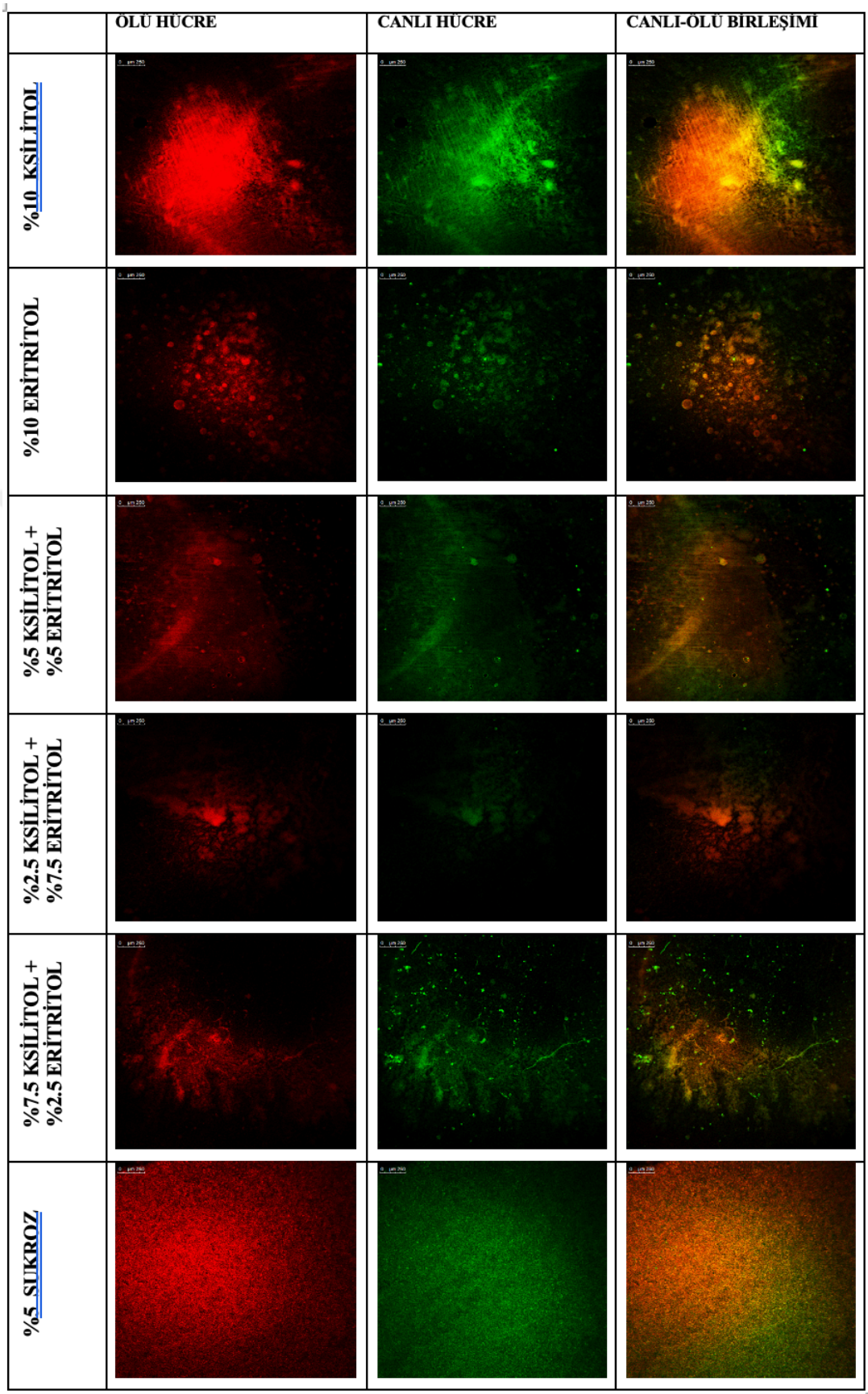
Hidroksiapatit, rezin esaslı fissür örtücü ve cam iyonomer fissür örtücü olmak üzere üç farklı yüzeyde oluşan bakteriyel biyofilmlerdeki canlı ve ölü hücrelerin görüntüleri konfokal lazer taramalı mikroskop (CLSM) kullanılarak incelenmiştir. Canlı / ölü hücre boyama LIVE/DEAD Baclight Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, ABD) ile sağlanmış ve toplam 126 diskte her numunenin üç farklı noktası ayrı ayrı görüntülenmiş ve her noktanın bir dizi fotoğrafı oluşturulmuştur. Boyama prosedüründe yeşil noktalar canlı hücreleri, kırmızı noktalar ölü hücreleri ve sarı noktalar ise hem canlı hem de ölü hücrelerin birleşimini göstermektedir. Hidroksipatit materyali üzerinde incelenen üçlü biyofilm görüntülerindeki hücre yoğunluğunun tek başına kullanılan şeker alkolü solüsyonlarında (%10 ksilitol ve %10 eritritol) karışım halinde kullanılan şeker alkolü solüsyonlarına göre (%5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %7,5 ksilitol +%2,5 eritritol) daha yoğun olduğu görülmüştür. Tüm yüzeyler ve solüsyonlar değerlendirildiğinde, en yüksek hücre yoğunluğu her zaman %5 sükroz solüsyonunda gözlenmiştir. Buna karşılık hidroksiapatit, rezin esaslı fissür örtücü ve cam iyonomer fissür örtücü materyaller ayrı ayrı incelendiğinde bu materyaller üzerinde oluşan üçlü biyofilmlerde en düşük hücre yoğunluklarının %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %5 ksilitol+%5 eritritol çözeltilerinde oluştuğu gözlenmiştir. Fissür örtücü materyaller incelendiğinde ise, rezin esaslı fissür örtücü yüzeyinde oluşan üçlü biyofilmdeki hücre yoğunluğunun çeşitli solüsyonlarda cam iyonomer fissür örtücü materyaller yüzeyinde oluşana oranla daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 30,31,32).



Şekil 30. 6 farklı solüsyonda Hidroksiapatit materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri



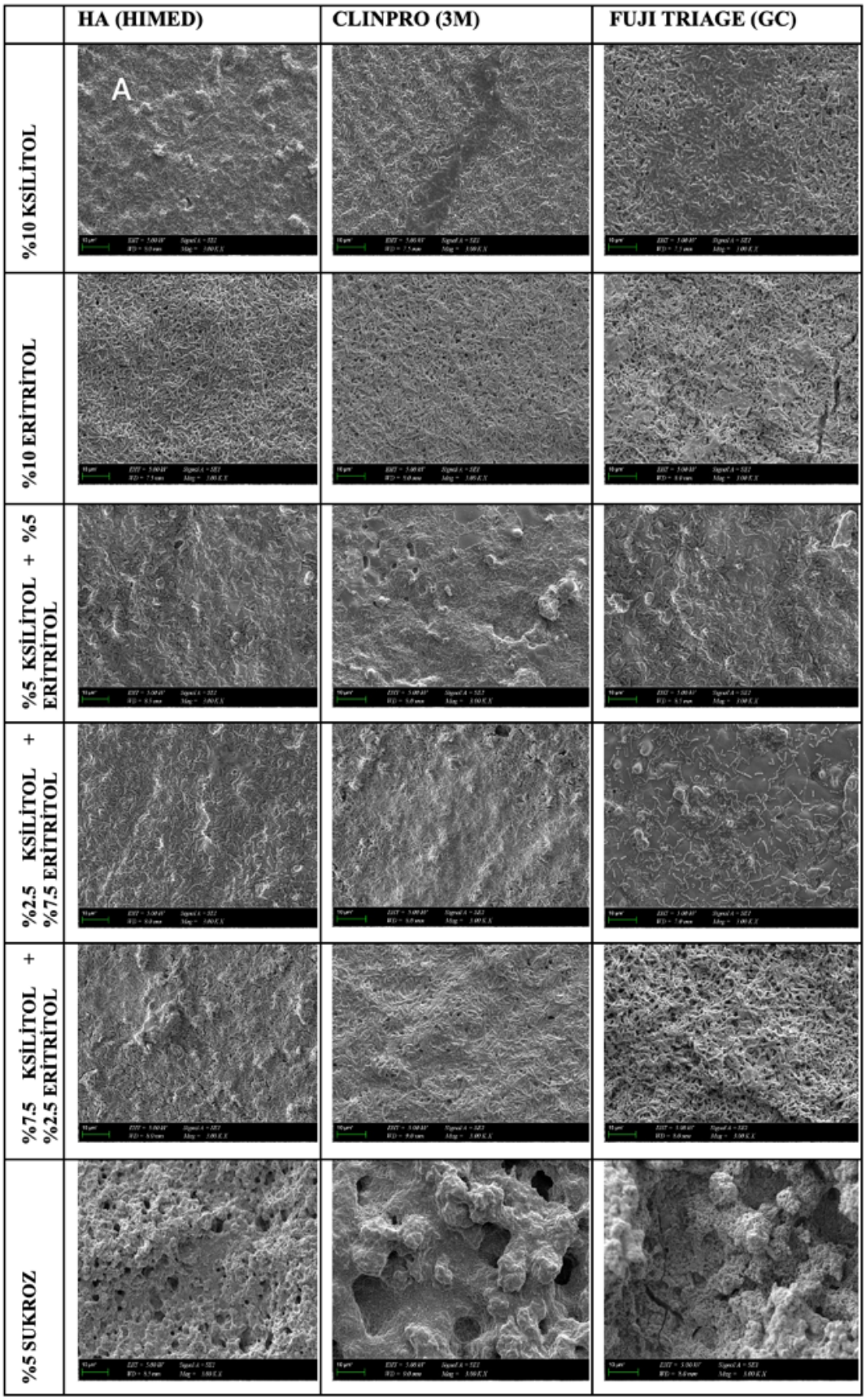
Şekil 31. 6 farklı solüsyonda Clinpro (Rezin esaslı FÖ) materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri



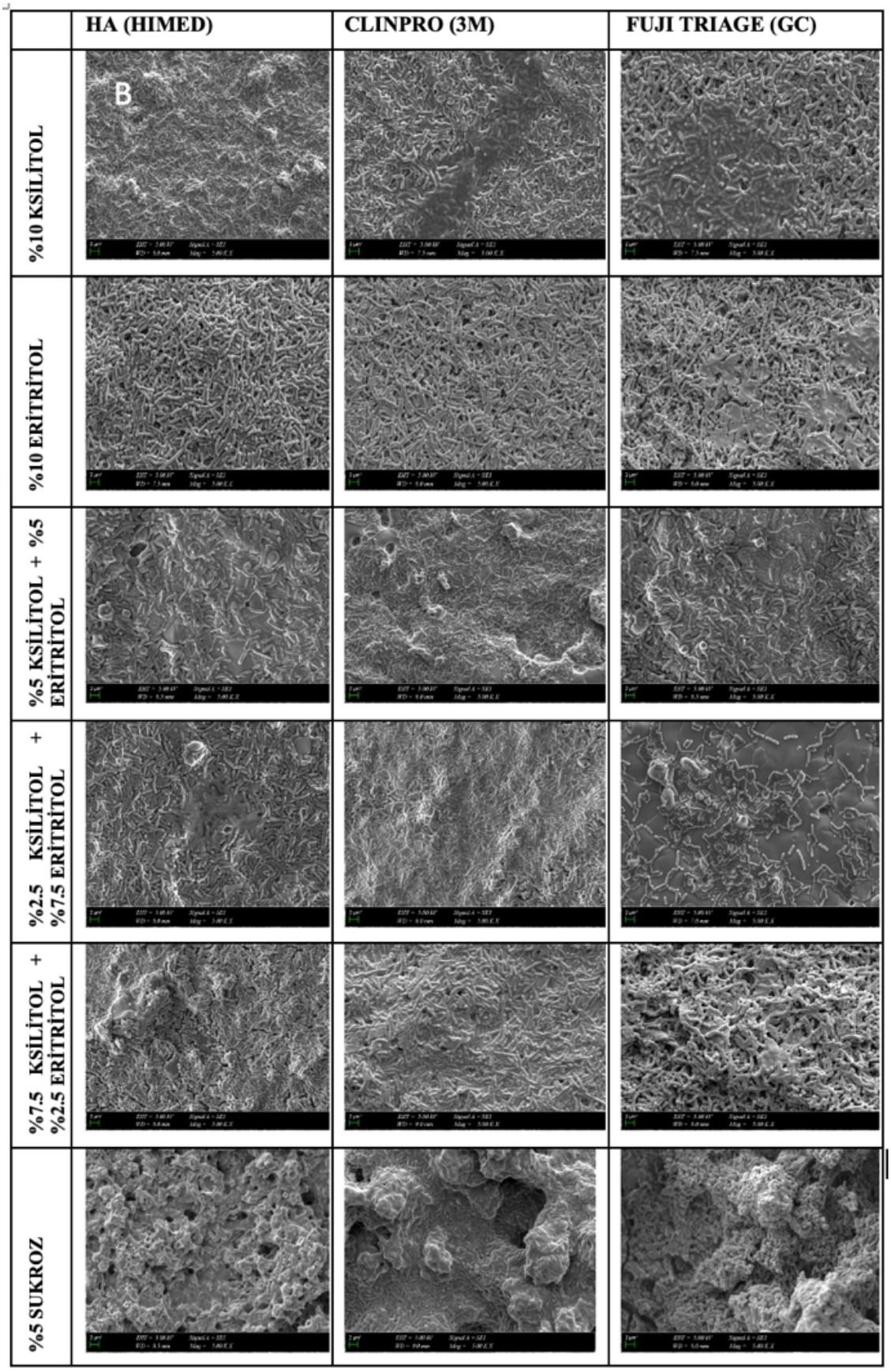
Şekil 32. 6 farklı solüsyonda Fuji Triage (Cam iyonomer FÖ) materyali üzerinde oluşan üçlü biyofilmin ölü, canlı ve ölü canlı hücre birleşimi CLSM görüntüleri

6.4. Hidroksiapatit ve Fissür Örtücü Yüzeyler Üzerinde Oluşan Biyofilmin Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ile Görüntülenmesi

Farklı konsantrasyonlardaki şeker alkolü solüsyonlarında bakteriyel üreme inhibisyonunu incelemek için, hazırlanan disklerin görüntüleri x3000 ve x5000 büyütmede SEM (Zeiss EVO MA10, Almanya) ile değerlendirilmiştir. Üçlü biyofilm oluşumu %5 sükroz kontrol grubunda belirgin bir şekilde gözlenirken, şeker alkolleri ile hazırlanan çözeltilerde bakteri üremesi belirgin bir şekilde engellenmiştir. Özellikle %2,5 ksilitol + %7,5 eritritol grubunda bakteri üremesi diğer gruplara kıyasla daha büyük ölçüde azalmıştır (Şekil 33, Şekil 34).



Şekil 33. Hazırlanan disklerin yüzeylerinde oluşan üçlü biyofilmin x3000 büyütmede elde edilen SEM görüntüleri



Şekil 34. Hazırlanan disklerin yüzeylerinde oluşan üçlü biyofilmin x5000 büyütmede elde edilen SEM görüntüleri

7. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu tez çalışması, oral kavitede bulunan ve diş çürüğü patogenezinde kritik rol oynayan *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) ve *Scardovia wiggsiae* (DSM 22547) gibi önemli karyojenik bakterilerin üremesini ve biyofilm oluşumunu incelemektedir. Çalışmamız, bu bakterilere karşı çeşitli konsantrasyonlardaki ksilitol ve eritritolün inhibe edici etkilerini değerlendirmeyi amaçlamıştır. Ksilitol ve eritritol gibi şeker alkollerinin oral biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini anlamak, diş çürüklerinin önlenmesi ve tedavisi açısından büyük önem taşımaktadır.

Önceki çalışmalarda ksilitol ve eritritolün farklı bakteri türleri üzerindeki etkileri incelenmiş olsa da, birden fazla karyojenik bakteri türünün birlikte oluşturduğu biyofilmin yapısını değerlendiren çalışmalar oldukça sınırlıdır. Bu bağlamda çalışmamız, karyojenik bakterilerin birlikte oluşturduğu kompleks biyofilm üzerine şeker alkollerinin etkilerini araştıran ilk çalışmalardan biri olma özelliğini taşımaktadır. Ayrıca, bu şeker alkollerinin çocuk diş hekimliğinde önemli bir yere sahip fissür örtücü materyallerden elde edilen yüzeylerdeki biyofilm oluşumuna etkilerini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışmanın bir diğer önemli katkısı, ksilitol ve eritritolün farklı kombinasyonlarının sinerjik veya antagonistik etkilerinin incelenmesidir. Şeker alkollerinin bir arada kullanıldığı çalışmalar sınırlı sayıdadır ve bu konuda literatürde önemli bir boşluk bulunmaktadır. Çalışmamızda özellikle ksilitol ve eritritolün kombinasyon halinde kullanımlarının, biyofilm inhibisyonunda tek başlarına kullanıldıklarında elde edilen sonuçlardan daha etkili olabildiği görülmüştür. Bu nedenle, çalışmamız hem teorik açıdan önemli bilgiler sunmakta, hem de bu alanda yapılacak gelecekteki araştırmalara ışık tutmaktadır.

Söderling ve ark. (2010) gerçekleştirdikleri çalışmada, ksilitol ve eritritolün polisakkarit üreten oral streptokokların cam yüzeylere tutunması üzerindeki etkilerini ve bu etkilerin üreme inhibisyonuyla ilişkisini incelemeyi amaçlamışlardır. Çalışmada, *S. mutans 10449, S. mutans Ingbritt, S. mutans CI 195, S. mutans CI 117, S. mutans CI 312, S. sanguinis 10904, S. mutans CI 2366, S. mutans CI 668, S. sobrinus OMZ 176, S. mutans CI 113, S. salivarius 25975, S. mutans CI 199, S. salivarius 13419, 14: S. sanguinis BAA 1455* bakterileri kullanılmıştır. Çalışmada elde edilen sonuçlar, %4 ksilitol ve %4 eritritol varlığında genel olarak streptokokların cam yüzeylere yapışmasının azaldığını göstermiştir.

Ancak, *S. mutans 10449 ve S. sobrinus OMZ 176* suşlarının yapışması ne ksilitol ne de eritritol tarafından etkilenmiştir. Örneğin, *S. mutans Ingbritt'in* yapışması ksilitol tarafından önemli ölçüde azaltılmış (p<0,05), ancak eritritol tarafından aynı etki gözlenmemiştir. Altı klinik izolatın (CI) tamamında, bir istisna dışında (CI 668/eritritol), hem ksilitol hem de eritritol ile cam yüzeye yapışmada önemli bir azalma gözlenmiştir. % 2 ve % 4 konsantrasyondaki şeker alkollerinin sonuçları karşılaştırıldığında, yapışmada linear bir azalma görülmüştür (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Benzer şekilde, *S. sanguinis 10904*' ün cam yüzeye yapışması ksilitol tarafından azaltılmış, ancak eritritol aynı etkiyi göstermemiştir. İlginç bir şekilde, başlangıçta düşük yapışma gösteren *S. sanguinis BAA 1455'* in yapışması ise ksilitol tarafından artırılmıştır. Ksilitol, *S. salivarius 13419*' un yapışmasını önemli ölçüde azaltmış ($p<0.01$), eritritol ise *S. salivarius 25975'* in cam yüzeye yapışmasını önemli ölçüde arttırmıştır ($p<0.01$) (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Her iki şeker alkolünün de çalışılan tüm mutans streptokokların üremesini inhibe ettiği gözlenmiştir. *S. mutans* ve *S. sobrinus* tip suşları için üreme inhibisyonu %36 ile %77 arasında değişmiştir. Genel olarak, %4 ksilitol ve %4 eritritol, %2' den daha fazla üreme inhibisyonu göstermiştir. Örneğin, klinik *izolat S. mutans 117*, eritritol ile güçlü bir şekilde inhibe edilirken ksilitol ile zayıf bir şekilde inhibe edilmiştir (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Ksilitol ayrıca *S. sanguinis NCTC 10904*' ün üremesini güçlü bir şekilde inhibe etmiş, %55' lik bir azalma gözlenmiştir, oysa eritritolün inhibisyon etkisi minimal olmuştur. *S. sanguinis BAA 1455* ise %4 ksilitol ile %45 üreme inhibisyonu göstermiştir. Her iki *S. salivarius* suşu da ksilitol ve eritritol ile log-fazında üreme inhibisyonu göstermiş, ancak bu etki yalnızca geçici olmuştur. *S. sanguinis* ve *S. salivarius* suşlarının ksilitol ve eritritol ile üreme inhibisyonu göstermesi, ancak bu etkinin sadece geçici olması, bu bakterilerin bu şeker alkollerine karşı adaptasyon geliştirebileceğini düşündürdüğü bildirilmiştir (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Ksilitol ve eritritolün üreme inhibisyonu ile cam yüzeye yapışmalarında sağlanan azalma arasında doğrudan bir ilişki bulunmamıştır. Bu durum, ksilitol ve eritritolün yapışma inhibisyonunun üreme inhibisyonundan bağımsız olabileceğini göstermektedir (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Bizim çalışmamızda da bakterilerin ayrı ayrı üreme eğrilerini değerlendirdiğimiz ilk deneyimizde 24 saatlik süre sonunda *Streptococcus mutans (ATCC 25175)*'ın %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol içeren solüsyonda absorbans değişim düzeyinin %10 eritritol ve %5 ksilitol+%5 eritritol içeren gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). *Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* için ise 24 saatlik süre sonunda %10 eritritol varlığında absorbans değişim düzeyinin, %10 ksilitol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritolden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Aynı şekilde *Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* için %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol solüsyonundaki absorbans değişim düzeyinin %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol solüsyonuna oranla daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0,05$).

Bu sonuçlar, her iki bakterinin ksilitol ve eritritole karşı farklı tepkiler verdiğini ve bu şeker alkollerinin etkilerinin suşlar arasında önemli ölçüde değişkenlik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Farklı suşların ksilitol ve eritritol gibi şeker alkollerine karşı duyarlılıkları, bu bakterilerin yüzey proteinleri, polisakkarit üretim kapasiteleri ve metabolik süreçleri gibi faktörlerle açıklanabilir. Farklı bakteri türlerinin, ksilitol ve eritritol gibi şeker alkollerinin varlığında farklı adaptasyon mekanizmaları geliştirebileceğini göstermektedir. Bu nedenle ksilitol ve eritritolün her bakteri türüne karşı tek tip bir etki göstermediği, bakteri türlerine özgü biyolojik ve yapısal özelliklerin bu şeker alkollerinin inhibe edici etkilerinde belirleyici rol oynadığı sonucuna ulaşılmıştır. (Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Ghazelbash ve ark. (2012), ksilitol ve yeni bir tatlandırıcı olan eritritolün ağızda bulunan Streptococcus türlerinin üremesi üzerindeki etkilerini incelemek ve bu etkileri karşılaştırmak amacıyla bir çalışma gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada, ksilitol ve eritritolün Streptococcus suşları üzerindeki inhibe edici etkilerinin yanı sıra streptokok biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri de değerlendirilmiştir. Araştırmada, oral kavitede bulunan Streptococcus türlerinden *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* ve *Streptococcus sanguinis* kullanılmıştır. Bu şeker alkollerinin biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri ise mikroplaka yöntemi ile belirlenmiştir (Ghezelbash ve ark., 2012).

Ksilitolün *S. mutans' ın* üremesini inhibe ettiğini bildiren ilk çalışma 1975 yılında yayımlanmıştır (Knuuttila & Mäkinen, 1975). Klinik çalışmalar, ksilitolün *S. mutans* sayısını, plak miktarını ve çocuklardaki çürük insidansını azalttığını göstermiştir (Bradshaw & Marsh, 1994; Ly ve ark., 2006; SÖDERLING & PIHLANTO-LEPPÄLÄ, 1989). Ayrıca bazı

çalışmalar, ksilitolün bazı *S. sanguinis* ve *S. salivarius* suşlarını da inhibe edebileceğini öne sürmüştür (Isotupa ve ark., 1995; Kontiokari ve ark., 1995).

İnsan diyetinde sakkarozun tamamen ya da kısmen ksilitol ile değiştirilmesi, diş çürüğü insidansında %85' ten fazla bir azalmaya yol açmıştır (Scheinin, 1976). Ksilitol gibi, eritritol de oral streptokok türleri tarafından katabolize edilmez. Ksilitol, PEP-PTS sistemi aracılığıyla oral streptokokların yapısına girer ve ksilitol 5-fosfata dönüştürülür, ardından defosforile edilerek ksilitol olarak dışarı atılır. Ksilitol-5-fosfat, glikoliz enzimlerini inhibe eder ve hem üremenin hem de asit üretiminin inhibisyonuna yol açar. (Mäkinen ve ark., 2001; Söderling, 2009). Bu enerji tüketen faydasız ksilitol döngüsünün, bakteriler ksilitole maruz kaldığında bu bakterilerin üremesinin inhibisyonundan sorumlu olduğu düşünülmektedir (Burt, 2006; Takahashi & Nyvad, 2008; Trahan, 1995). Dental plakta bulunan baskın bakteri türlerinin hiçbiri ksilitolden asit üretemez. Eritritolün de çürük önleyici olduğu öne sürülmüştür, ancak bu konuda yapılan çalışmalar sınırlıdır çürük önleme mekanizmasının anlaşılması için çok daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. (Burt, 2006; Mäkinen ve ark., 2002).

Bu çalışmada hem ksilitol hem de eritritol, incelenen tüm ağız Streptokoklarının üremesini inhibe etmiştir. Yapılan bir başka araştırmada, %4 ksilitol ve eritritol varlığı, sırasıyla %68 ve %71 oranında *S. mutans* üremesini inhibe etmiştir. Aynı konsantrasyonlarda ksilitol ve eritritol, *S. sanguinis* üremesini sırasıyla %65 ve %77 oranında azaltmıştır. 24 saatlik inkübasyondan sonra kültürün optik yoğunluğu, ksilitole kıyasla eritritol varlığında en düşük seviyeye ulaşmış, bu da eritritolün Streptococcus suşlarının üremesini inhibe etmede ksilitolden daha etkili olduğu gösterilmiştir (Ghezelbash ve ark., 2012).

Bizim çalışmamızda ise *Streptococcus mutans (ATCC 25175),* ve *Scardovia wiggsiae (DSM 22547)* bakterilerinin 24 saatlik inkübasyonu sonucunda tek başına kullanılan %10 eritritol ve %10 ksilitol arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır ($p>0,05$). *Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* bakterisinin 24 saatlik inkübasyon sonucunda ise %10 ksilitolün, %10 eritritole göre üremeyi istatiksel olarak anlamlı şekilde baskıladığı görülmüştür ($p<0,05$). Bu nedenle tek başına eritritol kullanımının tek başına ksilitol kullanımına oranla herhangi bir üstünlüğü bulunamamıştır.

Hashino ve ark. (2013) yaptıkları çalışmada; ksilitol, sorbitol ve eritritolün periodontal patojenlerin biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini incelemiştir. Oral mikroorganizma *Streptococcus gordonii* ve periodontal patojen *Porphyromonas gingivalis'* den oluşan

heterotipik bir biyofilm modeli kullanılarak şeker alkollerinin periodontopatik biyofilm oluşumunu inhibe etme etkinliği değerlendirilmiştir (Hashino ve ark., 2013).

Eritritolün inhibisyon etkisini incelemek için, eritritol ile işlenmiş *P. gingivalis* ve *S. gordonii* hücrelerinin metabolom profilleri analiz edilmiştir. Kapiler elektroforez zaman uçuşlu kütle spektrometresi kullanılarak yapılan metabolom analizleri, eritritolün doza bağlı olarak nükleik asit ara ürünleri ve ekstraselüler matriks bileşenleri gibi birçok bileşeni azalttığını ortaya koymuştur. Ardından, eritritolün özgül etkilerini belirlemek amacıyla hem *P. gingivalis* hem de *S. gordonii* hücrelerinde eritritol ve sorbitolle muamele edilen hücrelerin metabolitleri karşılaştırmalı olarak analiz edilmiştir. *P. gingivalis'te* Glu-Glu, Ser-Glu, Tyr-Glu, Ala-Ala ve Thr-Asp gibi tespit edilen tüm dipeptitler eritritol tarafından önemli ölçüde azaltılırken, sorbitolün bu peptitlerin artışına yol açtığı görülmüştür. Diğer yandan, sorbitol *S. gordonii* hücrelerinde trehaloz 6-fosfat birikimini teşvik etmiştir. Bu sonuçlar, eritritolün DNA ve RNA tükenmesine bağlı olarak üremeyi baskılamanın yanı sıra, ekstraselüler matriks üretimini zayıflatması ve dipeptit alımı ile amino asit metabolizmasında değişiklikler gibi çeşitli yollarla biyofilm gelişimini çifte tür inhibisyon etkisiyle engelleyebileceğini göstermektedir (Hashino ve ark., 2013).

Streptococcus gordonii, diş plağındaki önemli bileşenlerden olan oral streptokokların bir üyesidir. *S. gordonii* bir kez diş yüzeylerinde biyofilm oluşturduğunda, *Porphyromonas gingivalis* gibi daha patojen türlerin sonraki kolonizasyonu için bir bağlanma substratı sağlar (Kuboniwa & Lamont, 2010; Whitmore & Lamont, 2011).

Konfokal mikroskopik gözlemler *P. gingivalis*' in *S. gordonii* substratına birkimini en çok azaltan maddenin, ksilitol ve sorbitol ile karşılaştırıldığında eritritol olduğunu göstermiştir. Ayrıca, eritritolün *S. gordonii* monotipik biyofilm oluşumunu orta derecede baskıladığı tespit edilmiştir (Hashino ve ark., 2013). Diş hekimliğinde eritritol, çürükleri önlemek amacıyla tatlandırıcı olarak kullanılmaktadır ancak periodontal hastalıkları önlemeye yönelik etkilerine dair az sayıda çalışma vardır. Hashino ve ark. (2013) çalışmasında elde edilen bulgular eritritolün, özellikle *P. gingivalis* gibi periodontal patojenlerin biyofilm oluşumunu ve üremesini inhibe etme yeteneğine sahip olduğunu, periodontal hastalıkların önlenmesi ve tedavisinde önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir. (Hashino ve ark., 2013).

Şeker alkollerinin klinik ve in situ olarak yapılan çalışmalarda etkileri, genellikle günlük tüketim ağırlığının verilen miktarına (6-10 g/gün) veya ağız bakım ürünlerindeki ağırlık

yüzdesine göre hesaplanan reçete edilen doza göre (örneğin ağız gargaralarında %28-40, sakızlarda %65-70) karşılaştırılmıştır (Burt, 2006; Gonçalves ve ark., 2006; Van Loveren, 2004). Bu nedenle, Hashino ve ark. (2013) çalışmasında değerlendirme birimi olarak ağırlıkça yüzde kullanılmıştır (Hashino ve ark., 2013).

S. gordonii substratı üzerinde *Porphyromonas gingivalis* biyofilm oluşumu eritritol ilavesiyle doza bağlı bir şekilde engellenmiş ve >%10 konsantrasyonlarda bir platoya ulaşılmıştır. Sorbitol de %10' luk bir konsantrasyonda maksimum inhibitör etki göstermiştir bu nedenle konfokal mikroskop analizine tabi tutulan test çözeltilerde %10' luk konsantrasyonlar kullanılmıştır. Mikroskobik gözlemler, her bir şeker alkolünün *S. gordonii* ve *P. gingivalis* mikrokolonilerinin morfolojisini değiştirdiğini ortaya koymuştur. %10 eritritol, kontrol grubu (Fosfat tamponlu salin) kıyasla *P. gingivalis* sayısında belirgin azalma ile seyrek mikrokoloniler oluşmasına neden olmuştur. %10 sorbitol kullanımı da kontrol grubuna kıyasla düşük yoğunluklu biyofilmlerle sonuçlanmıştır (Hashino ve ark., 2013).

Bizim çalışmamızda da bu nedenle %10 eritritol ve %10 ksilitol kullanımına karar verilmiş ve sinerjistik etkilerin inceleneceği karışım gruplarında da toplam şeker alkolü konsantrasyonunun %10 olması sağlanmıştır. Bu sebeple %10 eritritol, %10 ksilitol, %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol çözeltileri olmak üzere 5 çalışma grubu hazırlanmıştır. Kontrol grubu olarak kullanılacak olan sükrozun ise mikrobiyolojik çalışmalarda çoğunlukla kullanıldığı gibi %5 olması gerektiği belirlenmiştir (Kõljalg ve ark., 2020).

Saran ve ark. (2015) yaptıkları çalışmada eritriritolün üretimi ve *S. mutans* üzerindeki inhibitör etkilerini incelemiştir (Saran ve ark., 2015). Eritritol doğal olarak armut, karpuz ve üzüm gibi bazı meyvelerde ve soya sosu, şarap, sake gibi fermente gıdalarda bulunur. Ayrıca sakız, şekerleme, çikolata, unlu mamuller ve alkolsüz içecekler gibi yiyecek ve içecek endüstrisinde geniş çapta kullanılır (Goossens & Röper, 1994; Marimuthu Jeya ve ark., 2009; Mitsubishi, 1996; Yang ve ark., 2014).

Eritritol üretimi için kimyasal süreçler, yüksek sıcaklıkta kimyasal reaksiyon içerir ve burada periyodat ile oksitlenmiş nişasta veya diyaldehit nişasta, nikel katalizör varlığında eritritole dönüştürülür (Pfeifer ve ark., 1960). Ancak bu reaksiyonun düşük verimliliği nedeniyle, ticari ölçekli eritritol üretiminde kullanılmaz. Endüstriyel düzeyde eritritol, *Candida magnoliae* osmotolerant mayası ile glikozdan fermantasyon yoluyla üretilir (Koh ve ark., 2003;

Savergave ve ark., 2011). Ancak bu suşun gliserol, mannitol, ksilitol, sitrik asit, glukonik asit, bütirik asit ve etanol gibi birkaç yan ürün ürettiği bildirilmiştir (Savergave ve ark., 2011).

Candida sorbosivorans SSE-24 numaralı izolat, en iyi eritritol üreticisi olarak bulunmuştur ve *Candida sorbosivorans* SSE-24'ün 2,1 g/L konsantrasyonda eritritol ürettiği tespit edilmiştir. Eritritol üretimi tamamlandıktan sonra, üretilen eritritolün *S. mutans* üremesi üzerine etkileri araştırılmıştır. Çeşitli konsantrasyonlarda eritritol çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan tüm çözeltiler, mikrobiyal fermantasyon yoluyla elde edilen saflaştırılmış ve kristalize edilmiş eritritol kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Eritritolün *S. mutans*'ın üremesini önemli ölçüde inhibe ettiği bulunmuştur. Eritritolün, *S. mutans* biyofilm oluşum kapasitesini %40,2 oranında inhibe ettiği ve üreme üzerinde %78 oranında azalmaya neden olduğu görülmüştür. Eritritolün %3, %4 ve %5 konsantrasyonlarında *S. mutans* biyofilm oluşumunu sırasıyla %30,12, %36,42 ve %40,2 oranında azalttığı bildirilmiştir (Saran ve ark., 2015).

Spektrofotometrik yöntemle yapılan üreme inhibisyonu çalışmaları, %5 ve üzeri eritritol konsantrasyonlarının, *S. mutans*'ın üremesi üzerinde %78'den fazla azalmaya neden olduğunu göstermiştir. Bu bulgular, eritritolün, *S. mutans* gibi diş çürüğüne neden olan bakterilerin üremesini ve biyofilm oluşumunu inhibe etme yeteneğini göstermektedir. *S. mutans* biyofilm oluşumunu inhibe eden eritritol diğer şeker alkollerine kıyasla daha düşük kalorili olması ve insanlarda daha yüksek tolere edilebilirliğe sahip olması nedeniyle önemli bir şeker ikamesi olarak değerlendirilmektedir. Ayrıca, eritritolün insan metabolizması üzerinde minimal etkisi olması, diyabet ve obezite hastaları için de uygun bir tatlandırıcı olmasını sağlamaktadır (Saran ve ark., 2015).

Bizim çalışmamızda da eritritol %10 konsantrasyonda kullanıldığında *Streptococcus mutans (ATCC 25175)* bakterisinin üremesini hem 1.saatte hem de 2.saatte güçlü bir şekilde engellemiştir. Aynı şekilde %10 eritritol *Scardovia wiggsiae (DSM 22547)'nin* de 1. saatte üremesini önemli ölçüde engellemiştir. *Streptococcus mutans (ATCC 25175)* bakterisinin 1. saat ve 2. saatte, *Scardovia wiggsiae (DSM 2254)' nin* ise 1. saatte başlangıç saatine oranla absorbans değerindeki artış istatiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Cannon ve ark. (2020)'nın gerçekleştirdiği çalışmada, çeşitli *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus* suşları üzerinde ksilitol ve eritritolün kombinasyon halinde kullanımı ile sinerji ve inhibisyon etkileri değerlendirilmiştir. Ksilitol ve eritritolün *S. mutans* ve *S. sobrinus'* un üreme ve biyokütle üretimi üzerindeki etkileri polistiren plastik yüzey üzerinde

değerlendirilmiştir. Çalışmada, *S. mutans* ve *S. sobrinus* suşları (American Type Culture Collection referans suşları 31341, 35668, 25175, sobrinus 33478) farklı ksilitol veya eritritol konsantrasyonlarının yer aldığı ortamda (Todd Hewitt Broth %1 sükroz veya Brain-Heart Infusion Broth %1 sükroz) mikroplaka test plakalarında 48 saat boyunca inkübe edilmiştir. Bu çalışma, geçmiş yıllarda yapılan çalışmaların ötesine geçerek diş çürüğü ile ilişkilendirilen oral Streptococcus suşlarının şeker alkollerinin inhibisyon ekilerini genişletmek amacıyla tasarlanmıştır (Cannon ve ark., 2020).

Önceki çalışmalar, şeker alkollerinin Brain Heart Infusion Broth (BHI) içinde çözündürülerek bakterilerin inhibisyonunu sağladığını rapor etmiştir. Cannon ve ark. (2020) yapmış olduğu bu çalışmanın farkı ise, BHI yerine Todd-Hewitt Broth (THB) kullanılarak bazı bulgular sağlanmasıdır. THB, diğer insan Streptococcus patojenleri olan *Streptococcus pyogenes* (A Grubu Strep) ve *Streptococcus agalactiae* (B Grubu Strep) gibi organizmaların üretimi için yaygın olarak kullanılan bir ortamdır. Cannon ve ark. (2020) yapmış oldukları çalışmanın temel amaçları daha önce rapor edilen şeker alkolü konsantrasyonlarının üzerinde konsantrasyonlar kullanarak yüksek konsantrasyonların etkilerini belirlemek ve ksilitol ve eritritolun kombinasyon halinde kullanılarak bu kombinasyonların in vitro olarak herhangi bir sinerjik etki gösterip göstermediğini belirlemektir (Cannon ve ark., 2020).

Cannon ve ark., şeker alkollerinin BHI ve THB içinde çözünürlüğünü belirleyerek ve yüksek konsantrasyonlarda şeker alkolleri hazırlayarak maksimum şeker alkolü konsantrasyonlarını belirlemiştir. Kullanılan son konsantrasyonlar ksilitol için %30, eritritol için %15 olarak belirlenmiştir. Çalışmada üç *Streptococcus mutans* izolatı, ATCC 35668, 31341 ve 25175 ve bir *Streptococcus sobrinus* suşu ATCC 33478 kullanılmıştır. Çalışma sonuçları, şeker alkollerinin üremeyi inhibe edici etkilerini ve biyokütle oluşumu üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde değerlendirmiştir. Ksilitolün test edilen dört suşun tamamını 300 mg/mL' de inhibe ederken, eritritolün 150 mg/mL' de iki suşu inhibe ettiği gözlenmiştir. *S. mutans* ATCC 31341, diğer üç suşa göre şeker alkolleri ile daha az ölçüde inhibe edilmiştir. Yöntemde değişiklik yapılarak eritritol konsantrasyonu 270 mg/mL' ye çıkarıldığında, dört suşun tamamının inhibe edildiği görülmüştür. Ancak, bakteri suşlarının çoğunda önemli ölçüde canlı bakteri azalması gözlemlenmemiştir. Bakterisidal bir ilaç konsantrasyonu, canlı bakterileri %99.9 azaltan bir konsantrasyon olarak tanımlanır. Hiçbir zaman önemli ölçüde canlı bakteri azalması gözlemlenmemiştir ve çoğu durumda 48 saatlik kültür sonrası canlı hücre sayımı başlangıç konsantrasyonun altında görülse de çarpıcı bir fark görülmemiştir (Cannon ve ark., 2020).

Sinerji çalışmaları ise başlangıçta *Streptococcus mutans* tip suşu olan ATCC 35668 ile yapılmıştır. Sinerji sonuçları tutarlı bir şekilde şeker alkollerinin etkilerinin sinerjik olmadığını, ancak olası bir additif etkiye işaret ettiğini göstermiştir. Diğer Streptokok suşları da sinerji deneylerinde kontrol edilmiştir. *Streptococcus sobrinus* suşu ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. *S. mutans* suşları şeker alkolleriyle üreme inhibisyonu göstermiştir, ancak şaşırtıcı bir şekilde biyokütle oluşumu açısından farklı davranmıştır. Biyokütle oluşumu açısından değerlendirildiğinde, test edilen üç suş için şeker alkollerinin üreme ve biyokütle oluşumu arasında doğrudan bir korelasyon olduğu gözlemlenmiştir. *S. mutans* ATCC 25175 suşunun üremesi şeker alkolleri tarafından etkilenirken, biyokütle oluşumu diğer üç suşa kıyasla az veya hiç olmamıştır. Şeker alkolü kombinasyonları ile yapılan sinerji çalışmalarında, özellikle biyokütle oluşumu açısından antagonist etkiler gözlemlenmiştir. Bu bulgular, şeker alkollerinin Streptococcus suşları üzerindeki inhibitör etkilerini ve bu etkilerin kombinasyon terapilerinde potansiyelini göstermektedir. Şeker alkolleri, oral mikrobiyomu etkileyerek diş çürüğü insidansını azaltmada etkili olabilir. Ancak, sinerjistik etkilerin eksikliği, kombinasyon terapilerinin etkinliğini sınırlayabilir (Cannon ve ark., 2020).

Bizim çalışmamızda ise sinerjistik etkileri inceleyebilmek için %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol olmak üzere 3 farklı çözelti hazırlanmıştır. Bakteri üremelerinin ayrı ayrı değerlendirildiği ilk deneyimizde; *Streptococcus mutans (ATCC 25175)*'ın 24 saat sonunda üremesinin %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol içeren solüsyonda, %5 ksilitol+%5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol içeren gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$). *Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)*'un 24 saat sonunda üremesinin %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol içeren solüsyonda, %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol içeren gruptan istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0,05$).

Bakterilerin bir arada kullanıldığı ve üçlü biyofilm oluşumunun izlendiği 2. deneyimizde ise hidroksipatit materyali üzerinde hem canlı hem de toplam hücrenin oluşturduğu biyokütlenin %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol içeren solüsyonda, %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol solüsyona göre istatiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Yine hem canlı hem de toplam hücrenin hidroksipatit materyali üzerinde oluşturduğu üçlü biyofilmdeki biyokütlenin %5 ksilitol+%5 eritritol solüsyonunda, %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol solüsyona göre istatiksel olarak anlamlı bir şekilde daha az olduğu görülmüştür ($p<0,05$). Bu durum şeker alkollerinin, her bir bakteri için ayrı ayrı gösterdiği etkilerin ve bakteriler bir araya gelerek bir yüzey üzerinde oluşturdukları biyofilme etkilerinin değişebileceğini göstermektedir. Bakteri

suşlarının şeker alkollerine duyarlılığı belirgin şekilde farklılık göstermektedir ve bazıları ksilitole daha duyarlıyken bazıları eritritole daha duyarlı olabilir. Farklı bakteri türlerine etkileri anlayabilmek için daha fazla çalışmaya gerek vardır.

Literatürde ksilitol ve eritritolün biyofilm oluşumu üzerindeki etkileri büyük bir varyasyon göstermektedir (Badet ve ark., 2008; Giertsen ve ark., 2011; Marttinen ve ark., 2012; Salli ve ark., 2016; Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010). Bu durum, farklı deneysel koşullar ve kullanılan farklı bakteriyel suşlardan kaynaklanmaktadır. Farklı suşlar, ksilitol ve eritritole karşı farklı duyarlılıklara sahiptir, bu da bizim çalışmamızda ve önceki çalışmalarda görülen farklıların sebebini açıklayabilir. (Marttinen ve ark., 2012; Salli ve ark., 2016; Söderling & Hietala-Lenkkeri, 2010).

Kõljalg ve ark. (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada, ksilitol ve eritritolün farklı konsantrasyonlarının ve kombinasyonlarının *Streptococcus mutans, Streptococcus sobrinus* ve *Scardovia wiggsiae* üzerindeki üreme ve biyofilm oluşumu üzerindeki etkilerini kapsamlı bir şekilde incelemiştir. Farklı şeker alkolü konsantrasyonlarının (15%, 7.5%, 3.75%, 1.9% ve 0.9%) inhibitör etkisi, iki klinik *S. sobrinus* suşu (*S. sobrinus* HUMB 13000, *S. sobrinus* HUMB 13104), iki klinik *S. mutans* suşu (*S. mutans* HUMB 13076, *S. mutans* HUMB 13034) ve *S. wiggsiae* DSM 22547 suşu üzerinde test edilmiştir. Bu çalışma, şeker alkollerinin sinerjik etkilerini ve bu etkilerin çürük yapıcı bakteriler üzerindeki olası inhibitör etkilerini değerlendirmekte önemli bulgular sunmaktadır. Çalışmada, şeker alkollerinin tekli ve kombinasyon halinde kullanımının çürük yapıcı bakteriler üzerindeki etkileri detaylı olarak incelenmiştir. Farklı eritritol ve ksilitol konsantrasyonlarının bakteriyel üreme inhibisyonu suş spesifik olmakla birlikte, ortalama olarak her iki şeker alkolünün de 15% konsantrasyonunda benzer şekilde yüksek inhibitör etkisi (inhibisyon %40'tan fazla) çalışılan tüm çürük yapıcı bakterilerde bulunmuştur. *S. mutans* suşlarının eritritole karşı diğer iki çürük yapıcı bakteriden daha duyarlı olduğu görülmüştür. *S. mutans'ın* üremesi, %15 eritritol ile %85' e kadar, %7.5 ve %3.75 eritritol ile %50' den fazla ve yaklaşık olarak %7.5 ksilitol ile %33 oranında inhibe edilmiştir (Kõljalg ve ark., 2020).

Bakteriyel üreme inhibisyonu test sonuçlarına göre, şeker alkollerinin sinerjik etkisini incelemek için %10' luk şeker alkolü konsantrasyonu seçilmiştir. Şeker alkollerinin farklı kombinasyonlarda kullanıldığı Kõljalg ve ark. (2020) çalışmasında kontrol grubu olarak iki farklı konsantrasyonda triklosan kullanılmıştır. Test edilen üç kombinasyon konsantrasyonu %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol olarak

seçilmiştir. Bu konsantrasyonların *S. mutans, S. sobrinus* ve *S. wiggsiae* üzerindeki etkisi nispeten tutarlı kalmıştır. Özellikle bu kombinasyon kullanımlarının etkileri araştırılmış ve sonuçlar, fazla eritritol içeren kombinasyonların *S. mutans* üremesini daha etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermiştir. Bunun aksine, fazla ksilitol içeren kombinasyonlar ise *S. sobrinus* ve *S. wiggsiae* üremesini daha etkili bir şekilde inhibe etmiştir. Bu bulgu, şeker alkollerinin bakteri türlerine özgü farklı inhibitör etkilere sahip olabileceğini ortaya koymaktadır. Ayrıca, %15 oranda tek başına eritritol veya ksilitolün kullanıldığı şeker alkolü konsantrasyonu, kombinasyon şekilnde kullanılan herhangi bir %10 şeker alkolü kombinasyonundan bazı durumlarda daha yüksek inhibitör etki göstermiştir. Ancak ağız boşluğunda bu oranın elde edilmesi daha zor olabilir. Pozitif kontrol olarak kullanılan %0.03 triklosan çözeltisi, mutans streptokoklara karşı yüksek etki göstermiştir (üreme inhibisyonu %70'ten fazla), ancak *S. wiggsiae'ye* karşı etkili olmamıştır. Aynı zamanda, daha düşük triklosan konsantrasyonu (%0.003) çürük yapıcı bakterilere karşı üreme inhibitör etkisi göstermemiştir. Kontrol çözeltisi, %0.03 triklosan, mutans streptokokların biyofilm oluşumunu inhibe etmiştir (*S. sobrinus* için %85 ve *S. mutans* için %66) ancak *S. wiggsiae* üzerinde etkili olmamıştır. %0.003 triklosan çözeltisi *S. sobrinus* üzerinde orta derecede inhibitör etki (%36) gösterirken, S. mutans (%−5) ve S. wiggsiae (%−14) üzerinde biyofilm destekleyici etki göstermiştir. Eritritol ve ksilitol ise, tüm çalışılan kombinasyonlarda ve tek başlarına, BHI' ye kıyasla çürük yapıcı bakterilerin üremesini inhibe etmiştir (Kõljalg ve ark., 2020).

Farklı kombinasyonlarda %10 şeker alkolü çözeltileri ve %15 tekli şeker alkolü çözeltileri mutans streptokoklara karşı eşit derecede etkili olmuştur (*S. sobrinus* için biyofilm inhibisyonu %57–69 ve *S. mutans* için %63–85). Bunun aksine, farklı şeker alkolü konsantrasyonlarında BHI' ye kıyasla *S. wiggsiae* biyofilm oluşumunun %1–34 oranında arttığı bulunmuştur. *S. wiggsiae* biyofilm oluşumu %10 şeker alkolü kombinasyonlarında %2–15, %10 tekli şeker alkolü çözeltilerinde %1–24 ve %15 tekli şeker alkolü çözeltisinde %8–34 artmıştır. Bu artış, *S. wiggsiae'* nin şeker alkollerine karşı farklı bir tepki mekanizmasına sahip olabileceğini düşündürmektedir. *S. wiggsiae' nin* ileri ve başlangıç çürüklerindeki artan rolü göz önüne alındığında, bu gözlemlenen denge, şeker alkollerinin farklı oranlardaki bireysel veya kombinasyonlarının kullanımını seçerken dikkate alınabilir. Çalışılan çürük yapıcı bakterilerin üreme ve biyofilm oluşumunun inhibisyonunda net sinerjik etkiler bulunmamıştır. Genel olarak eritritol, ksilitol ve kombinasyonlarının çürük yapıcı bakterilerin farklı türleri üzerindeki çeşitli etkilerine dayanarak, hastanın mevcut patojenlerine göre kişiselleştirilmiş şeker alkolü kullanımı önerilebilir (Kõljalg ve ark. , 2020).

Bizim çalışmamızda da şiddetli erken çocukluk çağı çürüklerinden özellikle sorumlu olduğu düşünülen yeni bir bakteri türü olan *Scardovia wiggsiae (DSM 2254)* kullanılmıştır. *S. wiggsiae'*nin 1.saatte üreme eğrisi incelendiğinde başlangıç saatine oranla absorbans değerinde %10 ksilitol grubundaki değişim oranı; %5 ksilitol+%5 eritritol, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol gruplarına oranla istatiksel olarak anlamlı şekilde düşük bulunuştur ($p<0,05$). Ayrıca 2. saatte %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol grubunda başlangıç değerine göre değişim miktarı %10 ksilitole göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol grubunda 4. saatte ve 6.saatte değişim oranı %5 ksilitol+%5 eritritol ve %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol gruplarına göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). 24 saat sonunda ise %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol grubunda başlangıç değerine göre değişim miktarı %7,5 ksilitol+%2,5 eritritol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Bu sonuç Kõljalg ve ark. (2020) çalışmasında görüldüğü gibi *S. wiggsiae'nin* ksilitole karşı eritritole oranla daha duyarlı olduğu sonucunu ortaya koymaktadır. 24 saatlik üreme sonuçları değerlendirildiğinde ise tüm şeker alkolü çözeltilerinde *S. mutans ve S. sobrinus'a* oranla absorbans değerlerinde en az değişim S.wigggsiae üzerinde olmuştur bu da diğer karyojenik bakterilerle karşılaştırıldığında şeker alkollerine farklı bir tepki gösterebileceğini düşündürmektedir.

Kõljalg ve ark. (2020) çalışmasında da *S. wiggsiae*' nin biyofilm oluşumunda artış gözlenmesi,şeker alkollerinin tüm çürük yapıcı bakteriler üzerinde aynı etkiye sahip olmayabileceğini ve daha fazla araştırma yapılması gerektiğini göstermektedir (Kõljalg ve ark., 2020). *S. wiggsiae'* nin oluşturduğu biyofilmin artış mekanizmaları ve bu durumun klinik anlamı henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Bu nedenle, gelecekteki çalışmalar, *S. wiggsia*e' nin biyofilm oluşumunu ve bu şeker alkollerinin biyofilm üzerindeki etkilerini daha detaylı incelemelidir. *S. wiggsiae*' nin ileri ve başlangıç çürüklerindeki artan rolü göz önüne alındığında, şeker alkollerinin farklı kombinasyonlar şeklinde kullanımını seçerken dikkate alınabilir.

Staszczyk ve ark. (2020) gerçekleştirdikleri çalışmada; sükroz, ksilitol, sorbitol ve eritritol varlığında kompozit ve cam iyonomer materyaller üzerindeki biyofilm oluşturma yeteneğini değerlendirmiştir. 40 pediatrik hastadan izole edilen klinik *Streptococcus mutans* suşlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin incelendiği bu çalışma, sekonder çürük gelişimi ve biyofilm oluşumu üzerine restoratif materyallerin ve tatlandırıcıların etkilerine dair önemli bilgiler sunmaktadır (Staszczyk ve ark., 2020).

Staszczyk ve ark. (2020) çalışması 2019–2020 yıllarında Kraków Üniversitesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiş ve çürük tanısı konulan 4-9 yaş arası 40 hastayı içermiştir. Dünya Sağlık Örgütü tarafından epidemiyolojik çalışmalar için belirlenen kriterlere dayanılarak yürütülmüştür. Grup, ICDAS II sınıflandırmasına (Uluslararası Çürük Tespiti ve Değerlendirme Sistemi Koordinasyon Komitesi, 2011) göre kod 3-6 olarak tanımlanan kavite değişimi olarak tanımlanan çürük bulunan sağlıklı çocuklardan oluşmuştur (Dikmen, 2015). Çocuklardan açlık durumunda sabah 8-9 arasında önerilen çalışma protokolüne göre plak örnekleri toplanmıştır (Krzyściak ve ark., 2017).

Staszczyk ve ark. (2020) çalışmasında Pedodonti Bölümü' nde gelişim çağındaki hastalarda en sık kullanılan iki restoratif materyal kullanılmıştır. Bu materyaller EQUIA® Forte Fil cam iyonomer (GC, Tokyo, Japonya) ve Ceram X® kompozit (One Universal, Dentsply, DeTrey, Konstanz, Almanya) olmuştur. Klinik olarak izole edilen 40 *S. mutans* suşunun biyofilm oluşturma yeteneği, hazırlanan kompozit materyaller ve cam iyonomer örneklerin, %5 sükroz, %5 ksilitol, %5 sorbitol veya %5 eritritol (Merck, Polonya) ile bakteri suşu süspansiyonlarını içeren 2.0 mL BHI kültür ortamına yerleştirilmesiyle mikrobiyolojik olarak değerlendirilmek istenmiştir. Daha sonra bakteriler mikroaerofilik koşullarda %10 CO_2 ortamda 37°C' de 72 saat inkübe edilmiştir (Staszczyk ve ark., 2020). Kontrol grubu (polistiren disk) ile karşılaştırıldığında hem biyofilm biyokütlesi, hem de kompozitler ve cam iyonomerler üzerinde biyofilm oluşturan mikroorganizmaların sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p< 0,0001$). Kontrollerle karşılaştırıldığında her iki restoratif materyal için de tüm zaman noktalarında (12, 24, 48, 72 saat) biyofilm oluşumunda (hem biyokütle hem de biyofilm koloni sayısı) istatistiksel olarak anlamlı bir yavaşlama gözlemlenmiştir. Aynı durum, %5 şeker alkolü içeren örnekler için %5 sükroz ile karşılaştırıldığında da gözlemlenmiştir. Eritritol, *S. mutans* biyofilmi üzerinde en güçlü inhibe edici etkiye sahip olarak bulunmuştur. Pasif bir yüzey (polistiren disk) üzerinde eritritol, biyokütle artışını 12 ve 72 saat arasında inhibe etmiştir. Sorbitol de benzer bir inhibe edici etkiye sahip olarak bulunmuştur ancak ksilitolde tam tersi bir etki gözlemlenmiştir; toplam biyokütlenin keskin bir şekilde artmasına neden olmuştur. *S. mutans* tarafından oluşturulan toplam biyofilm kütlesi, hem kompozit hem de cam iyonomer materyaller üzerinde, sükroz ve şeker alkollerinin varlığında kontrol grubu ile (dental materyal olmadan polistiren disk) karşılaştırıldığında her zaman noktasında önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur ($p<0.0001$). Bununla birlikte, cam iyonomer materyalin daha güçlü inhibe edici özelliklere sahip olduğu belirtilmiştir bu da kontrole göre daha düşük ortalama biyokütle artışına neden olmuştur. Hem sorbitol hem de eritritol, sükroza göre oluşan biyofilm kütlesini

azaltarak ek bir etki sağlamıştır. Ksilitolde restoratif materyallerde biyofilm oluşumunda kontrol yüzeyine göre bir azalma gözlemlense de ksilitol varlığındaki biyofilm kütlesi tüm zaman noktalarında sükroza göre daha yüksek görülmüştür (Staszczyk ve ark., 2020).

Tek başına restoratif materyaller (hem kompozit hem de cam iyonomer) tarafından gözlemlenen anti-biyofilm etkisi, içeriklerine antimikrobiyal maddelerin dahil edilmesiyle elde edilmiştir. Bu amaçla kullanılan antimikrobiyal maddeler üç kategoriye ayrılır (Chen ve ark., 2018). İlk kategori, klorheksidin veya benzalkonyum klorür gibi suda çözünebilen küçük moleküllerle zenginleştirilen malzemeleri içerir. Bu moleküller materyal ve komşu dokular içinde yayılır ve biyofilm oluşumuna karşı koruma sağlar (Du ve ark., 2012). İkinci kategori, dolgu materyali ile polimerizasyon eğiliminde olan bir birime ve antimikrobiyal aktiviteye sahip bir diğer birime sahip olan monomerleri içerir. Bu grubun etkisi yalnızca temas etkisi ile sınırlıdır ve komşu dokular için koruma sağlamaz. Antimikrobiyal aktiviteye sahip bir monomer örneği 12-metakriloksidodecypyridinium bromürdür (MDPB) (Wang ve ark., 2016). Üçüncü grup, metal veya oksit nanopartiküllerini içeren dolgu parçacıklarını içerir (Makvandi ve ark., 2020). Bu grubun etkisi; bakır, gümüş, titanyum ve çinko gibi antimikrobiyal özelliklere sahip metallerin yavaş salınmasına dayanır. Bu grup ayrıca cam iyonomer malzemelerde kullanılan nano-iyonomer dolgu maddelerini de içerir. Fluorid iyonları salan cam iyonomer sayesinde, bu malzemelerin ikincil çürüklerin önlenmesinde kullanılması, etkili antimikrobiyal aktivite sağlar ve diş sert dokularının demineralizasyonuna karşı duyarlılığını azaltır. Ayrıca, bu parçacıklar fluorid profilaksisinin bir parçası olarak ağız boşluğuna salınan fluorid iyonlarını bağlama yeteneğine sahiptir (Eick ve ark., 2004). Restoratif materyallerin yüzeylerinde oluşan biyofilmlerde toplam biyokütle ve canlı mikroorganizma miktarının kontrol yüzeyine (polistiren disk) kıyasla önemli ölçüde düşük değerlere sahip olduğuna dikkat edilmelidir. Yüzey pürüzlülüğü, birincil kolonizatörlerin yapışma ve biyofilm oluşturma yeteneğini belirleyen anahtar faktörlerden biridir (Buergers ve ark., 2007). Cam iyonomerin yüksek yüzey pürüzlülüğüne rağmen, biyofilm oluşumunun daha az olduğu gözlemlenmiştir; bu durumun fluorid iyonu salımı ile ilişkili olabileceği bildirilmiştir (Hahnel ve ark., 2017). İn vitro olarak yapay bir ağız modelinde gösterildiği gibi, bu özellikler sadece cam iyonomer yüzeyini ve ona temas eden yüzeyi değil, aynı zamanda dolgunun kenarından en az 500 μm uzaklıktaki diş yüzeyini de korumaktadır (Amend ve ark., 2018).

Cam iyonomer malzemelerin bozunma süreci, asitlerin etkisi altında matristen ve cam partiküllerinden metal iyonlarının sızmasıyla ilişkilidir, bu da sıvıların emilimine ve kademeli çözünmeye yol açar (De Paula ve ark., 2014). Sonuç olarak, yüzey pürüzlülüğünde bir artış

meydana gelir, bu da biyofilmin gelişmesini kolaylaştırır (Zhou ve ark., 2018). Asitlerin yıkıcı etkilerinin kanıtları, De Paula ve ark. (2014) tarafından yürütülen ve steril bir ortamda yiyeceklerden gelen asitlerin etkisi altında cam iyonomer malzemenin pürüzlülüğünde bir artış ve sertliğinde bir azalma gösteren çalışmada bulunabilir. Dolgu partiküllerinin boyutu, cam iyonomerlerin kimyasal ve mekanik direncini etkileyen faktörlerdir. Kullanılan partikül çapının azaltılması ile malzeme direnci artar (De Paula ve ark., 2014). Biyofilm mikroorganizmalarının cam iyonomerler üzerindeki nihai etkisi; dolgu partiküllerinin kaybı, sertlik kaybı, pürüzlülüğün artması ve mikro çatlakların ortaya çıkmasıdır (Krämer ve ark., 2018).

Staszczyk ve ark. (2020)'nın yaptığı araştırma, dental materyallerin ve tatlandırıcıların sekonder çürük gelişimi üzerindeki etkilerini anlamak için önemli bilgiler sunmaktadır. Sekonder çürüklerin önlenmesinde uygun diş materyalinin seçimi ve sükrozun şeker alkolleri ile değiştirilmesi önemlidir. Çalışmada, cam iyonomerlerin biyofilm oluşumunu inhibe edici etkisi, özellikle eritritol ile birlikte kullanıldığında daha belirgin olmuştur. Eritritol ve cam iyonomer kombinasyonu, biyofilm oluşumunu ve çürük yapıcı bakterilerin üremesini önemli ölçüde azaltmıştır. Bu kombinasyon, hem biyofilm oluşumunu inhibe ederek hem de diş materyalinin fizikokimyasal özelliklerini koruyarak uzun vadeli koruma sağlar (Staszczyk ve ark., 2020).

Bizim çalışmamızda da seçilen 3 çeşit karyojenik bakterinin bir arada kullanılmasıyla üçlü biyofilm oluşumunun gözlemlenebilmesi için farklı yüzeyleri temsil eden üç tip disk (hidroksiapatit (HA), rezin esaslı ve cam iyonomer içerikli fissür örtücüler) kullanılmıştır. Çalışmamızda kullanılan rezin esaslı fissür örtücü örnekler Clinpro (3M ESPE, USA), kapsül formunda bulunan cam iyonomer örnekler Fuji Triage (GC Dental, Tokyo, Japan) olarak belirlenmiştir. Üçlü biyofilmin CLSM ve COMSTAT yazılımı kullanılarak biyokütle, maksimum ve ortalama kalınlık değerlerinin ölçüldüğü çalışmamızda %10 eritritol, %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol grubunda rezin esaslı materyal üzerinde oluşan biyokütlenin hidroksiapatit ve cam iyonomer materyal üzerinde oluşan biyokütleye göre istatiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek olduğu bulunmuştur. %10 ksilitol grubunda ölü hücrelerin oluşturduğu üçlü biyofilmin ortalama kalınlığı ve maksimum kalınlığı; cam iyonomer içerikli materyalde, hidroksiapatit ve rezin esaslı materyale kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede daha düşük bulunmuştur. %10 eritritol grubunda ölü, canlı ve toplam hücrelerin oluşturduğu üçlü biyofilmin ortalama kalınlığı; rezin esaslı materyalde, hidroksiapatit ve cam iyonomer içerikli materyale kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. %5 ksilitol+%5 eritritol grubunda ölü ve toplam hücrelerin

oluşturduğu üçlü biyofilmin maksimum kalınlığı; hidroksipatit materyalde, rezin esaslı ve cam iyonomer içerikli materyale kıyasla istatiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur ($p<0,05$). Üçlü biyofilmin CLSM ve SEM gibi yüzey görüntüleme teknikleri kullanılarak yüzey özelliklerinin belirlendiği çalışmamızda cam iyonomer içerikli materyallerde; hidroksiapatit ve rezin esaslı materyallere göre daha az hücre yoğunluğu olduğu görülmüştür. En fazla hücre yoğunluğu tüm konsantrasyon ve yüzeylerde %5 sükroz grubunda görülmüştür. En az hücre yoğunluğu ise %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol çözelti gruplarında ve cam iyonomer içerikli yüzeylerde görülmüştür.

Sonuç olarak hem ksilitol hem de eritritol, *Streptococcus mutans (ATCC 25175), Streptococcus sobrinus (ATCC 33478)* ve *Scardovia wiggsiae (DSM 22547)* bakterilerinin üremeleri ve oluşturdukları üçlü biyofilm üzerine sükroza oranla önemli ölçüde azalma sağlamış, ağız ve diş sağlığını iyileştirme potansiyeline sahip şeker alkolleri olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın sağladığı önemli sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

1. Ksilitol ve eritritol, bu üç bakteri türü üzerinde farklı etkiler göstermiştir; bakteri türleri arasında inhibitör etkiler değişiklik göstermiştir. Biyokütle ve biyofilm kalınlığı üzerinde suşlara özgü etkiler gözlenmiştir. Biyofilm oluşumu, kullanılan şeker alkollerine göre değişiklik gösterdiği gibi materyal tipine göre de önemli farklılıklar göstermiştir.
2. *Streptococcus mutans* için %10 eritritol ve %10 ksilitol, üreme inhibisyonunda önemli bir fark yaratmamıştır.
3. *Streptococcus sobrinus,* %10 ksilitol varlığında %10 eritritole göre daha fazla üreme inhibisyonu göstermiştir.
4. *Scardovia wiggsiae,* ksilitolün biyofilm inhibisyonuna karşı eritritole oranla daha fazla duyarlılık göstermiştir.
5. Ksilitol ve eritritol kombinasyonlarında, tek başlarına kullanımlarına göre belirgin bir sinerjik etkisi gözlenmemiştir, ancak additif etkiler gözlenmiştir.
6. Üçlü biyofilm oluşum modelinde, %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol biyofilm oluşumunu en fazla inhibe eden çözelti olmuştur.
7. %5 ksilitol+%5 eritritol çözeltisi, biyofilm biyokütlesini ve kalınlığını anlamlı derecede azaltmıştır.
8. Cam iyonomer esaslı materyallerin yüzeylerinde, hidroksiapatit ve rezin esaslı materyallere göre daha az biyofilm oluşmuştur.

9. Biyofilm biyokütlesi ve kalınlığının genel olarak rezin içerikli yüzeylerde daha yüksek olduğu gözlenmiştir.
10. Hidroksiapatit yüzeylerde %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol ve %5 ksilitol+%5 eritritol çözeltisi biyofilm üzerinde en etkili iki çözelti olmuştur.
11. CLSM ve SEM görüntülemelerinde %5 ksilitol+%5 eritritol ve %2,5 ksilitol+%7,5 eritritol gruplarında daha düşük hücre yoğunluğu görülmüştür.

Çalışmamızın bulguları, fissür örtücü materyallerin ve tatlandırıcıların kombinasyonlar halinde birlikte kullanımının çürük gelişimini önemli ölçüde engelleyebileceğini göstermektedir. Özellikle çocuk hastalara erken dönemde uygulanacak olan cam iyonomer içerikli fissür örtücüler ve diyet ile alınan şekerin eritritol, ksilitol vb. şeker alkolleri ile değiştirilmesi, çürüklerin önlenmesinde umut vadetmektedir.

Bulgularımız ksilitol ve eritritolün hem tek başına hem de kombinasyonlar halinde birlikte kullanımlarının karyojenik bakterilere karşı etkili ajanlar olarak kullanılabileceğini göstermektedir. Eritritolün biyofilm oluşumunu engelleme ve bakteriyel üremeyi baskılama konusundaki üstün yeteneği, gelecekte diş sağlığı ürünlerinde yaygın olarak kullanılmasını desteklemektedir. Bu bulgular, eritritolün çürük önlemeye yönelik diş bakım ürünlerinde faydalı bir tatlandırıcı olarak kullanımını desteklemektedir. Ksilitol ve eritritol kombinasyonu ile gözlemlenen additif etkiler, maksimum terapötik fayda için formülasyonları optimize etmek üzere daha fazla araştırmayı gerektirmektedir. Araştırmalar ilerledikçe, bu şeker alkolleri ağız sağlığının geliştirilmesinde ve diş çürüklerinin önlenmesinde önemli bir role sahip olabilir. Ksilitol ve eritritolün günlük ağız hijyeni ürünlerine entegrasyonu, diş çürüğü insidansını azaltmadaki etkinliklerini önemli ölçüde artırabilir ve böylece genel ağız sağlığı sonuçlarını iyileştirebilir ancak bu sonuçlar, karışık biyofilmler ve klinik denemeler üzerinde ileride yapılacak daha fazla çalışmayla doğrulanmalıdır.

8. KAYNAKLAR

Amend, S., Frankenberger, R., Lücker, S., Domann, E., & Krämer, N. (2018). Secondary caries formation with a two-species biofilm artificial mouth. *Dental Materials*, *34*(5), 786-796. https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.02.002

Aminoff, C. (1978). The occurrence, manufacture and properties of xylitol. *Xylitol.*, 1-9.

Aoba, T. (2004). Solubility properties of human tooth mineral and pathogenesis of dental caries. *Oral Diseases*, *10*(5), 249-257. https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2004.01030.x

Artık, N., Velioğlu, S., & Kavalcı, B. (1993). Şeker alkollerden ksilitol; özellikleri üretimi ve gıdalarda kullanımı. *Gıda*, *18*(2).

Auschill, T. M., Arweiler, N. B., Brecx, M., Reich, E., Sculean, A., & Netuschil, L. (2002). The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *European Journal of Oral Sciences*, *110*(1), 48-53. https://doi.org/10.1046/j.0909-8836.2001.101160.x

Bädecker, C. (1929). The eradication of enamel fissures, Dent. *Items Int*, *51*, 859-866.

Badet, C., Furiga, A., & Thébaud, N. (2008). Effect of xylitol on an in vitro model of oral biofilm. *Oral Health & Preventive Dentistry*, *6*(4).

Berkowitz, R. J. (2006). Mutans streptococci: acquisition and transmission. *Pediatric Dentistry*, *28*(2), 106-109.

Bhise, S., & Kaur, A. (2013). Polyols to improve quality and shelf life of baked products: A review. *International Journal of Advanced Scientific and Technical Research*, *1*(3), 262-272.

Boesten, D. M., den Hartog, G. J., de Cock, P., Bosscher, D., Bonnema, A., & Bast, A. (2015). Health effects of erythritol. *Nutrafoods*, *14*, 3-9. https://doi.org/10.1007/s13749-014-0067-5

Bornet, F., Blayo, A., Dauchy, F., & Slama, G. (1996). Gastrointestinal response and plasma and urine determinations in human subjects given erythritol. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *24*(2), S296-S302. https://doi.org/10.1006/rtph.1996.0111

Bowen, R. (1982). Composite and sealant resins: past, present and future. *Pediatr Dent*, *4*(1), 10-15.

Bradshaw, D. J., & Marsh, P. (1994). Effect of sugar alcohols on the composition and metabolism of a mixed culture of oral bacteria grown in a chemostat. *Caries Research*, *28*(4), 251-256. https://doi.org/10.1159/000261977

Buergers, R., Rosentritt, M., & Handel, G. (2007). Bacterial adhesion of Streptococcus mutans to provisional fixed prosthodontic material. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, *98*(6), 461-469.

Burt, B. A. (2006). The use of sorbitol-and xylitol-sweetened chewing gum in caries control. *The Journal of the American Dental Association*, *137*(2), 190-196. https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0144.

Cannon, M. l., Merchant, M., Kabat, W., Catherine, L., White, K., Unruh, B., & Ramones, A. (2020). In vitro studies of xylitol and erythritol inhibition of Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus growth and biofilm production. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *44*(5), 307-314. https://doi.org/10.17796/1053-4625-44.5.4.

Charbeneau, G. (1982). Pit and fissure sealants. *International Dental Journal*, *32*(3), 215-222.

Chen, L., Suh, B. I., & Yang, J. (2018). Antibacterial dental restorative materials: A review. *Am J Dent*, *31*(Sp Is B), 6B-12B.

Chen, X., Jiang, Z.-H., Chen, S., & Qin, W. (2010). Microbial and bioconversion production of D-xylitol and its detection and application. *International Journal of Biological Sciences*, *6*(7), 834. https://doi.org/ 10.7150/ijbs.6.834

Clarke, J. K. (1924). On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, *5*(3), 141.

Craig, R., & Power, J. (1997). Restorative dental materials. Mosby-year book. *Inc., Missouri*, 486. https://doi.org/10.1016/C2010-0-65754-3

Çildir, Ş. Z. (2006). Fluorid içeren rezin esaslı olan ve olmayan dört farklı fissür örtücünün önceki ve yeniden yükleme yapıldıktan sonraki fluorid salınım değerleri ve salınım öncesi ve sonrası fiziksel özellikleri bakımından karşılaştırması.

De Paula, A., De Fúcio, S., Alonso, R., Ambrosano, G., & Puppin-Rontani, R. (2014). Influence of chemical degradation on the surface properties of nano restorative materials. *Operative Dentistry*, *39*(3), E109-E117. https://doi.org/ 10.2341/12-340.

Dikmen, B. (2015). Icdas II criteria (international caries detection and assessment system). *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, *49*(3), 63-72. https://doi.org/ 10.17096/jiufd.38691.

Downes, J., Mantzourani, M., Beighton, D., Hooper, S., Wilson, M. J., Nicholson, A., & Wade, W. G. (2011). Scardovia wiggsiae sp. nov., isolated from the human oral cavity and clinical material, and emended descriptions of the genus Scardovia and Scardovia inopinata. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *61*(1), 25-29. https://doi.org/ 10.1099/ijs.0.019752-0.

Du, X., Huang, X., Huang, C., Frencken, J., & Yang, T. (2012). Inhibition of early biofilm formation by glass-ionomer incorporated with chlorhexidine in vivo: a pilot study. *Australian Dental Journal*, *57*(1), 58-64. https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2011.01642.x.

Eick, S., Glockmann, E., Brandl, B., & Pfister, W. (2004). Adherence of Streptococcus mutans to various restorative materials in a continuous flow system. *Journal of Oral Rehabilitation*, *31*(3), 278-285. https://doi.org/ 10.1046/j.0305-182X.2003.01233.x.

Foschi, F., Nucci, C., Montebugnoli, L., Marchionni, S., Breschi, L., Malagnino, V., & Prati, C. (2004). SEM evaluation of canal wall dentine following use of Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. *International Endodontic Journal*, *37*(12), 832-839. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2591.2004.00887.x.

Frostell, G. (1980). A colourimetric screening test for evaluation of the buffer capacity of saliva. *Swedish Dental Journal*, *4*(3), 81-86.

Gao, X., Fan, Y., Kent Jr, R., Van Houte, J., & Margolis, H. (2001). Association of caries activity with the composition of dental plaque fluid. *Journal of Dental Research*, *80*(9), 1834-1839. https://doi.org/ 10.1177/00220345010800091201.

Ghezelbash, G. R., Nahvi, I., & Rabbani, M. (2012). Comparative inhibitory effect of xylitol and erythritol on the growth and biofilm formation of oral Streptococci. *Afr J Microbiol Res*, *6*(20), 4404-4408.

Giertsen, E., Arthur, R., & Guggenheim, B. (2011). Effects of xylitol on survival of mutans streptococci in mixed-six-species in vitro biofilms modelling supragingival plaque. *Caries Research*, *45*(1), 31-39. https://doi.org/10.1159/000322646.

Gonçalves, N., Cury, A. D. B., Simoes, G., Hara, A., Rosalen, P., & Cury, J. (2006). Effect of xylitol: sorbitol on fluoride enamel demineralization reduction in situ. *Journal of Dentistry*, *34*(9), 662-667. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2005.12.008.

Goossens, J., & Gonze, M. (1996). Nutritional properties and applications of erythritol: a unique combination? In *Advances in Sweeteners* (pp. 150-186). Springer.

Goossens, J., & Röper, H. (1994). Erythritol: A new bulk sweetener. *International Food Ingredients*, *1*(2), 27-33.

Groeneveld, A., Van Eck, A., & Dirks, O. B. (1990). Fluoride in caries prevention: is the effect pre-or post-eruptive? *Journal of Dental Research*, *69*(2_suppl), 751-755. https://doi.org/10.1177/00220345900690S145.

GÜRGAN, S., BAŞEREN, N., ÖZGÜN ALTAY, H., & ALAÇAM, R. Florürlü jellerin antibakteriyal etkileri.

Hahnel, S., Ionescu, A. C., Cazzaniga, G., Ottobelli, M., & Brambilla, E. (2017). Biofilm formation and release of fluoride from dental restorative materials in relation to their surface properties. *Journal of Dentistry*, *60*, 14-24. https://doi.org/10.1016/j.jdent.2017.02.005.

Hargreaves, J. (1992). The level and timing of systemic exposure to fluoride with respect to caries resistance. *Journal of Dental Research*, *71*(5), 1244-1248. https://doi.org/10.1177/00220345920710051801.

Hashino, E., Kuboniwa, M., Alghamdi, S. A., Yamaguchi, M., Yamamoto, R., Cho, H., & Amano, A. (2013). Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis. Molecular Oral Microbiology*, *28*(6), 435-451. https://doi.org/10.1111/omi.12037.

HC, M. (1990). Physicochemical perspectives on the cariostatic mechanisms of systemic and topical fluorides. *J Dent Res*, *69*, 606-613. https://doi.org/10.1177/00220345900690S119.

Heifetz, S. B., Yaari, A., & Proskin, H. M. (2004). Retention of a fluoride-releasing sealant compared with its non-fluoride analogue: interim results of a clinical study after an average of eight months. *The Journal of Clinical Dentistry*, *15*(1), 1-5.

Honkala, S., Runnel, R., Saag, M., Olak, J., Nõmmela, R., Russak, S., Mäkinen, P.-L., Vahlberg, T., Falony, G., & Mäkinen, K. (2014). Effect of erythritol and xylitol on dental caries prevention in children. *Caries Research*, *48*(5), 482-490. https://doi.org/10.1159/000358399.

Isotupa, K., Gunn, S., Chen, C.-Y., Lopatin, D., & Mäkinen, K. (1995). Effect of polyol gums on dental plaque in orthodontic patients. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, *107*(5), 497-504. https://doi.org/10.1016/s0889-5406(95)70117-6.

Jacqz-Aigrain, E., Kassai, B., Cornu, C., Cazaubiel, J., Housez, B., Cazaubiel, M., Prével, J., Bell, M., Boileau, A., & De Cock, P. (2015). Gastrointestinal tolerance of erythritol-containing beverage in young children: a double-blind, randomised controlled trial. *European Journal of Clinical Nutrition*, *69*(6), 746-751. https://doi.org/10.1038/ejcn.2015.4.

Jenkinson, H. F. (2011). Beyond the oral microbiome. *Environmental Microbiology*, *13*(12), 3077-3087. https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02573.x.

Jyoti, S., Shashikiran, N., & Subba Reddy, V. (2009). Effect of lactoperoxidase system containing toothpaste on cariogenic bacteria in children with early childhood caries. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *33*(4), 299-304. https://doi.org/10.17796/jcpd.33.4.83331867x68w120n.

Kanasi, E., Dewhirst, F., Chalmers, N., Kent, J., R, Moore, A., Hughes, C., Pradhan, N., Loo, C., & Tanner, A. (2010). Clonal analysis of the microbiota of severe early childhood caries. *Caries Research*, *44*(5), 485-497. https://doi.org/10.1159/000320158.

Kaur, R., Gilbert, S. C., Sheehy, E. C., & Beighton, D. (2013). Salivary levels of Bifidobacteria in caries-free and caries-active children. *International Journal of Paediatric Dentistry*, *23*(1), 32-38. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-263X.2011.01220.x.

Kawanabe, J. (1990). Non-cariogenicity of erythritol as a substrate. *Nichidai Koku Kagaku= Nihon University Journal of Oral Science*, *16*(1), 27-36. https://doi.org/10.1159/000261468.

Kiinzel, W. (1993). Systemic Use of Fluoride-Other Methods: Salt, Sugar, Milk, etc. *Caries Research*, *27*(1), 16-22. https://doi.org/10.1159/000261597.

Kinane, D. F. (2001). Causation and pathogenesis of periodontal disease. *Periodontology 2000*, *25*(1), 8-20. https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250102.x.

Kishen, A., & Haapasalo, M. (2010). Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics*, *22*(1), 58-78. https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00282.x

Kishen, A., & Haapasalo, M. (2012). Endodontic biofilm: Where are we now and where are we going? *Endodontic Topics*, *1*(22), 1-1.

Knuuttila, M. L., & Mäkinen, K. K. (1975). Effect of xylitol on the growth and metabolism of Streptococcus mutans. *Caries Research*, *9*(3), 177-189. https://doi.org/10.1159/000260156.

Koh, E.-S., Lee, T.-H., Lee, D.-Y., Kim, H.-J., Ryu, Y.-W., & Seo, J.-H. (2003). Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of Candida magnoliae. *Biotechnology Letters*, *25*, 2103-2105. https://doi.org/10.1023/b:bile.0000007076.64338.ce.

Kõljalg, S., Smidt, I., Chakrabarti, A., Bosscher, D., & Mändar, R. (2020). Exploration of singular and synergistic effect of xylitol and erythritol on causative agents of dental caries. *Scientific Reports*, *10*(1), 6297. https://doi.org/10.1038/s41598-020-63153-x.

Kontiokari, T., Uhari, M., & Koskela, M. (1995). Effect of xylitol on growth of nasopharyngeal bacteria in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *39*(8), 1820-1823. https://doi.org/10.1128/aac.39.8.1820

Krämer, N., Schmidt, M., Lücker, S., Domann, E., & Frankenberger, R. (2018). Glass ionomer cement inhibits secondary caries in an in vitro biofilm model. *Clinical Oral Investigations*, *22*, 1019-1031. https://doi.org/10.1007/s00784-017-2184-1.

Krzyściak, W., Papież, M., Jurczak, A., Kościelniak, D., Vyhouskaya, P., Zagórska-Świeży, K., & Skalniak, A. (2017). Relationship between pyruvate kinase activity and cariogenic biofilm formation in streptococcus mutans biotypes in caries patients. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 856. https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00856

Kuboniwa, M., & Lamont, R. J. (2010). Subgingival biofilm formation. *Periodontology 2000*, *52*(1), 38. https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00311.x.

Leach, S., Lee, G., & Edgar, W. (1989). Remineralization of artificial caries-like lesions in human enamel in situ by chewing sorbitol gum. *Journal of Dental Research*, *68*(6), 1064-1068. https://doi.org/10.1177/00220345890680060201.

Ledezma-Rasillo, G., Flores-Reyes, H., Gonzalez-Amaro, A. M., Garrocho-Rangel, A., Ruiz-Rodriguez, M. d. S., & Pozos-Guillen, A. (2010). Identification of cultivable microorganisms from primary teeth with necrotic pulps. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, *34*(4), 329-333.

Lee, H., Ocumpaugh, D. E., & Swartz, M. L. (1972). Sealing of developmental pits and fissures: II. Fluoride release from flexible fissure sealers. *Journal of Dental Research*, *51*(1), 183-190. https://doi.org/10.1177/00220345720510011401.

Ly, K. A., Milgrom, P., & Rothen, M. (2006). Xylitol, sweeteners, and dental caries. *Pediatric Dentistry*, *28*(2), 154-163.

Mäkinen, K., Isotupa, K., Kivilompolo, T., Mäkinen, P., Toivanen, J., & Söderling, E. (2001). Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutans streptococci. *Caries Research*, *35*(2), 129-135. https://doi.org/10.1159/000047444.

Mäkinen, K., Saag, M., Isotupa, K., Olak, J., Nõmmela, R., Söderling, E., & Mäkinen, P.-L. (2005). Similarity of the effects of erythritol and xylitol on some risk factors of dental caries. *Caries Research*, *39*(3), 207-215. https://doi.org/10.1159/000084800.

Mäkinen, K. K., Isotupa, K. P., Kivilompolo, T., Mäkinen, P. L., Murtomaa, S., Petäjä, J., Toivanen, J., & Söderling, E. (2002). The effect of polyol-combinant saliva stimulants on S. mutans levels in plaque and saliva of patients with mental retardation. *Special Care in Dentistry*, *22*(5), 187-193. https://doi.org/10.1111/j.1754-4505.2002.tb00269.x.

Makvandi, P., Gu, J. T., Zare, E. N., Ashtari, B., Moeini, A., Tay, F. R., & Niu, L.-n. (2020). Polymeric and inorganic nanoscopical antimicrobial fillers in dentistry. *Acta Biomaterialia*, *101*, 69-101. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.09.025.

Mantzourani, M., Gilbert, S., Sulong, H., Sheehy, E., Tank, S., Fenlon, M., & Beighton, D. (2009). The isolation of bifidobacteria from occlusal carious lesions in children and adults. *Caries Research*, *43*(4), 308-313. https://doi.org/10.1159/000222659.

Marimuthu Jeya, M. J., Lee KyoungMi, L. K., Tiwari, M., Kim JungSoo, K. J., Paramasamy Gunasekaran, P. G., Kim SangYong, K. S., Kim InWon, K. I., & Lee JungKul, L. J. (2009). Isolation of a novel high erythritol-producing Pseudozyma tsukubaensis and scale-up of erythritol fermentation to industrial level. https://doi.org/10.1007/s00253-009-1871-5.

Marttinen, A. M., Ruas-Madiedo, P., Hidalgo-Cantabrana, C., Saari, M. A., Ihalin, R. A., & Söderling, E. M. (2012). Effects of xylitol on xylitol-sensitive versus xylitol-resistant Streptococcus mutans strains in a three-species in vitro biofilm. *Current Microbiology*, *65*, 237-243. https://doi.org/10.1007/s00284-012-0151-2.

Mclean, J. W. (1994). Proposed nomenclature for glass-ionomer dental cements and related materials. *Quint. Int.*, *25*, 587-589.

Mohammadi, Z., Palazzi, F., Giardino, L., & Shalavi, S. (2013). Microbial biofilms in endodontic infections: an update review. *Biomedical Journal*, *36*(2). https://doi.org/10.1093/sumbio/qvae001

Mount, G. J. (2001). *An atlas of glass-ionomer cements: a clinician's guide*. CRC Press. https://doi.org/10.3109/9780203215456

Munro, I., Bernt, W., Borzelleca, J., Flamm, G., Lynch, B., Kennepohl, E., Bär, E., & Modderman, J. (1998). Erythritol: an interpretive summary of biochemical, metabolic, toxicological and clinical data. *Food and Chemical Toxicology*, *36*(12), 1139-1174. https://doi.org/10.1016/s0278-6915(98)00091-x.

Nicholson, J. W. (2007). Polyacid-modified composite resins ("compomers") and their use in clinical dentistry. *Dental Materials*, *23*(5), 615-622. https://doi.org/10.1016/j.dental.2006.05.002.

O'Donnell, K., & Kearsley, M. (2012). *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. John Wiley & Sons. https://doi.org/10.1002/9781118373941

Øgaard, B. (1990). Effects of fluoride on caries development and progression in vivo. *Journal of Dental Research*, *69*(2_suppl), 813-819. https://doi.org/ 10.1177/00220345900690S155.

Pepper, T. (2001). Philip M. Olinger Polyol Innovations, Inc., Reno, Nevada Tammy Pepper Danisco Sweeteners, Redhill, Surrey, United Kingdom. *Alternative Sweeteners, Revised and Expanded*, *112*, 335. https://doi.org/10.1201/b11242

Perry, D. A. (2006). Plaque control for the periodontal patient. *Carranza's Clinical Periodontology*, *10*, 728. https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-0416-7.00044-5

Pfeifer, V., Sohns, V., Conway, H., Lancaster, E., Dabic, S., & Griffin, E. (1960). Two stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid. *Industrial & Engineering Chemistry*, *52*(3), 201-206.

Pinkham, J., Casamassimo, P., Fields, H., Nowak, A., & McTigue, D. (1994). Pediatric dentistry: infancy through adolescence WB Saunders Company. In: USA.

Pratten, J., Smith, A., & Wilson, M. (1998). Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *42*(4), 453-459. https://doi.org/ 10.1093/jac/42.4.453.

Quirynen, M., Teughels, W., Kinder Haake, S., & Newman, M. (2006). Microbiology of Periodontal Diseases.

Runnel, R., Mäkinen, K. K., Honkala, S., Olak, J., Mäkinen, P.-L., Nõmmela, R., Vahlberg, T., Honkala, E., & Saag, M. (2013). Effect of three-year consumption of erythritol, xylitol and sorbitol candies on various plaque and salivary caries-related variables. *Journal of Dentistry*, *41*(12), 1236-1244. https://doi.org/ 10.1016/j.jdent.2013.09.007.

Salli, K., Forssten, S., Lahtinen, S., & Ouwehand, A. (2016). Influence of sucrose and xylitol on an early Streptococcus mutans biofilm in a dental simulator. *Archives of Oral Biology*, *70*, 39-46. https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.05.020.

Samaranayake, L. (2002). Microbiology of dental caries. *Essential Microbiology for Dentistry*, *2*, 217-223.

Saran, S., Mukherjee, S., Dalal, J., & Saxena, R. K. (2015). High production of erythritol from Candida sorbosivorans SSE-24 and its inhibitory effect on biofilm formation of Streptococcus mutans. *Bioresource Technology*, *198*, 31-38. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.08.146.

Savergave, L. S., Gadre, R. V., Vaidya, B. K., & Narayanan, K. (2011). Strain improvement and statistical media optimization for enhanced erythritol production with minimal by-products from Candida magnoliae mutant R23. *Biochemical Engineering Journal*, *55*(2), 92-100. https://doi.org/10.1016/j.bej.2011.03.009

Scheinin, A. (1976). Caries control through the use of sugar substitutes. *International Dental Journal*, *26*(1), 4-13.

Seneviratne, C. J., Zhang, C. F., & Samaranayake, L. P. (2011). Dental plaque biofilm in oral health and disease. *Chinese Journal of Dental Research*, *14*(2), 87.

Söderling, E. (2009). Xylitol, mutans streptococci, and dental plaque. *Advances in Dental Research*, *21*(1), 74-78. https://doi.org/10.1177/0895937409335642.

SÖDERLING, E., & PIHLANTO-LEPPÄLÄ, A. (1989). Uptake and expulsion of 14C-xylitol by xylitol-cultured Streptococcus mutans ATCC 25175 in vitro. *European Journal of Oral Sciences*, *97*(6), 511-519. https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1989.tb00925.x.

Söderling, E. M., & Hietala-Lenkkeri, A.-M. (2010). Xylitol and erythritol decrease adherence of polysaccharide-producing oral streptococci. *Current Microbiology*, *60*, 25-29. https://doi.org/10.1007/s00284-009-9496-6.

Staszczyk, M., Jurczak, A., Magacz, M., Kościelniak, D., Gregorczyk-Maga, I., Jamka-Kasprzyk, M., Kępisty, M., Kołodziej, I., Kukurba-Setkowicz, M., & Krzyściak, W. (2020). Effect of polyols and selected dental materials on the ability to create a cariogenic biofilm–on children caries-associated Streptococcus mutans isolates. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *17*(10), 3720. https://doi.org/10.3390/ijerph17103720.

Stephan, R. M. (1940). Two factors of possible importance in relation to the etiology and treatment of dental caries and other dental diseases. *Science*, *92*(2399), 578-579. https://doi.org/10.1126/science.92.2399.578.

Storey, D., Lee, A., Bornet, F., & Brouns, F. (2007). Gastrointestinal tolerance of erythritol and xylitol ingested in a liquid. *European Journal of Clinical Nutrition*, *61*(3), 349-354. https://doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602532.

Strużycka, I. (2014). The oral microbiome in dental caries. *Polish Journal of Microbiology*, *63*(2), 127.

Takahashi, N., & Nyvad, B. (2008). Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. *Caries Research*, *42*(6), 409-418. https://doi.org/10.1159/000159604.

Tanner, A., Kent Jr, R., Holgerson, P. L., Hughes, C., Loo, C., Kanasi, E., Chalmers, N., & Johansson, I. (2011). Microbiota of severe early childhood caries before and after therapy. *Journal of Dental Research*, *90*(11), 1298-1305. https://doi.org/10.1177/0022034511421201

Tanner, A., Sonis, A., Lif Holgerson, P., Starr, J., Nunez, Y., Kressirer, C., Paster, B., & Johansson, I. (2012). White-spot lesions and gingivitis microbiotas in orthodontic patients. *Journal of Dental Research*, *91*(9), 853-858. https://doi.org/10.1177/0022034512455031.

Tanner, A. C. (2015). Anaerobic culture to detect periodontal and caries pathogens. *Journal of Oral Biosciences*, *57*(1), 18-26. https://doi.org/ 10.1016/j.job.2014.08.001.

Tanzer, J. M., Livingston, J., & Thompson, A. M. (2001). The microbiology of primary dental caries in humans. *Journal of Dental Education*, *65*(10), 1028-1037.

Tetzloff, W., Dauchy, F., Medimagh, S., Carr, D., & Bär, A. (1996). Tolerance to subchronic, high-dose ingestion of erythritol in human volunteers. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, *24*(2), S286-S295. https://doi.org/10.1006/rtph.1996.0110.

Toors, F. (1992). Chewing gum and dental health. Literature review. *Revue Belge de Medecine Dentaire*, *47*(3), 67-92.

Torlakovic, L., Klepac-Ceraj, V., Øgaard, B., Cotton, S. L., Paster, B. J., & Olsen, I. (2012). Microbial community succession on developing lesions on human enamel. *Journal of Oral Microbiology*, *4*(1), 16125.

Touger-Decker, R., & Van Loveren, C. (2003). Sugars and dental caries. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *78*(4), 881S-892S. https://doi.org/ 10.1093/ajcn/78.4.881S.

Trahan, L. (1995). Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque--its clinical significance. *International Dental Journal*, *45*(1 Suppl 1), 77-92.

Van Loveren, C. (2004). Sugar alcohols: what is the evidence for caries-preventive and caries-therapeutic effects? *Caries Research*, *38*(3), 286-293. https://doi.org/ 10.1159/000077768.

Wang, S.-P., Ge, Y., Zhou, X.-D., Xu, H. H., Weir, M. D., Zhang, K.-K., Wang, H.-H., Hannig, M., Rupf, S., & Li, Q. (2016). Effect of anti-biofilm glass–ionomer cement on Streptococcus mutans biofilms. *International Journal of Oral Science*, *8*(2), 76-83. https://doi.org/10.1038/ijos.2015.55

Welbury, R., Raadal, M., & Lygidakis, N. (2004). EAPD guidelines for the use of pit and fissure sealants. *European Journal of Paediatric Dentistry*, *5*, 179-184.

Whiley, R., & Beighton, D. (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiology and Immunology*, *13*(4), 195-216. https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1998.tb00698.x.

Whitmore, S. E., & Lamont, R. J. (2011). The pathogenic persona of community-associated oral streptococci. *Molecular Microbiology*, *81*(2), 305-314. https://doi.org/ 10.1111/j.1365-2958.2011.07707.x

Wood, S., Kirkham, J., Marsh, P., Shore, R., Nattress, B., & Robinson, C. (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *Journal of Dental Research*, *79*(1), 21-27. https://doi.org/10.1177/00220345000790010201.

Yang, L.-B., Zhan, X.-B., Zheng, Z.-Y., Wu, J.-R., Gao, M.-J., & Lin, C.-C. (2014). A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by Yarrowia lipolytica from glycerol. *Bioresource Technology*, *151*, 120-127. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.10.031.

Zaura, E., & Ten Cate, J. (2004). Dental plaque as a biofilm: a pilot study of the effects of nutrients on plaque pH and dentin demineralization. *Caries Research*, *38*(Suppl. 1), 9-15. https://doi.org/ 10.1159/000074357.

Zhou, X., Wang, S., Peng, X., Hu, Y., Ren, B., Li, M., Hao, L., Feng, M., Cheng, L., & Zhou, X. (2018). Effects of water and microbial-based aging on the performance of three dental restorative materials. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, *80*, 42-50. https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.01.023.

Zimmer, S., Robke, F. J., & Roulet, J. F. (1999). Caries prevention with fluoride varnish in a socially deprived community. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, *27*(2), 103-108. https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1999.tb01998.x.

Zumbe, A., Lee, A., & Storey, D. (2001). Polyols in confectionery: the route to sugar-free, reduced sugar and reduced calorie confectionery. *British Journal of Nutrition*, *85*(S1), S31-S45. https://doi.org/10.1079/bjn2000260.

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

Makale

Sarihan S., Topcuoglu N., & Eren F. (2024). Comparison of the Effects of Sugar Alcohols at Different Concentrations on the Growth of Cariogenic Bacteria. *International Journal of Medical Science and Dental Health*, *10*(08), 89-103.
https://doi.org/10.55640/ijmsdh-10-08-09

Bildiri (Poster veya Sözel)

Sarihan S., Çağırıcı B., Eren F. Diş Hekimlerinin Hasta Tercihlerinin Belirlenmesi (Sözlü Sunum) 27. International Congress of Turkish Society Pediatric Dentistry (7-10 November 2021) Cyprus, Turkiye.

Sarihan S., Menteş A., Eren F. (8-11 Eylül 2022) Ektodermal Displazili 2 Çocuk Hastada Uygulanan Protetik Rehabilitasyon (Poster Sunumu) TDB 26. Uluslararasi Dişhekimliği Kongresi, Istanbul, Turkiye.

Sarihan S., Topçuoğlu N., Eren F. (5-7 May 2024) Farklı Konsantrasyonlardaki Şeker Alkollerinin Karyojenik Bakterilerin Üremesi Üzerine Etkilerinin Değerlendirilmesi (Sözlü Sunum) 5th Prevent From Caries Symposium International, Istanbul, Turkiye.

Proje

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri Koordinasyon Birimi (BAPKO), Proje no: TDK-2023-11029

Üyesi Olduğu Ulusal ve Uluslararası Kuruluşlar

Türk Pedodonti Derneği

İstanbul Diş Hekimleri Odası (İDO)

Katıldığı Kongre ve Kurslar

1.International MI Congress (GC) - 2020

Oscar Special Care Academic Resources (OSCAR) Project Yaygınlaştırma Etkinliği (İstanbul)- 2020

Learning Teaching Training Event of Oscar Special Care Academic Resources (OSCAR) Project (Bükreş, Romanya) - 2021

Pediatrik Kron ve MTA Kursu Teorik & Uygulama NuSmile Zirkonia, Konuşmacı: Prof. Dr. Zafer Çehreli (İstanbul)- 2021

27. Uluslararası Türk Pedodonti Derneği Kongresi (Kıbrıs) - 2021

TDB 26. Uluslararası Diş Hekimliği Kongresi (İstanbul) - 2022

5. Uluslararası Çürümeden Koru Sempozyumu (İstanbul) - 2024