



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KARADUT EKSTRESİ, METİLEN MAVİSİ
VE KLOORHEKSİDİNİN, *STREPTOCOCCUS*
MUTANS VE *LACTOBACILLUS CASEI* İLE
KONTAMİNE EDİLMİŞ DENTİN
DİSKLERİ ÜZERİNDEKİ
ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI**

NAİME SELEN ÖZDEMİR

**TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. BAHAR BAŞAK KIZILTAN ELİAÇIK**

**ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ ANA BİLİM DALI
ÇOCUK DİŞ HEKİMLİĞİ DOKTORA PROGRAMI**

**DOKTORA TEZİ
OCAK/2025**

İTHAF

“Sevgileri ve emekleriyle hayatımı şekillendiren canım aileme ithaf ediyorum.”

TEŞEKKÜR

Doktora eğitim sürecimde hekimlik mesleğine ve hayata dair duruşuyla ilham kaynağım olan, bilgi ve deneyimleriyle akademik yolculuğuma yön veren, sabrı, anlayışı ve samimi desteğiyle her zaman yanımda hissettiğim, öğrencisi olmanın gururunu taşıdığım kıymetli danışman hocam Sayın Doç. Dr. Bahar Başak KIZILTAN ELİAÇIK’a,

Her zaman samimiyetiyle destek olan, tecrübelerini esirgemeyen ve bizlere örnek olan ana bilim dalı başkanımız Sayın Prof. Dr. Günseli GÜVEN POLAT’a,

Tezimin planlanması ve laboratuvar çalışmalarının gerçekleştirilmesinde desteklerini sunan, bu süreçte imkân sağlayan İstanbul Üniversitesi Temel Bilimler Bölümü Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Nursen TOPÇUOĞLU ve Arş. Gör. Merve YILDIRIM’a; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Analitik Kimya Bölümü Ana Bilim Dalı Başkanı Doç. Dr. Ömer Zafer ÖZDEMİR ve Dr. Arş. Gör. Duygu MISIRLI’ya,

Tüm zorlukları ve mutlulukları birlikte paylaştığım, her zaman yanımda olduklarını hissettiğim dostlarım Dt. Gizem Er, Dt. Feyza Şaş, Dt. Ece Karakaş Oğrak, Dt. Ceren Beker, Dt. Esin Gökçek, Segah Koçak, Dilara Çiviler ve adını buraya sığdıramadığım diğer tüm arkadaşlarıma; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği bölümü ailesine,

Hayatım boyunca sevgileriyle beni saran, inançlarıyla güçlendiren ve her adımda yanımda olduklarını hissettiren kıymetli aileme; varlığıyla yaşamıma anlam katan sevgili eşim Halim ÖZDEMİR’e, bana her daim destek olan canım babam Ahmet ERSOY’a, sınırsız sevgisiyle yolumu aydınlatan canım annem Hülya ERSOY’a, çocukluğumdan itibaren Atatürk ilke ve inkılaplarını bana özümseterek hayatıma ışık tutan sevgili dedem Alaadin KAYA’ya ve biricik anneannem Naime KAYA’ya, koşulsuz sevgisiyle ve neşesiyle hep yanımda olan canım kızım EOS’a,

Sonsuz teşekkürlerimi ve derin saygılarımı sunarım.

İÇİNDEKİLER

İTHAF.....	iv
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiv
ÖZET	xvi
ABSTRACT	xviii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. DİŞ ÇÜRÜĞÜ VE ETİYOLOJİSİ	5
2.1.1. DİŞ ÇÜRÜĞÜNÜN Yapısı	7
2.1.1.1. Mine çürüğü.....	7
2.1.1.2. Dentin çürüğü	7
2.2. DİŞ ÇÜRÜĞÜ ÇEŞİTLERİ	7
2.2.1. Anatomik Bölgeye Göre Sınıflama.....	8
2.2.1.1. Pit ve fissür çürükleri.....	8
2.2.1.2. Düz yüzey çürükleri.....	8
2.2.1.3. Kök çürükleri	8
2.2.2. Yeni Lezyon veya Rekurent Varlığına Göre Sınıflama.....	8
2.2.2.1. Primer çürük	8
2.2.2.2. Sekonder (rekurent) çürük	8
2.2.2.3. Rezidüel çürük	9
2.2.3. Çürük Lezyonun Aktivitesine Göre Sınıflama	9
2.2.4. Çürük İlerleme Hızına Göre Sınıflama	9
2.2.4.1. Akut çürük	9
2.2.4.2. Rampant çürük.....	9
2.2.4.3. Erken Çocukluk Çağı Çürüğü.....	10
2.2.4.4. Ksrestomia ile ilişkili çürük.....	12
2.2.4.5. Kronik çürük.....	13
2.2.5. Görsel Sınıflama	13
2.2.6. İçerdiği Yüzey Sayısına Göre Sınıflandırma	14
2.2.6.1. Basit çürük	14

2.2.6.2. Kompound (ikili, karışık) çürük	14
2.2.6.3. Kompleks (komplike) çürük	14
2.2.7. Çürüğün Şiddetine Göre Sınıflandırma	14
2.2.8. Çürüğün Radyografik Sınıflandırması.....	15
2.3. DIŞ ÇÜRÜĞÜ DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN İNDEKSLER	15
2.3.1. Çürük, Kayıp, Dolgulu Diş/ Çürük, Kayıp, Dolgulu Yüzey	15
2.3.2. Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi	15
2.3.3. Uluslararası Çürük Sınıflandırma ve Yönetim Sistemi	16
2.3.4. Evrensel Görsel Sınıflama Sistemi	17
2.4. ÇÜRÜK TEMİZLEME YÖNTEMLERİ	17
2.4.1 Dental El Aletleri	18
2.4.2. Dental Mekanik Döner Aletler ve Frezler	19
2.4.3. Dental Mekanik Döner Olmayan Aletler ve Teknikler	19
2.4.3.1. Air-abrasive teknik	19
2.4.3.2. Air-polishing tekniği.....	19
2.4.3.3. Ultrasonik teknik	20
2.4.3.4. Lazer tekniği	20
2.4.3.5. Enzim tekniği	20
2.4.3.6. Kemomekanik teknikler.....	21
2.4.3.7. Atravmatik Restoratif Tedavi	22
2.5. BAKTERİLER VE DIŞ ÇÜRÜĞÜ	22
2.6. KAVİTE DEZENFEKSİYON MATERYALLERİ.....	24
2.6.1. Klorheksidin Diglukonat	25
2.6.2. Sodyum Hipoklorit	26
2.6.3. Hidrojen Peroksit	26
2.6.4. Benzalkolyum Klorür	27
2.6.5. İyodin Solüsyonları.....	27
2.6.6. Fosforik Asit	27
2.6.7. Florür	27
2.6.8. Ozon.....	28
2.6.9. 12-Methacryloyloxy-Dodecylpyridinium Bromid İçerikli Adeziv Sistemler	28
2.6.10. Kuarterner Amonyum Silan.....	28
2.6.11. Lazerler	28
2.6.12. Antimikrobiyal Fotodinamik Terapi.....	29
2.6.13. Zerdeçal	29
2.6.14. Propolis	30

2.6.15. <i>Aleo vera</i>	30
2.6.16. <i>Morinda citrifolia</i>	30
2.6.17. Misvak Ağacı (<i>Salvadora persica</i>)	30
2.6.18. Karadut (<i>Morus nigra</i>)	31
2.7. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ	31
2.7.1. Difüzyon Yöntemi	31
2.7.1.1. Agar-Disk difüzyon yöntemi	32
2.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi - Biyootografi.....	32
2.7.3. Dilüsyon Yöntemi.....	32
2.7.4. Zamana Bağlı Öldürme (Time- Kill) Testi	32
2.7.5. Adenozin Trifosfat Biyoluminesans Yöntemi	32
2.7.6. Akış Sitometrisi Yöntemi	32
2.8. BİYOFİLM İNCELEME YÖNTEMLERİ.....	33
2.8.1. Mikrobiyal Kültür Yöntemi	33
2.8.2. Kolorimetrik Yöntem.....	33
2.8.3. Mikroskopik Yöntem.....	33
2.8.4. Taramalı Elektron Mikroskopu.....	33
2.8.5. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop	34
2.8.6. Fiziksel Yöntem.....	35
2.8.7. Biyokimyasal Yöntem	35
2.8.8. Moleküler Biyolojik Metot	35
2.8.9. Güncel Biyofilm Değerlendirme Yöntemleri	35
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	36
3.1. ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN ELDESİ	36
3.1.1. Klorheksidin Diglukonat	36
3.1.2. Metilen Mavisi.....	37
3.1.3. Karadut (<i>Morus nigra</i>) Ekstresi.....	38
3.1.3.1. Karadut ekstresinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizi. 51	
3.2. KAVİTE DEZENFEKSİYON MATERYALLERİNİN <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> ATCC 4646 VE <i>STREPTOCOCCUS MUTANS</i> ATCC 25175 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ.....	53
3.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması	53
3.2.2. Materyallerin Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi.....	55
3.2.3. Materyallerin Biyofilm Üzerine Etkilerinin İncelenmesi	57
3.2.3.1. Diş örneklerinin seçilmesi ve dentin disklerinin hazırlanması	57
3.2.3.2. Tükürüğün hazırlanması	60
3.2.3.3. Biyofilmlerin oluşturulması	60

3.2.3.4. Kavite dezenfeksiyon materyallerinin biyofilm üzerine uygulanması ..	67
3.2.3.5. Biyofilmlerin incelenmesi.....	71
3.3. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRMELER	75
4. BULGULAR.....	76
4.1. KARADUT EKSTRESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOĞRAFİSİ ANALİZİNE AİT BULGULAR.....	76
4.2. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU TESTİNE AİT BULGULAR	78
4.3. KONFOKAL LAZER TARAMALI MİKROSKOP İNCELEMESİNE AİT BULGULAR.....	78
4.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP İNCELEMESİNE AİT BULGULAR	86
5. TARTIŞMA	90
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	108
KAYNAKLAR	112
EKLER	131

TABLÖLER LİSTESİ

Tablo 2.1: Ekstrand ve arkadaşları tarafından geliştirilen sınıflandırma sistemi.....	13
Tablo 2.2: Kemomekanik çürük temizleme yönteminde kullanılan ajanlar	21
Tablo 2.3: Kavite dezenfeksiyon materyalleri	25
Tablo 3.1: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi pompa program.....	51
Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizi bilgileri	52
Tablo 4.1: Karadut ekstresinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi analizi sonuçları.....	77
Tablo 4.2: Cansız ve canlı bakteri hücre sayısı toplamının gruplar arası karşılaştırılması	81
Tablo 4.3: Canlı bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması.....	82
Tablo 4.4: Cansız bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması	83
Tablo 4.5: Canlı/cansız bakteri hücresi oranının gruplar arası karşılaştırılması.....	85
Tablo 4.6: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısının grup içi karşılaştırılması.....	86

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.1: Modifiye Keyes-Jordan Diagram.....	5
Şekil 2.2: Amerikan Diş Hekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemine göre çürük ve mineral kaybı ilişkisi.....	14
Şekil 3.1: Klorheksidin Diglukonat.....	76
Şekil 3.2: %0,02'lik Metilen mavisi.....	37
Şekil 3.3: Woodpecker LED- D	38
Şekil 3.4: Balıkesir Burhaniye mevkiinden toplanan karadut yaprakları.....	39
Şekil 3.5: Yarı gölge ortamda kurutulmuş karadut yaprakları	40
Şekil 3.6: <i>Morus nigra</i> herbaryum kayıt belgesi.....	41
Şekil 3.7: Toz haline getirilmiş karadut	42
Şekil 3.8: Sonikatörde (ISOLAB Laborgetate GmbH, Almanya) %70 oranında hazırlanan etil alkol su karışımının 60 dk bekletilmesi	43
Şekil 3.9: Karışımın orbital çalkalayıcıda (OniLab-Sk-0330-Pro) 8 saat bekletilmesi..	44
Şekil 3.10: İki katlı süzme kağıdında karadut posasının, etil alkol-su karışımından süzülerek ayrıştırılması	45
Şekil 3.11: Karadut - etil alkol karışımı rotavapore (Büchi R-300) ekstre oluşumu için aktarılması.....	46
Şekil 3.12: Karadut ekstresi ve sudan oluşan yeni ürün elde edilmesi.....	47
Şekil 3.13: -80 °C dondurularak saklanan karadut ekstresi	48
Şekil 3.14: %100 karadut ekstresi formunda toz elde etmek amacıyla donmuş ürün liyofilizatörde (Büchi L-200) 2 hafta bekletilmesi	49
Şekil 3.15: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizi cihazı (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus)	50
Şekil 3.16: Stoktan (-80 °C) çıkarılan <i>L. casei</i> ATCC 4646 ve <i>S. mutans</i> ATCC 25175 suşları	53
Şekil 3.17: %5 sakkarozlu Beyin Kalp İnfüzyon buyyon besiyeri.....	54

Şekil 3.18: Bakteri süspansiyonunun hazırlanması.....	55
Şekil 3.19: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu / Minimal Bakterisidal Konsantrasyon mikrodilüsyon testi	56
Şekil 3.20: Akrilik bloklara yerleştirilen dişler	57
Şekil 3.21: Buehler Hassas Kesme Cihazı	58
Şekil 3.22: Metkon bıçağı	59
Şekil 3.23: Dentin disklerinin sterilizasyonu	59
Şekil 3.24: Steril dentin diskleri petri kaplarına yerleştirildikten sonra üzerlerine tükürük eklenmesi	61
Şekil 3.25: Pelikül oluşumu için tükürük eklenmiş petri kapları çalkalayıcıda 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmesi	62
Şekil 3.26: Tükürük içerisinde bulunan dentin diskleri 1 ml tuzlu su ile yıkandıktan sonra 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilmesi.....	63
Şekil 3.27: Her kuyucuğa bakteri süspansiyonu eklenmesi.	64
Şekil 3.28: Plakların %5 Karbondioksitli ortama alınarak 24 saat 37 °C’de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesi	65
Şekil 3.29: Bakteri çoğalması izlenen örnekler.....	66
Şekil 3.30: Dentin disklerinin steril tuzlu suda yıkanma aşaması.....	67
Şekil 3.31: Kontrol grubu.....	68
Şekil 3.32: Biyofilm bulunan dentin diskleri üzerine Klorheksidin Diglukonat (Cavity Cleanser, Bisco USA) eklenmesi.....	69
Şekil 3.33: Metilen mavisi her disk üzerinde 60 sn bekletildikten sonra fotodinamik terapiye başlanarak her diske 60 sn LED (Woodpecker LED- D) uygulanması	69
Şekil 3.34: Dentin diskleri üzerine karadut ekstresi uygulanması	70
Şekil 3.35: Dimetil Sülfoksit ve Live/Dead Bacterial Viability Kitinde (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD) bulunan A ve B bileşenlerinden karışım oluşturulması.....	71

Şekil 3.36: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (TCS SPE, Leica Microsystems, ABD) cihazı.....	72
Şekil 3.37: Fiksasyon işlemi yapılan dentin disklerinin dehidrate edilmesi	73
Şekil 3.38: Örneklerin grup numaralarına göre düz bir plakaya sabitlenmesi	73
Şekil 3.39: Örneklerin Altın – Paladyum Alaşımı ile kaplanmasında kullanılan püskürtme cihazı (Leica EM ACE200, Almanya).....	74
Şekil 3.40: Taramalı Elektron Mikroskopu (Carl Zeiss, EVO 40, Almanya) cihazı	74
Şekil 4.1: Karadut ekstresi fenolik bileşiklerinin kromatogramı.....	76
Şekil 4.2: Klorheksidin Diglukonat grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri	79
Şekil 4.3: Karadut grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri.....	79
Şekil 4.4: Metilen mavisi grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri.....	80
Şekil 4.5: Cansız ve canlı bakteri hücre sayısı toplamının gruplar arası karşılaştırılması	81
Şekil 4.6: Canlı bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması	82
Şekil 4.7: Cansız bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması.....	84
Şekil 4.8: Canlı/cansız bakteri hücresi oranının gruplar arası karşılaştırılması	85
Şekil 4.9: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısının grup içi karşılaştırılması	86
Şekil 4.10: Kontrol grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500).....	87
Şekil 4.11: Klorheksidin Diglukonat grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500).....	88
Şekil 4.12: Metilen mavisi grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)	88
Şekil 4.13: Karadut grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)	89

SİMGELER VE KISALTMALAR

<i>A. naeslundii</i>	: <i>Actinomyces naeslundii</i>
AAPD	: Amerikan Pediatrik Diş Hekimleri Akademisi
ADA	: Amerikan Diş Hekimleri Birliği
ADA CCS	: Amerikan Diş Hekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemi
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
APF	: Asidüle Fosfat Fluorid
ART	: Atravmatik Restoratif Tedavi
ATP	: Adenozin Trifosfat
Au	: Altın
Au/Pd	: Altın - Paladyum Alaşımı
C	: Karbon
Ca	: Kalsiyum
CAMBRA	: Risk Değerlendirmesine Göre Çürük Yönetimi
CFU	: Koloni Oluşturan Birim
CHX	: Klorheksidin Diglukonat
CLSM	: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
CO₂	: Karbondioksit
DMFS	: Çürük, Kayıp, Dolgulu Yüzeyler İndeksi
DMFT	: Çürük, Kayıp, Dolgulu Dişler İndeksi
DMSO	: Dimetil Sülfoksit
EÇÇ	: Erken Çocukluk Çağı Çürüğü
<i>E. faecalis</i>	: <i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi
E TEST	: Antimikrobiyal Gradian Metodu
Er:YAG	: Erbiyum-Doped Yttrium Alüminyum Garnet
Er,Cr:YSGG	: Erbiyum, Krom: Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
RCF	: Göreceli Santrifüj Kuvveti
H₂O₂	: Hidrojen Peroksit
H₃PO₄	: Fosforik Asit
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IgA	: Immunoglobulin A
ICCMS	: Uluslararası Çürük Sınıflandırma ve Yönetim Sistemi
ICDAS	: Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi
ICDAS II	: Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi II
<i>L. casei</i>	: <i>Lactobacillus casei</i>
<i>L. paracasei</i>	: <i>Lactobacillus paracasei</i>
MBK	: Minimal Bakterisidal Konsantrasyon
MDPB	: 12-Metakriloyloxy-Dodecylpyridinium Bromür
MİK	: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu
NaOCl	: Sodyum Hipoklorit
Nd:YAG	: Neodymium: Yttrium-Alüminyum-Garnet
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<i>P. gingivalis</i>	: <i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>P. intermedia</i>	: <i>Porphyromonas intermedia</i>
PO₄	: Fosfat
Pt	: Platin
Q-PCR	: Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Rpm	: Bir Dakikada Gerçekleşen Dönüş Sayısı
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. gordonii</i>	: <i>Streptococcus gordonii</i>
<i>S. mitis</i>	: <i>Streptococcus mitis</i>
<i>S. mutans</i>	: <i>Streptococcus mutans</i>
<i>S. oligofermantas</i>	: <i>Streptococcus oligofermantas</i>
<i>S. oralis</i>	: <i>Streptococcus oralis</i>
<i>S. parasanguinis</i>	: <i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>S. sanguinis</i>	: <i>Streptococcus sanguinis</i>
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskopu
ŞEÇÇ	: Şiddetli Erken Çocukluk Çağı Çürüğü
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UniVISS	: Evrensel Görsel Sınıflama Sistemi
UV	: Mor Ötesi Işımlar

KARADUT EKSTRESİ, METİLEN MAVİSİ VE KLOORHEKSİDİNİN, *STREPTOCOCCUS MUTANS* VE *LACTOBACILLUS CASEİ* İLE KONTAMİNE EDİLMİŞ DENTİN DİSKLERİ ÜZERİNDEKİ ANTİBAKTERİYEL ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

ÖZET

Amaç: Klorheksidin diglukonat, fotodinamik terapi ile aktive edilen metilen mavisi ve karadut ekstresinin; *S. mutans* ve *L. casei* ile kontamine edilmiş dentin diskleri üzerindeki antibakteriyel etkileri ve biyofilm kaldırma güçlerinin *in vitro* olarak karşılaştırması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: *S. mutans* ve *L. casei* ile kontamine edilmiş dentin diskleri üzerine maserasyon yöntemi ile elde edilen karadut ekstresi, %0,02'lik metilen mavisi ve %2'lik CHX uygulanmıştır. Materyallerin *S. mutans* ve *L. casei* üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi için MİK ve CLSM analizleri yapılmıştır. Biyofilmin morfolojik değişimleri SEM ile görüntülenmiştir.

Bulgular: Tez çalışmasında yapılan MİK deneyi sonucunda CHX'in güçlü bir antibakteriyel ajan olduğu ancak karadut ekstresi ve foto-aktive edilen metilen mavisinin antibakteriyel etki göstermediği belirlenmiştir. Yapılan CLSM analizleri sonucunda; canlı/cansız bakteri hücre sayısı oranının CHX uygulanan grupta daha küçük olduğu yani CHX'in en güçlü antibakteriyel etkiyi gösterdiği görülmüştür. Metilen mavisi, karadut ekstresi ve kontrol grubunda ise bu oranlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Yapılan grup içi değerlendirmelerde; CHX ve metilen mavisi gruplarında cansız bakteri hücre sayısının canlı bakteri hücre sayısından fazla olduğu ancak karadut grubunun canlı ve cansız bakteri hücre sayısı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. SEM görüntülemelerinde CHX grubunda biyofilm izlenmezken; karadut ve metilen mavisi gruplarında biyofilm izlenmiştir.

Sonuç: CHX'in kavite dezenfeksiyonunda altın standart olduğunun bir kez daha kanıtlandığı bu tez çalışmasında; metilen mavisi ve karadut ekstresinin CHX kadar güçlü antibakteriyel etki göstermediğı görölmüştür. Metilen mavisi ve karadutun antibakteriyel etkilerinin belirlenebilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu ve araştırmaların sonuçları doğrultusunda bu iki materyalin klinik kullanımının mümkün olabileceğı düşünölmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antibakteriyel Fotodinamik Terapi, Karadut (*Morus nigra*), Kavite Dezenfeksiyonu, Klorheksidin, Metilen Mavisi



COMPARISON OF THE ANTIBACTERIAL EFFECTS OF BLACK MULBERRY EXTRACT, METHYLENE BLUE AND CHLORHEXIDINE ON DENTIN DISCS CONTAMINATED WITH *STREPTOCOCCUS MUTANS* AND *LACTOBACILLUS CASEI*

ABSTRACT

Aim: The comparison, *in vitro*, of the antibacterial effects and biofilm removal capabilities of chlorhexidine digluconate, methylene blue activated by photodynamic therapy, and black mulberry extract on dentin discs contaminated with *S. mutans* and *L. casei*.

Materials and Methods: Dentin discs obtained from caries-free third molars were contaminated with *S. mutans* and *L. casei*. The contaminated discs were subsequently treated with black mulberry extract (prepared via maceration), 0.02% methylene blue, and 2% CHX. Antibacterial effects of the materials on *S. mutans* and *L. casei* were assessed using MIC and CLSM to visualize live and dead bacterial cells. Morphological changes in the biofilm on the dentin discs were analyzed using SEM.

Results: The antibacterial activity of CHX was assessed against *S. mutans* and *L. casei* strains using the MIC test. CHX was identified as a potent antibacterial agent, whereas black mulberry extract and photo-activated methylene blue demonstrated no significant antibacterial effects. CLSM analysis revealed a significantly lower live/dead bacterial cell ratio in the CHX-treated group, indicating its stronger antibacterial effect. No statistically significant differences in the live/dead bacterial cell ratios were observed in the methylene blue, black mulberry extract, and control groups.

Statistical analysis confirmed that in both the CHX and methylene blue groups, the number of dead bacterial cells exceeded that of live cells. SEM imaging showed no biofilm formation in the CHX group, whereas biofilm formation was observed in the black mulberry and methylene blue groups.

Conclusion: CHX remains the gold standard for cavity disinfection, with evidence demonstrating that methylene blue and black mulberry extract do not exhibit antibacterial effects comparable to CHX. Further examination is essential to comprehensively assess the antibacterial properties of these two materials, and based on the outcomes, their potential for clinical application could be validated.

Key Words: Antibacterial, Black Mulberry (*Morus nigra*), Cavity Disinfection, Chlorhexidine, Methylene Blue, Photodynamic Therapy



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Karyojenik bakterilerin ürettiği asidik yan ürünler ağız içinde pH seviyesini düşürür. Ağız ortamının pH seviyesinin uzun süre düşük kalması diş sert dokularında mineral kaybı ile sonuçlanır ve enfeksiyöz bir hastalık olan diş çürüğü oluşur. Diş çürüğü bulunduğu anatomik bölgeye göre, lezyon derinliğine, lezyonun ilerleme hızına göre sınıflandırılır ve çeşitli indeksler ile değerlendirilir (1–3).

Restoratif tedavi öncesinde diş çürüğünü temizlemede klasik yaklaşım; yumuşak dentinin uzaklaştırılması ve restore edilmesidir. Geçmişten günümüze çürük temizleme yaklaşımları değişmektedir (4,5). Black kavitede çürük bırakılmayacak şekilde temizlenmesi gerektiğini savunurken, günümüzde minimal invaziv bakış açısıyla yeni yöntemler uygulanmaktadır (6–9). Atravmatik Restoratif Tedavi (ART), kemomekanik çürük temizleme yöntemleri ve parsiyel çürük temizleme yöntemi güncel yaklaşımlara örnek verilebilir (5,9,10). Minimal invaziv yaklaşımda amaç; yumuşak dentini temizlemek, kavite tabanındaki sert, çürükten etkilenmiş dentine dokunmayarak diştten daha az doku kaybı olmasını sağlamak ve pulpaya zarar vermeden dişin vitalitesini korumaktır (7,8).

Yedi yüzden fazla sayıda bakteriden oluşan ağız mikrobiyotasında ağız sağlığı için yararlı bakteriler olduğu gibi çürük yapıcı karyojenik bakteriler de bulunur (11). Karyojenik bakterilerin aktivitesinin, diş yüzeyindeki biyofilmin pH'ından etkilendiği görülmüştür. pH seviyesinin düşmesiyle aside toleranslı *Streptococcus* ve *Actinomyces* gibi karyojenik bakterileri türlerinin arttığı tespit edilmiştir (12). Çürük oluşumunda etkili bakterilerden biri *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) diş yüzeyine güçlü bir şekilde tutunma yeteneğine sahiptir. Aynı zamanda *S. mutans*'in diğer bakterileri türlerine göre daha çok bakteriyosin ürettiyor olması ağız mikrobiyosunda baskın tür olduğunu gösterir (13–15). *S. mutans*'in dışında ağız mikrobiyotasının %1'ini oluşturan *Lactobacillus*'lar da çürüğün ilerlemesinde etkilidir. Uygun ortamda, yaptığı fermentasyon sonucunda çok fazla laktik asit üreten *Lactobacillus casei* (*L. casei*) geniş pH aralığında yaşayabilmektedir (16).

Streptococcus mutans'in; *L. casei*'nin diş yüzeyine tutunma direncini artırdığı bilinmektedir. Mikroorganizmalar, ağız içindeki üreme alanlarının kısıtlılığı ve besin erişiminin zorluğu gibi nedenlerle kolonileşmek için rekabet içindedirler (17).

Biyofilm oluşumunda ilk kolonize olan bakteriler oldan *Streptococcus sanguinis* (*S. sanguinis*)'in ürettiği Hidrojen Peroksit (H_2O_2) antibakteriyel etki göstermektedir. *S. sanguinis*, baskın olduğu mikrobiyotada H_2O_2 üreterek *S. mutans* ve diğer patojen özellikteki bakterileri inhibe eder. Bunun yanında *S. mutans*'ın baskın tür olduğu bir mikrobiyotada ise *S. sanguinis* sayısı azdır (18,19). Kısaca *L. casei* ve *S. mutans* birbirini biyofilm oluşumu esnasında desteklerken; *S. sanguinis* varlığında bu iki türün de çürük yapma özelliği azalmaktadır.

Kavite preperasyonu sonrasında dentinin içinde kalan rezidüel bakterilerin enzimatik aktivitelerini sürdürdüğü ve sayılarında bir ayda iki kat artış olduğu görülmüştür. Rezidüel bakteri varlığında oluşan sekonder çürük; postoperatif hassasiyet ve pulpal enflamasyona neden olur. Sekonder çürük nedeni ile restorasyon tekrarı veya pulpa tedavileri gibi komplike yaklaşımlar gerekebilir. Kavite preperasyonu tamamlandığında, kavitede rezidüel bakteri kalmaması amacıyla restorasyondan önce kavitenin antimikrobiyal bir materyal ile dezenfekte edilmesi önerilir. Kavite dezenfeksiyon materyallerinin; antibakteriyel özellikleri, bağlanma dayanımına etkisini ve mikrosızıntıdaki rolünün bilinmesi önemlidir (20–24). Kavite dezenfeksiyonunda kullanılan antimikrobiyal ajanlar; Klorheksidin Diglukonat (CHX) (25,26), Sodyum Hipoklorit ($NaOCl$) (27), benzalkolyüm klorür (20), H_2O_2 (20), iyodin solüsyonları (20), Fosforik Asit (H_3PO_4) (28), florid (29,30), ozon (31), lazerler (21,32), propolis (33,34), *Aleo vera* (33–35), karadut (*Morus nigra*) (36–38), zerdeçal (39,40) ve fenotiyazinler (metilen mavisi, toluidine mavisi) gibi fotosensitizörler ile uygulanan antimikrobiyal fotodinamik terapi (39,41–43) olarak örneklendirilebilir. CHX'in gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde yüksek dozlarda bakterisidal, düşük dozlarda bakteristatik etki gösterdiği bilinmektedir. Bakterilerin hücre duvarı yapısını bozarak inhibe eden CHX uzun yıllardır kavite dezenfeksiyon ajanı olarak kullanılmaktadır (25,26,44). Metilen mavisi bir fenotiyazin grubu olup, sağlık sektöründe uzun yıllardır antimikrobiyal olarak kullanılan bir ajandır. Aynı zamanda ışığa duyarlı ve ışıkla aktivasyonu artan fotosensitizör bir materyal olan metilen mavisi, antimikrobiyal fotodinamik terapide en çok tercih edilen ajanlardan biridir. Antibakteriyel, antiviral ve antifungal etkileri olan metilen mavisi, ekonomik ve temin edilmesi kolay bir üründür. Dentin üzerine uygulanan metilen mavisi ışık ile aktive olduktan sonra, gram pozitif ve gram negatif bakterilerin sitoplazma ve DNA'larına zarar vererek inhibe eder (39,42,45,46).

Son dönemlerde bitkisel ürünlere yönelimin artmasıyla sağlık sektöründe de bitkisel alternatiflerin kullanımı artmaktadır. Ağız yaralarında kullanımıyla bilinen karadut; flavanoidler, karotenoidler, fenoller, antosiyaninler gibi biyolojik olarak aktif bileşenlerden oluşur. Karadut; antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikanser ve antienflamatuvar etkiler gösterir. Karadut ile yapılan çalışmalarda yaprak, meyve ve kök kabuğu ekstrelerinin; *S. mutans*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) gibi gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdikleri izlenmiştir (36,37,47–49). Karadut ile ilgili yapılan bir başka çalışmada *S. mutans*’ın hücre zarına zarar vererek antibakteriyel etki gösterdiği, bu sayede çürük önleyici materyal olarak kullanılabileceği savunulmuştur (38).

Antimikrobiyal ajanların biyofilm üzerindeki bakterisidal, bakteriostatik etkilerinin değerlendirilebilmesi için in vitro olarak uygulanan yöntemler kullanılır. Bu yöntemler ile materyalin antimikrobiyal aktivitesini ve biyofilmde gerçekleşen değişimleri kantitatif ve kalitatif olarak değerlendirilmek mümkündür (50).

Antimikrobiyal aktivite değerlendirmek için kullanılan yöntemlere; difüzyon yöntemi, agar-disk difüzyon yöntemi, dilüsyon yöntemi, Adenozin Trifosfat (ATP) biyoluminesans yöntemi örnek gösterilebilir (50). Dilüsyon yöntemi uygun klinik ortamda, antimikrobiyal ajanın beyin infüzyon sıvısı veya agar ile seyreltilerek Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MİK) belirlemek için en uygun yöntemlerden biridir (50).

Mikrobiyal kültür yöntemi, kolorimetrik yöntem, Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM), biyokimyasal yöntem ve Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (CLSM) incelemeleri biyofilmi değerlendirmek için kullanılan metotlardır (50–54). SEM, mine yüzeyinin topografik yapısındaki değişikliklerin derinlemesine analizini sağlayan, mükemmel alan derinliğine sahip görüntüler üreten, ışık mikroskobundan 300 kat daha fazla odak derinliği ve 20-100,000 kat daha net görüş sağlayarak çok ayrıntılı görüntüler verebilen bir cihazdır. Bu görüntüler yüksek voltajlı elektronların yüzeyi tararken dış yüzeyine temas etmesi sonucu ortaya çıkan sinyallerin toplanarak bir ekrana yansıtılmasıyla oluşur (52,53). CLSM biyofilm analizi için temel yöntemlerden biri olarak kabul edilen 3 boyutlu mikroskobik görüntüleme yöntemidir. CLSM analizi için örnekler floresan boya ile boyanır ve cihaza yerleştirilir.

Örnekler tarandığında cansız hücreler kırmızı, canlı hücreler yeşil ışık yayarak biyofilmdeki dağılımları görüntülenmiş olur (55,56). Oluşan görüntüler COMSTAT ve Image J gibi yazılım programlarına aktararak; canlı ve cansız hücrelerin sayısal karşılığı olan sonuçlar elde edilir (57,58).

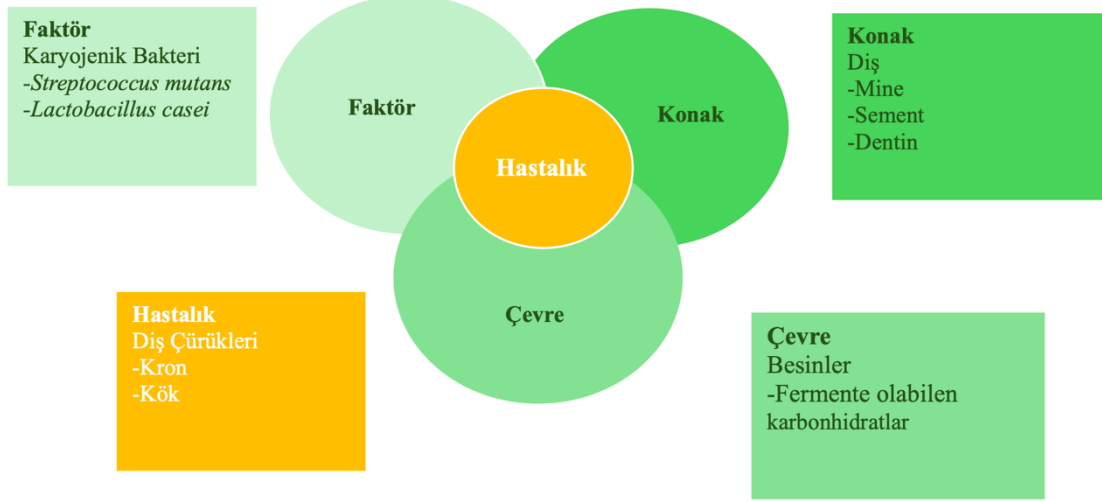
Bu bilgiler ışığında; CHX, fotodinamik terapi ile aktive edilen metilen mavisi ve karadut ekstresinin; *S. mutans* ve *L. casei* ile kontamine edilmiş dentin diskleri üzerindeki antibakteriyel etkileri ve bu bakterilerin dentin disklerinde oluşturdukları biyofilmi kaldırma güçlerinin *in vitro* olarak karşılaştırması amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. DIŞ ÇÜRÜĞÜ VE ETİYOLOJİSİ

Diş çürüğü enfeksiyöz bir hastalıktır. Oral mikrobiyotada bulunan bakteriler diyet ile alınan karbonhidratları fermente eder ve açığa çıkan asidik yan ürünler ağız içindeki pH seviyesini düşürür. Uzun süreli düşük pH seviyesi asidofilik bakteri sayısının artmasıyla sonuçlanır ve diş sert dokularında mineral kaybı başlar. Konak, fermente olabilen karbonhidratlar ve karyojenik biyofilm çürük oluşum sürecinin etiyolojisini oluşturan temel elemanlarıdır (1,2). Çürük, toplumun her kesiminden, tüm yaş gruplarından insanı biyolojik, fiziksel, ekonomik, sosyal ve psikolojik olarak etkileyen bir hastalıktır (1,3,59). Çürük oluşum sürecinde etkili olan modifiye edici risk faktörleri ve koruyucu faktörlerin etkileşimleri Keyes-Jordan diyagramında belirtilmiştir (Şekil 2.1) (60).



Şekil 2.1: Modifiye Keyes-Jordan Diagram

Diş çürüğü oluşum sürecinde dişlerin kontak yüzeyleri, morfolojik yapıları, mineralizasyonu, tükürük yapısı ve akış hızı, diyet alışkanlıkları, oral hijyen alışkanlıkları, flor alım düzeyi, sosyoekonomik durumu ve eğitim düzeyi gibi birçok faktör etkili olduğu için multifaktöriyel bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (61–64).

Ağız yaklaşık 1000 çeşit bakteri içeren oldukça karmaşık bir bir popülasyona sahiptir. Vücudumuzda sindirim sisteminin yapı taşı olan bağırsaklardan sonra en fazla bakteri popülasyonunun ağız ortamında bulunduğu tahmin edilmektedir (65). Binlerce bakterinin oluşturduğu ağız mikrobiyotasındaki dengenin bozulması diş çürüğünün oluşmasındaki en önemli faktörlerden biridir (66,67). *Streptokok*'lar, *Lactobacillus*'lar, *Actinomyces* diğer aerobik/anaerobik organizmalar ağızdaki yaygın mikrobiyal popülasyonlar arasında yer alır. Ağız boşluğunda yaşayan mikroorganizmalar 'oral mikroflora' veya 'oral mikrobiyota' olarak adlandırılmaktadır (68,69). Oral mikrobiyota insan vücudunun en karmaşık bakteri florasından biridir ve diş çürüğü, dişeti hastalıkları gibi birçok probleme neden olabilir (70,71). Oral mikrobiyotada, karbonhidrat fermentasyonu sonucu yoğun asit üretimi yaparak dişte demineralizasyona neden olacak birkaç çeşit mikroorganizma vardır (72). *Lactobacillus*'lar, *Asidojenik streptokoklar*, *Stafilokoklar* bu mikroorganizmalara örnek olarak gösterilebilir. *S. mutans* çürük oluşumdan etkili primer mikroorganizma olarak kabul edilmektedir (72). *S. mutans* yüksek oranda asit oluşturabilme kapasitesinin yanında, mine yüzeyi ve diş plağına yapışarak diş çürüğüne neden olan virülans etkisini gösterir (72–74). Diş yüzeyindeki dental biyofilmde bulunan *S. mutans* ve *Lactobacillus* gibi endojen bakteriler, karbonhidrat fermentasyonu sonucu yan ürün olarak zayıf organik asitler üretmektedir. Organik asitler lokal pH değerini kritik değerin altına düşürerek diş dokusundan Kalsiyum (Ca), Fosfat (PO₄) gibi minerallerin kaybına (demineralizasyon) sebep olur (74,75). Bu sürecin tersi yani; asitlerin dental biyofilmde metabolize ve nötralize olması sonucunda biyofilmde pH yükseltmekte mine yapısına Ca ve PO₄ geri kazanarak remineralize olabilmektedir. Dişteki mineraller ve oral mikrobiyal biyofilm arasındaki fizyolojik dengenin bozulduğu, demineralizasyonun remineralizasyona baskın geldiği durumlarda çürük oluşumu gözlenmektedir (64,76,77). Bu dengenin yönü tükürük içeriği ve tükürük akış hızının kontrolü, flor uygulamaları, önleyici diğer uygulamalar ile değiştirilebilmektedir (76–78). Diş çürüğü lezyonlarının lokasyonu ve derinliği ağız boşluğunda dental mikrobiyal biyofilmin gelişimi ve formasyonun bozulmadan kalabildiği süreye bağlıdır (76,79).

2.1.1. Diş Çürüğünün Yapısı

2.1.1.1. Mine çürüğü: Mine dişin en dış tabakası olarak bilinen, tükürük ve oral mikrobiyota ile doğrudan temas halinde bir dokudur. Periodontal olarak sağlıklı olan bireylerde çürük oluşumu ilk olarak minede başlamaktadır (80). Sürekli olarak devam eden demineralizasyon remineralizasyon döngüsünde, fermente olabilen karbonhidrat tüketiminin sonucunda dengenin demineralizasyona doğru kayması ile çürük oluşumu başlamaktadır (80,81). Minede başlayan bu çürüklerin başlangıç evresinde, sağlıklı mineden ayırt etmek için lezyon hava ile kurutulduğunda, beyaz nokta şeklinde izlenen görüntüden dolayı 'Beyaz Nokta Lezyonu' olarak tanımlanmaktadır (10). Minenin pöröz yapısını oluşturan mine prizmalarının arasındaki boşluklardan geçen organik asitler, yüzeyel minenin altındaki mine dokusunda demineralizasyona sebep olmaktadır. Alt tabakada demineralizasyonun başlamasıyla yüzeyel tabakanın geçirgenliği artar. Geçirgenliği artan yüzeyel tabakaya tükürük içerisindeki Ca ve PO₄ iyonları geçiş yapar. Böylece mineralize olan yüzeyel tabaka bütünlüğünü korur. Beyaz nokta lezyonlarında, mikroorganizma bulunmamaktadır. Çünkü mikroorganizmalar mine prizmaları arasındaki boşluktan geçemezler (10,82). Mine çürüklerinde diş yapısındaki bozulma ve mineral kaybı dört farklı tabakanın oluşmasına neden olmaktadır. Yüzeyel tabaka, lezyon gövdesi, karanlık tabaka ve saydam tabaka olarak isimlendirilen bu tabakalar her mine çürüğünde izlenmeyebilir (83).

2.1.1.2. Dentin çürüğü: Bu çürüklerin izlenebilmesi için mine çürüğünün derinleşmesi veya periodontal yıkım sonrasında dentin dokunun açığa çıkması gerekmektedir. Bakterilerin ürettiği proteolitik enzimler ve organik asitler dentinin inorganik ve organik yapısında yıkıma neden olmaktadır (84). Dentin dokunun pörözlü yapısından kaynaklı bakteriler ve bakterilerin yıkıcı enzimleri derin dentin dokularına hızla ilerleyebilmektedir (30,85).

2.2. DIŞ ÇÜRÜĞÜ ÇEŞİTLERİ

Günümüze kadar kabul görmüş ve etkinliğini korumuş birçok diş çürüğü değerlendirme yöntemi vardır. Diş çürüklerini, diş üzerindeki lokasyonuna, aktivitesine, ilerleme hızına, tedavi ve restorasyon tipine göre değerlendiren farklı sınıflamalar mevcuttur (86,87).

2.2.1. Anatomik Bölgeye Göre Sınıflama

2.2.1.1. Pit ve fissür çürükleri: Mine - dentin sınırına veya dentine kadar uzanan derin fissürler, pit ve fissür çürüklerinin oluşumu ile ilişkilidir (88–90).

2.2.1.2. Düz yüzey çürükleri: Mine ile sınırlı olup, kaviteye izlenmemektedir. Genellikle kole bölgesinde izlenen bu çürük lezyonlar nemli ortamda translusens görünürken hava ile kurutulduğunda ‘beyaz nokta lezyonu’ ismini veren mat beyaz görünümde izlenmektedir (91,92).

2.2.1.3. Kök çürükleri: Servikal çürük olarak da bilinen kök çürükleri diş eti hastalıklarından kaynaklı dişeti çekilmeleri sonucu açığa çıkan mine- sement birleşimi veya sement yüzeylerinde izlenen, serbest diş eti kenarına komşu olan lezyonlardır (93–95).

2.2.2. Yeni Lezyon veya Rekurent Varlığına Göre Sınıflama

2.2.2.1. Primer çürük: Sağlam diş yüzeyinde oluşan lezyonun ilk evresi olarak bilinmektedir (96).

2.2.2.2. Sekonder (rekurent) çürük: Mevcut restorasyondan kaynaklı meydana gelen çürük olarak tanımlanmaktadır (96). ‘Restorasyonlar ve örtücülerle ilişkilendirilen çürük’ olarak da bilinmektedir (97). Primer çürük oluşumuna sebep olan organik bileşenlerin çözünmesi ile restoratif materyallerin spesifik özellikleri sekonder çürük oluşumunu çok faktörlü ve karmaşık bir süreç haline getirir (97,98). Restoratif materyalin marjindeki morfolojik düzensizliklerin neden olduğu plak retansiyonu sekonder çürük oluşumunda etkili olmaktadır (99). Biyofilm ve fermente edilebilir karbonhidrat varlığı, mineral kaybındaki dengesizlik gibi patojenlere ek olarak restorasyon materyali ile diş yüzeyi arasındaki düzensizlikler ve geniş marjinal aralık sonucu oluşan lezyon ‘duvar lezyonu’ olarak bilinmektedir (99–101). Restorasyon materyalinin morfolojik düzensizliklerinden kaynaklı oluşan biyofilm retansiyonun komşu dişte oluşturduğu çürük lezyon ‘dış lezyon’ olarak isimlendirilmektedir (98,102).

2.2.2.3. Rezidüel çürük: Dişin restorasyonu tamamlanmadan önce kavite tabanında bırakılan demineralize çürük dokusudur (96). Bu demineralize alanlar mikroorganizmaların aktivitesi, restorasyon materyalinin marjinal uyumsuzlukları sebebiyle yeni çürük atakları yaparak çürüğün ilerlemesine neden olabilirler (103).

2.2.3 Çürük Lezyonun Aktivitesine Göre Sınıflama

Kaviteli ve kavitesiz çürük lezyonların aktivitesine göre sınıflama yapan Nyad sistemi güvenilir bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Bu sistemde renk, opaklık ve çürük varlığı gibi diş yüzeyinin klinik özelliklerine göre lezyonu aktif veya inaktif olarak sınıflandırır (104).

2.2.4. Çürük İlerleme Hızına Göre Sınıflama

2.2.4.1. Akut çürük: Diş yüzeyinde açık renkte izlenen ve sond ile muayenede yumuşama hissedilen çürüklerdir. Oral hijyen eksikliği, fermente edilebilen karbonhidratların sık tüketimi gibi patojenlerin varlığında hızlı ilerleme gösteren çürüklerdir (104). Sürekli diş dentin kalınlığının yarısı kadar dentin kalınlığına sahip süt dişlerinde mineralizasyon yoğunluğu da sürekli dişlere oranla azdır. Bu nedenle akut çürüklerin mine dentin sınırını aşması sonucu pulpayı etkilemesi çok hızlı gerçekleşmektedir (105).

2.2.4.2. Rampant çürük: Rampant çürükler ilk olarak Massler tarafından ‘birdenbire orataya çıkan, yaygın, hızlı bir şekilde kavite oluşturan, pulpanın etkilenmiş olabileceği çürük türü’ olarak tanımlanmıştır (106). Rampant çürükler, hastada bukkal veya lingual yüzey gibi plak tutulum oranının düşük olduğu atipik bölgelerde izlenen birden fazla aktif çürük lezyonun bulunması olarak da tanımlanır. Rampant çürüklerin etiyolojisinde yaş grubuna, alışkanlıklara ve ilaç kullanımına göre sınıflama yapılabilir (107). Küçük yaşlarda çocuklarda görülen yaygın çürükler Erken Çocukluk Çağı Çürüğü (EÇÇ) olarak da isimlenmektedir. Ergenlerde ve yetişkinlerde görülen rampant çürüklerin etiyolojisinde radyasyona terapisi, uyuşturucu kullanımı gibi durumlar etkilidir (72,107). Rampant çürük; *S. mutans* ve *Lactobacillus*’ların yüksek oranda lokalize olduğu bölgelerde beyaz noktalar şeklinde belirir. Dişlerin bukkal veya sevikal kole bölgelerinde başlayan bu beyaz görünüm zamanla kaviteye ve sıcak soğuk hassasiyetine neden olur.

Çürükler bu evrede ilerlemiş seviyededir ve hasta diş ağrısı, dişeti iltihabı abse gibi şikayetlerle diş hekimine başvurur. Rampant çürükler dişlerin fonksiyonunu etkilediği gibi hasta psikolojisi, özgüveni ve sosyal çevreye uyumu açısından da negatif etkili bir hastalıktır (72,106,107).

2.2.4.3. Erken Çocukluk Çağı Çürüğü: 6 yaş altındaki çocukların süt dişlerinde bir veya birden fazla çürük varlığı (kaviteli veya kavitesiz lezyonlar), çürük nedeniyle eksik veya dolgulu yüzeylerin varlığı olarak tanımlanan EÇÇ, önlenebilir olmakla beraber dünya çapında 600 milyondan fazla çocuğu etkilemektedir (108).

Diğer çürük türleri gibi biyofilm aracılığı ile başlayan, fermente olabilen karbonhidrat varlığında devam eden multifaktöriyel, diş sert dokularında remineralizasyon ve demineralizasyon arasındaki dengenin bozulmasıyla ortaya çıkan bulaşıcı, dinamik bir hastalıktır (108,109). Amerikan Pediatrik Diş Hekimleri Akademisi (AAPD) tarafından kabul gören Drury ve arkadaşları tarafından tanımlanan EÇÇ sınıflama sistemi; 71 aylık veya daha küçük çocuklarda 1 veya daha fazla çürük (kavite oluşmuş/ oluşmamış), çürük nedeniyle kayıp diş veya dolgulu süt dişinin bulunması olarak tanımlanırken, Şiddetli Erken Çocukluk Çağı Çürüğü (ŞEÇÇ) her yaş grubu için farklı tanımlanmıştır (110). 3 yaşından küçük çocuklarda üst kesici dişlerde arayüz çürükleri veya düz yüzey çürüklerinin olması, 3-5 yaş arası çocuklarda bir veya birden fazla ön bölge çürüklerinin bulunması, 3 yaşındaki çocukta 4 veya daha fazla çürük, 4 yaşındaki çocukta 5 veya daha fazla çürük, 5 yaş için 6 veya üzeri çürük bulunması olarak tanımlanmaktadır (110).

Çürük oluşumunda rol alan üç ana faktör; mikroorganizma, substrat ve konaktan, EÇÇ etiyojisinde en etkili olduğu düşünülen dental biyofilm ve karyojenik bakterilerdir (111). Fermente olabilen karbonhidrat içerikli sağlıksız ve dengesiz beslenme (112), kötü oral hijyen alışkanlıkları (113) ile de ilişkilendirilmektedir. Sosyoekonomik seviyenin düşük olması (114,115), çok sık ara öğün tüketimi (115), annenin ağız hijyeni ve tükürüğündeki *S. mutans* seviyesi (114,116), annenin sigara kullanımı (115), ebeveyn eğitim durumu (114), çocuğun lokal ve sistemik flor tüketimi (115) gibi faktörler EÇÇ ile ilişkilendirilen çevresel ve sosyal faktörler arasında sayılmaktadır.

Erken çocukluk döneminde görülen bu hastalığın etiyolojisinde çocuğun ağzına uyurken veya gün içinde uzun süreli şekerli emzik verilmesi (117), bebeğin tüm gün veya gece boyu uzun süreli anne sütü ve/veya bebek maması tüketimi, çocuğun gece boyu ağzında biberon ile uyuması (118,119), EÇÇ için ciddi risk faktörleri olarak görülmektedir. Çocuğun immünolojik durumu, tükürüş akış hızının azalması, minenin immatur olması, dişin morfolojik yapısı (derin fissür ve fossalar), çapraşık dişlerin varlığı çürük oluşum riskini arttıran faktörlerdendir (120,121). Fermente olabilen karbonhidrat grubuna aldığımız sükröz, fruktoz ve glukoz gibi şekerler diş çürüğünün başlaması ve ilerlemesinde oldukça etkilidir. Sükröz, karyojenik olmayan besinlerin bile karyojenik etki göstermesine neden olmasına ek olarak *S. mutans* ve *Lactobacillus* sayılarında artışa neden olan en önemli çürük yapıcı gıda olarak bilinmektedir (122). Bu tür besinlerin uyku öncesi veya uyku sırasında yapılan beslenmeye dahil edilmesi, gece boyunca azalan tükürük akış hızının da etkisi ile remineralizasyon demineralizasyon dengesini demineralizasyon yönünde bozarak EÇÇ riskini arttırdığı görülmektedir (123,124). 0-6 yaş dönemi süt dişlerinin sürme ve maturasyonun tamamlandığı dönemdir. Minenin *S. mutanslara* ve *S. sobrinus* gibi karyojenik bakterilere karşı immünolojik olarak inaktif olduğu ve çürük yapıcı bakterilere karşı esas cevabı tükürükteki ve diş eti oluşu sıvısındaki Immunoglobulin A'nın (IgA) verdiği bu süreçte, floridin ağız içerisinde koruyucu, önleyici etkisi oldukça önem kazanmaktadır (121,125). *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *Lactobacillus* gibi karyojenik mikroorganizmaların oral mikrobiyotada izlenmesi EÇÇ'nin ilerlemesinde ilk basamaktır (108,126). *S. mutans*'ın çürük lezyonun oluşumunun ilk evresinde aktif rol oynadığı bilinmektedir (127). 0-6 yaş aralığında, özellikle dişlerin henüz sürmediği dönemlerde *S. mutans*'ın ağız içinde görülmesinin nedeni olarak vertikal ve horizontal geçiş gösterilmektedir. Vertikal geçiş, bebeğe anne ya da bakıcı yolu ile bakterilerin geçişi olarak tanımlanırken, horizontal geçiş aile içindeki diğer bireyler veya arkadaş/kardeş gibi çevredeki kişilerden bakteri taşınması olarak bilinmektedir. 19-31 ayları kapsayan ve enfektivite penceresi olarak adlandırılan dönemde enfekte bireyden (anne, bakıcı, kardeş, arkadaş) bebeğe bakteri geçişi kolayca olmaktadır (128). Tüm bu risk faktörleri göz önünde bulundurulduğunda diş çürüklerinden korumaya yönelik uygulamalar ve çocuğun en geç 1 yaşında diş hekimi kontrolüne götürülmesi önem kazanmaktadır (108,115,119,124,129).

2.2.4.4. Ksrestomia ile ilişkili çürük: Remineralizasyon ve demineralizasyon süreçleri ağız mikrobiyotasıyla doğrudan ilişkilidir (130). Ağız mikrobiyotasının dengesinde tükürüğün içeriği, akış hızı ve tamponlama kapasitesi gibi fizikokimyasal özelliklerinin etkili olduğu bilinmektedir (131,132). Parotis, sublingual (dilaltı) ve submandibular (çene altı) tükürük bezleri olarak bilinen üç büyük tükürük bezi ve bine yakın sayıda küçük tükürük bezleri tarafından ağız ortamına salgılanan tükürüğün kayganlığı arttırma, sindirime yardımcı olma, remineralizasyona katkı sağlama, antimikrobiyal etki gösterme, fonasyona yardımcı olma, tat almayı sağlama ve tamponlama kapasitesi gibi ağız ve diş sağlığı için önemli birçok görevi bulunmaktadır (130,131,133). Tükürük yapısında bulunan su, elektrolitler, musin ve glikoproteinler ile kayganlığı arttırarak besinlerin; oral mukozaya veya dile yapışmasını engeller. Tükürük içerisindeki amilaz, lipaz gibi enzimler besinlerin sindiriminde görevlidir.

Tükürük, yapısındaki bikarbonatların tamponlama etkisiyle ağız ortamının pH dengesinin koruyarak 6,5 – 7,5 arasında değişen optimum pH seviyesinde kalmasını sağlar. Tüm bunlara ek olarak tükürük içerisindeki su sayesinde mukozanın, dilin ve dişlerin temizlenmesinde de görev almaktadır. Tükürük tamponlama kapasitesinin azlığı ve tükürüğün akış hızının azalması çürük riskini arttırmaktadır (130–134). Ağız sağlığının sürekliliği için tükürük akış hızının optimum seviyede olması oldukça önemlidir. Düşük tükürük akış hızı olarak tanımlanan hiposalivasyonun etiyolojisinde tükürük bezlerinin oluşmaması veya sayıca az olması gibi gelişimsel sebeplerin yanında diyabet, yeme bozuklukları, psikolojik rahatsızlıklar (depresyon), kullanılan ilaçlar (antidepresanlar, antihipertansivler, antihistaminikler, antimigren, anti-HIV), Sjögren sendromu, tükürük bezi iltihabı ve baş boyun bölgesi kanserleri gibi durumlar etkili olmaktadır (135–137). Normal tükürük akış hızını, hiposalivasyonu ve hipersalivasyonun tanımlanmasında kullanılan referans değerler; uyarılmış ve uyarılmamış tükürük akış hızına göre değerlendirilmektedir (138). Tükürük akışının azalması sonucu meydana gelen ağız kuruluğu diş yüzeylerinin, oral mukozanın temizlenememesinden kaynaklı çürük riskinin artmasına neden olur. Ksrestomia ile ilişkili çürüklerin rampant çürük olarak da tanımlandığı durumlar vardır. Rampant çürükler, baş boyun bölgesi kanseri hastalarının gördükleri tedavi sonucu tükürük bezlerinin zarar gördüğü ve tükürük üretiminin azaldığı durumlarda ortaya çıkan, hızlı yayılan çürükler olarak bilinirken; altta yatan etken hiposalivasyon olduğu için ksrestomia ile ilgili çürük sınıflamasına dahil edilebilir (139).

2.2.4.5. Kronik çürük: Sond ile muayenede sert ve kaygan hissedilen, koyu siyah renk izlenen çürüklerdir (104,140). Kronik çürükte pulpanın kavite tabanından geri çekilerek kendini koruma altına alması amacıyla kavite tabanında reaksiyonel dentin oluşur (141,142).

2.2.5. Görsel Sınıflama

Ekstrand ve arkadaşları okluzal çürük lezyonların skorlamasını görsel olarak değerlendirmiş ve lezyon derinliği ile ilişkilendirmişlerdir (Tablo 2.1) (143).

Tablo 2.1: Ekstrand ve arkadaşları tarafından geliştirilen sınıflandırma sistemi (143)

0	5 sn ve üzeri havayla kurutma sonrasında mine saydamlığında değişiklik olmaması ya da çok az değişiklik olması durumu
1	Opasite (beyaz veya kahverengi) ıslak yüzeyde ayırt edilemezken havayla kurutulduğunda belirgin şekilde izlenen opaklık vardır.
2	Opaklık (beyaz/sarı/kahverengi) hava ile kurutulmaksızın izlenebilmektedir.
3	Opak veya rengi bozulmuş mine yapısında bozulmalar izlenir. Dentinde grimsi, yansıyan renk bozulmaları izlenebilir.
4	Minenin opasitesi veya renk bozulmasının yanında dentin açığa çıkmıştır.

2.2.6. İçerdiği Yüzey Sayısına Göre Sınıflandırma

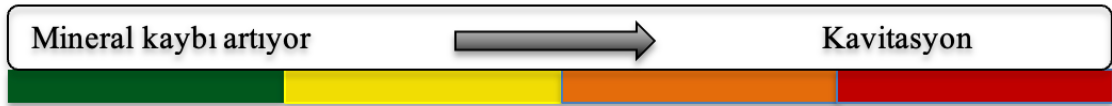
2.2.6.1. Basit çürük: Dişin yalnızca bir yüzeyini etkileyen çürüktür (91,92).

2.2.6.2. Kompound (ikili, karışık) çürük: Bir dişin iki farklı yüzeyini etkileyen, birbirinden ayrı iki çürüğün bulunduğu durumlardır. İki farklı yüzeyde oluşan bu çürükler birleşerek tek bir çürük gibi görüldüğü durumlarda ‘Birleşik Kompant Çürük’ olarak isimlendirilir (144,145).

2.2.6.3. Kompleks (komplike) çürük: Bir dişin farklı farklı yüzeylerinde üç ya da daha fazla çürüğün bulunmasıdır. Bu çürük tipinin birleşik formu bulunmaktadır (144,145).

2.2.7. Çürüğün Şiddetine Göre Sınıflandırma

Amerikan Diş Hekimleri Birliği (ADA), çürüğü dinamik bir hastalık süreci olarak tanımlayarak, çürüğün aktivitesini, şiddetini ve hasta üzerindeki etkisini değerlendiren çürük sınıflandırma sistemi Amerikan Diş Hekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemi (ADA CCS) geliştirmiştir. Böylece çürük sınıflandırmasının statik olmasını amaçlamıştır (146). ADA CCS, yeterli bir aydınlatma altında basınçlı bir hava ile plaksız diş yüzeyinde yuvarlak uçlu bir sond ile değerlendirme sonucu sınıflandırma yapar. Çürük lezyonun bulunduğu anatomik bölge ve çürüğün şiddetine göre radyografik olarak desteklenen bir sınıflamadır (145,146). ADA CCS’ye göre çürük oluşum süreci mineral kaybının artışıyla net olarak ilişkilidir (Şekil 2.2). Mineral kaybı orta ve ileri derecede çürük lezyonlarda kavitasyon oluşumu olarak izlenmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2: Amerikan Diş Hekimleri Birliği Çürük Sınıflandırma Sistemine göre çürük ve mineral kaybı ilişkisi

2.2.8. Çürüğün Radyografik Sınıflandırması

1895'te X ışınlarının Wilhelm Conrad tarafından keşfedilmesiyle (147), radyografi diş çürüklerinin tespitinde kullanılmaya başlanmıştır. X ışınları mineral yoğunluğu az olan diş sert dokularında daha az penetre olur. X ışınlarının daha az penetre olması görüntüde opasitenin artışı olarak izlenir. Çürük lezyon bölgesindeki mineral kaybı sebebiyle emilemeyen X ışınları, lezyonun translusens görünerek tespitini kolaylaştırır (148). Klinik olarak gözlemlenemeyen ara yüz çürüklerinin ve ek olarak fissür çürüklerinin tespitinde kullanılan bu yöntem ile çürüğün derinliği tespit edilebilir. Radyografik görüntüleme ile kalıcı kayıtlar tutulabilir böylece belirli aralıklarla tekrarlandığında çürüğün ilerleyişi tespit edilebilir (148–150). Yaygın kullanılan radyolojik olarak çürük sınıflama sisteminde lezyon derinlik derecesine göre kodlanmaktadır (151).

2.3. DİŞ ÇÜRÜĞÜ DEĞERLENDİRİLMESİNDE KULLANILAN İNDEKSLER

2.3.1. Çürük, Kayıp, Dolgulu Diş/ Çürük, Kayıp, Dolgulu Yüzey

İlk olarak 1938 yılında Klein ve Palmer tarafından tanımlanan Çürük, Kayıp, Dolgulu Dişler İndeksi (DMFT), çürük nedeniyle çekilmiş ve dolgulu dişlerin toplam sayısını ifade etmektedir (152). Bödecker'in 1939 yılında diş sayısı yerine diş yüzey sayısının hesaplanmasını önererek Çürük, Kayıp, Dolgulu Yüzeyler İndeksi'ni (DMFS) tanımlamıştır (153). Bu indekslerin en önemli görevi dünya çapında farklı araştırmacıların topladığı bilgileri belirli bir standardizasyon altında değerlendirilmesini sağlamaktır (154). Araştırmacılara arasında farklı algılanabileceği düşünülen kaviteleşmemiş lezyonlar bu indekse dahil edilmeyerek değerlendirmelerin aynı kalitede olması hedeflenmiştir (145).

2.3.2. Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi

2002 yılında geliştirilen Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi (ICDAS) çürüğü derinliğine göre 0-6 arasında kodlayan, bu kodlamaları histolojik olarak destekleyen, çürüğe en uygun, en konservatif yaklaşımın belirlenmesini sağlayan kanıta dayalı sınıflandırma sistemidir (155–157).

Çürüğün kavitasyon oluşmamış başlangıç aşamasından kavitasyon gösteren derinliğe kadar yüzey değişimlerine göre 0 ile 6 arasında kodlamaktadır. ICDAS'da çürükler; koronal (mesial, distal, bukkal, pit ve fissür çürükleri), kök çürükleri ve restorasyon/fissür örtücüyle ilişkili çürükler olarak ele alınmaktadır (157,158). ICDAS sınıflanmasından kodlamanın doğru yapılabilmesi için diş yüzeyi temizlenip, kurutulduktan sonra ışık ve künt sond yardımı ile gözle değerlendirilmelidir (158,159). 2005 yılında Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi II (ICDAS II) olarak yenilenen sistemde; plaksız, kuru veya nemli diş yüzeyinde, çürüğün klinik ve histopatolojik olarak değerlendirilmesine olanak sağlayan, güvenilir çürük teşhis sistemi oluşturulması hedeflenmiştir (155,157,160). ICDAS II ile çürük aşamalarının belirlenmesinde özellikle kavitasyon oluşmamış dişlerin yüzeyinin temiz ve kuru olması önemlidir. Diş yüzeyindeki su, porları tıkayarak beyaz nokta lezyonlarının tespit edilmesini engelleyebilmektedir. Kavitasyonlu dişlerde plak uzaklaştırıldıktan sonra künt uçlu sond kullanımı lezyona geri dönüşümsüz bir zarar vermeyi önlemek açısından oldukça önemlidir (160,161).

2.3.3. Uluslararası Çürük Sınıflandırma ve Yönetim Sistemi

Çürük Belirleme ve Değerlendirme Sistemi sınıflamasını temel alan Uluslararası Çürük Sınıflandırma ve Yönetim Sistemi (ICCMS) çürüğün evresini tespit edildiği, hastanın çürük risk grubunu belirlediği bir sistemdir. Hastanın risk grubuna uygun koruyucu / önleyici tedavilerin yapılmasını ve çürük teşhisi koyulduğu durumlarda dişin restorasyonunun yapılmasını hedefleyen 2012 yılında kabul edilen bir misyondur (162). ICCMS ile hekimlerin tedavi kararı verirken ortak olarak izleyebilecekleri değerlendirme basamakları tedavi planı oluşturulmasına yardımcı olmaktadır. ICCMS'de tedavi planı oluşturma aşamasında izlenmesi gerek üç basamak vardır (162,163):

1. Çürüğün evresinin saptanması
2. Hastanın risk grubunun belirlenmesi ve sınıflandırılması
3. Uygulanacak tedavi protokolünün belirlenmesi

Çürüğün belirlenmesi ICDAS sınıflamasındaki çürük değerlendirme sistemi baz alınarak 3 kodlu bir sistem oluşturulmuştur. ICDAS kod 1 ve 2 ICCMS'de başlangıç evresinde yer almaktadır. Kod 3 ve 4 orta evre, kod 5 ve 6 ileri evre çürük olarak sınıflanmaktadır (160,162,163).

Çürüğün evrelerinin yanında çürük aktivitesi de ICCMS için uygulanacak tedavi kararını etkilemektedir (163,164). Yapılacak koruyucu önleyici tedaviye veya restorasyona karar vermek için en önemli basamaklardan olan çürük risk grubu belirleme için ICCMS herhangi bir sınıflama yapmamıştır. Çürük risk grubunun belirlenmesinde en çok kullanılan yöntemlerden olan Risk Değerlendirmesine Göre Çürük Yönetimi (CAMBRA), ADA'nın belirlediği çürük değerlendirme formu veya karyogram kullanılabilir (165–167). Çürüğün bulunduğu evre ve hastanın çürük risk grubuna göre göre belirlenen tedavi planlamasında koruyucu önleyici tedaviler (flor, fissür örtücü ve kontrol seansları) ve konservatif restoratif yaklaşımlar mevcuttur (155,168).

2.3.4. Evrensel Görsel Sınıflama Sistemi

Geçmişten günümüze kullanılan Nyvad, ICDAS gibi çürük sınıflandırma sistemlerinin eksiklerini gidermek ve çürük tespitindeki ihtiyaçları gidermek amacıyla, klinik olarak kabul edilmiş ve onaylanmış kriterleri kullanan Evrensel Görsel Sınıflama Sistemi (UniVISS) geliştirilmiştir. UniVISS sisteminde çürük değerlendirilmesi üç basamakta yapılmaktadır (169):

1. Basamak: Çürüğü şiddeti belirlenir.
2. Basamak: Çürükteki renklemenin değerlendirilmesidir.
3. Basamak: Çürük aktivite değerlendirilir. Lezyonun aktivitesi okluzal pit ve fissürler ve düz yüzey olmak üzere iki farklı diş yüzeyine göre evet/hayır olarak değerlendirilir.

2.4. ÇÜRÜK TEMİZLEME YÖNTEMLERİ

Diş çürüğü tedavisine klasik yaklaşım; yumuşak dentinin uzaklaştırılması sonrasında restoratif materyalin kaviteye yerleştirilmesidir. Bakterilerle enfekte olmuş çürük dokunun restoratif tedavi öncesinde temizlenmesi ve çürük oluşumunun durdurulması amacıyla frezler, ekskavatör gibi keskin el aletleri ve kemomekanik çürük kaldırma yöntemleri gibi farklı yöntem ve görüşler vardır (4,6,170). Black, restoratif tedavi öncesinde kavitede çürük bırakılmamalı görüşünü savunurken günümüzde çürük patolojisinin daha iyi anlaşılmasıyla bu görüş değişikliğe uğramıştır (5,6,171).

Çürük temizleme yöntemlerine geçmişten günümüze; dental el aletleri, dental mekanik döner aletler/frezler, air-abrasivler, ultrasonikler, lazer tekniği, enzim tekniği, kemomekanik teknikler ve ART şeklinde sıralanabilir (4,5,172). Restoratif materyali kaviteye yerleştirmeden önce sert ve yumuşak dentin dokusunun tamamının kaldırılmasını savunan geleneksel çürük temizleme yönteminde pulpa perforasyon riski oldukça yüksektir. Dişin çekimi veya kanal tedavisi gerektiren durumlar oluşabilmektedir (173). Çürüğün patolojisinin daha iyi anlaşıldığı bu günlerde semptom vermeyen derin çürüklü dişlerde pulpayı ekspoz etmeden minimal invaziv yaklaşımlar daha çok desteklenmektedir (7,8).

İkinci bir yaklaşım olan parsiyel çürük temizleme yönteminde ise çürüğün tamamen kaldırılması çürük ilerlemesini durdurmak için bir ön koşul olmadığını savunmanın yanı sıra çürükten etkilenmiş dentin içerisinde bulunan bakterilerin inflamatuvar aktivite başlattığını ve bu durumun pulpa rejenerasyonunu olumlu etkileyebileceğini savunmaktadır (7,171). Parsiyel çürük temizleme yönteminde kavite duvarlarındaki enfekte dentin tamamen kaldırılıp, kavite tabanında pulpaya bakan yüzeyde deminerilize çürükten etkilenmiş dentin bırakarak geçici restorasyon veya final restorasyon ile tedavinin tamamlanması olarak bilinmektedir. Buradaki amaç etkilenmiş dentindeki çürük oluşum sürecini durdurmak ve pulpaya zarar vermeden dişin vitalitesini korumaktır (7,9). Geçmişten günümüze çürük temizleme yöntemleri; dental el aletleri, dental mekanik döner aletler ve frezler, mekanik döner olmayan aletler ve teknikler şeklinde listelenebilir (172).

2.4.1 Dental El Aletleri

1870’li yıllarda diş hekimlerinin çürük temizleyebilmesi amacıyla; mekanik döner aletleri olmadığı için keskin uçlu el aletleri kullanılıyordu. 1880’li yıllarda pedal ile aktifleşebilen el aletleri geliştirildi. Takip eden senelerde bu aletlerin modifikasyonu pedal ile çalışabilen, frezler ile kullanılan dik açılı veya geniş açılı seçenekleri bulunan el aletleri kullanılmaya başlandı (172,174). 1955 senesinden sonra diş hekimliği aletlerindeki radikal gelişimler yaşandı. Su püskürten özellikteki el aletleri piyasaya sürüldü. Su soğutucularının kullanılmasıyla el aletlerin Bir Dakikada Gerçekleşen Dönüş Sayısı (rpm) 20,000 ve üzeri rakamlara ulaşacak kadar hızlıları kullanılmaya başlandı. El aletlerinin hızları ve su soğutucu özelliklerine ek olarak açılarının ergonomisi geliştirildi ve ışık sistemleri eklenerek gelişimini sürdürdü (175,176).

2.4.2. Dental Mekanik Döner Aletler ve Frezler

Frezlerin ve disklerin keskinlikleri yeterince gelişme gösteremediği için 19. yüzyılın sonuna kadar kullanımı yaygın değildi (172). 1871 yılında Morinson tarafından ayak pedali ile çalışan ve diş motoru olarak adlandırılan ilk aletin icadından kısa bir süre sonra günümüzde aerotor olarak isimlendirdiğimiz aletin ilk versiyonu icat edildi. Aerotorun kullanımının artmasıyla frez üretiminde teknoloji olarak oldukça ilerlendi (175). 1891 yılında fabrikada yapılan ilk frezin piyasaya sürülmesiyle frezler; diş endüstrisinin standartlarını oluşturmaya başladı. 1957 yılında 300,000 rpm dönen aerotorler piyasaya sürülmesiyle frezlerin dayanıklılık ve yapı özelliklerinde yeni gelişmelere gidildi. Aynı zamanda kompozit materyallerinin de bu dönemde diş hekimliği endüstrisine girişi frez üretiminde çeşitlilik ihtiyacını arttırdı (175,176).

2.4.3. Dental Mekanik Döner Olmayan Aletler ve Teknikler

2.4.3.1. Air-abrasive teknik: Hava gücüyle çürüğün aşındırılıp kaldırılması olarak tanımlanan bu teknik; aerotor gibi mekanik döner aletler değil yüksek basınçlı hava, titreşim ve ısı üretimi yapan, yüksek hızda hareket eden toz formundaki alüminyum oksit parçacıklarının kullanımına dayanmaktadır. 1950'lerde geliştirilen bu teknik; el hissiyatı olmadığı ve kavite kenarlarının şekillendirilip açıldırılmasındaki zorluk nedeniyle klinikte kullanılmamaktadır. Aynı zamanda toz formundaki alüminyum oksitin hasta ve hekim için solunum yolu hastalıklarına neden olabileceği için kullanımı bırakılmıştır (177,178).

2.4.3.2. Air-polishing tekniği: Hava basıncı ile parlatma olarak da isimlendirilen bu teknik sodyum bikarbonat toz parçacıklarının hava basıncı ile birlikte diş yüzeyindeki plakları, lekeleri ve çürüğü kaldırmayı sağlayan bir yöntemdir. Kullanım şekline göre kompozit, mine, dentin ve sement yüzeyinden kontrolsüz madde kaldırabileceği için tehlikeli görünen yönleri de bulunmaktadır. Aynı zamanda doğru kullanım ile sağlam dentini kaldırmayarak sadece çürük dentinin temizlenebilirliğini sağladığı için kullanımının yaygınlaşması beklenmiştir. Fakat döner aletler ve frezler kadar gelişimi devam etmemiştir (7,179–181).

2.4.3.3. Ultrasonik teknik: Ultrasonik cihazların ürettiği yüksek frekanslı ultrasonik titreşim, aşındırıcı pat ile birlikte çürük yüzeye uygulanırken pulpaya zarar verebilecek ısı ve basıncı oluşturmamaktadır. Hastanın gürültü ve titreşim kabulü döner aletlere göre daha kabul edilebilir seviyededir. Fakat ultrasonik cihazlarının uç çeşitliliğinin az olması ve zor bulunması, aşındırıcı pat ile uygulama yapıldığı için kavitedeki bulanık görüntü ve altın, amalgam gibi güçlü restoratif materyaller üzerinde yeterince etkili olamadığı için kullanımı yaygınlaşmamıştır (182–184).

2.4.3.4. Lazer tekniği: Lazer cihazları sert ve yumuşak doku lazeri olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Yumuşak lazerler, yumuşak doku üzerine uygulanarak hücrel aktivitenin uyarılmasını sağlayan aynı zamanda cerrahi kesilerde de kullanılan ışık kaynaklarıdır (185). Sert doku lazerleri ise çürük temizlemek, kavite hazırlamak amacıyla tercih edilen lazerlerdir. Karbondioksit (CO₂) ve Neodymium: Yttrium-Alüminyum-Garnet (Nd:YAG) lazerler yüksek enerji yoğunluğuna sahip sert doku lazerleridir. Yüksek enerjinin dental dokulara verebileceği zarardan dolayı sert doku üzerinde etkili daha düşük enerjili Erbiyum-Doped Yttrium Alüminyum Garnet (Er:YAG) ve Erbiyum, Krom: Yttrium-Scandium-Gallium-Garnet (Er,Cr:YSGG) lazer gibi sistemler klinik kullanıma girmiştir (32,185,186). Sert doku ve lazer etkileşmesi sonucu hidroksiapatit matriks içinde enerji ısıya dönüşerek su buharı ortaya çıkar ve dokuda basınç artışı oluşur. Bu olaylar dizisi, termomekanik ablasyon (patlama) ile açıklanan ani mikro patlamalara ve parçalanan dokunun bölgeden ayrılmasına yol açar. Lazerler çürük temizlemenin yanında hassasiyet giderici, kompozit polimerizasyonu, kavite dezenfeksiyonu ve diş beyazlatma gibi diş hekimliği alanlarında kullanımı mevcuttur (32,187–189).

2.4.3.5. Enzim tekniği: Goldberg ve arkadaşları 1989 senesinde yaptıkları bir çalışmada; çekilmiş, çürüklü insan dişlerini 2 ila 92 saat boyunca 33 °C'de borat tamponu içindeki bir kollajenaz enzim çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra dentin yüzeyleri SEM ile incelendiği ve dentin tabanında açığa çıkan kollajende bakteri görülmediği bildirilmiştir (190). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada ise proteaz enziminin çürük temizlemede etkili olduğu görüldü. Klinik uygulamada yaygınlaşmamış bir yöntemdir (191).

2.4.3.6. Kemomekanik teknikler: Kemomekanik yöntem ile çürük temizleme fikri 1970’li senelerde NaOCl’nin çürük dentin üzerindeki çözücü etkisini keşfeden endodontist Goldman tarafından gündeme getirilmiştir. Kemomekanik çürük temizleme yöntemi sağlıklı dentini koruyarak sadece çürük dentinin uzaklaştırılmasını sağlayan ve minimal invaziv diş hekimliği felsefesini destekleyen bir yöntemdir (192). Diş hekimi fobisi olan, döner aletler ve frezlerden, su soğutmasından rahatsız olan hastalar, mide bulantı refleksi tetiklenen hastalarda ve özellikle çocuk hastalarda döner aletlere alternatif gösterilmektedir (193,194). Mineralize ve demineralize dentinin ayırt edilerek sadece demineralize dentinin uzaklaştırılması amaçlanan bu yöntemde zayıflayan kolajen bağları daha da bozacak güçlü ajanlar kullanılmaktadır. Esas amaç sadece enfekte dentini temizleyerek, kavite tabanında kalan etkilenmiş dentinin remineralize olmasını sağlamaktır. Kemomekanik çürük temizleme yönteminde kullanılan ajanlar NaOCl bazlı veya enzimatik bazlı olabilmektedir (Tablo 2.2). Süt dişlerde ve sürekli dişlerde kemomekanik çürük temizleme ajanları kullanılabilmektedir. Özellikle süt dişi çürüklerinde kavitasyon varlığı daha sık görüldüğü ve kaviteye ajanı uygulamak daha kolay olduğu için bu ajanlar tercih edilebilmektedir (195).

Tablo 2.2: Kemomekanik çürük temizleme yönteminde kullanılan ajanlar

Sodyum Hipoklorit Bazlı Ajanlar	Enzimatik Bazlı Ajanlar
- GK-101 - GK-101E (Caridex) - Carisolv	- Papacarie - Carie-Care - Biosolv

2.4.3.7. Atravmatik Restoratif Tedavi: Minimal invaziv diş hekimliği görüşü altında birleşen yöntemlerden biri olarak bilinen ART; sadece enfekte demineralize dentinin uzaklaştırılarak; remineralize olma potansiyeli bulunan dentinin korunması olarak tanımlanmaktadır. ART’de dişten gereksiz madde kaldırmayarak sağlıklı diş dokusunun korunması amaçlanmıştır (196). Bu çürük temizleme yönteminde sadece el aletleri ve adeziv materyaller ile diş tedavisi tamamlanmaktadır. Klinik şartlara ihtiyaç duyulmadan uygulanabilen bu tedavi kırsal sahalarda, elektriğin ulaşmadığı bölgelerde uygulanabilir. Döner alet kullanımı olmadığı için küçük, kooperasyonu zayıf, engel durumu bulunan, hareket kontrolü zayıf hastalarda uygulanabilirliği oldukça yüksek bir tedavidir. Isı oluşumu olmadığı için pulpa hasarı riskinin azaldığı bu çürük temizle yönteminde lokal anestezi gereksinimi de ortadan kalkmıştır (196–198). ‘Hasta dostu’ tedavi olarak bilinen ART’de pulpanın etkilenmediği ve el aleti ile ulaşılabilen dentin çürüğünün temizlenmesinden sonra flor salınımı yapan yüksek viskoziteli cam iyonomer simanlarla (Ketac Molar Easymix (3M ESPE, Seefeld, Almanya), Fuji IX (GC, Tokyo, Japonya) veya rezin içerikli restoratif materyaller ile tedavi tamamlanmaktadır (197–199).

2.5. BAKTERİLER VE DİŞ ÇÜRÜĞÜ

Çürük oluşumu ve ilerlemesinin temelinde bakteriler yer almaktadır. Ağız içerisinde çok farklı mikroorganizmalar mevcuttur. 700’den fazla sayıda bakteriden oluşan ağız mikrobiyotasında bu mikroorganizmalar dil, ağız mukozası, damak, periodontal cep ve dişler üzerine kolonize olmuşlardır. Ağız mikrobiyotasında bazı bakteriler ağız sağlığı için faydalıyken bazıları patojen özelliktedirler (11). Çürük ile ilişkili plak biyofilminin ekolojisi incelendiğinde biyofilm pH’nın bakteri dengesinde etkili olduğu görülmüştür. pH seviyesinin düşmesiyle aside toleranslı bakteriler olan *Streptococcus* ve *Actinomyces* türlerinin arttığı görülmüştür (12).

Streptococcus mutans, çürük yapıcı bakteriler arasında en çok bilinendir. Neredeyse her insanın ağız mikrobiyotasında bulunduğu düşünülen *S. mutans*’ın diş yüzeyine tutunarak çürük oluşturabilmesi için ortamda fermente edebileceği sükröz gibi şekerlerin bulunması gerekmektedir. Sükröz; laktik asiti fermente ederek mine matriksini çözer. Bu fermentasyon sırasında suda çözünmeyen ekstraselüler polisakkaritler üreten *S. mutans* diş yüzeyine güçlü adezyon sağlar (13,14).

Yapılan bir çalışmada ağız ortamında bulunan diğer bakterilere göre *S. mutans*'in daha çok bakteriyosin ürettiği görülmüştür (15). Bu durumun *S. mutans*'in ağız içerisinde baskın tür olmasına neden olabileceği düşünülmektedir. Ağız içindeki yaşam alanının darlığı ve besin varlığının kısıtlılığı gibi nedenlerle mikroorganizmaların rekabet içinde varlıklarını sürdürmeleri gerekebilir. Örneğin *S. mutans* varlığında, *S. sanguinis* sayısı azdır. Çünkü bu iki bakteri yeterli besin olmadığı durumda birbirlerini inhibe edici özellik göstermektedir (17). Biyofilm oluşumunda ilk kolonize olan bakterilerden olan *S. sanguinis*'in ürettiği H₂O₂ antibakteriyel etki göstermektedir. *S. sanguinis*'in baskın olduğu mikrobiyotada *S. mutans* ve diğer patojen özellikteki bakteriler H₂O₂ aracılığı ile inhibe edilmektedir (17,18). Dişetindeki pelikül üzerine ilk tutunan bakterilerden olan *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*), *S. mutans* ile rekabet halindedir. Ek olarak *Streptococcus oralis* (*S. oralis*) ve *Streptococcus oligofermantas* (*S. oligofermantas*) dental biyofilmden izlenen bakterilerdendir. *S. sanguinis* gibi *S. oligofermantas*, *Streptococcus mitis* (*S. mitis*), *S. gordonii*, *S. oralis* ve *Streptococcus parasanguinis* (*S. parasanguinis*) de H₂O₂ üreterek *S. mutans* gelişimini inhibe etmektedirler (19).

Ağız mikrobiyotasının %1'ni oluşturan *Lactobacilluslar*, çürüğün ilerlemesinde etkilidirler. Dental biyofilmden izole edilen ve çürük oluşumunda etkili olduğu görülen *L. casei*, fermentasyon sonucu çok fazla laktik asit üretebilir ve geniş pH aralığında yaşayabilmektedir. *S. mutans*'in, *L. casei* ve diş yüzeyi arasındaki adezyonunu kolaylaştırdığı görülmüştür. *Lactobacillus* ailesinin bir başka üyesi *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) ise bakteriyosin üreterek, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Porphyromonas intermedia* (*P. intermedia*) ve *S. sanguinis*'in sitoplazmik membranında porlar oluşturarak gelişimlerini inhibe eder (16). Actinomyces grubu bakteriler ise birçok karbonhidratı fermente edebilir ve bunun sonucunda laktik asit, asetik asit, suksinik asit ve formik asit üretebilirler. Dental biyofilm oluşumu sırasında diş ve diş etine ilk kolonize olan *Actinomyces naeslundii* (*A. naeslundii*), dişlerde kök çürüklerine ve periodontal hastalıklara neden olmaktadır. *A. naeslundii*, antibakteriyel etki gösteren H₂O₂'i inhibe ederek birçok bakterinin dental biyofilm içindeki varlığını sürdürmesine yardımcı olarak patojen özellik gösterir (200). Bağırsak mikrobiyotasında izlenen *Bifidobacterium* ailesinden; *Bifidobacterium dentium* dişsiz ağızlarda kolonize olamazlar. Diş yüzeyindeki plakta düşük pH derecelerinde yaşamaya dayanıklı bakterilerdir (201).

Anne, Taner ve arkadaşları tarafından 2011 yılında belirlen anaerob gram pozitif *Scardovia wiggsiae* EÇÇ ve ŞEÇÇ olarak bilinen agresif ve yıkıcı diş çürüğü ile ilişkili bulunmuştur (202,203). *Scardovia wiggsiae*'nin asitlere karşı toleransının çok yüksek olduğu anlaşılmıştır. Hem başlangıç çürük lezyonlarında hem de ilerlemiş çürüklerle ilişkili olduğu tespit edilmiştir (204–206). Kavite preperasyonu sonrasında dentinin içinde kalan rezidüel bakterilerin enzimatik aktivitelerini sürdürerek sayılarında hızlı bir artış olduğu görülmüştür. Bir ayda sayılarını iki kat arttırabilen bu karyojenik mikroorganizmaların neden olduğu sekonder çürüğü, postoperatif hassasiyeti ve pulpal enflamasyonu önlemek amacıyla restorasyon tamamlanmadan önce kavite dezenfeksiyonu önerilmektedir. Kullanılan kavite dezenfektanlarının; antibakteriyel özelliklerinin, restoratif materyal - diş arasındaki bağlanma dayanımına etkisinin ve mikrosızıntıdaki rolünün bilinmesi önemlidir (20,21,207).

2.6. KAVİTE DEZENFEKSİYON MATERYALLERİ

Kavite preperasyonu tamamlandıktan sonra, enfekte dentinin tespit edilmesi için klinik ortamda en çok sond ve ayna kullanılmaktadır. Dokunma ve görsel duyularla yapılan bu teşhis objektif veriler sunmamaktadır. Klinik tecrübe gerektiren bu teşhis yöntemi bakterilerin durumuyla ilgili yeterli veri vermemektedir (20,21,207). Çürük tespitinde objektif veriler sunan indikatörler kullanılarak temizlenmiş kavite dezenfeksiyonunda %15-40'ında bakteri tespit edilmiştir. Enzimatik aktiviteleri devam eden bu bakteriler üreyerek dentinin organik ve inorganik yapısını yıkama uğratmaktadır (208,209). Restorasyonu tamamlanmış bir dişte, restoratif materyal altında tekrardan başlayan bakteri aktivitesi; postoperative hassasiyet, sekonder çürük ve pulpal enflamasyonlara neden olmaktadır. Dişin kırılması, restorasyonun yenilenmesi, pulpal tedaviler ve diş çekimi ile sonuçlanabilen bu durumu önlemek için kavite dezenfeksiyonu önerilmektedir (20,21,208–210). Günümüzde kullanılan kavite dezenfeksiyon materyalleri oldukça çeşitlidir (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Kavite dezenfeksiyon materyalleri

Kavite Dezenfeksiyon Materyalleri			
- Klorheksidin Diglukonat - Sodyum Hipoklorit - Hidrojen Peroksit - Benzalkolyum Klorür - İyodin Solüsyonları - Fosforik Asit - Fluorid - Ozon - 12-Methacryloyloxy-Dodecylpyridinium Bromid - İçerikli Adeziv Sistemler - Kuaterner Amonyum Silan	- Lazerler	- Fenotiyazinler (metilen mavisi ve toluidin mavisi) - Ftalosiyeninler - Porfirinler - Xanthene (eritrosin)	- Propolis - <i>Aleo vera</i> - <i>Morus nigra</i> (Karadut) - Misvak ağacı (<i>Salvadora persica</i>) - <i>Morinda citrifolia</i> (Noni) - Zerdeçal

2.6.1. Klorheksidin Diglukonat

İngiltere’de 1940’larda geliştirilen CHX bir bisbiguaniddir (211). 1969’da Schroeder ilk kez diş plağı üzerindeki antiseptik etkisini araştırmıştır (212). Loe ve Schiott 1972’de CHX’in diş plağı üzerindeki antibakteriyel etkisi sayesinde diş çürüğünü önleyebileceğini gösteren bilimsel çalışmayı yürütmüştür (213). CHX, suda az çözünen diglukonat, asetat ve hidroklorür tuzları gibi çeşitli formlarda bulunur (25). CHX’in moleküler yapısı simetriktir. Moleküler yapının merkezinde konumlanan heksametilan köprüsüyle birbirine bağlanan iki tane biguanid grubuna bağlı dört tane klorofenil halkasından oluşmaktadır (25). Pozitif yüklü CHX, negatif yüklü bakteri hücre duvarının bütünlüğünü bozmaya başlar ve bakterinin hücre zarına ulaşır. Hücre zarının yapısını oluşturan fosfolipitlere bağlanır. Zarar gören hücre zarından düşük moleküler ağırlıktaki potasyum iyonları dışarıya sızmaya başlar. Bunun sonucunda hücre sitoplazmasında kimyasal çökelmeler ve pıhtılaşmalar oluşarak bakteri ölümü gerçekleşir. Böylece CHX bakterisidal etkisini göstermiş olur (25,214).

Klorheksidin Diglukonatın gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etkisinden dolayı, restoratif materyal ile tedavi tamamlanmadan önce kavitede kalan rezidüel mikroorganizmaların eliminasyonu için CHX ile dezenfeksiyon önerilmektedir (22,44,207,209,215–220). Aynı zamanda yer tutucu, ortodontik aperey ve sabit protetik restorasyonların simantasyonundan önce de diş yüzeyine uygulanması önerilmektedir (21,216–218,221). CHX farklı konsantrasyonlarda farklı markalarla piyasada bulunmaktadır. Cervitec (%0,2 CHX, Vivadent, Liechtenstein), Cervitec Plus (%1 Klorheksidin diasetet, Vivadent, Liechtenstein), Klorhex (%0,2 CHX, Drogas, Türkiye), Cavity Cleanser (%2 CHX, Bisco, Schaumberg), Corsodyl (%1 CHX, GlaxoSmithKline, ABD) ve Consepsis Scrub (%2 CHX, Ultradent, SJ) örnek verilebilir (20,44,217–219). Lessa ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada farklı konsantrasyonlardaki CHX’lerin bakteriler üzerinde farklı etki gösterdikleri görülmüştür. Yüksek konsantrasyonlarda bakterisidal, düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik etki gösterdiği görülmüştür (44,215).

2.6.2. Sodyum Hipoklorit

Sodyum Hipoklorit; seyreltilmiş kostik sodanın klor ile reaksiyona girmesi sonucu oluşan yeşilimsi renkli bir sıvıdır (222). NaOCl, spektrumu geniş antimikrobiyal bir ajandır. Bakteriler, sporlar, mantarlar ve virüslere karşı etkili olduğu bilinmektedir (27,222). Diş hekimliğinde kök kanallarının dezenfeksiyonu (223) ve vital pulpa tedavilerinden önce kavitenin dezenfeksiyonunda kullanılmaktadır (27). Fakat NaOCl iyonlarına ayrıştığında ortaya çıkan oksijen; rezin bazlı restoratif materyallerin polimerizasyonunu engellemektedir. Bu nedenle kavite dezenfektanı olarak kullanımı tartışılmaktadır (27,224).

2.6.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen Peroksit güçlü antibakteriyel özellik göstermesinde etki mekanizması; köpürme ve oksidasyon özelliklerine dayanmaktadır (20,210). Antibakteriyel etkisinin; *S. mutans*, *S. aureus* ve *L. acidophilus* üzerinde CHX göre daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Antibakteriyel etkisini oksijen ve suya kadar ayrıştığı bilinmektedir (28,225,226). Açığa çıkan oksijenin rezin esaslı restoratif materyallerin polimerizasyonu inhibe etmesi H₂O₂’nin dezavantajıdır (20,210,225).

2.6.4. Benzalkolyum Klorür

Benzalkolyum klorür, bakterisidal özelliğini; gram negatif bakterilerin hücre zarındaki polisakkaritlerine; gram pozitif bakterilerin hücre duvarındaki PO₄ gruplarına bağlanıp seçici geçirgenliği bozarak gösterir. *S. mutans*, *S. salivarius*, *Actinomyces viscosus*, *L. acidophilus*, ve *S. aureus* gibi oral mikrobiyotada bulunan bakteriler üzerinde güçlü antibakteriyel etki göstermektedir. Piyasada Ubulicid Blue ve Tubulicid Red isimli prepatlar halinde bulunan benzalkolyum klorür kavite dezenfeksiyonunda %0,4-1,6'lık konsantrasyonları kullanılır (20,28,210).

2.6.5. İyodin Solüsyonları

İyodin solüsyonları; gram pozitif ve gram negatif bakterilerin hücre duvarından elektron geçiş mekanizmasını bozarak antibakteriyel etki gösterir. En çok kullanılan iyodin solüsyonları povidon iyodin ve poloksamer iyodindir. *S. mutans*, *L. acidophilus*, ve *S. aureus* üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği raporlanmıştır (20,23,28,210).

2.6.6. Fosforik Asit

Adeziv restoratif tedavilerde, dentindeki smear tabakası uzaklaştırılmasını sağlamak ve bağlanma kuvvetini artırma amacıyla dentin bonding öncesinde %37'lik H₃PO₄ uygulanmaktadır. Mikroorganizmalar için uygun bir ortam olan smear tabakasının uzaklaştırılmasını sağlayan H₃PO₄'ün kavite dezenfeksiyonu açısından önemi savunulmaktadır (227).

2.6.7. Florür

Çürük profilaksisinde en çok tercih edilen ajan olan ve remineralizasyon etkisiyle bilinen florür farklı etki mekanizmalarına sahiptir. Tükürükte bulunan Ca ve PO₄ florür ile birlikte mine yapısına katılarak remineralizasyonu sağlar. Bakterilerin asit üretimi yaparak tükürük pH'nı azaltmalarına neden olan enerji metabolizmalarını inhibe eder. Aynı zamanda bakteri hücre zarının yapısını dejenere ederek bakterisidal etki de gösterir (31,218,221). Uygun yapıdaki florürün remineralizasyon ve antibakteriyel özellikleri düşünüldüğünde kavite dezenfeksiyonunda kullanılabileceği gündeme gelmiştir (21,30,31,218).

2.6.8. Ozon

Ozon, atmosferdeki oksijenin güneşten gelen Mor Ötesi Işıklar (UV) ile parçalanması sonu oluşan renksiz bir gazdır. Bakterilerin glikoproteinler, aminoasitler ve glikolipidler gibi yapılarını etkileyerek enzimatik sistemlerini bloke eden ve hücre duvarlarının parçalanmasına neden olan ozon güçlü bir antibakteriyeldir (228,229). Bu özelliklerinden dolayı diş çürüğü oluşumu üzerinde etkili olabileceği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda ozon uygulamasının *S. mutans*, *S. sobrinus* ve *L. Casei* üzerinde %99 bir azalma sağladığı görülmüştür (219,228–230).

2.6.9. 12-Methacryloyloxy-Dodecylpyridinium Bromid İçerikli Adeziv Sistemler

12-Metakriloyloxy-Dodecylpyridinium Bromür (MDPB) içerikli adeziv sistemlerin; kavite üzerine uygulandığında, polimerize olmadan önce antibakteriyel etkinliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (231–233).

2.6.10. Kuarterner Amonyum Silan

Kuarterner Amonyum Silan (QAS) bileşikler cilt üzerinde, mukoza zarları üzerinde dezenfektan olarak kullanılan güçlü katyonik özelliğe sahiptir (234). Bu bileşikler katyonik özellikleri sayesinde bakterilerin anyonik hücre duvarını etkileyerek büyümelerini inhibe eder (234–236). U. Daood ve arkadaşlarının 2018 yılında yaptığı *in vitro* çalışmada çürük oluşumunda etkili *S. mutans* ve *L. acidophilus* biyofilmine karşı QAS'ın güçlü antibakteriyel etkinliği izlenmiştir (220).

2.6.11. Lazerler

'Lazer' terimi hızlandırılmış ve yoğunlaştırılmış enerji taşıyan ışık demetini ifade etmektedir (237). Diş hekimliğinde kullanılan lazerler; Er:YAG, Er,Cr:YSGG lazerler, diod lazer, Nd:YAG lazerle, CO₂ lazerler ve argon lazerlerdir (238–241). Gücü çok yüksek olan lazer ışığı, karyojenik organizmalar üzerinde bakterisidal özellik göstermektedir. Mikroorganizmalara karşı farklı lazerlerin antibakteriyel etkilerini inceleyen çalışmalar mevcuttur (34,242–247).

2.6.12. Antimikrobiyal Fotodinamik Terapi

Günümüzde kullanımı yaygınlaşan kavite dezenfeksiyon sistemlerinden biri de antimikrobiyal fotodinamik terapidir. Minimal invaziv, lokal olarak etkili ve tekrarlanabilir bir tedavi yöntemi olan fotodinamik terapi; fotosensitizör madde ve ışık kaynağından oluşan bir sistemdir. Serbest radikaller üreterek antibakteriyel etki gösteren fotosensitizör madde, ışık kaynağının kullanımıyla aktifleştirilir. Oksijen varlığında açığa çıkan singlet oksijen, süperoksit, hidroksil gibi serbest radikaller; bakteri hücre duvarına, yapısal proteinlere, membran lipidlerine ve nükleik asitler gibi temel hücresel moleküllere zarar vererek hücre ölümlerine neden olur (46,248). Kullanımı yaygın fotosensitizör maddelere; fenotiyazinler (metilen mavisi ve toluidin mavisi), ftalosiyeninler, porfirinler, xanthene (eritrosin) örnek gösterilmektedir. Aynı zamanda zerdeçal da antibakteriyel fotodinamik terapide kullanılan bitkisel fotosensitizör olarak bilinmektedir (39,40,249). Diş hekimliğinde en yaygın kullanılan fotosensitizör maddeler metilen mavisi ve toluidine mavisidir (39,42,250). Antibakteriyel, antiviral ve antifungal özellikleri gösteren metilen mavisi ve toluidine mavisinin temini de oldukça ekonomiktir (39). Metilen mavisi düşük moleküler ağırlığa sahip katyonik fenotiyazin boyasıdır (251). Metilen mavisi gram negatif ve gram pozitif bakterilerin plazma mebranları üzerinde inhibe edici etki gösterirken, bakteri sitoplazmalarına ve DNA'larına zarar vermektedir (252). Dentin üzerine uygulanan metilen mavisi ışık ile aktive edildikten sonra açığa çıkan reaktif oksijen tabakası dentin üzerinde birikir ve hidrofilik bir yüzey oluşmasına neden olur. Bu durumun diş ve restorasyon arasındaki bağlanmayı negatif etkilediğini gösteren çalışmalar mevcuttur (43,253,254).

2.6.13. Zerdeçal

Zerdeçalın sarı pigmentasyonu sağlayan ana yapılardan biri olan kurkumin; doğal polifenolik fitokimyasaldır (255,256). Kurkumin ile ilgili yapılan çalışmalarda antioksidan (256), antiinflamatuvar (255,257), antibakteriyel (256,257), antifungal (258) ve antikarsinogenik (259) etkileri olduğu görülmüştür. İnsanlar ve hayvanlar üzerinde yüksek dozlarda bile düşük toksisiteye sahip olduğu görülmüştür (260). Kurkiminin antimikrobiyal fotodinamik terapi ile de kullanıldığı çalışmalarda düşük dozlarda ışık uygulaması ile emilim alanının genişlediği ve antimikrobiyal etkilerinin arttığı görülmüştür (45,261). Fakat çözünürlüğünün düşük, yarılanma ömrünün kısa ve stabilitesinin zayıf olmasından dolayı klinik kullanımı kısıtlanmıştır (261,262).

2.6.14. Propolis

Propolis, antibakteriyel, antifungal, antimikrobiyal özelliklerinin yanında iyileştirici ve antiinflamatuvar biyolojik özellikleriye bilinen bal arılarının doğal flavonoid açısından zengin ürünüdür (263). Propolis ile ilgili yapılan çalışmalarda antibakteriyel etkisinin olduğu ve kavite dezenfeksiyonunda kullanılarak sekonder çürük oluşumunu engellemede faydalı olabileceği sonucuna ulaşılmıştır (33,263).

2.6.15. *Aleo vera*

Aleo vera'nın antimikrobiyal, antioksidan, antiinflamatuvar özelliklere sahip olduğunu ve sitotoksitesinin az olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (33,216). George ve arkadaşları tarafından yürütülen bir çalışmada *Aleo vera*'nın *S. mutans* üzerinde antiseptik özellik gösterdiği tespit edilmiştir (35).

2.6.16. *Morinda citrifolia*

Morinda citrifolia, hint dutu, plaj dutu gibi 100'den fazla isimle bilinen Güney Asya bölgesinde yetişen sulu bir meyvedir. Ticari ismi noni olarak bilinen tropikal bölgelerde yetişen ve yüz yıllardır kullanılan bitkisel ilaçlardandır (264). Suyunun antibakteriyel, antifungal, antiviral, antitümör, analjezik, antiinflamatuvar ve bağışıklık güçlendirici etkileri olduğu bilinmektedir (265,266). 2008 yılında Murray ve ekibinin yürüttüğü bir çalışmada endodontik irrigant olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (265).

2.6.17. Misvak Ağacı (*Salvadora persica*)

Milattan önce 3500 yıl öncesinde dişleri ve ağzı temizlemek amacıyla misvak çubuklarının kullanıldığını bildiren antik Yunan ve Roma literatürlerinde bildirilmiştir (267). Dünya sağlık örgütünün 2000 yılında yayınladığı Ağız Hijyeni Konsensüs Raporu'nda misvak çubuklarının ağız hijeni için önemi belirtilmiştir (268). Yapılan çalışmalarda misvağın, *S. mutans*, *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Candida albicans* ve *S. aureus* gibi oral mukozada sık karşılaşılan bakteriler üzerinde antimikrobiyal bir etkisi olduğu görülmüştür (269–272).

2.6.18. Karadut (*Morus nigra*)

Türkiye’de karadut olarak bilinen *Moraceae* ailesine ait ağaç formunda bir bitkidir. Latince gecikme anlamındaki ‘mora’ kelimesinden türediği düşünülen Morus adı; en geç çiçek açan bitkilerden biri olmasını da çağrıştırmaktadır. Soğukların tamamen bittiği dönemde çiçek açtığı için ağaçların akıllısı olarak da anılmaktadır. Orta Asya ve Güneybatı Asya için yerel bitki türüdür. Akdeniz ve Avrupada’da uzun yıllardır yetişmekte olan karadut için Anadolu da oldukça uygun şartlara sahiptir (273). Karadut ağacının meyveler, yaprakları, gövde kabukları ve kökleri gibi tüm kısımları tedavi amaçlı kullanılmaktadır. En yaygın kullanım formları pekmez, meyve suyu ve marmelatıdır (273,274). Özellikle ağız yaralarında kullanımıyla bilinmektedir. Karadut, biyolojik olarak aktif birçok bileşik içermektedir. Flavonoidler, karotenoidler, fenoller, antosiyaninler, yağ asitleri, askorbik asit ve çeşitli organik asitler bu bileşiklere örnek gösterilebilir (274–276). Ayrıca antienflamatuar, antitussif ve antipiretik amaçla da kullanılan karadut ile yapılan çalışmalarda yaprak, meyve ve kök kabuğu ekstraktlarının; *S. mutans*, *S. aureus* gibi gram pozitif ve gram negatif bakteriler üzerinde antibakteriyel aktivite gösterdikleri izlenmiştir (36,37,48,49,275–279). Budiman ve arkadaşlarının 2020 yılında yaptığı in vitro çalışmada karadut ekstresinin *S. mutans*’ın hücre duvarına zarar vererek antibakteriyel etki gösterdiğini bu nedenle çürük önleyici ajanlar için ham madde olarak kullanılma potansiyeli olduğunu belirtmişlerdir (38). Bu tezde; birçok çalışma sonucunda antimikrobiyal özellikleri kanıtlanan karadut, sekonder çürüğü önlemek için kavite dezenfeksiyonunda kullanılan diğer deney ajanları ile karşılaştırmak amacıyla kullanılacaktır.

2.7. ANTİBAKTERİYEL AKTİVİTE DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Antimikrobiyal bir ajanın, belirli bir bakteri suşuna karşı aktivitesini belirlemek için uygulanan antimikrobiyal duyarlılık testleri için birçok farklı yöntem kullanılmaktadır (50).

2.7.1. Difüzyon Yöntemi

Saf bir bileşiğin veya bir ekstrenin antibakteriyel aktivitesini değerlendiren *in vitro* bir testtir. Agar-disk difüzyon, Antimikrobiyal Gradian Metodu (E test) bu metoda örnek olarak gösterilen testlerdir (50).

2.7.1.1. Agar-Disk difüzyon yöntemi: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü tarafından kabul görmüş, 1940 yılından bugüne birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarı tarafından rutinde kullanılan antibiyotik duyarlılık testidir. Maliyetinin düşük olması, basit bir uygulama prosedürü ile birçok mikroorganizma ve antimikrobiyal ajanı test edebilmesi gibi avantajları vardır. Agar içinde ne kadar antimikrobiyal maddenin yayıldığı tespit edilemeyeceği için MİK, agar-disk difüzyon yöntemi ile belirlenemez (50,51).

2.7.2. İnce Tabaka Kromatografisi - Biyootografi

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC) - biyootografi yöntemi, bitkisel ekstraktların antibakteriyel ve antifungal aktivitelerini değerlendirmek için kullanılır. Antimikrobiyal ilaçların değerlendirilmesi için kullanılan biyootografi prosedürü; agar difüzyon, direkt biyootografi ve agar-üst katman testi olmak üzere üç çeşittir (50).

2.7.3. Dilüsyon Yöntemi

Seyreltme metodu olarak da bilinen bu yöntemde antimikrobiyal ajanın, agar veya beyin infüzyon sıvısı gibi seyrelticilerdeki konsantrasyonu belirlemede kullanılır. MİK'i belirlemek için en uygun olan yöntemlerden biridir (50).

2.7.4. Zamana Bağlı Öldürme (Time- Kill) Testi

Antimikrobiyal ajanın bakterisidal ve fungisidal aktivitelerini, zamana ve konsantrasyonlarına bağlı olarak belirleyen bir yöntemdir (50).

2.7.5. Adenozin Trifosfat Biyoluminesans Yöntemi

Tüm canlı hücrelerin kimyasal enerji formu olan ATP her hücre için sabit bir değere sahiptir. Biyoluminesans yöntemi ile bakteri ve mantarların oluşturduğu ATP ölçülerek mikrobiyal popülasyon tahmin edilir. ATP biyoluminesans yöntemi kısa sürede sonuçlanan bir testtir (50).

2.7.6. Akış Sitometrisi Yöntemi

Akış sitometrisi metodunda, organizmanın canlılığı ve hücre hasarı üzerindeki etkileri değerlendirilir. Bu prosedür antimikrobiyal direncin saptanmasına yöneliktir. Hasar görmüş hücreler boyanarak; ölü, canlı ve yaralı olarak üç alt başlıkta sınıflandırılır (50).

2.8. BİYOFİLM İNCELEME YÖNTEMLERİ

Biyofilm; diş yüzeyi veya dental materyal üzerinde üreyerek, üç boyutlu bir yapı oluşturan karmaşık mikrobiyal bir topluluktur. Biyofilm içeriği; polimerik maddeler, canlı/ölü hücreler ve hücre sel salgılardan oluşmaktadır. Biyofilm analizleri mikroorganizmaların canlılığını, miktarını, türünü, yaşını, kalınlığını, yapısını ve yüzey topografisi gibi birçok özelliğini belirlemek için kullanılır. Mikrobiyolojik kültür yöntemi, kolorimetrik yöntem, mikroskopik yöntem, SEM, CLSM, fiziksel metot, biyokimyasal metot, moleküler biyolojik metot gibi birçok farklı yöntemle incelenir (52).

2.8.1. Mikrobiyal Kültür Yöntemi

Canlı hücrelerin sayısını belirlemek için kullanılan standart bir yöntemdir. Koloni Oluşturan Birim (CFU) tekniği veya aerobik plak sayımı olarak bilinen bu teknik ile sadece koloni oluşturabilen canlı hücrelerin sayımı yapılabilir (52).

2.8.2. Kolorimetrik Yöntem

Bakterilerin boya emilimine dayana bu yöntemde; biyofilmdeki bakteri hücre sinin bir boya ile boyandıktan sonra yüzey aktif bir madde ile parçalanarak, boya yoğunluğunun spektrofotometre ile ölçüldüğü bir yöntemdir (53).

2.8.3. Mikroskopik Yöntem

Bakterinin yüzeye yapışmasını inceleyen bu yöntemde mikroskop ve bakterinin boyanması için cihaza uygun bir boya kullanılmaktadır. Mikroskop incelemesinde; yüzeye yapışan hücre sayısı, yüzeyin bakteriler tarafından kaplanan alanı, bakteri türü, sayısı, canlılığı ve dağılımı kaydedilir (52). Işık mikroskobu, floresan mikroskobu, SEM, transmisyon elektron mikroskobu, CLSM, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve epifloresan mikroskobu gibi mikroskopi teknikleri, bakteriyel yapışmayı değerlendirmek için kullanılabilir. Fiksasyon ve dehidratasyon gibi hassas çalışma gerektiren örneklerin hazırlık süreci bu metodun dezavantajıdır (52).

2.8.4. Taramalı Elektron Mikroskopu

Manfred von Ardenne 1938'de SEM'i icat etmiştir. Yüksek voltajlı elektronlar, yüzeyi tararken diş yüzeyine temas eder. Ortaya çıkan sinyaller toplanarak bir ekrana yansıtılır (52).

Mine yüzeyinin topografik yapısındaki değişikliklerin derinlemesine analizini sağlayan SEM ile üretilen görüntüler mükemmel alan derinliğine sahiptir (54). SEM, ışık mikroskopundan 300 kat daha fazla odak derinliği ve 20-100,000 kat daha net görüş sağlar. Farklı büyütmelerde (x20-x10,000 veya daha yüksek) inanılmaz derecede ayrıntılı görüntüler verebilir (52,56). Yüzeyin görünür olması için örneklerin elektronları yansıtan bir maddeyle kaplanması gerekir. Örnekler ince bir Altın - Paladyum Alaşımı (Au/Pd), Platin (Pt), Altın (Au) veya Karbon (C) tabakası uygulanabilir. Bu işleme "püskürtme" veya "püskürtme kaplama" denir (56). Bu yöntemin dezavantajı, örnekleri hazırlamak için dehidratasyon, fiksasyon, kurutma ve püskürtme gibi çok sayıda ön hazırlık gerekmektedir. Bu işlemlerin hassas yapılmadığı durumlarda biyofilm yüzeyi üzerinde yanıltıcı değişiklikler olabilir (52).

2.8.5. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop

Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop kullanımı oldukça yaygın, invaziv olmayan 3 boyutlu mikroskopik görüntüleme yöntemidir. CLSM yönteminde örnekler floresan boya ile boyanarak taramalar yapılır. Tarama örnekler, yüksek kaliteli üç boyutlu görüntüler oluşturmak için x, y ve z düzlemlerinde katmanlanır (52). Sadece 50–200 mm kalınlıktaki örneklerde kullanılabilen CLSM, biyofilmin yapısını analiz etmek için temel bir yöntemdir.

Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop analizi için floresan boya kitinde (LIVE/DEAD BAC light) canlı ve cansız hücreleri boyayan 1:1 oranında karıştırılarak kullanılan iki bileşenli boya (Syto 9 ve propidium iyodür) bulunmaktadır. Düşük iyonik yükü ile DNA'ya yüksek afinitesi bulunan propidium iyodür cansız hücrelerin boyanmasını sağlarken, Syto 9 canlı ve cansız hücrelerin boyanmasında kullanılır (52,55). CLSM görüntülemelerinde cansız hücreler kırmızı, canlı hücreler yeşil ışık yayar. CLSM ile oluşturulan görüntülemelerin kantitatif karakterizasyonu ölçmek için üretilen görüntüler; MATLAB (MathWorks- R2018a)'da yazılımı yapılan COMSTAT programına aktarılır. CLSM'de üretilen üç boyutlu görüntüler COMSTAT'da ham veri olarak kullanarak görüntülerdeki biyofilmin miktarı, koloni hacmi gibi özelliklerin sayısal değerlerini verir (29,57,58,280).

2.8.6. Fiziksel Yöntem

Işık mikroskopu ile biyofilmin büyümesi; ağırlık, kalınlık, kapladığı alan ve yoğunluk gibi temel fiziksel değişkenler kullanılarak ölçülür (52).

2.8.7. Biyokimyasal Yöntem

Tüm biyofilmin ıslak ve kuru ağırlığı, hücre içeriklerinin, hücresel aktivitelerinin ölçümlerinin yapıldığı yöntemdir. Bu ölçümlerle belirli bir bölgedeki mikroorganizmaların toplam sayısını veren mikrobiyal biyokütledeki değişimler değerlendirilir (52).

2.8.8. Moleküler Biyolojik Metot

Bu yöntemle biyofilmi oluşturan bakterilerin genleri ile ilgili bilgilere ulaşılır. Bakterilerin bir arada kalarak biyofilm oluşturma şekilleri incelenen bu yöntemde tanımlanmış düzenleyici mutantlar ve mikrodizi analizi kullanılır (52). Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Testi (ELISA), bir numunenin önemli antijenlere veya antikorlara sahip olup olmadığını belirlemenin hassas bir yoludur (281). Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), küçük DNA dizilerini hızlı bir şekilde çoğaltmak için kullanılan bir tekniktir. PCR, termal döngü ve enzimatik DNA çoğaltmasını kullanır. Üretilen DNA, replikasyon için bir şablon olarak kullanılır. Bu analiz ile bir bakteri DNA'sının mevcut olup olmadığını belirlenebilir. Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Q-PCR) ise belirli bir DNA molekülünü aynı anda çoğaltmak ve ölçmek için kullanılan bir yöntemdir (281).

2.8.9. Güncel Biyofilm Değerlendirme Yöntemleri

Son zamanlarda bakter hücreleri - temas yüzeyi ve bakterilerin kendi arasındaki temas kuvvetleri, AFM ile incelenmektedir (281,282). Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanımı yaygınlaşan yöntemlerdendir. Bu yöntemde olgunlaşmış biyofilme kızılötesi radyasyon gönderilir. Bu radyasyonun bir miktarı biyofilm içinden geçerken bir kısmı emilir ve bu prosedürde biyofilm yapısındaki kimyasal bileşenler, nitel ve nicel olarak analiz edilmiş olur (281).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışması karadut ekstresi, metilen mavisi ve CHX'in; *S. mutans* ve *L. casei* üzerindeki antibakteriyel etkileri ile bu bakterilerin dentin disklerinde oluşturdıkları biyofilm üzerindeki etkilerinin incelenmesi amacıyla *in vitro* olarak; Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda ve İstanbul Üniversitesi Temel Bilimler Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Hamidiye Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun 16.02.2024 tarihli ve 24/95 kayıt numaralı etik kurul onayı alındı (EK-1.Etik Kurul Kararı).

3.1. ANTİMİKROBİYAL AJANLARIN ELDESİ

3.1.1. Klorheksidin Diglukonat

Klinik ve laboratuvar kullanımına uygun sıvı formda %2 CHX (Cavity Cleanser Bisco, USA) temin edildi (Şekil 3.1).



Şekil 3.1: Cavity Cleanser (Bisco, USA)

3.1.2. Metilen Mavisi

Metilen mavisi özel bir laboratuvar tarafından (Kimya Ofisim) %0,02'lik orana uygun, 250 mg alkali solüsyon formunda üretildi (Şekil 3.2). Metilen mavisinin fotodinamik terapiye uygun şekilde aktiveştirilmesi için klinik ortamda polimerizasyon için kullanılan, 420 nm - 480 nm dalga boyuna sahip ışık yoğunluğu 1000 – 1700 mW /cm² olan LED ışık (Woodpecker LED- D) (Şekil 3.3) cihazı uygulandı.



Şekil 3.2: %0,02'lik Metilen mavisi (Kimya Ofisim)



Şekil 3.3: Woodpecker LED- D (Paşa dental)

3.1.3. Karadut (*Morus nigra*) Ekstresi

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Fitoterapi Laboratuvarı'nda bu tez çalışmasında kullanılmak amacıyla özel olarak üretimi gerçekleştirilen karadut ekstresi için Balıkesir iline bağlı Burhaniye mevkiinden toplanan karadut yaprakları (Şekil 3.4) yarı gölge ortamda kurutulmuş şekilde temin edildi (Şekil 3.5).



Şekil 3.4: Balıkesir Burhaniye mevkiinden toplanan karadut yaprakları



Şekil 3.5: Yarı gölge ortamda kurutulmuş karadut yaprakları

Bitkinin botanik teşhisi Altınbaş Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Herbarium’unda yapıldı. Bitkinin herbarium kaydı (Şekil 3.6) Altınbaş Üniversitesi’nde saklanmaktadır (Herbarium numarası: HERA1274).

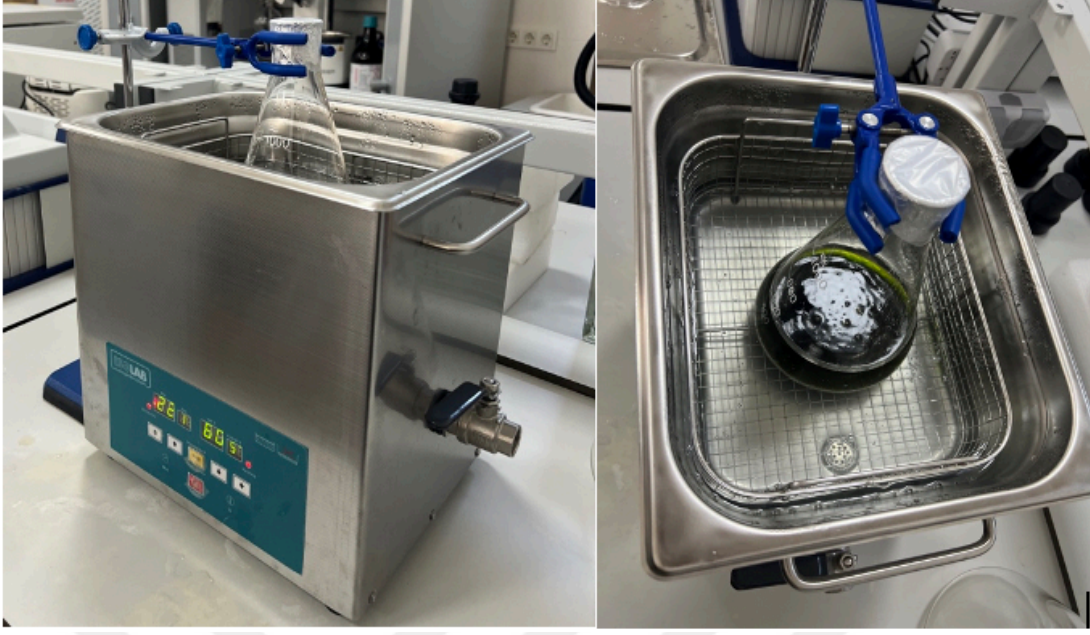


Şekil 3.6: *Morus nigra* herbaryum kayıt belgesi

Kurutulmuş karadut yaprakları öğütülerek toz haline getirme işlemi (Şekil 3.7) Sağlık Bilimleri Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, Fitoterapi Laboratuvarı'nda tamamlandıktan sonra %70 oranında hazırlanan etil alkol - su karışımı ile 60 °C sıcaklığa ayarlanmış sonikatörde (ISOLAB Laborgetate GmbH, Almanya) karadut tozu ve %70'lik etil alkolün moleküler seviyede karışabilmesi amacıyla 60 dk bekletildi (Şekil 3.8).

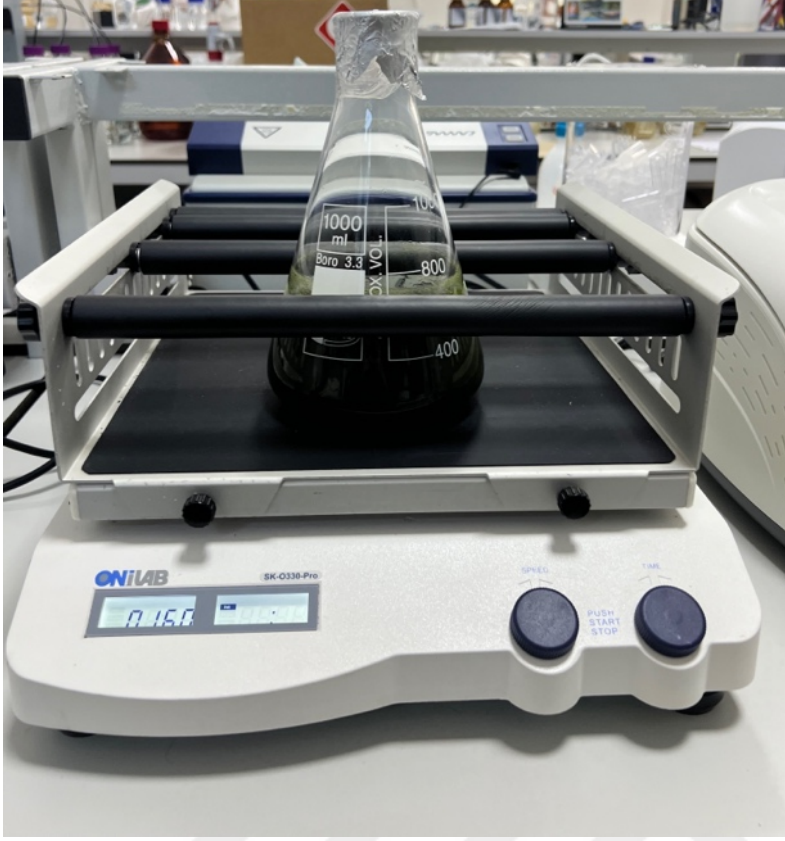


Şekil 3.7: Toz haline getirilmiş karadut



Şekil 3.8: %70 oranında hazırlanan etil alkol - su karışımının 60 dk sonikatörde (ISOLAB Laborgetate GmbH, Almanya) bekletilmesi

Ardından 8 saat boyunca orbital çalkalayıcıda (OniLab-Sk-0330-Pro) homojenize olarak karışımını sağlamak amacıyla ekstraksiyonu yapıldı (Şekil 3.9). İki katlı süzme kağıdında karadut posası etil alkol - su karışımından süzülerek ayrıştırıldı (Şekil 3.10). Posasından ayrılan karadut - etanol karışımı rotavapore (Büchi R-300) ekstre oluşumu için aktarıldı (Şekil 3.11).



Şekil 3.9: Karışımın orbital çalkalayıcıda (OniLab-Sk-0330-Pro) 8 saat bekletilmesi



Şekil 3.10: İki katlı süzme kağıdında karadut posasının, etil alkol - su karışımından süzülerek ayrıştırılması

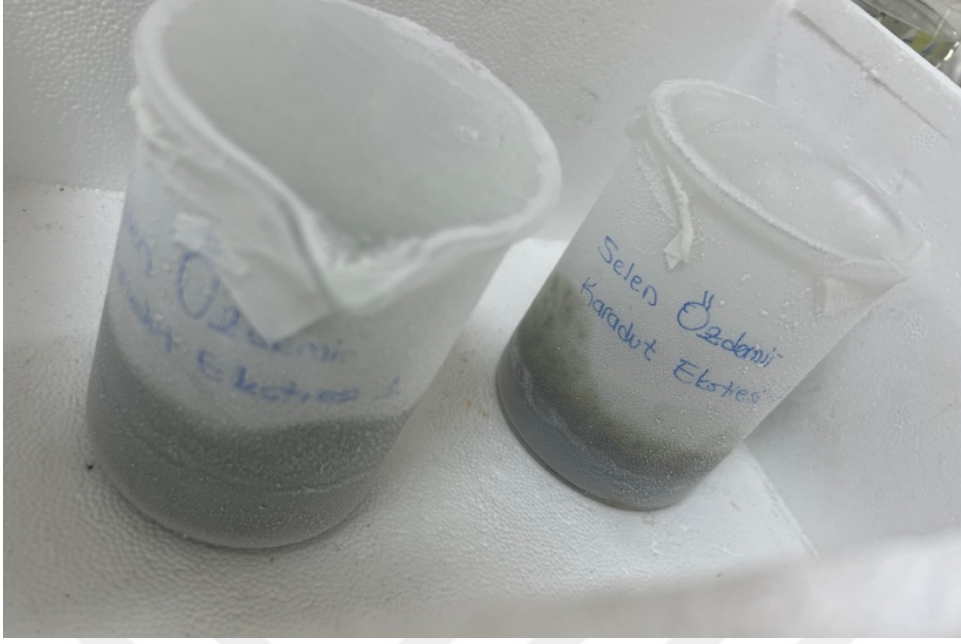


Şekil 3.11: Karadut - etanol karışımının ekstre oluşumu için rotavapor cihazına (Büchi R-300) aktarılması

Karışımındaki tüm etil alkol rotavapor (Büchi R-300) ile alçak basınçta yoğunlaştırıldı. Elde edilen karadut ekstresi ve sudan oluşan yeni ürün (Şekil 3.12) -80 °C dondurularak saklandı (Şekil 3.13). Dondurulmuş son ürün, içerdiği suyun tamamı uçurularak sadece %100 karadut ekstresi formunda toz elde etmek amacıyla -80 °C alçak basınçta liyofilizatörde (Büchi L-200) 2 hafta bekletildi (Şekil 3.14). %100 karadut içerikli toz formuna gelen ekstre mikrobiyoloji deneylerinde kullanılmak üzere +4 °C ışıık geçirmeyecek şekilde saklandı.



Şekil 3.12: Karadut ekstresi ve sudan oluşan yeni ürün



Şekil 3.13: -80 °C dondurularak saklanan karadut ekstresi



Şekil 3.14: %100 karadut ekstresi formunda toz elde etmek amacıyla liyofilizatörde (Büchi L-200) 2 hafta bekletilen donmuş ürün

Toz formundaki karadutun dentin disklerine uygulanabilirliğinde standardizasyon sağlamak amacıyla Dimetil Sülfoksit (DMSO) ile stok solüsyon oluşturuldu. 17,4 °C'deki laboratuvar ortamında 1 mL DMSO içerisinde 100 Miligram (mg) karadut ekstresi tozunun çözüldüğü kaydedildi. Karadut ekstresi DMSO ile çözündürülerek stok solüsyon oluşturuldu. Çünkü etanol karışımının içeriğinde bulunan etil alkolün antibakteriyel etki göstererek çalışma sonuçlarını etkilememesi amaçlanmıştır.

Karadut ekstresinin stok solüsyon oluşumunda tercih edilen DMSO'nun %5 ve üzeri oranlarda bakteriler üzerinde toksik etki gösterdiği bilindiği için oranı %1'de tutulmuştur. Hazırlanan solüsyon karadut ekstresinin içerdii fenolikleri belirlemek amacıyla Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) analizi için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus marka HPLC cihazına yerleştirildi (şekil 3.15).



şekil 3.15: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizi cihazı (Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus)

3.1.3.1. Karadut ekstresinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

analizi: Kantitatif analiz için Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus marka HPLC cihazı kullanıldı. 254 nm tarama yapılması için dedektör olarak DAD detektör, ayırım için Phenylhexyl 4,6 x 150 mm, 3 µm (UP) (GL Sciences InterSustain Made in Japan) ters faz dolgu maddeli kolon kullanıldı. Hareketli faz olarak %0,1 formik asit/deiyonize su (Çözücü A) ve asetonyril (Çözücü B) (Merck, HPLC grade) ile Tablo 3.1'deki pompa programı kullanıldı. Analiz boyunca mobil faz akış hızı 1 ml/dk olarak ayarlandı. Kolon sıcaklığı ise 30 °C'ye ayarlandı. Numune ve standartlar cihaza 10 µL olarak enjekte edildi.

Tablo 3.1: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi pompa program

Adımlar	Akış hızı (ml/dk)	Zaman (dk)	% Çözücü B (asetonyril)	%Çözücü A (%0,1 formik asit/deiyonize su)
Adım 1	1,00	0,01	5	95
Adım 2	1,00	7	9,5	90,5
Adım 3	1,00	20	17	83
Adım 4	1,00	35	40	60
Adım 5	1,00	40	0	100
Adım 6	1,00	40,01	Stop	

Yukarıda Tablo 3.1'de verilen metot uygulanarak 15 tane fenolik bileşik, her bir fenolik bileşiğin maksimum absorbans verdiği dalga boyu belirlenerek maksimum dalga boylarında tarandı. Standart grafikleri çizildi. Daha sonra bitki ekstraktları 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlandı ve HPLC analiz cihazına yerleştirildi (Tablo 3.2).

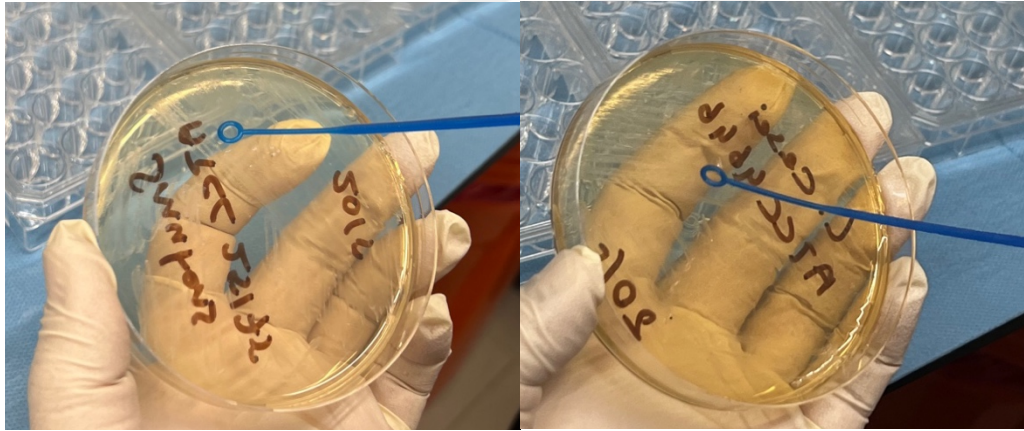
Tablo 3.2: Standart olarak kullanılan fenolik bileşiklerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analizi bilgileri

Sıra	İsim	Altkonma zamanı	Birimi	Maksimum Dalga Boyu	Standart kalibrasyon denklemi	R ²	Limit of Detection	Quantification of Detection
1	Gallik asit	4,352	mg/L	271nm	$y=29799,9x+6494,60$	0,9995969	0,744081	2,254791
2	4-hidroksibenzoik asit	10,217	mg/L	254nm	$y=40036,7x+1238,33$	0,9995870	0,644531	1,953125
3	Klorojenik asit	12,073	mg/L	325nm	$y=28066,0x+25870,2$	0,9990219	1,368727	4,147657
4	Vanilik asit	12,437	mg/L	260nm	$y=48654,4x-26981,1$	0,9997661	1,056564	3,201708
5	Kafeik asit	12,850	mg/L	320nm	$y=16914,9x-1409,46$	0,9972149	3,173077	9,615385
6	Epikatesin	14,150	mg/L	277nm	$y=4788,08x+789,457$	0,9986685	8,461538	25,64103
7	p-kumarik asit	18,486	mg/L	308nm	$y=64013,4x-19190,2$	0,9933422	1,380753	4,1841
8	Ferulik asit	20,971	mg/L	322nm	$y=46665,0x-14606,2$	0,9928040	1,386555	4,201681
9	Salisilik asit	21,929	mg/L	235nm	$y=23472,2x+25113,1$	0,9994182	4,690635	14,21405
10	Rutin	23,494	mg/L	254nm	$y=17392,1x-5957,13$	0,9959336	2,125867	6,442022
11	Chicoric acid	27,011	mg/L	327nm	$y=7443,82x+72484,6$	0,9887105	3,963964	12,01201
12	Apigenin-7-glukozid	27,574	mg/L	336nm	$y=39321,9x+1685,18$	0,9993868	0,72955	2,210759
13	Sinamik asit	30,234	mg/L	276nm	$y=75026,0x-11276,0$	0,9988811	0,677618	2,053388
14	Quercetin	32,008	mg/L	254nm	$y=26403,4x+1558,71$	0,9997869	1,272494	3,856041
15	Naringenin	34,939	mg/L	288nm	$y=24207,0x+2212,93$	0,9920277	1,314741	3,984064

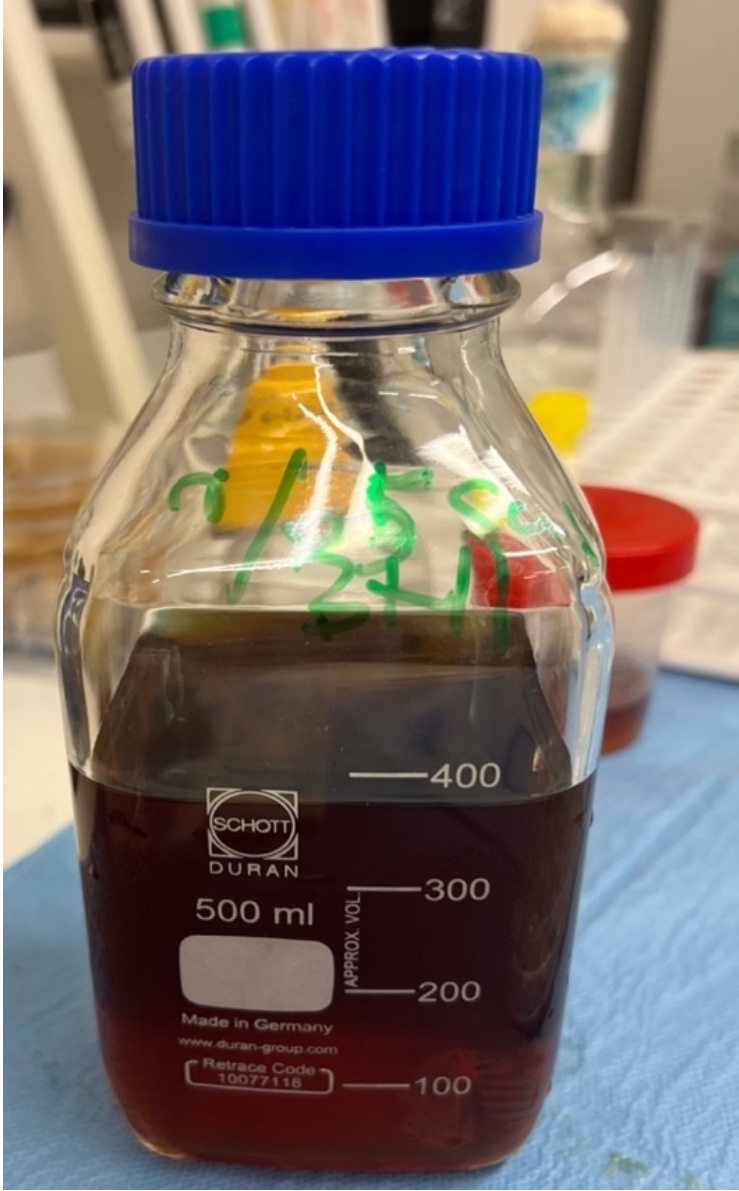
3.2. KAVİTE DEZENFEKSİYON MATERYALLERİNİN *LACTOBACILLUS CASEI* ATCC 4646 VE *STREPTOCOCCUS MUTANS* ATCC 25175 ÜZERİNE ANTİBAKTERİYEL VE ANTİBİYOFİLM ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ

3.2.1. Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

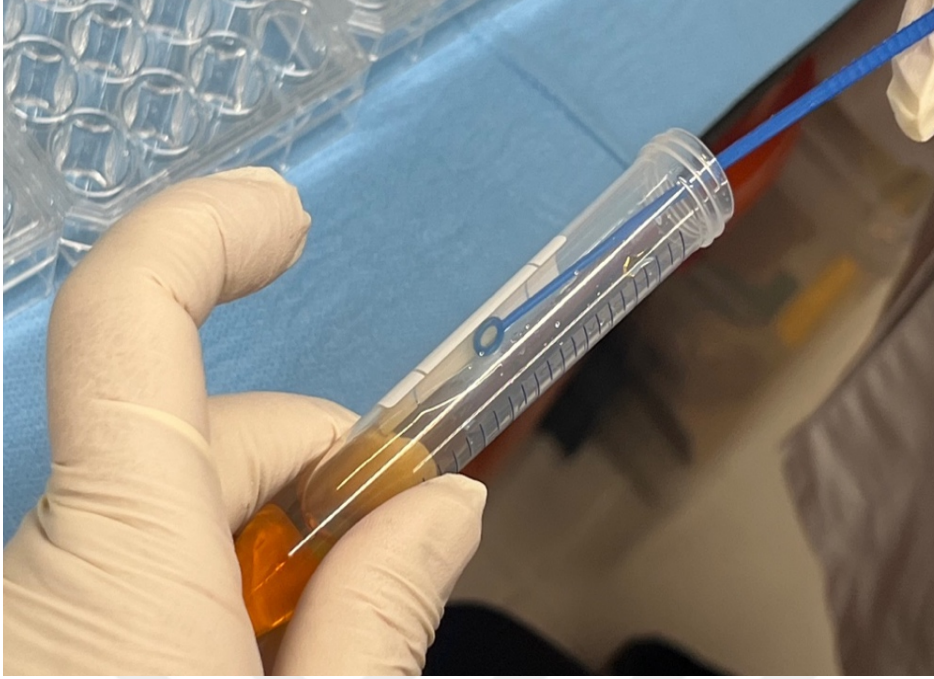
Bakteri biyofilm deneyleri için Amerikan Kültür Koleksiyonlarına (ATCC) ait *L. casei* ATCC 4646 ve *S. mutans* ATCC 25175 suşları kullanıldı (Şekil 3.16). Stoktan (-80°C) çıkarılan bakteriler, Beyin Kalp İnfüzyon besiyerine ekilerek 37 °C’de 24 saat inkübe edildi. Bu kültürlerden alınan bakterilerle 10 ml %5 sakkarozlu Beyin Kalp İnfüzyon buyyon besiyerinde (Şekil 3.17) 0,5 McFarland standartlarına göre (10^8 CFU/ml) bir bakteri süspansiyonu hazırlanarak 100 kat sulandırıldı. Böylece süspansiyonun 1 ml’inde 1×10^6 CFU/ml bakteri yoğunluğu sağlandı (Şekil 3.18).



Şekil 3.16: Stoktan (-80 °C) çıkarılan *L. casei* ATCC 4646 ve *S. mutans* ATCC 25175 suşları



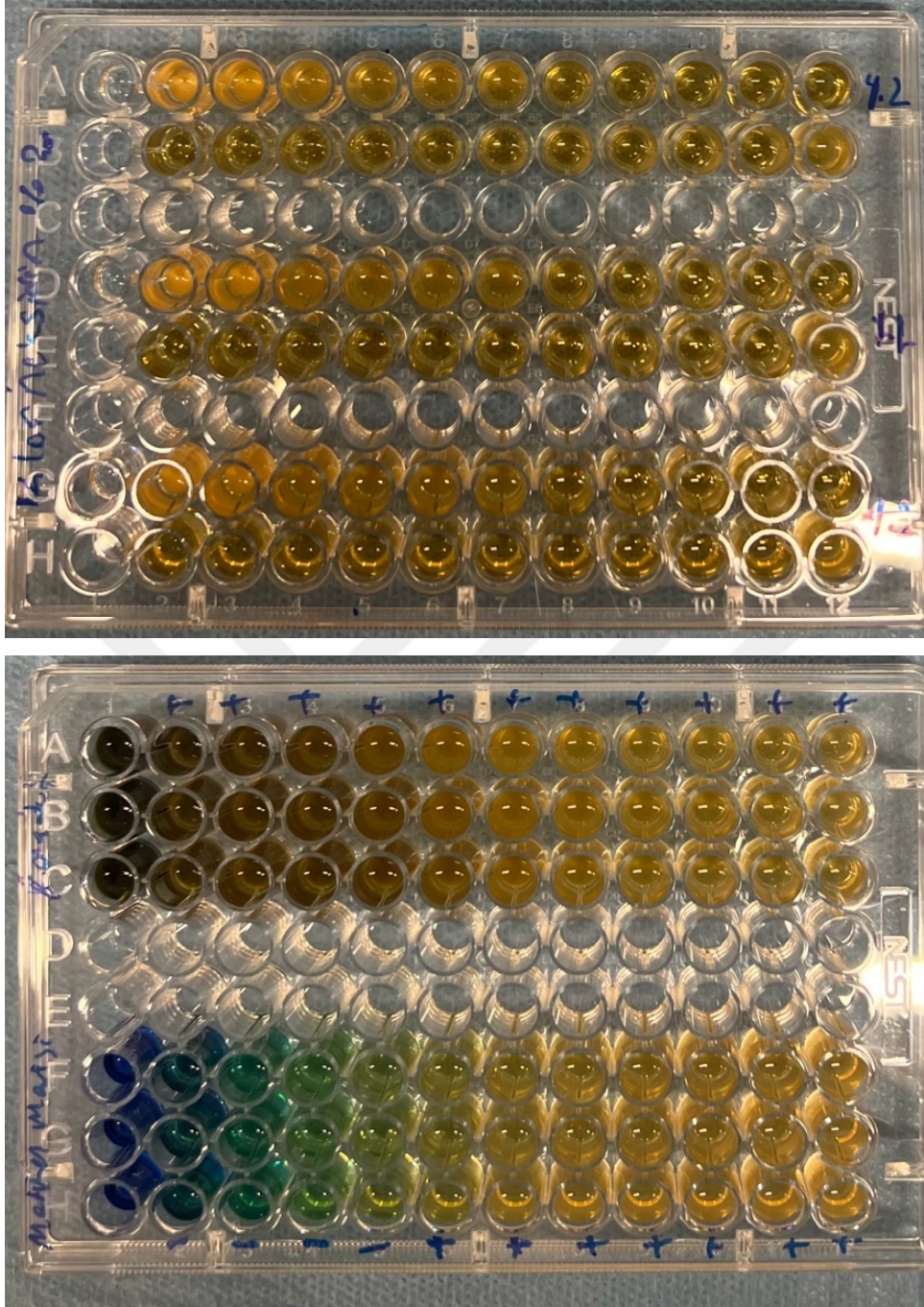
Şekil 3.17: %5 sakkarozlu Beyin Kalp İnfüzyon buyyon besiyeri



Şekil 3.18: Bakteri süspansiyonunun hazırlanması

3.2.2. Materyallerin Antimikrobiyal Aktivitesinin İncelenmesi

Materyallerin antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi için mikrodilüsyon yöntemi ile MİK deneyi yapıldı. Deney için 96 kuyucuklu steril polistiren plaklar kullanıldı. İlk kuyucuk hariç tüm kuyucuklara 100'er μL beyin kalp infüzyon buyyon besiyeri koyuldu. İlk kuyucuğa ise 200 μL deney maddesi yerleştirildikten sonra 100 μL 'si alındı. Sırasıyla son kuyucuk hariç diğer kuyucuklarda ikişer katlı sulandırım yapılarak 1,0-0,00048 arası seyreltiler elde edildi. Tüm kuyucuklara 100'er μL bakteri süspansiyonu ilave edilerek %5-7 CO_2 'li ortamda, 37 °C'de 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.19). Üremenin olmadığı en düşük konsantrasyon MİK olarak değerlendirildi. Minimal Bakterisidal Konsantrasyonunu (MBK) belirlemek için MİK kuyucuğundan itibaren üreme olmayan daha yüksek konsantrasyonlu kuyucuklardan 10 μL alınarak beyin kalp infüzyon agara ekim yapıldı. 37 °C'de 24 saatlik inkübasyon sonrası koloni oluşumu gözlenmeyen en düşük konsantrasyon MBK olarak kaydedildi. Mikrobisidal etki hesabı için MBK /MİK oranı belirlendi. Buna göre oranı ≥ 4 olan ürünler “bakteriyostatik etkili”; <4 olan ürünler “bakterisid etkili” olarak değerlendirildi. Tüm deneyler üçer kez tekrarlandı.



Şekil 3.19: Minimum İnhibitör Konsantrasyonu / Minimal Bakterisidal Konsantrasyon mikrodilüsyon testi

3.2.3. Materyallerin Biyofilm Üzerine Etkilerinin İncelenmesi

3.2.3.1. Diş örneklerinin seçilmesi ve dentin disklerinin hazırlanması:

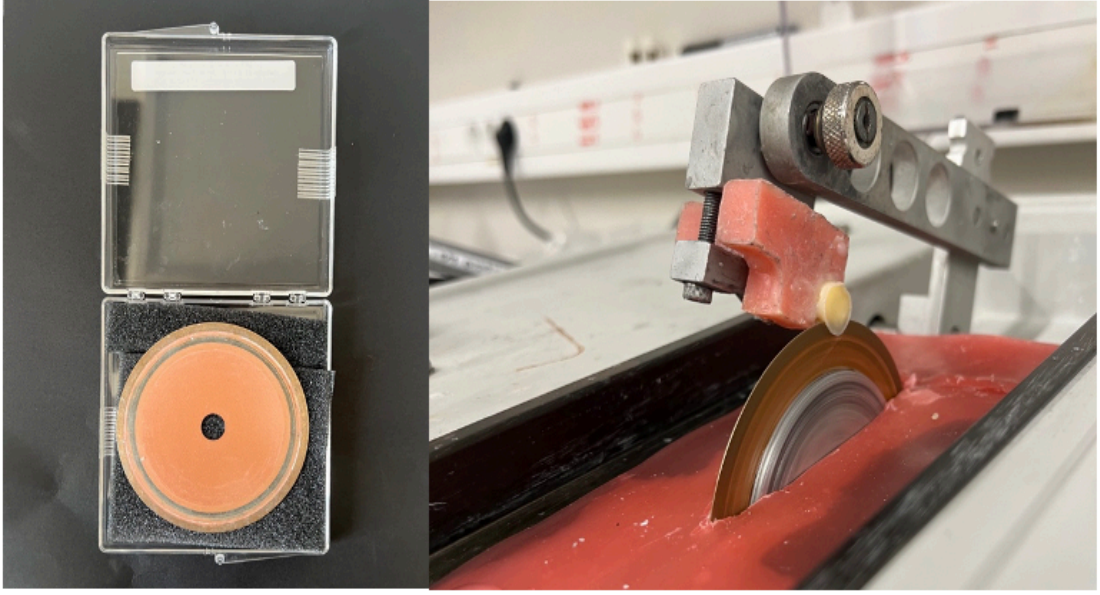
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde araştırmada kullanılmak üzere onam alınan (Ek-2. Bilgilendirilmiş Onam Formu) sistemik rahatsızlığı olmayan, 18-40 yaş aralığında bulunan hastalardan çekilen 76 adet çürüksüz üçüncü molar diş timol içerisinde hazırlık aşamasına kadar bekletildi. İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı'nda akrilik içine yerleştirilen dişler (Şekil 3.20), Buehler hassas kesme cihazı (Şekil 3.21) ve Metkon bıçağı (Şekil 3.22) ile uzun eksenine dik olacak şekilde okluzal mine yüzeyi kaldırıldıktan sonra, 1 mm kalınlığında orta koronal dentinden kesilerek dentin diskleri elde edildi. 1200 gritlik su zımparasıyla mine adacıkları giderildikten sonra 5 dk boyunca deiyonize su ile durulandı ve pulpaya bakan yüzeylerinden %1'lik sitrik asit ile 5 dk asitlenerek smear tabakası uzaklaştırıldı. Dentin disklerinin dehidrate olmaması amacıyla saf su ile doldurulmuş ısıya dayanıklı petri kapları içerisinde 121 °C otoklavda 15 dk sterilizasyon işlemi gerçekleştirilerek standardizasyon sağlandı (Şekli 3.23).



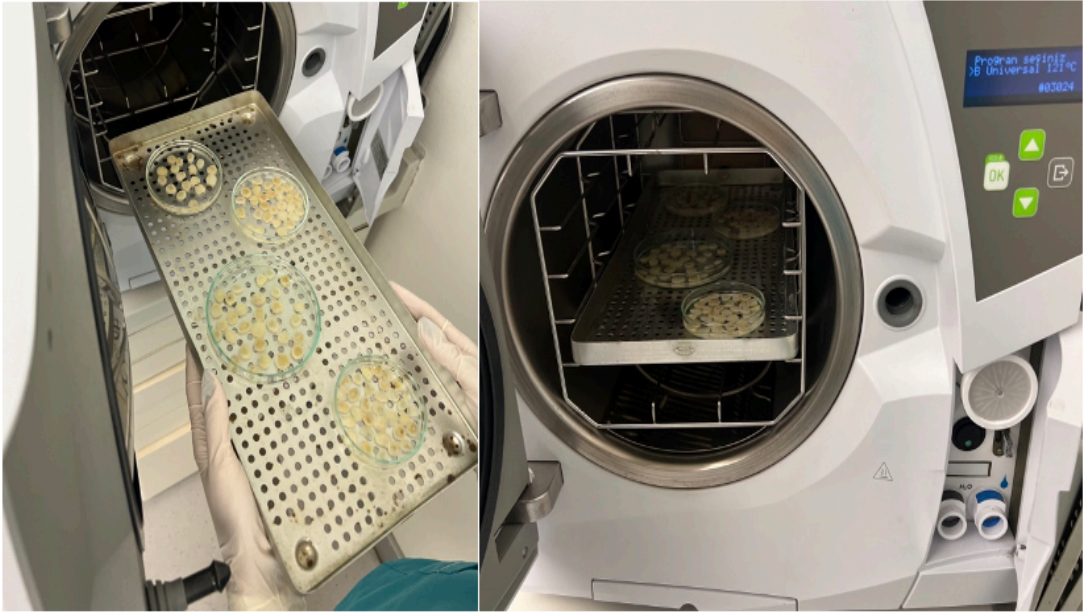
Şekil 3.20: Akrilik bloklara yerleştirilen dişler



Şekil 3.21: Buehler hassas kesme cihazı



Şekil 3.22: Metkon bıçağı



Şekil 3.23: Dentin disklerinin sterilizasyonu

3.2.3.2. Tükürüğün hazırlanması: Dentin diskleri üzerinde bakteri adezyonunu sağlamak ve pelikül tabakasını oluşturmak için, çürük dişi bulunmayan ve periodontal açıdan sağlıklı gönüllüden yeme, içme ve diş fırçalama işlemlerinden en az 1,5 saat sonra uyarılmamış tükürük örnekleri toplandı. Örnekler soğutmalı santrifüj (3-18K, Sigma, Almanya) ile 4 °C’de, Göreceli Santrifüj Kuvveti (RCF) 15,000 devirde 15 dk boyunca santrifüj edildikten sonra süpernatant 0,22 µm filtrasyon ile steril edildi ve -20 °C bekletildi.

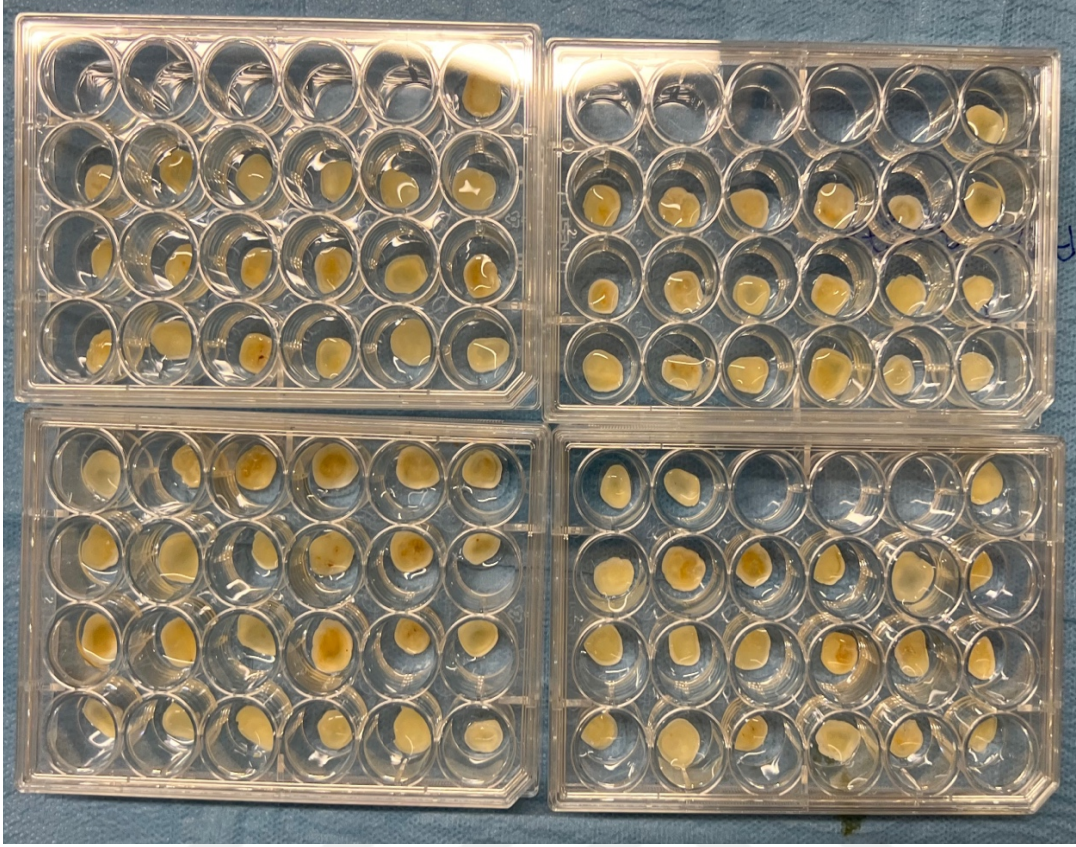
3.2.3.3. Biyofilmlerin oluşturulması: Orta koronal dentinden 1 mm kalınlığında elde edilen ve steril edilmiş dentin diskleri, petri kaplarına yerleştirildi. (Şekil 3.24). Dentin diskleri üzerini pelikül kaplaması için petri kaplarına disklerin üzerini kaplayacak şekilde tükürük eklenerek çalkalayıcıda 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edildi (Şekil 3.25). Çalkalayıcı sonrası tükürük içerisinde bulunan diskler 1 mL tuzlu su ile yıkanarak 24 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1 adet dentin diski olacak şekilde yerleştirildi (Şekil 3.26). Her kuyucuğa *S. mutans* /*L. casei* oranı 3/2 olacak şekilde karıştırılması ile hazırlanan 200 µL bakteri süspansiyonu eklendi (Şekil 3.27).



Şekil 3.24: Steril dentin diskleri petri kaplarına yerleştirildikten sonra üzerlerine tükürük eklenmesi



Şekil 3.25: Pelikül oluşumu için tükürük eklenmiş petri kapları çalkalayıcıda 37 °C’de 1 saat boyunca inkübe edilmesi

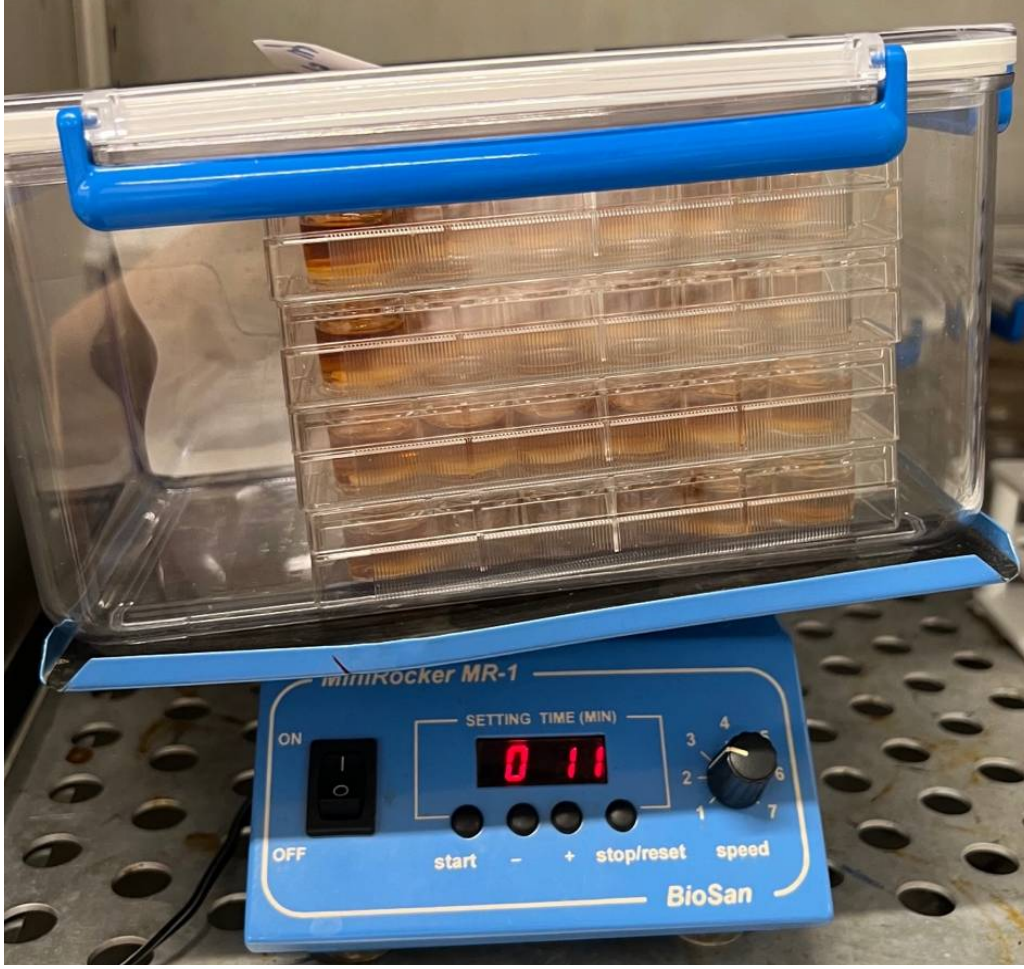


Şekil 3.26: Tükürük içerisinde bulunan dentin diskleri 1 ml tuzlu su ile yıkandıktan sonra 24 kuyucuklu plaklara yerleştirilmesi

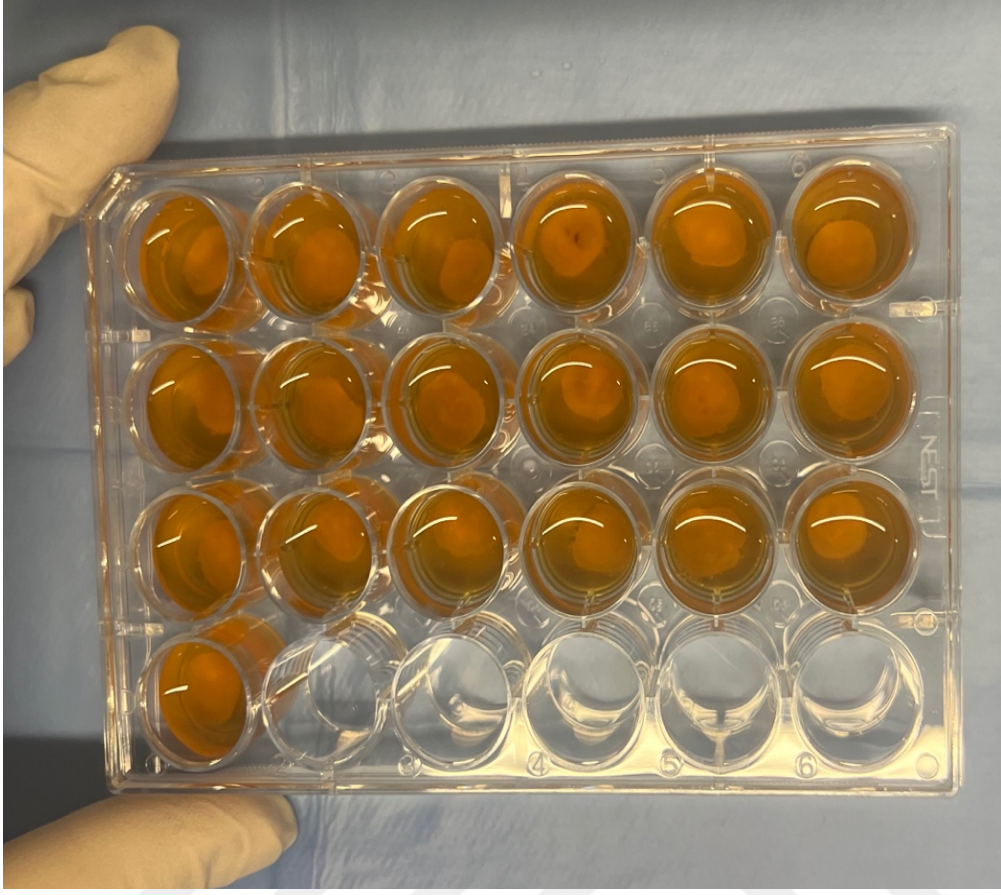


Şekil 3.27: Her kuyucuğa bakteri süspansiyonu eklenmesi

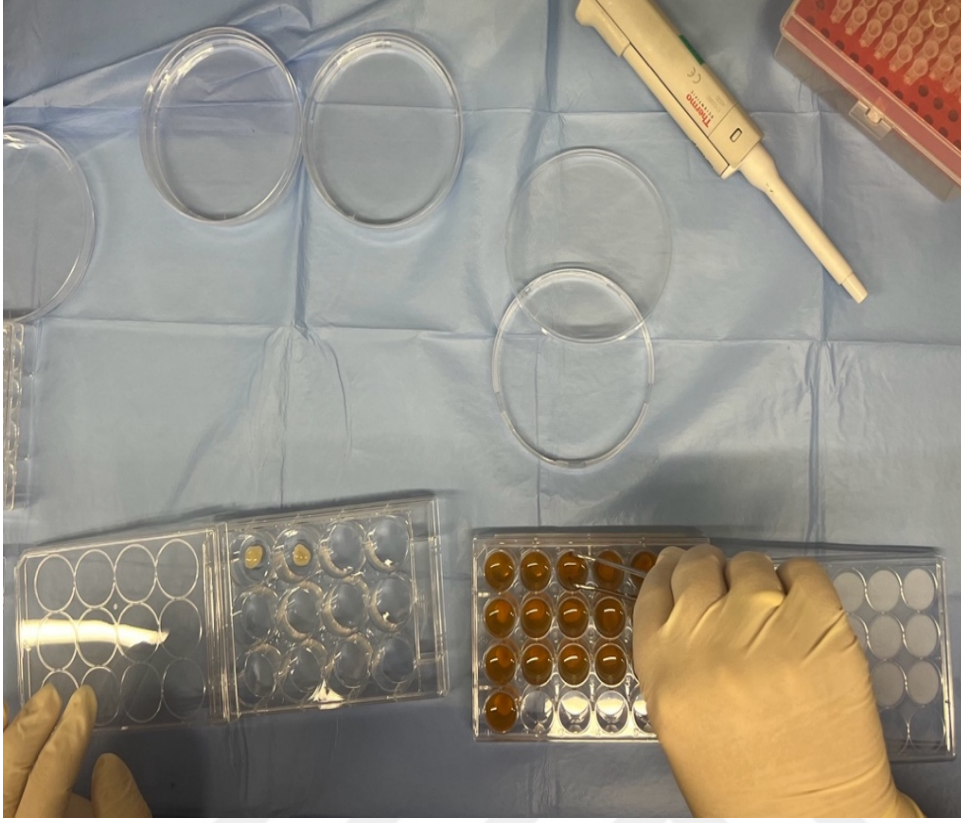
Her kuyucuğa 200'er μL eklenen bakteri süspansiyonun üremesi için kuyucuklara 1,6 ml sakkarozlu beyin kalp infüzyon buyyon eklendi. Plaklar 37 °C'lik %5 CO_2 'li ortamda çalkalayıcı içinde 24 saat inkübe edildi (Şekil 3.28). İnkübasyon sonunda örnekler (Şekil 3.29) plaklardan alınarak, dentin diski üzerine tutunamamış bakterilerin uzaklaştırması için 5 ml steril tuzlu su ile 3'er kez yıkandı (Şekil 3.30).



Şekil 3.28: Plakların %5 Karbondioksitli ortama alınarak 24 saat 37 °C’de çalkalayıcı üzerinde inkübe edilmesi



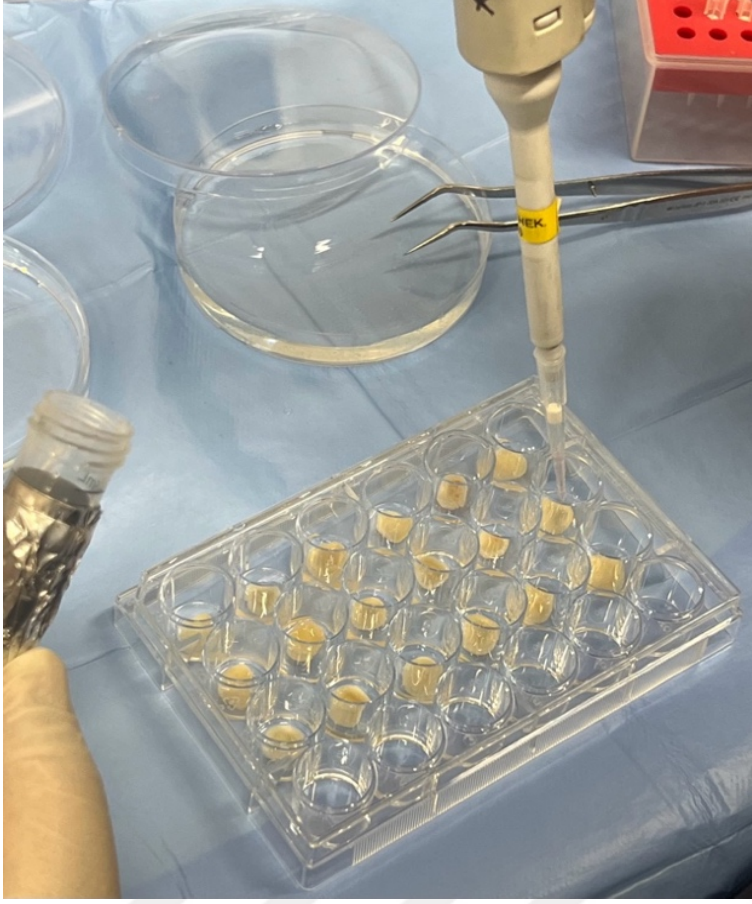
Şekil 3.29: Bakteri çoğalması izlenen örnekler



Şekil 3.30: Dentin disklerinin steril tuzlu suda yıkanma aşaması

3.2.3.4. Kavite dezenfeksiyon materyallerinin biyofilm üzerine uygulanması: Biyofilm oluşturulan diskler steril presel yardımı ile tutularak dentin diski üzerine tutunamamış bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla 5 ml steril tuzlu su ile üç kez yıkandıktan sonra 24 kuyucuklu yeni plaklara 4 grup ve her grupta 19 örnek olacak şekilde rastgele yerleştirildi. Her kuyucuğa disklerin yüzeyini kaplayacak şekilde 250 μ L steril deney solüsyonu eklendi. Diskler antibakteriyel solüsyonların içinde belirlenen sürelerde bekletildikten sonra yeni plaklara aktarıldı. Her gruptan 18 dentin diski CLSM ve 1 adet dentin diski ise SEM analizi için hazırlandı.

3.2.3.4.a. Kontrol grubu: Bakteri tutulumunun izlendiği 19 adet dentin diski, 24 kuyucuklu plaklara her kuyucukta 1 adet disk olacak şekilde yerleştirildi. Herhangi bir antibakteriyel deney solüsyonu uygulanmadı (Şekil 3.31).



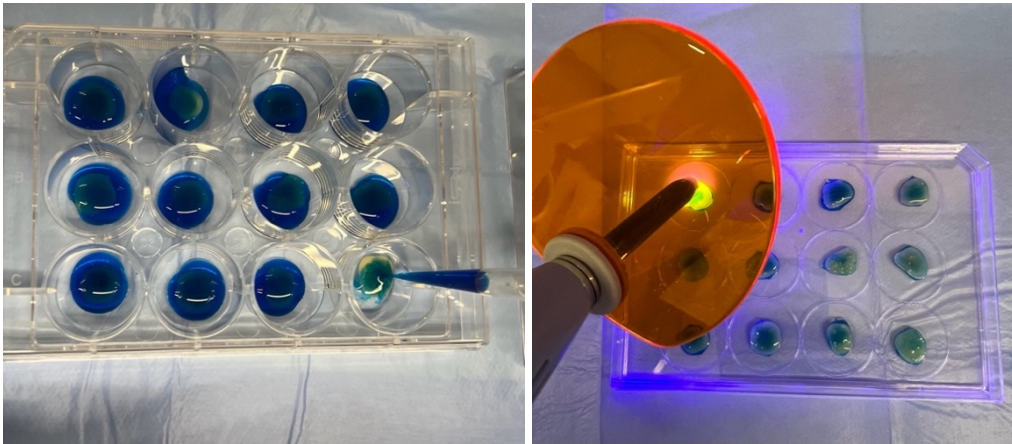
Şekil 3.31: Kontrol grubu

3.2.3.4.b. Klorheksidin Diglukonat uygulaması: Dentin disklerini kaplayacak şekilde her kuyucağa 250 μ L CHX (Cavity Cleanser, Bisco USA) eklendi (Şekil 3.32). Yapılan çalışmalar ışığında (1–3) ve CHX (Cavity Cleanser, Bisco USA) kullanım klavuzunda belirtildiği gibi dentin diskleri üzerinde 20 sn bekletildi. Sonra steril tuzlu su ile üç kere yıkanarak, başka bir steril plağa her kuyucukta 1 adet disk olacak şekilde yerleştirildi.



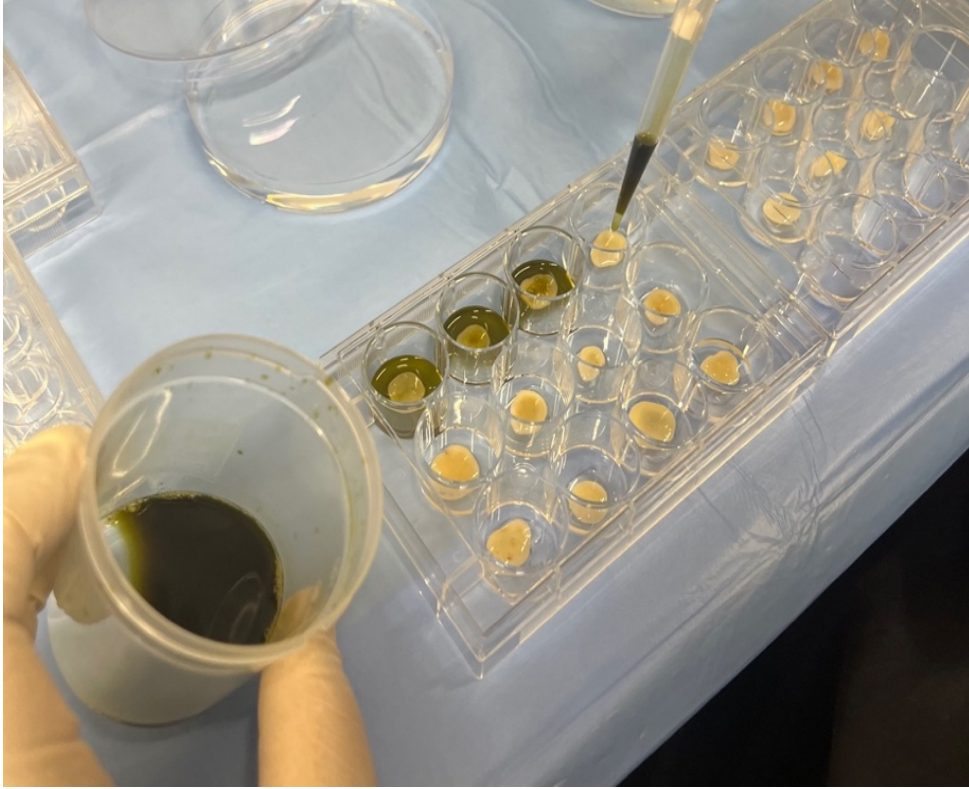
Şekil 3.32: Biyofilm bulunan dentin diskleri üzerine Klorheksidin Diglukonat (Cavity Cleanser, Bisco USA) eklenmesi

3.2.3.4.c. Metilen mavisi ve LED uygulaması: Dentin disklerini kaplayacak şekilde her kuyucağa 250 μ L metilen mavisi (Kimya Ofisim) eklendi (Şekil 3.33). Yapılan benzer çalışmalar ışığında (4–6) dentin diskleri 60 sn metilen mavisi ile bekletildi. Metilen mavisinin fotodinamik olarak aktivasyonun sağlanması için 420 nm-480 nm dalga boyuna sahip, ışık yoğunluğu 1000 -1700 mW/cm^2 olan LED ışık (Woodpecker LED- D) (6,7) her diskin üzerinde 60 sn uygulandıktan sonra steril tuzlu su ile üç kere yıkanarak, başka bir steril 24 kuyucuklu plağa her kuyucukta 1 adet disk olacak şekilde yerleştirildi.



Şekil 3.33: Metilen mavisi her disk üzerinde 60 sn bekletildikten sonra fotodinamik terapiye başlanarak her diske 60 sn LED (Woodpecker LED- D) uygulanması

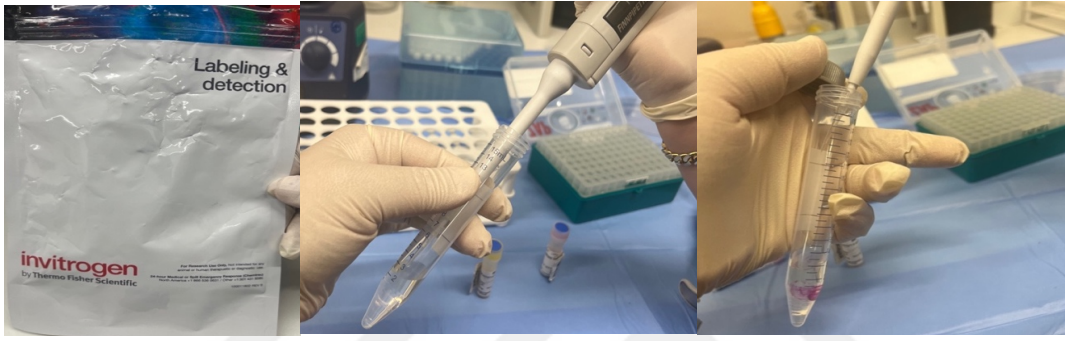
3.2.3.4.d. Karadut ekstresi uygulaması: Eppendorf tüpüne 0,1 gr karadut ekstresi üzerine 1 ml steril DMSO ilave edildi. 3 dk vortekslenen karadut ekstresi tamamen çözündürüldü. Çözünen karadut ekstresinden dentin disklerini kaplayacak şekilde her kuyucuğa 250 µL eklendi (Şekil 3.34). Dentin diskleri 60 sn karadut ekstresi ile bekletildikten sonra steril tuzlu su ile üç kere yıkanarak, steril plağa yerleştirildi.



Şekil 3.34: Dentin diskleri üzerine karadut ekstresi uygulanması

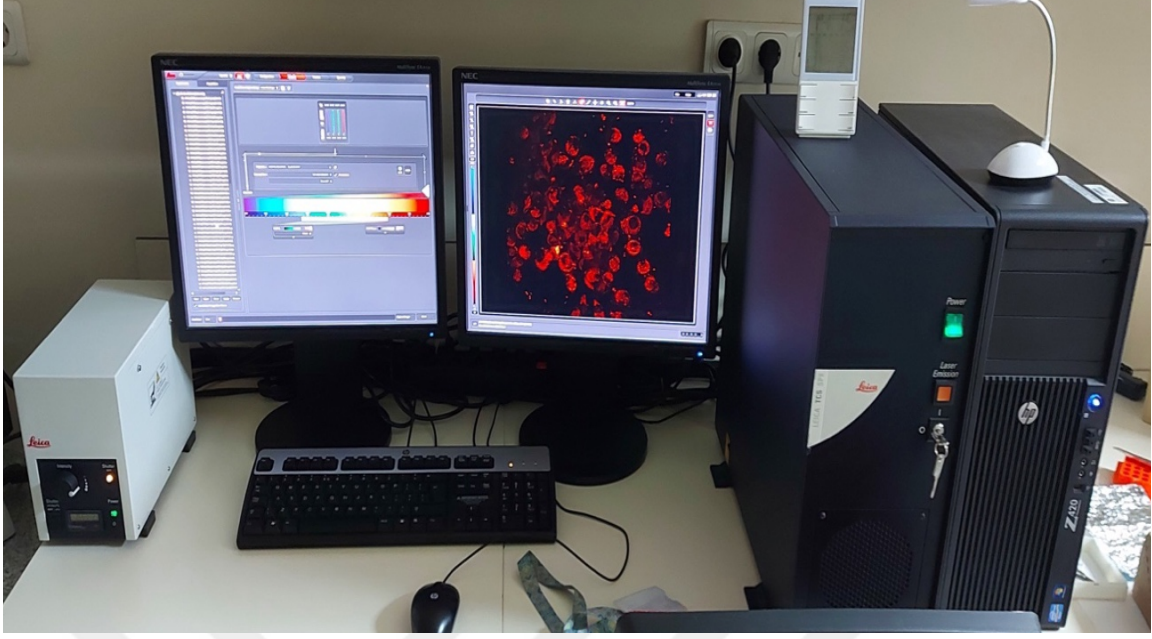
3.2.3.5. Biyofilmlerin incelenmesi

3.2.3.5.a. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop incelemesi: Biyofilmi boyamak için kullanılan Live/Dead Bacterial Viability Kit (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD) (Şekil 3.35) içerisinde bulunan A ve B komponentlerinden 0,4'er $\mu\text{L}/\text{mL}$ mikropipet yardımıyla 2 ml DMSO bulunan Eppendorf tüpüne eklendi. 20'şer μL boya solüsyonu ile muamele edilen dentin diskleri alüminyum folyo ile sarılarak 15 dk karanlıkta bekletildikten sonra $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de konfokal mikroskop incelemesi için saklandı.



Şekil 3.35: Dimetil Sülfoksit ve Live/Dead Bacterial Viability Kitinde (Thermo Fisher Scientific, Molecular Probes, ABD) bulunan A ve B bileşenlerinden karışım oluşturulması

Boyanan örnekler İstanbul Üniversitesi Aziz Sancar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü'nde bulunan CLSM (TCS SPE, Leica Microsystems, ABD) (Şekil 3.36) ile 488 ve 532 nm'de 10'luk büyütmede incelendi. Sonrasında elde edilen biyofilm görüntülerinden biyokütle ve canlılık oranının hesaplanabilmesi için Image J programı (National Institutes of Health, ABD) kullanıldı.



Şekil 3.36: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (TCS SPE, Leica Microsystems, ABD) cihazı

3.2.3.5.b. Taramalı Elektron Mikroskop incelemesi: Fiksasyon ve dehidratasyon işlemlerine tabii tutulmak amacıyla SEM analizi için ayrılan her gruptan 1 adet dentin diski %4'lük paraformaldehit bulunan 24 kuyucuklu petri kaplarına yerleştirildi. 36 saat süren fiksasyon aşaması sonrası dehidratasyon sağlama amacıyla diskler sırasıyla %25'lik, %50'lik, %75'lik, 2x%96'lık, 2x%100'lük etanol içerisinde 30'ar dk bekletildi (Şekil 3.37). Dehidratasyon işleminin tamamlanması için diskler 24 saat açık havada kurumaya bırakıldı.

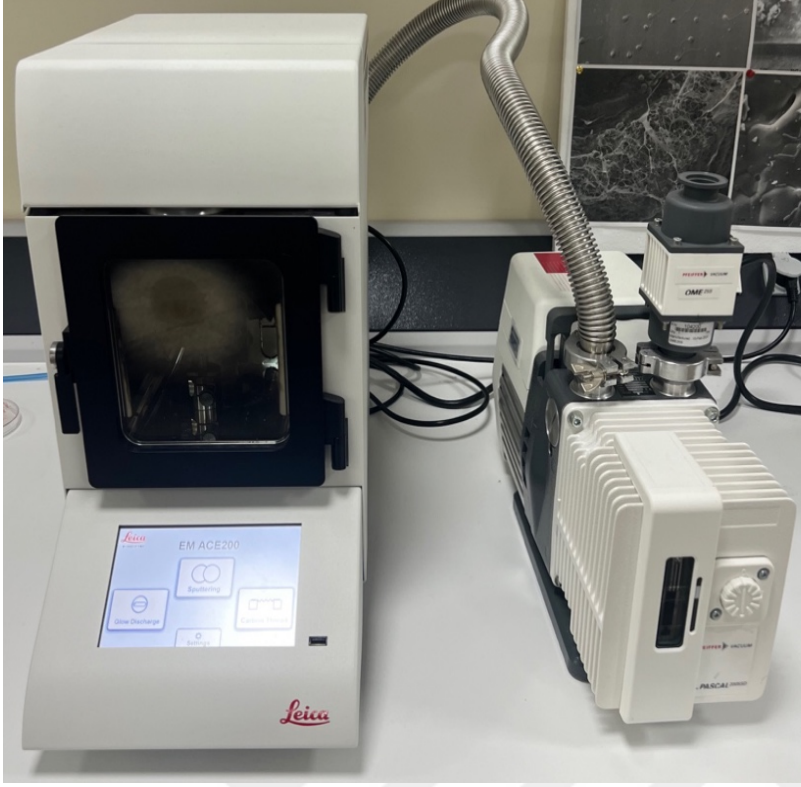


Şekil 3.37: Fiksasyon işlemi yapılan dentin disklerinin dehidrate edilmesi

Kurutulan örnekler düz bir plakaya grup numaraları belli olacak şekilde (Şekil 3.38) sabitlendikten sonra püskürtme cihazı (Leica EM ACE200, Almanya) (Şekil 3.39) ile 45 sn boyunca Au/Pd ile kaplandı. Kaplama işleminden sonra görüntülemeler için SEM (Carl Zeiss, EVO 40, Almanya) cihazı (Şekil 3.40) ile sırasıyla x1000, x2500, x7500 ve x15000 büyütme altında Yeditepe Üniversitesi'nde tamamlandı.



Şekil 3.38: Örneklerin grup numaralarına göre düz bir plakaya sabitlenmesi



Şekil 3.39: Örneklerin Altın - Paladyum Alaşımı ile kaplanmasında kullanılan püskürtme cihazı (Leica EM ACE200, Almanya)



Şekil 3.40: Taramalı Elektron Mikroskopu (Carl Zeiss, EVO 40, Almanya) cihazı

3.3. İSTATİKSEL DEĞERLENDİRMELER

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için Number Cruncher İstatiksel Sistem 2007 (Kaysville, Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metotların (Ortalama, Standart Sapma, Medyan, Frekans, Oran, Minimum, Maksimum) yanı sıra verilerin dağılımı için Shapiro-Wilk Testi kullanılmıştır. Niceliksel verilerin üç ve üzeri grup karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi, iki grup karşılaştırmasında Mann-Whitney U Testi kullanıldı. Anlamlılık $p<0,01$ ve $p<0,05$ düzeylerinde değerlendirildi.

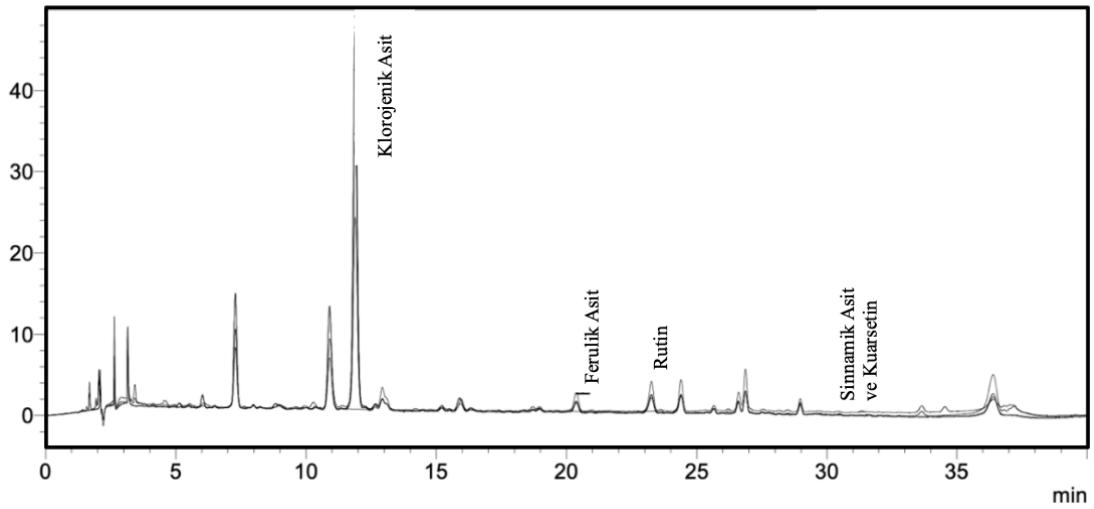
İstatistiksel anlamlılıkta kullanılan sembollerden; $p<0,05$ anlamlı farklılık bulunmasını gösterirken, $p>0,05$ anlamlı farklılık bulunmadığını ifade etmektedir.

4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında; çalışma için özel olarak elde edilen karadut ekstresi, metilen mavisi ve CHX; *S. mutans* ve *L. casei* üzerine antibakteriyel etkileri ile bu bakteriler ile dentin diskleri üzerinde oluşturulan biyofilm üzerine etkileri karşılaştırılmalı olarak değerlendirilmiştir.

4.1. KARADUT EKSTRESİNİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMOTOGRAFİSİ ANALİZİNE AİT BULGULAR

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi analiz cihazına karadut ekstresi yerleştirilerek, 15 adet fenolik bileşik üzerinden yapılan taramada; en çok tespit edilen fenolik bileşen klorojenik asit olarak belirlendi. Ek olarak rutin, kuarsetin sinnamik asit ve ferulik asit fenolikleri tespit edildi (Şekil 4.1) (Tablo 4.1).



Şekil 4.1: Karadut ekstresi fenolik bileşiklerinin kromatogramı

Tablo 4.1: Karadut ekstresinin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi analizi sonuçları

PDA Ch1 254nm					
Peak	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	Mark
1	Rutin	23,259	2,263	mg/L	
2	Kuarsetin	31,341	0,040	mg/L	
Total					
PDA Ch3 325nm					
Peak	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	Mark
1	Klorojenik Asit	11,886	15,503	mg/L	S
Total					
PDA Ch3 325nm					
Peak	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	Mark
1	Klorojenik Asit	11,886	15,503	mg/L	S
Total					
PDA Ch12 276nm					
Peak	Standart Madde	Alıkonma Zamanı	Konsantrasyon	Birim	Mark
1	Sinnamik Asit	30,480	0,015	mg/L	
Total					

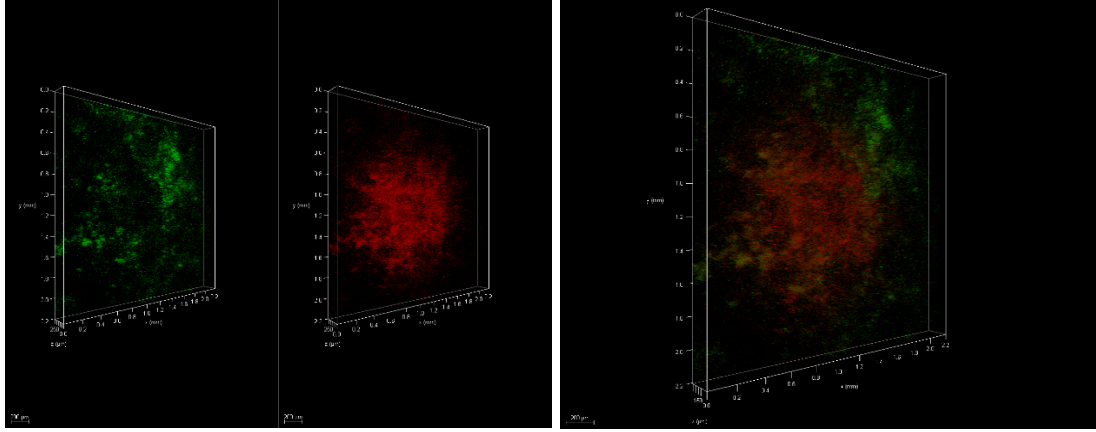
4.2. MİKRODİLÜSYON YÖNTEMİ İLE MİNİMUM İNHİBİTÖR KONSANTRASYONU TESTİNE AİT BULGULAR

Minimum İnhibitör Konsantrasyonu değerlerinin tespiti amacıyla yapılan mikrodilüsyon testinde; CHX uygulanan kuyucuklarda, hiçbir konsantrasyonda üreme tespit edilememiştir. Karadut ekstresi uygulanan kuyucukların tamamında *S. mutans* ve *L. casei* üremesi gözlenmiş, antimikrobiyal etkinliğinin olmadığı belirlenmiştir. Metilen mavisi uygulanan kuyucuklarda, yoğun koyu mavi renk sebebiyle üreme olup olmadığı belirlenememiştir. Bu nedenle bu kuyucuklardan alınan örneklerden katı besiyerine ekim yapılmıştır.

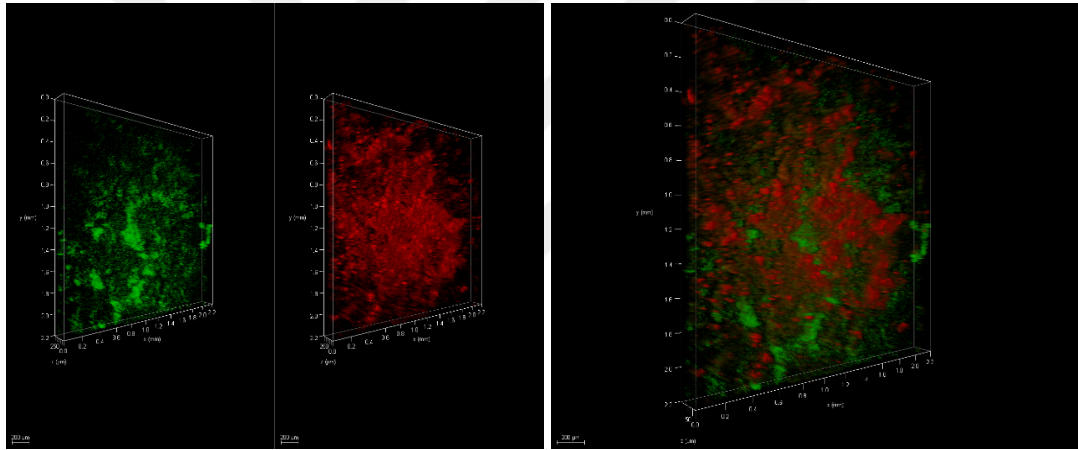
İnkübasyon sonrası üreme olduğu tespit edilmiş ve böylece metilen mavisi için de MİK değeri negatif olarak belirlenmiştir. *S. mutans* ve *L. casei* ile yapılan MİK deneyinde metilen mavisi ve karadutun antimikrobiyal etkisi izlenmemiştir.

4.3. KONFOKAL LAZER TARAMALI MİKROSKOP İNCELEMESİNE AİT BULGULAR

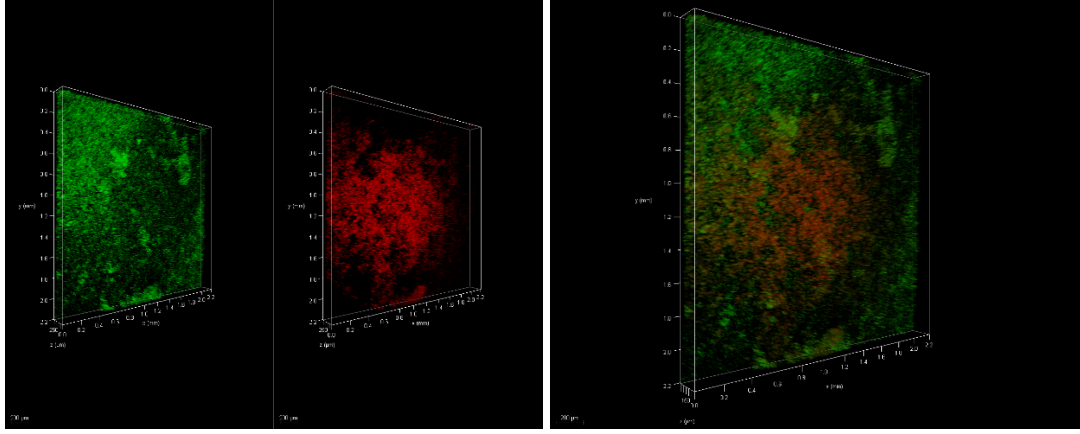
Oluşturulan ikili biyofilm tabakasının biyokütle (biomass) ölçümleri için kullanılan CLSM'ye ait görüntüler aşağıda yer almaktadır. Antibakteriyel ajanların dentin diskleri üzerinde oluşturulan ikili biyofilm tabakasına uygulanmasını takiben yapılan incelemede; kırmızı renkler cansız hücreleri gösterirken, yeşil renk canlı hücre varlığını ve sarı renkler canlı ile cansız hücre görüntülerinin üst üste getirildiği gerçek alan görüntülerini ifade etmektedir (Şekil 4.2, 4.3, 4.4).



Şekil 4.2: Klorheksidin Diglukonat grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri



Şekil 4.3: Karadut grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri



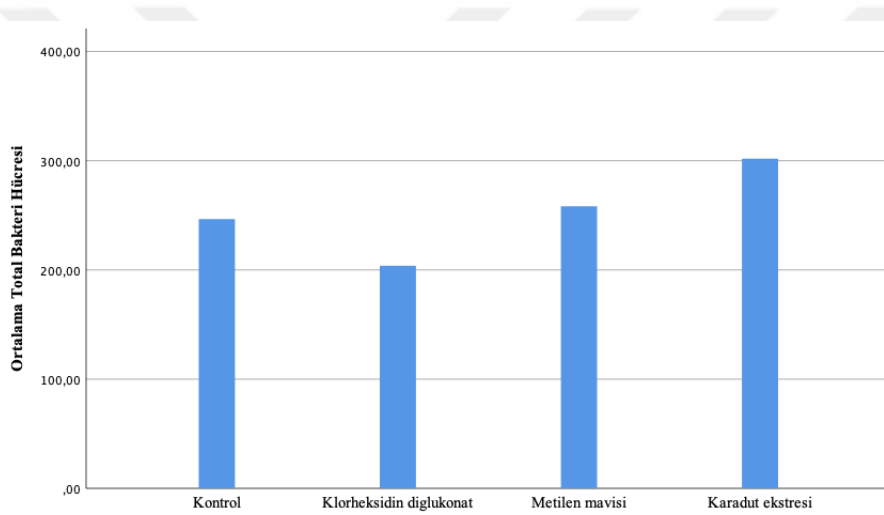
Şekil 4.4: Metilen mavisi grubuna ait üç boyutlu Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop görüntüleri

Gruplara göre canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamı total biyofilm değerini bildirir. Gruplar arası karşılaştırmada, canlı ve cansız hücre sayısının toplam değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (Tablo 4.2) (Şekil 4.5.) ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubu grubunun canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının, CHX grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubu ile metilen mavisi arasında canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,189$; $p>0,05$). Kontrol grubunun canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamı, metilen mavisi olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Gruplar arası canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının ortancaları; Karadut>kontrol grubu - metilen mavisi>CHX şeklinde sıralanabilir. Canlı ve cansız bakteri hücre sayılarının toplamı; dentin diski üzerinde oluşturulan biyofilmde ne kadar bakteri hücresi ürettiği hakkında bilgi verir. Biyofilmin dinamik yapısının bir göstergesidir.

Tablo 4.2: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının gruplar arası karşılaştırılması

		<i>n</i>	<i>Ort±Ss</i>	<i>Min-Max (Median)</i>	<i>p</i>	<i>Post Hoc</i>
Canlı ve Cansız Bakteri Hücre Sayısı Toplamı	Kontrol Grubu^a	49	246,54±49,6 4	150,54-336,23 (252,49)	0,001**	a>b a<d b<c b<d c<d
	Chx Grubu^b	50	203,79±64,3 4	92,4-336,35 (194,16)		
	Matilen Mavisi^c	48	258,22±53,8 7	129,41-344,66 (268,79)		
	Karadut^d	48	301,82±50,2 7	189,18-363,74 (312,06)		

Kruskall Wallis Testi * $p<0,05$ ** $p<0,01$



Şekil 4.5: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının gruplar arası karşılaştırılması

Gruplar arası canlı bakteri hücre sayısının ortancaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (Tablo 4.3) (Şekil 4.6) ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubunun canlı bakteri hücreleri sayısının, CHX grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubu ile metilen mavisi arasında canlı bakteri hücreleri sayısının istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,525$; $p>0,05$). Kontrol grubunun canlı bakteri hücreleri sayısının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$).

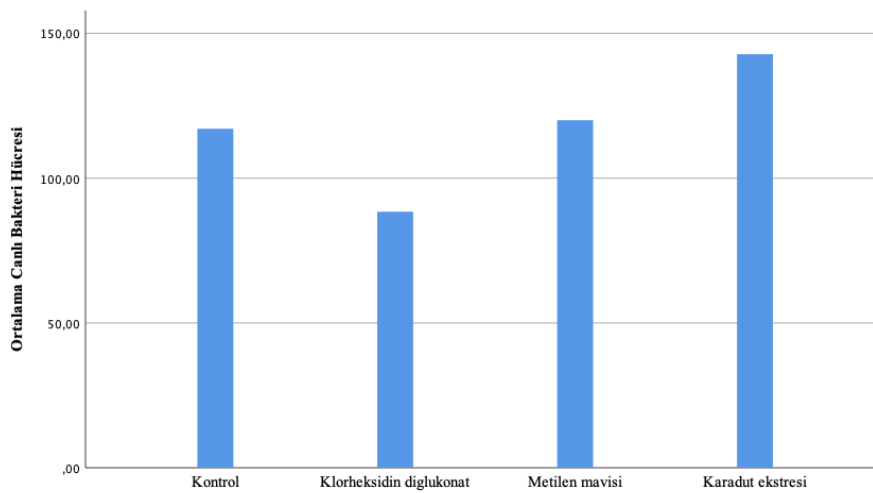
Klorheksidin Diglukonat grubunun canlı bakteri hücreleri sayısının, metilen mavisi grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubu canlı bakteri hücreleri sayısının, karadut olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$).

Metilen mavisi grubu canlı bakteri hücreleri sayısının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Gruplar arası canlı bakteri hücre sayısının ortancaları; Karadut>kontrol -metilen mavisi>CHX şeklinde sıralanabilir. Fakat canlı bakteri hücre sayısı tek başına anlamlı bir sonuca ulaştıramayacağı için diskler üzerinde canlı ve cansız bakter hücre sayısının toplam değerinin yanısıra canlı/cansız bakteri hücre sayısı oranının da incelenmiştir.

Tablo 4.3: Canlı bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması

		<i>n</i>	<i>Ort±Ss</i>	<i>Min-Max (Median)</i>	<i>p</i>	<i>Post Hoc</i>
Canlı Bakteri hücre sayısı	Kontrol Grubu^a	49	117,04±25,47	57,75-163,71 (124,29)	0,001**	<i>a>b</i> <i>a<d</i> <i>b<c</i> <i>b<d</i> <i>c<d</i>
	Chx Grubu^b	50	88,41±32,45	38,4-164,78 (84,13)		
	Matilen Mavisi^c	48	119,97±31,27	55,52-174,43 (126,3)		
	Karadut^d	48	142,78±39,22	56,97-189,66 (153,75)		

Kruskal Wallis Testi * $p<0,05$ ** $p<0,01$



Şekil 4.6: Canlı bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması

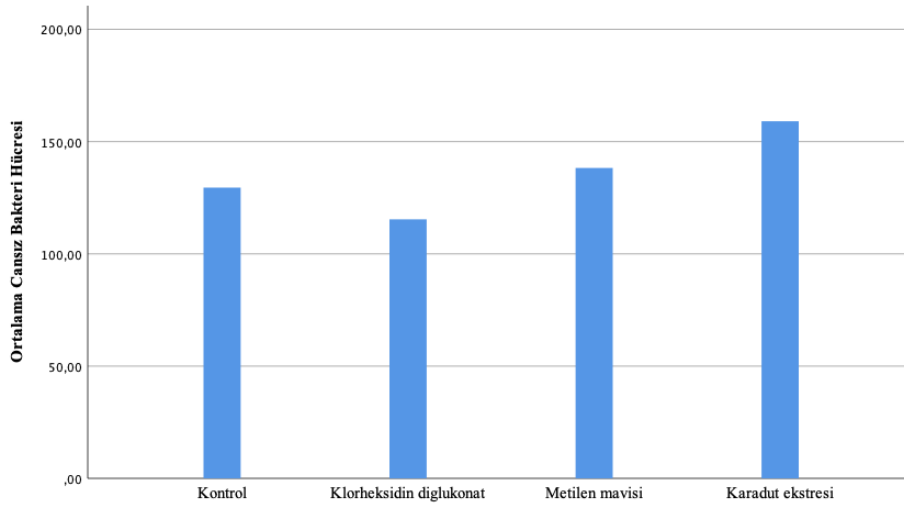
Gruplar arası cansız bakteri hücre sayısının ortancaları istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (Tablo 4.4) (Şekil 4.7) ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubunun cansız bakteri hücre sayısının, CHX grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Kontrol grubu ile metilen mavisi grubu arasında cansız bakteri hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamıştır ($p=0,075$; $p>0,05$).

Kontrol grubunun cansız bakteri hücre sayısının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun cansız bakteri hücre sayısının, metilen mavisi grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun cansız bakteri hücre sayısının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Metilen mavisi grubunun cansız bakteri hücre sayısının, karadut grubuna göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Gruplar arası cansız bakteri hücre sayısının ortancaları; Karadut>kontrol - metilen mavisi>CHX şeklinde sıralanabilir. Fakat cansız bakteri hücre sayısı tek başına anlamlı bir sonuca ulaştıramaz.

Tablo 4.4: Cansız bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması

		<i>n</i>	<i>Ort±Ss</i>	<i>Min-Max (Median)</i>	<i>p</i>	<i>Post Hoc</i>
Cansız Bakteri hücre sayısı	Kontrol Grubu^a	49	129,5±28,28	68,97-183,52 (128,56)	0,001**	a>b a<d b<c b<d c<d
	Chx Grubu^b	50	115,38±34,52	52,59-179,68 (109,87)		
	Matilen Mavisi^c	48	138,25±27,43	62,2-176,97 (142,41)		
	Karadut^d	48	159,03±16,95	113,75-187,49 (162,25)		

*Kruskall Wallis Testi * $p<0,05$ ** $p<0,01$*



Şekil 4.7: Cansız bakteri hücre sayısının gruplar arası karşılaştırılması

Gruplar arası canlı/cansız bakteri hücresi oranı istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermektedir (Tablo 4.5) (Şekil 4.8) ($p=0,001$; $p<0,05$). Canlı/cansız bakteri hücresi oranı düşük olması materyalin antibakteriyel etkisinin güçlü olduğu anlamına gelmektedir. Kontrol grubunun canlı/cansız bakteri hücresi oranı, CHX grubuna göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$).

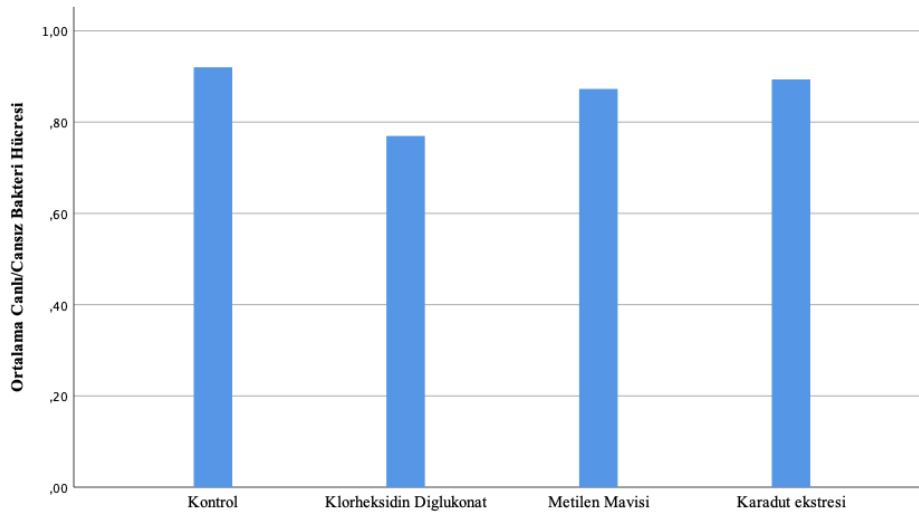
Kontrol grubu ile metilen mavisi arasındaki canlı/cansız bakteri hücresi oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,379$; $p>0,05$). Kontrol grubu ile karadut grubu arasında canlı/cansız bakteri hücresi oranı istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,379$; $p>0,05$). CHX grubunun canlı/cansız bakteri hücresi oranı, metilen mavisi olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun canlı/cansız bakteri hücresi oranı, karadut olanlara göre düşük olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Metilen mavisi ile karadut grubu arasında canlı/cansız bakteri hücresi oranında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p=0,256$; $p>0,05$). Gruplar arası istatistiksel anlamlılığa göre canlı/cansız bakteri hücre sayısının ortancaları; Kontrol grubu - metilen mavisi - karadut>CHX şeklinde sıralanabilir. Materyallerin antibakteriyel etkilerini karşılaştırmak için önemli bir değerdir.

Canlı/cansız oranının azalması materyalin antibakteriyel etkisinin arttığı anlamına gelmektedir. Bu durumda istatistiksel olarak CHX'nin antibakteriyel etkisi en güçlüyken, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Tablo 4.5: Canlı/cansız bakteri hücresi oranının gruplar arası karşılaştırılması

		<i>n</i>	<i>Ort±Ss</i>	<i>Min-Max (Median)</i>	<i>p</i>	<i>Post Hoc</i>
Canlı/ Cansız Bakteri Hücre Sayısı Oranı	Kontrol Grubu^a	49	0,92±0,17	0,4-1,37 (0,91)	0,001**	a>b a<d b<c b<d c<d
	Chx Grubu^b	50	0,77±0,17	0,46-1,11 (0,74)		
	Metilen Mavisi^c	48	0,87±0,16	0,42-1,13 (0,9)		
	Karadut^d	48	0,89±0,22	0,4-1,2 (0,96)		

Kruskall Wallis Testi * $p<0,05$ ** $p<0,01$



Şekil 4.8: Canlı/cansız bakteri hücresi oranının gruplar arası karşılaştırılması

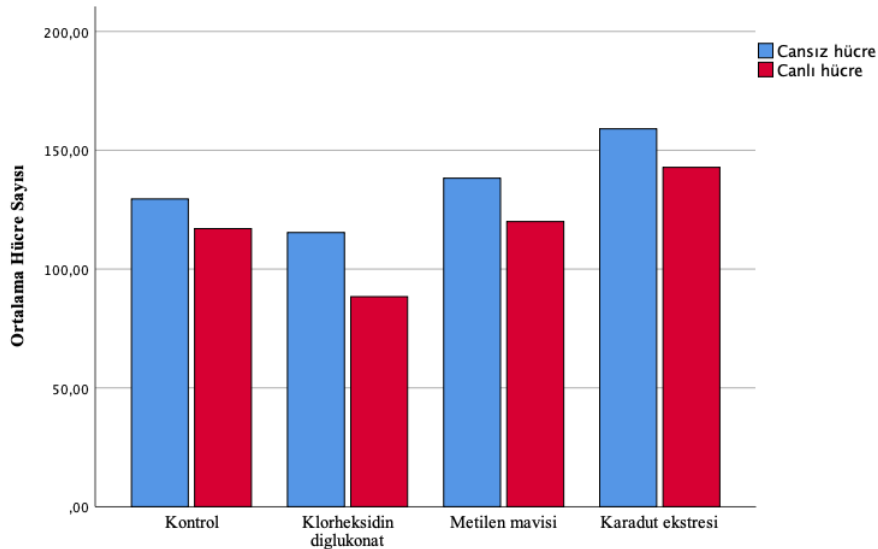
Grup içinde ortalama cansız ve canlı hücre sayısının karşılaştırmasına ait tablo ve grafikler aşağıda yer almaktadır (Tablo 4.6) (Şekil 4.9). Kontrol grubunun cansız bakteri hücre sayısı değerinin, kontrol grubu canlı bakteri hücre sayısına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). CHX grubunun cansız bakteri hücre sayısı değerinin, CHX grubu canlı bakteri hücre sayısına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$).

Metilen mavisi grubunda, cansız bakteri hücre sayısı değerinin, metilen mavisi canlı bakteri hücre sayısına göre yüksek olması istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0,001$; $p<0,05$). Karadut grubunda hücre yaşam durumuna göre hücre sayısı değeri istatistiksel olarak anlamlı farklılık göstermemektedir ($p>0,05$).

Tablo 4.6: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısının grup içi karşılaştırılması

		<i>n</i>	<i>Ort±Ss</i>	<i>Min-Max (Median)</i>	<i>p</i>
Kontrol	Ölü	49	129,5±28,28	68,97-183,52 (128,56)	0,042*
	Canlı	49	117,04±25,47	57,75-163,71 (124,29)	
CHX	Ölü	50	115,38±34,52	52,59-179,68 (109,87)	0,001**
	Canlı	50	88,41±32,45	38,4-164,78 (84,13)	
Matilen Mavisi	Ölü	48	138,25±27,43	62,2-176,97 (142,41)	0,003**
	Canlı	48	119,97±31,27	55,52-174,43 (126,3)	
Karadut	Ölü	48	159,03±16,95	113,75-187,49 (162,25)	0,180
	Canlı	48	142,78±39,22	56,97-189,66 (153,75)	

*Mann Whitney U Testi * $p<0,05$ ** $p<0,01$*

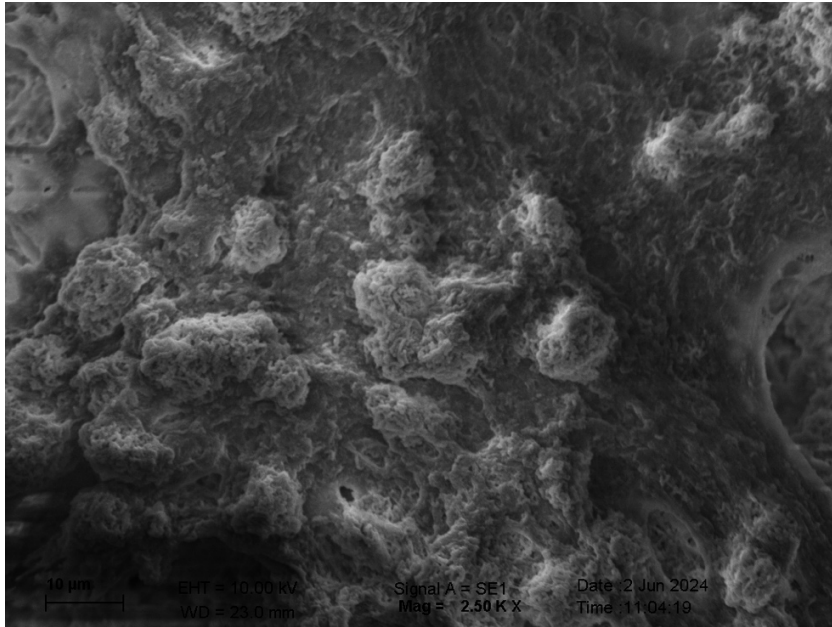


Şekil 4.9: Canlı ve cansız bakteri hücre sayısının grup içi karşılaştırılması

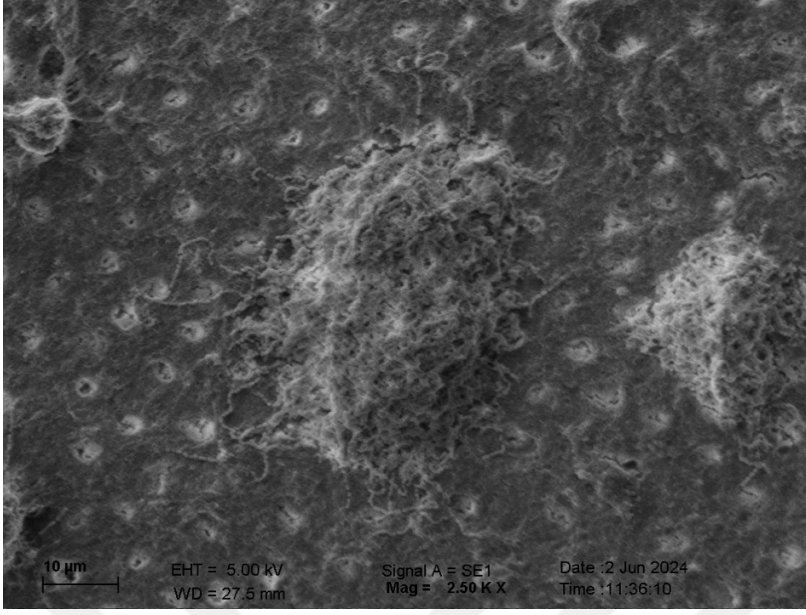
4.4. TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOP İNCELEMESİNE AİT BULGULAR

Her gruptan birer örnek SEM ile X2500 büyütmede incelenmiştir. Biyofilm tabakası; kontrol grubu (Şekil 4.10) ve metilen mavisi (Şekil 4.12) grubunda oldukça belirgindir.

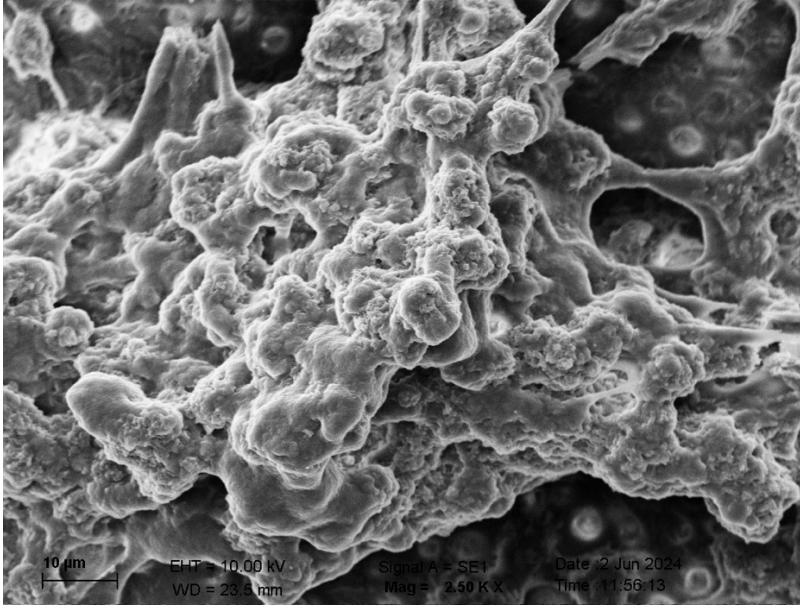
Karadut grubuna ait (Şekil 4.13) SEM görüntüleri incelendiğinde biyofilm yoğunluğunun; kontrol grubuna (Şekil 4.10) göre daha az olduğu belirlenmiştir. Metilen mavisini uygulanan dentin disklerinin SEM görüntüleri (Şekil 4.12) incelendiğinde ise yoğun biyofilmi ifade eden, katmanlı bir görüntü belirlenmiştir. CHX grubu görüntülerinde (Şekil. 4.11) diğer gruplardan farklı olarak; biyofilm tabakasının bulunmadığı ve dentin kanal ağzlarının ortaya çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar; CHX'in karadut ve metilen mavisine göre antibakteriyel etkisinin ve biyofilm kaldırma potansiyelinin daha fazla olduğu görüşünü desteklemektedir.



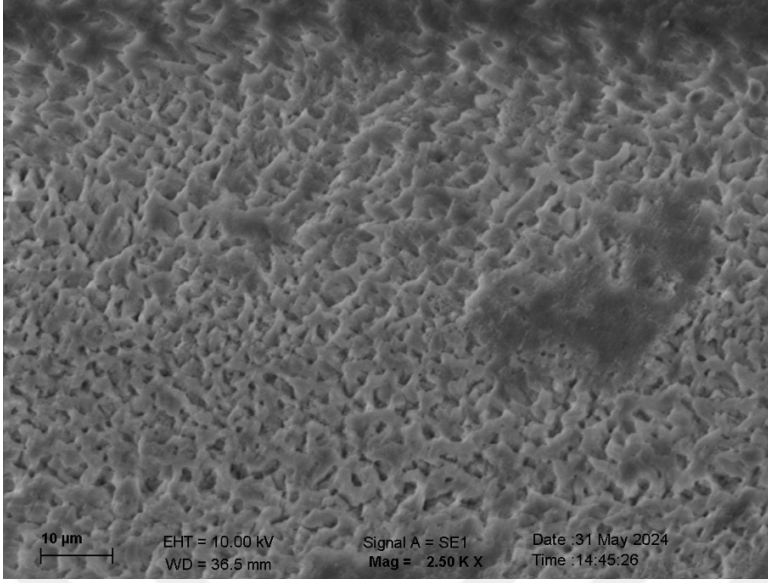
Şekil 4.10: Kontrol grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)



Şekil 4.11: Klorheksidin Diglukonat grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)



Şekil 4.12: Metilen mavisi grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)



Şekil 4.13: Karadut grubunun Taramalı Elektron Mikroskop görüntüsü (X2500)

5. TARTIŞMA

Kavite preparasyonu sonrasında dentin içerisinde kalan rezidüel bakteriler enzimatik aktivitelerini sürdürürler. Rezidüel bakterilerin varlığı, sekonder çürük oluşumuna zemin hazırlar. Sekonder çürük oluşumu; postoperatif hassasiyet ile pulpal enflamasyona yol açabilir. Kavite tabanındaki sekonder çürük, semptomlar oluşturarak restorasyonun yenilenmesi, pulpa tedavileri gibi daha karmaşık, maliyetli müdahalelerin gerekliliğini doğurabilir. Bu nedenle, kavite preparasyonu tamamlandıktan sonra, kavitedeki rezidüel bakterilerin elimine edilebilmesi amacıyla restorasyon öncesinde antimikrobiyal bir materyal ile kavitenin dezenfekte edilmesi önerilir (5,20,23).

Kavite dezenfeksiyonunda kullanılan antimikrobiyal ajanlar, diş hekimliği uygulamalarında pulpal enflamasyon riskini minimize etmek ve tedavi tekrarlarını önlemek amacıyla çeşitli türlerde geniş bir yelpaze sunar (219,225,283). CHX (25,26,244), NaOCl (27,214,223), benzalkonyum klorür, H₂O₂ (208,266,280), ozon ve lazer uygulamaları (21,219,228,229,243) diş yüzeylerinin dezenfeksiyonunda kullanılan antimikrobiyal ajanlardır. Metilen mavisi, toluidin mavisi gibi fotosensitizör maddelerin fotodinamik terapi ile diş yüzeyine uygulanarak antimikrobiyal etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur. (41,248,252). *Propolis* ve *Aleo vera* gibi bitkisel bazlı ajanların da kavite dezenfektanı olarak kullanıldığı bilinmektedir (33,34). Son zamanlarda yapılan çalışmalarda ise karadutun; *S. mutans*, *E. faecalis*, *E. coli* gibi bakteriler üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. (36,47,49,275).

Güncel literatürler göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında CHX, metilen mavisi ve karadut materyallerinin antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılmasına karar verilmiştir. CHX'in kavite dezenfeksiyonunda güçlü antibakteriyel etkisiyle altın standart olarak kabul görüldüğü için (25), metilen mavisi son dönemlerde gündemde olan, antimikrobiyal fotodinamik terapide en çok tercih edilen fotosensitizör olduğu için (284,285) tercih edilmiştir. Kimyasal içerikli bu materyallere alternatif olarak ağız yaraları, dişeti ve kanser hücreleri üzerinde iyileştirici etkileri olduğu ve fenolikler ve flavonoidler gibi kimyasal bileşenleri sayesinde antimikrobiyal özellikler gösterdiği bilinen (28,31) karadut çalışmaya dahil edilmiştir.

Ağız içindeki dinamik yapı, bireysel farklılıklar, mikrobiyal çeşitlilik, etik gereklilikler *in vivo* çalışmaları sınırlamaktadır. Bu nedenle, ağız içi biyolojik süreçlerin daha kontrollü ve tekrarlanabilir şekilde incelenmesini sağlayan *in vitro* ve *in situ* modeller geliştirilmiştir. Bu tür çalışma modellerinin en önemli avantajları; standardizasyonun daha kolay sağlanabilmesi, deneydeki değişkenlerin her test aşamasında incelenebilmesi, yeni değişkenlerin aşamalı olarak tanıtılabilmesi ve diş dokusundaki değişikliklerin belirlenmesi için hassas ölçüm yapan teknolojik cihazların kullanılabilmesi şeklinde sıralanabilir. *In vitro* modeller, uygulama süresinin kısalığı, *in situ* çalışmalara kıyasla daha az araştırmacı gerektirmesi, ve maliyet açısından daha uygun olması nedeniyle sıkça tercih edilmektedir (286). Bu avantajlar doğrultusunda, tez çalışmasının *in vitro* koşullarda yürütülmesine karar verilmiştir.

İnsan dişlerinin kullanıldığı *in vitro* çalışmaların; ileride yapılacak olan *in vivo* deneylere ışık tutacağı düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında sistemik rahatsızlığı olmayan, 18-40 yaş aralığında bulunan hastalardan çekilen yetmiş altı adet çürüksüz üçüncü molar diş kullanılmıştır. Deneylerde kullanılacak insan dişlerinin saklama koşulları, *in vitro* deneylerde elde edilen sonuçların güvenilirliğini etkileyen önemli bir faktördür. Çekilen insan dişlerinin bozulmadan saklanabilmesi için en çok tercih edilen çözeltiler nötral pH seviyesine sahip distile su ve serum fizyolojiktir. Bu nötral çözeltilere, mikroorganizmaların çoğalmasını önlemek amacıyla; NaOCl, timol, glutaraldehit, formalin ve kloramin T gibi antibakteriyel özellikler taşıyan maddeler eklenebilir. Serum fizyolojik veya distile suya %0,1 oranında timol eklenmesinin, dişte histolojik değişiklikler oluşturmada antimikrobiyal etkinlik sağladığı bildirilmiştir (287,288). Bu nedenle, bu tez çalışmasında, yetmiş altı adet diş örneği deney süresince %0,1'lik timol içeren distile su içerisinde muhafaza edilmiş ve dişlerin toplanmasının ardından iki ay içinde deney çalışmalarına başlanmıştır.

Dentin yüzeyi, mineye göre antibakteriyel etkinliğin değerlendirilmesi açısından daha elverişli bir ortam sunar çünkü dentinde bakteriyel biyofilm oluşumu mineye göre daha kolay gerçekleşir. Dentin disklerinin kullanılması, deneylerin daha kolay standardize edilmesini sağlayarak *in vitro* çalışmalar için avantaj sağlar.

Ayrıca, dentin diskleri belirli boyut ve kalınlıkta kesilerek hazırlandığından, deneylerin standardizasyonu sağlanmış olur ve tekrarlanabilirliği artar (289). Mineye kıyasla dentin yüzeyinin daha tutarlı ve güvenilir sonuçlar vereceği düşünüldüğü için bu tez çalışmasında 1 mm kalınlıkta hazırlanan ve sterilize edilerek standardizasyonu sağlanan dentin diski tercih edilmiştir.

Kavite dezenfeksiyonu ile ilgili yapılan birçok çalışmada, çürük oluşumunda etkili bakterilerden biri olan *S. mutans* kullanımı tercih edilmiştir (290–293). Aynı zamanda *L. casei*'nin, *S. mutans* ile birlikte çürük yapıcı kolonizasyonlar oluşturabildiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (294,295). *S. mutans*, *L. casei* ve *S. sobrinus*'un birlikte kullanıldığı Oliveria ve arkadaşlarının 2015 yılında yaptığı çalışmada *F. nucleatum* ve *Atopobium rimae* suşları da çalışmaya dahil edilmiştir (296). Bu tez çalışmasında çürük oluşumunda ana etken olarak bilinen *S. mutans* ve çürüğün ilerlemesinde etkili olan ve *L. casei* bakterileri ile çalışılmıştır. Ağız ortamındaki kolonizasyon oluşumunu taklit edebilmek amacıyla dentin diskleri üzerinde ikili biyofilm oluşturulmuş ve antimikrobiyal deney materyalleri ikili biyofilm üzerine uygulandıktan sonraki canlı ve cansız bakteri hücre sayıları değerlendirilmiştir.

Kavite dezenfeksiyonunda kullanılan ajanların antimikrobiyal etkilerinin; konsantrasyon, kimyasal bileşim ve uygulama süresi gibi parametrelere bağlı olarak değiştiğini, özellikle geniş bir kullanım alanına sahip olan CHX'in bu parametrelere göre etkinliğinin farklılık gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (26,297,298). Ağız gargaraları formunda olan CHX'in yüzdeleriyle ilgili yapılan çalışmalarda %0,12 ve %0,2 konsantrasyonlarında CHX kullanımı önerilmektedir (297,298). Gargara formundaki CHX için %0,2 üzeri konsantrasyonlar için yan etki gösterdiğini bildiren çalışmalar mevcuttur (26,297,298). CHX en yüksek konsantrasyon kullanımı verniklerdir. %40, %10 konsantrasyon seviyelerine kadar yükselebilen CHX vernikler çürük önlemede etkili ajanlardır (26,299). CHX'in kavite dezenfeksiyonunda farklı oranlarda uygulandığı bilinse de en yaygın konsantrasyon %2'dir. Gilbert ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı bir çalışmada CHX düşük konsantrasyonlarda (%0,02- %0,06) bakteristatik, yüksek konsantrasyonlarda (%0,1, %2) bakterisidal etki gösterdiği görülmüştür (300).

Cieplik ve arkadaşlarının 2019 yılında yaptığı bir başka çalışmada da %0,02-%0,06 gibi düşük konsantrasyonlardaki CHX, bakteri hücre duvarında potasyum kaybına neden olarak bakterinin aktivitesini durdurucu bakteriositatik etkili olduğu; %0,1 ve üzeri yüksek konsantrasyonlarda bakteri hücre duvarının yapısını tamamen bozarak bakterisidal etki gösterdiği bildirilmiştir (301).

Mohan ve arkadaşlarının yaptığı *in vitro* çalışmada %2'lik CHX kontrol grubu olarak kabul edilmiş ve Asidüle Fosfat Fluorid (APF) jel, diyet lazer ve propolis ile *S. mutans* ve *Lactobacillus*'lardan oluşan biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkileri karşılaştırılmıştır. Üretici firmanın önerisine uyularak 20 sn uygulanan %2 konsantrasyondaki CHX'in, APF jelden daha etkili olduğu; diyet lazer ve propolisin ise CHX kadar güçlü antibakteriyel özellik gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (21). 2010 yılında Kandaswamy ve ekibi tarafından yürütülen bir çalışmada propolis, povidon iyodin, %2 CHX jel ve CaOH₂'nin dentin yüzeyinde biyofilmi oluşturulan *E. Faecalis*'e antibakteriyel etkilerini karşılaştırmışlardır. %2 CHX jelin *E. Faecalis* üzerinde %100 antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna ulaşmışlardır (266). Krithikadatta ve arkadaşlarının yaptığı bir başka çalışmada da %2 CHX jelin *E. Faecalis* üzerinde %100 antibakteriyel etki gösterdiği sonucu bildirilmiştir (302). CHX'in %2 gibi yüksek dozlarda bakterisidal etki göstermesi ve CHX'in dentin yüzeyine olan afinitesi sayesinde dentin tübüllerine daha iyi nüfuz etmesi bu sonuçları açıklar niteliktedir (266,302). Kapdan ve arkadaşları çekilmiş çürüksüz dişlerde açtıkları kaviteleri *S. mutans* ile kontamine ettikten sonra üretici firmanın belirttiği gibi 20 sn %2 CHX (Cavity Cleanser Bisco USA) ve ozon uygulamışlardır. %2 CHX uygulanan grubun *S. mutanslar* üzerinde daha antibakteriyel olduğu görülmüştür (219). CHX'in kavite dezenfeksiyonunda kullanıldığı bir çalışmada %2 CHX (Cavity Cleanser Bisco, USA) firma tarafından önerilen 20 sn uygulama önerisine uyularak kullanılmıştır. Güçlü antibakteriyel etkileri sayesinde rezidüel çürüğün önlenmesinde etkili olabileceği bildirilmiş fakat CHX, uygulanmadan önce %37'lik H₃PO₄ ile 15 sn yüzey pürüzlendirmesi yapıldığı için H₃PO₄'ün de CHX'e ek olarak antibakteriyel etki gösterebileceği düşünülmektedir (49). Bu tez çalışmasında da %2 CHX (Cavity Cleanser Bisco USA) kullanım talimatlarını uygun şekilde 20 sn uygulanmış ancak CHX'in antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi amacıyla; CHX uygulaması öncesi %37'lik H₃PO₄ ile pürüzlendirme yapılmamıştır.

Benzer çalışmaları destekler nitelikte yüksek antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Cavity Cleanser'da bulunan %2 CHX'in; maya, mantar, gram pozitif ve gram negatif mikroorganizmalar, fakültatif anaerobik ve aerobik mikroorganizmalar üzerinde geniş etki spektrumuna sahip olduğu bilinmektedir. Ancak, CHX'e en duyarlı olan mikroorganizmaların gram pozitif koklar, özellikle *S. mutans* olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (98,304). Bu çalışmada gram pozitif kok olan *L. casei* ve *S. mutans* ikili biyofilmi üzerinde %2 CHX'in yüksek antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır.

Geçmişten günümüze bu amaçla yaygın olarak kullanılan CHX, EDTA ve NaOCl gibi antimikrobiyal ajanlara alternatif olarak günümüzde 'Antimikrobiyal fotodinamik terapi' tercih edilebilir (42,46,248,285). Antimikrobiyal fotodinamik terapinin biyofilm üzerindeki etkisi *in vitro* ve *in situ* koşullarda yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Son dönemlerde antimikrobiyal fotodinamik terapi ile yapılan çalışmalarda fotosensitizör madde olarak; zencefil, klorin e6, toluidine mavisi ve metilen mavisi gündemdedir (41,46). Metilen mavisi diş hekimliğinde en yaygın kullanılan fotosensitizör maddelerden biridir. Kolay erişilebilir olması, ekonomik olması ve güçlü antimikrobiyal özellikleri metilen mavisinin avantajlarıdır (41,43,305). Fotosensitizör maddenin aktive edilmesi için en çok kullanılan ışık kaynakları; lazerler ve LED'lerdir. Lazerler belirli dalga boyuna sahip, yüksek verimlilikte ve güçlü etkileriyle bilinir. Yüksek güçlü lazerler ürettikleri fazla ısı sebebiyle dokulara hasar verebilirler ve maliyetleri yüksek cihazlardır. LED ışık kaynakları maliyetinin düşük ve daha güvenli olmalarından dolayı kullanımı desteklenmektedir (248,305,306). Nemezio ve arkadaşlarının 2017 yılında yaptığı bir çalışmada %0,9 NaOCl, %0,12 CHX, ve diyet lazer ile aktive edilen %0,01 metilen mavisinin *S. mutans* biyofilmi üzerindeki etkilerini karşılaştırmıştır. %0,12 konsantrasyonundaki CHX'in pozitif kontrol grubu olarak kullanıldığı bu çalışmada antimikrobiyal fotodinamik terapinin ışık kaynağı; 660 nm dalga boyunda 320 J/cm² enerji yoğunluğunda diyet lazer olarak belirlenmiştir. %0,01 konsantrasyondaki metilen mavisi 5 dk boyunca *S. mutans* biyofilmi ile kaplanan akrilik rezin disk üzerinde bekletilmiştir. Daha sonra disk üzerindeki metilen mavisine 90 sn diyet lazer uygulanmış ve sonuç olarak; antimikrobiyal fotodinamik terapinin uygulanan diskler üzerinde bakteri canlılığının azaldığı görülmüştür. Fakat CHX uygulanan biyofilmlerde antibakteriyel etki daha güçlü bulunmuştur.

Metilen mavisinin uygulama süresinin uzunluğu, diyet lazerin erişilebilirliğinin zor ve pahalı olması, biyofilmin sadece bir tür bakteri ile oluşturulması; *in vivo* koşullarda yapılacak yeni çalışmalar için limitasyonları olarak gösterilmiştir (307). 2023 yılında Hanan ve arkadaşları, dentin diskleri üzerinde oluşturdukları *S. mutans* biyofilminde %2 CHX, %6 NaOCl, LED ışık ile aktive edilen kurkumin ve diyet lazer ile aktive edilmiş metilen mavisinin antibakteriyel etkilerini değerlendirmişlerdir. 100 mg/L metilen mavisi hazırlanarak nötr pH seviyelerinde kalması sağlanmıştır. Metilen mavisi uygulanan dentin yüzeylerine 60 sn süreyle 660 nm dalga boyunda 40 mW/cm güç aralığında diyet lazer uygulanmıştır. CLSM analizinde, özellikle metilen mavisi ile antimikrobiyal fotodinamik terapi uygulanan dentin disklerinde, *S. mutans* canlılığının CHX ve NaOCl'ye kıyasla belirgin şekilde azaldığı gözlemlenmiştir. Hanan ve arkadaşlarının yaptığı bu çalışmada; benzer çalışmalardan farklı olarak antimikrobiyal fotodinamik terapinin, %2 CHX'ten daha etkili olması kullanılan lazer türü, ışınlama süresi ve radyasyon parametreleri gibi fotodinamik terapinin değişkenlerinden etkilendiği düşünülmektedir (39). Karaoğlu ve arkadaşlarının 2020 yılında yürüttüğü bir çalışmada; antimikrobiyal fotodinamik terapinin kök kanalları içine ekilen *E. Faecalis* üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. %0,1 metilen mavisi, %0,1 toluidine mavisi ve tetra 2-merkaptopiridin içeren çinko ftalosiyanın kök kanallarına her kanala eşit şekilde ve ayrı ayrı 1'er ml uygulanmıştır. 60 sn boyunca 630 nm dalga boyuna sahip LED ışık uygulanarak fotosensitizör materyaller aktive edilmiştir. Yapılan incelemeler sonucunda düşük konsantrasyonlarda metilen mavisi ve toluidin mavisi ile uygulanan antimikrobiyal fotodinamik terapinin kanal içi bakteri eliminasyonunda etkili olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Fotosensitizörlerin foto-aktivasyonu için görünür bölgede ışık üreten, lazerler veya lazer dışındaki diğer ışık kaynaklarının (LED, beyaz ışık, halojenler) kullanılabildiği bildirilmiştir (308). Foto-aktivasyon için helyum-neon (He-Ne) (309,310) ve diyet lazerler (21,244) kullanılabilir. Lazerler kullanımı için özel bir eğitim gerekmesi, maliyetlerinin yüksek olması ve uygulandığı bölgede yüksek ısı üreterek çevre dokulara zarar vermesi gibi dezavantajları bulunmaktadır (293,295,296). 2002 yılında Mills ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada LED ışık kaynaklarının dokudaki etki derinliğinin halojen ışık kaynaklarından fazla olduğu bildirilmiştir (311). Panhoca ve arkadaşları 2016'da 450 nm dalga boyuna sahip mavi LED ışık cihazı ile 630 nm dalga boyuna sahip kırmızı LED ışık cihazıyla yaptıkları antimikrobiyal fotodinamik terapide iki grup için de mikrobiyal yükte azalma tespit etmişlerdir (312).

Yapılan çalışmalar incelendiğinde fotosensitizör maddenin foto-aktivasyonu için lazer kullanımı ve lazer dışındaki diğer ışık kaynaklarının (LED, beyaz ışık, halojenler) kullanımıyla benzer ve başarılı sonuçlar elde edildiği görülmüştür. LED cihazların dalga boyu 350-1100 nm arasında değişirken, diş hekimliğinde kompozit polimerizasyonunda kullanılan LED cihazların dalga boyu 400-500 nm arasında değişmektedir. Mavi ışık üreten bu LED ışık cihazları; antimikrobiyal fotodinamik terapide kullanılan birçok fotosensitizörü aktive edebileceği bildirilmiştir (313). Günümüze kadar yapılan birçok çalışmada diş hekimliğinde polimerizasyon amacıyla kullanılan LED ışık cihazları fotosensitizörlerin foto-aktivasyonu için kullanılmıştır. Farklı dalga boylarında ışık üreten cihazların benzer sonuçlar verdiği görülmüştür (290,293,295,314). Bu bilgiler ışığında; tez çalışmasında yüksek enerjili lazerler yerine, her diş hekimi kliniğinde bulunan, kullanımı kolay, maliyeti düşük ve yüksek ısı üretmeyen, dental ışık kaynaklarından olan LED ışık kaynağı tercih edilmiştir.

Antimikrobiyal fotodinamik terapide, fotosensitizörün ışık ile aktive edilme süresi ve ışık uygulanmadan önce bakteri ile temas süresi sonuçları etkileyebilen parametrelerdir. Bazı çalışmalarda foto-aktivasyondan önce metilen mavisinin bakteri ile temas süresini 2-5 dk olarak bildirmiştir (291,307,315,316). Klinik ortamda uygulanabilirliği göz önünde bulundurarak bu süreyi 30 sn ve 60 sn olarak bildiren çalışmalar bulunmaktadır (296,315,317). Metilen mavisinin foto-aktivasyondan önce bakteri ile temas süresindeki artışın, sonuçlar üzerinde bir fark yaratmadığı bildirilmiştir (291,296,314,318). Aluarenga ve arkadaşlarının 2015 yılında sürdürdüğü bir çalışmada metilen mavisinin farklı foto-aktivasyon süreleri (1,3,5 dk) sonucunda antibakteriyel etkileri karşılaştırılmıştır. 1 dk ve 3 dk aktive edilen metilen mavisi gruplarında antibakteriyel etki izlenmiş fakat gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. 5 dk foto-aktive edilen metilen mavisi grubunun en yüksek antibakteriyel etkiyi gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (315).

Mendez ve ekibi 2018 yılında *S. mutans* ve *Lactobacillus* biyofilmi ile kaplanan dentin diskleri üzerine %0,01 konsantrasyondaki metilen mavisi uygulamışlar ve metilen mavisi LED ile aktive edilmeden önce dentin disklerini karanlık ortamda 2 dk bekletmişlerdir. Daha sonra 630 nm dalga boyundaki LED ışık ile farklı enerjilerde (37,5 ve 75 J/cm²) ve farklı sürelerde (23 ve 46 dk) metilen mavisi aktive etmişlerdir. Elde edilen veriler sonucunda metilen mavisi LED ışık ile aktive edildiğinde, biyofilmdeki bakterilerin canlılığının ve metabolik aktivitesinin azaldığı görülmüştür. Fakat metilen mavisi aktive edilmeden bekletilme süresi ve LED ışık ile aktivasyon süresinin uzun olması klinik ortamda uygulanabilirliğini azalttığı ve diş hekimliği kliniklerinde bulunan yüksek güce sahip LED ışıkların kullanımı ile uygulama süresi 30-60 sn'ye kadar düşürülebileceği bildirilmiştir (316). Diniz ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı bir çalışmada %0,01, %0,02 ve %0,05 konsantrasyonlardaki metilen mavisi 60 sn foto-aktif edildiğinde antibakteriyel etki sağlayan serbest oksijen radikallerin sentezlendiği görülmüştür (319). Karaoğlu ve arkadaşları 2020 yılında kök kanallarının dezenfeksiyonu için metilen mavisini LED ışık cihazı ile 60 sn aktive etmişlerdir. %0,0015 gibi düşük konsantrasyonda bile 60 sn foto-aktivasyon sonucu antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir (320). Entezari 2022 yılında ekibiyle yürüttüğü bir çalışmada %0,002 konsantrasyonda metilen mavisini aktive etmeden ve 60-100 sn foto-aktif etmiştir. Sonuçları karşılaştırdığında metilen mavisinin tek başına antibakteriyel etkisinin, 60 ve 100 sn foto-aktif edilen iki gruba göre daha az olduğu ek olarak foto-aktivasyon süresi arttıkça antibakteriyel etkinin arttığı sonucuna ulaşılmıştır (41). 2023 senesinde Hanan ve arkadaşları CHX, NaOCl, %0,05 kurkumin ve %0,01 konsantrasyonda metilen mavisi ile yaptıkları bir çalışmada; 60 sn foto-aktivasyonu sağlanan metilen mavisinin *S. mutans*'a karşı antibakteriyel etkisinin, CHX dahil diğer üç gruptan daha yüksek olduğu bildirilmiştir (39). Klinik çalışmalar için uygulanabilir olması ve yeni araştırmalara yön verebilmesi amacıyla bu tez çalışmasında; metilen mavisi; 60 sn'lik foto-aktivasyon öncesinde, dentin diskleri üzerine 60 sn bekletilmiştir.

Fotodinamik terapide kullanılan metilen mavisinin farklı konsantrasyonlarda insan pulpa hücreleri üzerindeki etkilerini değerlendiren Diniz ve arkadaşları; %0,0125, %0,025 ve %0,050 konsantrasyonlarındaki metilen mavisinin dental pulpa hücrelerine etkilerini araştırmışlardır. %0,050 konsantrasyonda uygulanan metilen mavisi grubunda nekrotik dental pulpa hücre sayısı diğer gruplara göre belirgin şekilde daha yüksek bulunmuştur. %0,025 metilen mavisi uygulandıktan 24 saat sonra nekrotik dental pulpa hücresinde artış izlenmiştir. Tüm konsantrasyonların bakteriler üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Fakat %0,050 gibi yüksek dozda metilen mavisinin ışık ile aktive edilmeksizin, tek başına dental pulpa hücreleri üzerinde sitotoksik etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır. Derin kavitelerin dezenfeksiyonu için daha çok *in vivo* çalışmaya ihtiyaç olduğu bildirilmiştir (319). 2022 yılında Entezari ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada %0,02 konsantrasyonda metilen mavisi kullanmışlardır. %0,02 metilen mavisinin tek başına *L. acidophilus* üzerinde etkili olduğu görülmüştür (41). Bu tez çalışmasında; ileride yapılacak olan *in vivo* çalışmalarda metilen mavisi kullanımı ve çalışmanın sürdürülebilirliği göz önünde bulundurularak; dental pulpa hücreleri üzerinde toksik etki yaratmayacak şekilde %0,02 konsantrasyonda metilen mavisi kullanılmasına karar verilmiştir.

Yapılan birçok çalışmanın ışığında ve *in vivo* koşullarda uygulanabilirliği göz önünde bulundurularak bu tez çalışmasında *in vitro* ortamda %0,02 konsantrasyonda, her dentin diski üzerine 250 µL kullanılan metilen mavisinin foto-aktivasyonu için diş hekimliği kliniklerinde en çok tercih edilen polimerizasyon cihazı Woodpecker LED-D kullanılmıştır. Dalga boyu 420-480 nm olan bu cihazın ışık yoğunluğu 1000-1700 mW/cm²'dir. 60 sn metilen mavisi uygulanmış dentin disklerinin; 60 sn boyunca Woodpecker LED- D mavi LED ışık cihazı ile foto-aktivasyonu sağlanmıştır. MİK deneyi sonucunda; LED ile aktive edilmeden *S. mutans* ve *L. casei* üzerine uygulanan metilen mavisinin antimikrobiyal etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır. CLSM ve SEM analizi için hazırlanan dentin diskleri üzerine LED ile aktive edilerek uygulanan %0,02'lik metilen mavisinin; *S. mutans* ve *L. casei* ile oluşturulan biyofilmde hücre ölümüne neden olduğu; fakat biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisinin CHX kadar güçlü olmadığı görülmüştür.

Kullanılan LED ışık kaynağının dalga boyu gücünün metilen mavisini aktive ettiği fakat yeterli olamadığı düşünülmektedir. Aynı zamanda toksik etki yaratmadığı bilinen daha yüksek konsantrasyonlarda metilen mavisi kullanımının, foto-aktivasyon öncesi dentin diskleri üzerinde bekletilme süresini ve foto-aktivasyon süresinin uzatılmasının; antibakteriyel etkiyi arttıracakı düşünülmektedir.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan kavite dezenfektan materyallerinin çoğunun içeriği kimyasaldır. Kimyasal içerikli materyallerin yan etkilerinden dolayı tercih etmeyen hastalar için alternatif olarak doğal içerikli kavite dezenfeksiyon materyallerine yönelim artmıştır. Bu durumun tıp dünyasından diş hekimliğine yansması holistik diş hekimliğidir. Bir bireyin psikolojik, sosyal ve fiziksel iyilik halini koruma felsefesiyle şekillenen holistik yaklaşımın son günlerde popüleritesinin artmasıyla diş hekimliğinde doğal içerikli, biyouyumlu materyaller ile minimal invaziv yaklaşımlara yönelim artmaktadır (321,322). Bitkilerin biyolojik olarak aktif bileşenlerinden olan flavonidlerin, antimikrobiyal etki gösterdiği bilinmektedir. İçerdiği flavonidler sayesinde güçlü antimikrobiyal özelliğe sahip karadut; oral mukaza yaraları üzerindeki teröpatik etkisi ile tıp dünyasında oldukça gündemdedir. Karadutun meyvesi, yaprağı ve gövdesinden elde edilen ekstraların antioksidan, antihistaminik, antiinflamatuvar, antiHIV, hipolipidemik, antidiabetik, antifungal, antiviral ve antibakteriyel aktiviteleri olduğu bilinmektedir (36,49,275,323).

Karadut, Türkiye’de ağız yaraları, çocuklarda sık görülen pamukçuk ve boğaz enfeksiyonu gibi durumlarda geleneksel olarak en yaygın kullanılan bitkilerdendir (324). Aynı zamanda ağrı kesici, ateş düşürücü ve diş eti iltihaplanmalarında teröpatik etkileriyle bilinmektedir (324,325). Karadut ekstresi ile yapılan bir çalışmada HPLC analizinde askorbik asit, klorjenik asit, gallik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşikler tespit edilmiştir. Bu ekstrenin hiperlipidemik sıçanlarda serum kolestrolu düşürerek antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterdiği bildirilmiştir (326). Zhou ve arkadaşları karadut ekstresinin insizyon ve eksizyon yaraları üzerindeki antiinflamatuvar etkisini araştırmışlardır. Karadut ekstresinin yara iyileşmesini ve ödemin azalmasını hızlandırdığı görülürken antioksidan etkisi de bildirilmiştir (327). Turan ve arkadaşları karadut ekstresini ilk kez insan prostat adenokarsinom üzerindeki etkisini incelemişlerdir. Ürettikleri karadut ekstresinin HPLC analizinde baskın dozda askorbik asit ve klorojenik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşenler içerdiğini bildirmişlerdir.

Karadutun; kanser hücrelerinin çoğalmasını engellediğini hatta kanser hücrelerini apoptoza uğratarak ölümüne neden olduğu görülmüştür (328). Tıp dünyasında yapılan araştırmalar ışığında ağız ve diş ile ilgili çalışmalara da karadut dahil edilmeye başlanmıştır.

Budiman ve ekibinin 2019 yılında yaptığı çalışmada; karadut ekstresini sakız formunda kullanarak *S. mutans* ve *S. sangius* üzerindeki etkilerini incelemiş ve antibakteriyel etkileri olduğunu belirtmişlerdir. (329). 2020 yılında yine Budiman tarafından yürütülen çalışmada karadut ekstresinin *S. mutans*'lar üzerindeki antibakteriyel etkisi MİK ve SEM ile test edilmiştir. Karadut ekstresinin *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etki gösterdiği ve çürük önleyici olarak kullanılma potansiyeli olduğu bildirilmiştir (38). Tüm bu çalışmalar göz önüne alındığında karadutun birçok bakteri üzerinde antibakteriyel etkisi literatürler ile pek çok kez kanıtlanmıştır (38,277,327–329). Ancak karadutun diş çürüğüne neden olan bakteriler ve biyofilm üzerindeki aktivitesini değerlendiren çalışmalar yeterli değildir. Direkt diş yüzeyine uygulanarak antibakteriyel etkisinin değerlendirildiği bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu tez çalışmasında, etanol ile karadut ekstresi üretilmiş, üzerinde *S. mutans* ve *L. casei* ile biyofilm oluşturulmuş dentin disklerine uygulanmıştır. Karadutun dentin diskleri üzerindeki antibakteriyel etkisi MİK, CLSM ve SEM analizleri ile değerlendirilerek ileride yapılacak inovatif çalışmalara katkı sağlamak amaçlanmıştır.

Karadut ile ilgili yapılan çalışmalarda meyve, yaprak ve dalından elde edilen ekstraktlar kullanıldığı bildirilmiştir (36,47,330). Karadut meyvesinde flavonoidler, antosiyaninler, fenoller, karotenoidler ve askorbik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşenler bulunmaktadır. Bu bileşenlerin antihistaminik, antienflamatuar ve antioksidan etki gösterdiği bildirilmiştir (49,328). Aynı şekilde yapılan çalışmalarda karadutun yapraklarından elde edilen ekstraktlarda da antosiyaninler, flavonoidler, klorojenik asit askorbik asit, kuinik asit, sitrik asit ve gallik asit gibi biyolojik olarak aktif bileşenlerin antibakteriyel, antienflamatuar, antioksidan etkiler gösterdiği bildirilmiştir (36,47,330,331).

Aulifa ve ekibinin 2018 yılında yürüttüğü bir çalışmada karadutun meyve, yaprak ve gövde kabuğundan etanol ile oluşturulan ekstralarının antibakteriyel ve antioksidan etkileri değerlendirilmiştir. Üç ekstrenin de *Staphylococcus epidermidis* ve *Propionibacterium acnes* bakterilerinin hücre duvarı yapısını bozarak, antibakteriyel etki gösterdiği tespit edilmiştir. Yapılan analizlerde gövde kabuğu ve meyvedeki biyolojik olarak aktif bileşenlerin daha çeşitli olduğu ve MİK deneylerinde daha fazla bakteri inhibasyon alanı oluşturdıkları bildirilmiştir (49). 2022 yılında Rocha ve arkadaşlarının yürüttüğü bir çalışmada %70 etanol ile hazırlanan yaprak ekstresinin MİK deneylerinde; *S. aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella flexneri*, *E. faecalis*, *Serratia marcescens*, *Salmonella enterica* bakterileri üzerinde antibakteriyel ve antioksidan etki gösterdiğini bildirmiştir (47). Souza ve ekibinin yürüttüğü bir başka çalışmada ise %95 etanol ile hazırlanan karadut yaprak ekstresinin MİK deneyinde düşük konsantrasyonlarda bile; *Bacillus cereus*, *E. faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *S. aureus* bakterilerinin büyümesini engellediği izlenmiştir (36). Karadut yaprak ekstresinin, ratlarda oluşturulan ödemli ve granüloamatöz dokudaki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada; ekstrede bulunan biyolojik olarak aktif bileşenlerin antienflamatuar etkileri bildirilmiştir (332). Karadut yaprak ekstresinin %70 metanol ile hazırlandığı ve kanser hücreleri üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir başka çalışmada izole edilen rahim ağzı kanseri hücrelerine karadut yaprak ekstresi uygulanmıştır. Rahim kanseri hücrelerini inhibe ettiği görülen karadut yaprak ekstresinin antikanser etkisi olduğu saptanmıştır (333). 2023 yılında yapılan bir çalışmada karadutun gövde kabuğu, meyve ve yaprakları analiz edildiğinde; karadut yaprağının fenolik ve flavonoid gibi biyoaktif bileşenler açısından daha zengin içerikte olduğu belirtilmiştir (330). Flavonoid ve fenolikler gibi biyoaktif bileşenler açısından zengin olan yaprak ekstresinin; bakteri, mantar ve virüs gibi patojenler üzerinde daha güçlü inhibe edici etkiye sahip olduğu tespit edilmiştir (47,330,331,334). Ek olarak karadut yapraklarının ekstre üretim sürecinde işlenebilirliği meyve ve gövde kabuğuna göre daha kolay olması ve yaprakların yıl boyunca temin edilebilmesi; çalışmaların sürdürülebilirliği için önemlidir (330). Yapılan çalışmaların ışığında bu tez çalışmasında her mevsim ulaşılabilirliğinin kolay olması ve yapılacak çalışmaların sürdürülebilirliği için karadutun yaprak ekstresinin üretilmesine karar verilmiştir.

Tıp dünyasında bitkisel ürünlerin gündemde olduğu, holistik yaklaşımın daha çok tercih edildiği bugünlerde kullanılacak olan bitki ekstresini hazırlama yöntemi de oldukça önemli bir süreçtir (335). Ekstraksiyon yönteminin ürün verimliliğini etkileyebilir. Geleneksel ekstraksiyon yöntemleri; maserasyon, perkolasyon, infüzyon ve kaynatma (Soxhlet ekstraksiyonu) olarak bilinmektedir. Mikrodalga destekli / ultrasonik destekli ekstraksiyon ve süper kritik sıvı ekstraksiyon yöntemleri günümüzde gelişmiş laboratuvarlarda ileri düzey ekstraksiyon yöntemleri olarak kullanılmaktadır (330,335). Karadut ekstresi üretimi ile ilgili çalışmalar incelendiğinde meyve ve yaprak ekstresi oluşumu için farklı ekstraksiyon tekniklerinin kullanıldığı görülmüştür. Budiman ve ekibinin karadut ile yaptığı çalışmalarda karadut meyvesi %96 oranında etanol ile karıştırılarak ve 50 °C maserasyon yöntemi ile ekstre üretilmiştir. Üretilen ekstrenin antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (38,329). Karadut meyve ve yaprak ekstresinin %70 etanol ve kaynatma (Soxhlet) yöntemi ile üretildiği bir başka çalışmada ise ekstrenin antioksidan etki gösterdiği görülmüştür (330). Aulifa ve ekibinin; karadutun yaprak, meyve ve gövde kabuğundan üretilen ekstrelerin, antibakteriyel etkilerini değerlendirdiği çalışmasında ise etanol ile karıştırılan karadutun tüm ekstreleri maserasyon yöntemi ile üretilmiştir. Yaprak, meyve ve gövde kabuğu ekstrelerinin antibakteriyel etki gösterdiği fakat karşılaştırma yapıldığında bakteri inhibasyonun en çok görüldüğü grubun gövde kabuğu ekstresi olduğu bildirilmiştir (49). Souza ve arkadaşları 2016 yılında yürüttükleri bir çalışmada %96 etanol ile muamele ettikleri kurutulmuş karadut yapraklarını, 50 °C, maserasyon yöntemini kullanarak ekstre üretmişlerdir. Ürettikleri ekstrenin antibakteriyel ve antioksidan etki gösterdiğini bildirmişlerdir (36). Maserasyon yöntemi basit bir süreç olup karmaşık ekipmanlara ihtiyaç yoktur. Maliyeti düşük ve küçük laboratuvarlarda uygulanabilen bir yöntemdir. Düşük sıcaklıklarda çalışılabilmesi için fazla ısıdan kaynaklı gerçekleşebilecek bitkisel bileşik bozulmalarının önüne geçilmiş olur. Yüksek sıcaklık ve yüksek basınç gerektirmeden yüksek verimde ekstreler üretilmesini sağladığı için çevre dostu bir yöntem olarak kabul edilir (47,336). Ekonomik olması, bitkiye zarar vermeyecek şekilde düşük sıcaklıklarda ve basınçta çalışabilmesi ve laboratuvar sürecinin basit olmasından dolayı bu tez çalışmasında karadut ekstresi maserasyon yöntemi ile üretilmiştir.

Karadut ekstresinin kullanıldığı bir çalışmada, kurutularak muhafaza edilen karadut yaprakları %70 etanol ile muamele edilerek 45 °C’de maserasyon yöntemi ile ekstraksiyonu tamamlanmıştır. Üretilen karadut yaprak ekstresinin antibakteriyel ve antioksidan etkileri kaydedilmiştir. Melo ve arkadaşları yaptıkları bu çalışmada; fitokozmetik ürünlerin yan etkisinin mümkün olduğunca az görülmesi aynı zamanda tat ve koku gibi organoleptik özelliklerinin kabul edilebilir olması amacıyla %70 etanol ile ekstraksiyon yaptıklarını belirtmişlerdir (47). Ekstraksiyonun etanol ile yapılmasının avantajlarından biri de etanolün karadut yaprağında bulunan hem hidrofobik hem de hidrofilik yapıdaki flavonoidleri çözerek daha fazla biyoaktif bileşenin etki göstermesini sağlamasıdır. %96 oranındaki etanol daha az oranda su içerdiğinden dolayı hidrofilik yapıdaki flavonoidlerin çözünmesinde; %70 oranında etanol kadar etkili olamayacağı sonucuna varılmıştır. %70 oranında etanol ile oluşturulan karadut yaprak ekstresinin daha fazla flavonoid ve fenoliklerin açığa çıkmasını sağlayarak antibakteriyel, antifungal, antiviral ve antioksidan özelliklerinin daha güçlü olacağı sonucuna varılmıştır (47,337). Karadut ile ilgili yapılan çalışmalardan yola çıkarak bu tez çalışmasında kurutulmuş karadut yapraklarının %70 etanol ile moleküler düzeyde karıştırılarak ekstresi elde edilmiştir. Vukmirovic ve arkadaşlarının karadut yaprağı-%70 etanol ekstresini kaynatma yöntemiyle ürettiği çalışmada HPLC analizi yapılmıştır. 200 HPLC Sistem (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) cihazı ile yaptıkları analizde cihaza kayıtlı 23 farklı fenolikten 8 tanesinin karadut yaprağı-etanol ekstresinde bulunduğunu bildirmişlerdir. Klorojenik asit, rutin, kuarsetin gibi ortak flavanoid ve fenoliklerin bildirildiği bu çalışmada vanilik asit, morin, isokuarsetin gibi farklı fenoliklerde tespit edilmiştir. Bu çalışmada karadut meyvesi-etanol ekstresinin de HPLC analizi yapılmıştır. Toplam fenolik miktarının karadut yaprak ekstresinde daha fazla olduğu görülmüştür (330). Fenolik miktarının fazla olması bitkinin antibakteriyel, antioksidan ve antiinflamatuvar etki gösterme kapasitesinin daha fazla olduğunu belirtmektedir. Melo ve ekibi tarafından yürütülen bir çalışmada ise %70 etanolün kullanıldığı maserasyon yöntemi ile ekstresi oluşturulan karadut yaprağının HPLC analizi Shimadzu Nexera-i LC-20AT marka HPLC cihazı ile yapıldı. Analiz sonuçlarında rutin ve izokuarsetin tespit edildi. İçerdiği bu flavonoidler ve fenolikler sayesinde %70 etanol ile hazırlanan karadut yaprak ekstresinin antibakteriyel etki gösterdiğini bildirmişlerdir (47).

Çalışmalarda birbirinden farklı flavonoid ve fenoliklerin tespit edilme nedeni olarak bitkinin yetiştirildiği bölgenin değişimi gösterilmiştir. Bitkilerin yetiştiği bölgedeki toprağın mineral içeriği, iklim koşulları ve kullanılan gübre flavonoid ve fenolik bileşenlerinin farklı olmasına neden olduğu gözlemlenmiştir. (338). Aynı zamanda HPLC analiz cihazları, sistemlerinde kayıtlı olan flavonoid ve fenolikleri baz alarak bitkinin bileşenlerini belirlediği bilinmektedir. Bu tez çalışması için özel olarak üretilen karadut etanol ekstresinin içerdiği fenolikleri belirlemek amacıyla HPLC analizi; Shimadzu Nexera-i LC-2040C 3D Plus marka HPLC cihazı ile yapılmıştır. En yaygın 15 adet fenolik bileşiğinin kayıtlı olduğu bu tarama sisteminde karadutun etanol ekstresi analiz edildiğinde en yüksek konsantrasyonda bulunan fenoliğin klorojenik asit olduğu görülmüştür. Kuarsetin sinnamik asit, ferulik asit ve rutin tespit edilen diğer fenoliklerdir. Daha geniş yelpazede bileşen kaydı bulunan bir cihaz ile HPLC analizi yapıldığında; karadut ekstresinin farklı bileşenleri de tespit edilebileceği düşünülmektedir.

Verimliliğin korunması ve bitkisel çürümelerin olmaması için bitki ekstraktlarının muhafaza koşulları oldukça önemlidir. Bitki ekstraktlarıyla yapılan bir çalışmada hidroalkolikler (etanol, metanol) ile elde edilen bitki ekstresi deney sürecine kadar -21 °C’de muhafaza edilerek bileşenlerin yapısını korumayı hedeflemişlerdir (335). Turan ve ekibi prostat kanseri hücreleri üzerinde test edecekleri saf karadut meyve ekstresini deney sürecine kadar -21 °C muhafaza ettiklerini bildirmişlerdir (328). Bu tez çalışmasında uygulanabilirliğinin ve muhafaza edilebilirliğinin kolay olması için karadut ekstresi liyofilizasyon ile toz formuna getirilmiştir. Dondurarak kurutma diye de bilinen liyofilizasyon işlemi karadut ekstresinin içerdiği suyun; -80 °C’de dondurulduktan sonra düşük basınç altında buzdan gaz haline geçmesini sağlayarak, doğrudan buharlaşması prensibine dayanır. Bu tez çalışmasında maserasyon yöntemi ile içeriğindeki %70 etil alkolün ve liyofilizasyon işlemi ile %30 suyun uzaklaştırılması sonucu karadut ekstresi saf hale ulaştırılmıştır. Çürümeye neden olacak suyun uzaklaştırılmasıyla toz formuna getirilen karadut ekstresi +4 °C muhafaza edilebilir hale getirilmiştir. İçeriğindeki su ve etil alkolden arınarak saf hale gelen karadut ekstresi; mikrobiyoloji deney sürecinin başlamasına kadar +4 °C buzdolabında aliminyum folyaya sarılarak muhafaza edilmiştir.

Toz formdaki karadut ekstresinin kavite dezenfeksiyon materyali olarak dentin diskleri üzerine uygulanabilmesi ve MİK analizinin yapılabilmesi için stok solüsyon hazırlanmıştır. 100 mg karadut yaprak ekstresi tozu 1 ml DMSO ile çözülerek homojen kıvama geldiği izlenmiş ve bu oranlarda stok solüsyon üretilmiştir. DMSO'nun %5 ve üzeri oranlarda toksik ve bakterisidal etki gösterdiği bilindiği (339) için karadut ekstresinin antibakteriyel etkisi hakkında soru işaretlerine yer vermemek adına, stok solüsyon konsantrasyonun %1 olarak belirlenmiştir. Souza ve Turan'nın yürüttüğü çalışmada DMSO ile stok solüsyon oluşturulduğu bildirilmiştir (36,328). DMSO ile çözülme işleminin hemen ardından karadut ekstresi; *S. mutans* ve *L. casei* ile kontamine edilmiş dentin disklerine uygulanmıştır. Karadut ekstresinin direkt olarak bakteri suşları ile çalışıldığı ve antibakteriyel etkisinin bildirildiği literatürler mevcut iken (36,37,48,49,327); direkt diş doku üzerine uygulandığı bir çalışmaya ulaşılamamıştır.

Karadut ekstresi, standardizasyonun sağlanması amacıyla, dentin disklerinin yer aldığı kuyucuklara, diğer üç grupta olduğu gibi, mikro pipet kullanılarak her birine eşit miktarda 250 µL olacak şekilde uygulandı. Karadut ekstresinin dentin diskleri ile muamele edildiği benzer bir çalışma bulunmadığından, uygulama süresi; metilen mavisinin LED ile aktive edildiği 60 sn (39,41,319,320) referans alınarak, standardizasyon sağlanması amaçlanmıştır. Dentin diski bulunan kuyucuklara mikropipetle 250 µL aktarılan karadut ekstresi 60 sn bekletilmiştir. Daha sonra MİK, CLSM ve SEM analizleri yapılmıştır. MİK deneyi sonucunda; *S. mutans* ve *L. casei* üzerine uygulanan karadut ekstresinin antimikrobiyal etki göstermediği izlenmiştir. CLSM görüntülemelerinde *S. mutans* ve *L. casei* ile oluşturulan biyofilmde canlı ve cansız bakteri hücreleri arasında anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür. SEM analizleri incelendiğinde biyofilm olduğu düşünülen smear bir görüntü izlenmektedir. Karadut ekstresinin yapraktan değil meyveden üretilmesi, diskler üzerinde uygulama miktarının ve bekleme süresinin arttırılması gibi parametrelerin antibakteriyel etkiyi değiştirebileceği düşünülmektedir. Bu tez çalışmasında kavite dezenfeksiyon materyallerinin antibakteriyel etkilerini karşılaştırmalı olarak değerlendirmek amacıyla MİK testi, CLSM ve SEM görüntüleme yöntemleri kullanılmıştır. MİK birçok bakteri türü için kullanımı uygun ve standardize edilmiş bir yöntemdir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için özel ekipmanlar ve steril inkübasyon alanına ihtiyaç vardır (340).

Klorheksidin Diglukonat ile ilgili yapılan bir çalışmada; CHX'in ağız gargarası ve jel olarak kullanımı ele alınmıştır. Bu çalışmada MİK testi kullanılarak CHX'in etkili konsantrasyonları ile ilgili objektif veriler kaydedilmiştir (297). Karadutun antibakteriyel etkisini araştıran bir çalışmada ise; farklı konsantrasyonlardaki yaprak, meyve ve gövde kabuğu ekstrelerini *S. mutans*, *Staphylococcus epidermidis* ve *Propionibacterium acnes* suşları kuyucuklara ekilmiştir. Her bakteri suşu üzerine karadut ekstreleri ayrı ayrı uygulanmıştır. Antibakteriyel etki gösteren karadut ekstre konsantrasyonları kaydedilerek konu ile yapılacak yeni çalışmalara objektif veriler bildirilmiştir (38).

Antibakteriyel etkinin değerlendirildiği ve ajanların biyofilm üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmalarda, en çok tercih edilen görüntüleme yöntemlerinden biri CLSM'dir. CLSM cihazı maliyetli ve verilerin uzun sürede hazırlanması gibi dezavantajları vardır (341). Metilen mavisi ve kurkuminin fotodinamik terapi ile aktive edilerek *S. mutans* üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirildiği bir çalışmada; CLSM ile analizi sonucunda ölü bakteri hücreleri kırmızı, canlı bakteriler ise yeşil izlenmiştir. Analiz edilen numunelerin canlı/ cansız bakteri hücre sayısı verilerine göre foto-aktivasyonu yapılan metilen mavisinin kurkumine göre daha antibakteriyel etki gösterdiği sonucuna ulaşılmıştır (39). *S. mutans* ve *L. Acidophilus*'un oluşturduğu dual biyofilm üzerinde; CHX ve QAS'ın antibakteriyel etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada CLSM analizi sonucunda QAS'ın da CHX gibi güçlü antibakteriyel etkisi olduğu bildirilerek güncel bir materyalin etkisi bilim dünyasına aktarılmıştır (220). Mendez ve arkadaşları, metilen mavisinin; dentin diski yüzeyinde oluşturulan biyofilm üzerindeki, antibakteriyel etkisini değerlendirdikleri bu çalışmada; dentin diskleri CLSM ile analiz edilmiştir. Canlı hücrelerin oluşturduğu yeşil bölge ve cansız bakteri hücrelerini belirten kırmızı bölgenin değerlendirilmesiyle; foto-aktivasyonu yapılmış metilen mavisinin biyofilm üzerinde antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir (316). Bu tez çalışmasında; CLSM analizleri sonucunda gruplar arası antibakteriyel etkinin anlaşılabilmesi için canlı / cansız bakteri sayısı oranı, canlı ve cansız bakteri sayısı toplamı, canlı ve cansız bakteri sayısı incelenmiştir. Bu verilerin antibakteriyel gücü yorumlamada en etkili olanı canlı/cansız bakteri hücresi oranıdır. Bu oranın küçük olması; antibakteriyelin gücün fazla olduğunu belirtmektedir.

İstatiksel olarak veriler incelendiğinde CHX grubunun canlı/cansız bakteri oranın (0,46-1,11 (0,74)); kontrol grubu (0,4-1,37 (0,91)), metilen mavisi grubu (0,42-1,13 (0,9)) ve karadut grubunun (0,4-1,2 (0,96)) oranlarına göre daha küçük olduğu görülmüştür. CHX'nin antibakteriyel etkisi en güçlüyken, diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadığı kaydedilmiştir ($p=0,001$; $p<0,05$).

Antibakteriyel ajanların uygulandığı yüzeylerde biyofilm değişiminin incelenmesi, antibakteriyel etkinin yorumlanması için önemli bulgulardan biridir. SEM analizi biyofilm yapısını yüksek çözünürlükte görüntülenebilmesini sağlar. Özellikle dentin diski üzerindeki biyofilm incelemelerinde sıkça tercih edilen bir yöntemdir.

Taramalı Elektron Mikroskop ile analiz edilecek numuneler laboratuvar ortamında hassas bir hazırlık sürecinden geçmektedir. Bu hazırlık sürecindeki ufak hatalar, görüntüde çok şey değiştireceği için SEM analizinin dezavantajıdır (342). Dentin yüzeyi ve biyofilm görüntülemeleri için SEM analizi kullanılan çalışmalarda; biyofilm yoğunluğu izlenen yüzeylerde antibakteriyel etkinin zayıf olduğu bildirilirken; dentin yüzeyinde tübüllerin belirgin olduğu grupların antibakteriyel etkisinin güçlü olduğu kaydedilmiştir (302,320). Bu tez çalışmasında MİK ve CLSM analizlerinde elde edilen kantitatif verilerin; kalitatif yorumlarla desteklenmesi, çalışmanın sonuçlarının daha güvenilir ve anlaşılır olmasına katkı sağlayacağı için; SEM analizi ile yüksek çözünürlüklü görüntüler incelenmiş ve yorumlanmıştır. CHX grubunun antibakteriyel etkisi; SEM görüntülerinde dentin tübülleri izlenmesi ile kalitatif olarak da kanıtlanmıştır. Kontrol grubu ve metilen mavisi grubunda biyofilm tabakası çok net izlenirken; karadut grubunda biyofilm tabakası olduğu düşünülen smear bir görüntü izlenmiştir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında CHX, metilen mavisi ve karadut ekstresinin; dentin disklerinde oluşturulan *S. mutans* ve *L. casei* içerikli dual biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkilerinin değerlendirilmesi ve karşılaştırılması amaçlanmaktadır. Materyallerin antibakteriyel etkilerinin değerlendirilmesi için yapılan MİK testi, dual biyofilm değerlendirmek için uygulanan CLSM ve SEM analizlerinin sonuçları, çalışma ile ilgili limitasyonlar ve öneriler aşağıda özetlenmiştir.

- Minimum İnhibitör Konsantrasyon testinde; CHX'in seyreltilerek kullanıldığı kuyucuklarda *S. mutans* üremesi izlenmeyerek CHX'in güçlü antibakteriyel etkisi desteklenmiştir.
- Metilen mavisi; MİK testinde biyofilm üzerine foto-aktif edilmeden uygulanmış ve bakteri üremesini engellemediği gözlemlenmiştir. %0,02'lik metilen mavisinin *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.
- Karadut ekstresinin %1 DMSO ile hazırlanan stok solüsyonun MİK testi sonucunda *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etki göstermediği sonucuna ulaşılmıştır.
- Materyallerin biyofilm üzerinde etkilerinin incelendiği CLSM görüntülemelerinin sayısal verileri istatistiksel olarak değerlendirildiğinde CHX uygulanan dentin disklerindeki canlı/cansız bakteri hücreleri oranı en düşük seviyede bulunarak biyofilm üzerine en fazla antibakteriyel etkiyi CHX'in gösterdiği görülmüştür. CHX uygulanan gruptaki canlı ve cansız bakteri hücre sayısı değerlendirildiğinde cansız bakteri hücre sayısının canlı bakteri hücre sayısından oldukça fazla olduğu izlenmiştir.
- Foto-aktivasyonu yapılan metilen mavisi grubu dentin diskleri CLSM ile incelendiğinde biyofilmdeki cansız bakteri hücre sayısının canlı bakteri hücre sayısından fazla olduğu görülmüştür. Canlı/cansız bakteri hücre sayısı oranını gösteren grafikler incelendiğinde metilen mavisinin, kontrol grubuna göre biyofilm üzerindeki etkinliğinin daha fazla olduğu şeklinde yorumlanabilirken, kontrol grubu ile arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.

- Karadut ekstresinin CLSM analizinde biyofilm üzerine etkisinin CHX kadar güçlü olmadığı görülmüştür. Canlı / Cansız bakteri hücresi oranının karadut, metilen mavisi ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vermediği görülürken; toplam biyofilm değerini veren canlı ve cansız bakteri hücre sayısı toplamının en fazla karadutta olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Bu durum karadutun biyofilmin adezyonunu engelleyemediği düşüncesini destekler niteliktedir. Karadut grubunun kendi içindeki canlı ve cansız bakteri hücre sayısı incelediğinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı görülmüştür.
- Taramalı Elektron Mikroskopu görüntülerinde CHX'in biyofilm üzerine etkisi dentin tübüllerinin izlenmesiyle daha da desteklenmiştir. SEM görüntülemelerinde CHX uygulanan dentin diskleri üzerinde bakteri hücreleri izlenemezken dentin tübülleri oldukça net görülmektedir. Bu durum CHX'in güçlü antibakteriyel etkisiyle biyofilmi uzaklaştırdığının kanıtı niteliktedir.
- Metilen mavisi uygulanan dentin disklerinin SEM görüntüleri incelendiğinde yoğun ve katmanlar halinde izlenen biyofilm görülürken; dentin tübüllerine rastlanılmamıştır. Metilen mavisinin dentin diskleri üzerinde biyofilme etkisinin CHX kadar güçlü olmadığı anlaşılmıştır.
- Karadut grubunun SEM görüntülerinde smear formda biyofilm tabakası izlenirken dentin tübülleri tespit edilememiştir. Karadut ekstresinin dentin üzerinde oluşturulan *S. mutans* ve *L. casei* biyofilmi üzerinde CHX gibi güçlü antibakteriyel etki göstermediği sonucuna ulaştırmıştır.
- Foto-aktivasyon ile metilen mavisinin antibakteriyel etkisini arttırdığı belirlenmiş olup, antibakteriyel etkinin CHX kadar güçlü olmamasına; mavi LED ışık kaynağının neden olabileceği sonucuna ulaşılmıştır.
- Kullanımının kolay ve diş hekimliği kliniklerinde rutinde kullanılan ekonomik bir ışık kaynağı olmasından dolayı tercih edilen mavi LED ışık kaynağının dalga boyu gücünün metilen mavisini aktive ettiği fakat yeterli olmadığı ve metilen mavisinin farklı dalga boyundaki LED ışıklarla yapılacak yeni çalışmalarda etkinliği daha iyi anlaşılacağı kanısına varılmıştır.

- Karadut ekstresinin dentin diskleri üzerine uygulanma miktarı ve bekleme süresi gibi parametrelerin yeni yapılacak çalışmalarda arttırılarak antibakteriyel etkinin daha iyi anlaşılacağı düşünülmektedir.
- Karadut ekstresine ek olarak; karadutun meyvelerinden üretilen ekstrelerin dentin diskleri üzerinde kullanımının gelecek çalışmalara dahil edilerek; karadut bitkisinin farklı bölümlerinin antibakteriyel etkilerinin incelenmesi önerilebilir.
- Bu tez çalışmasının karadut bitkisinin diş doku üzerinde uygulanabilirliği ile ilgili yapılacak yeni çalışmalara ışık olması ve holistik diş hekimliği yaklaşımı için yeni bitkisel bir ürünün gündeme gelmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.
- Bu çalışmanın *in vitro* koşullarda sürdürülmesi; tükürük akışı, pH değişimleri, mikrobiyal çeşitlilik gibi ağız içindeki dinamik koşulları tam olarak yansıtamaması, aynı zamanda dentin disklerinin, doğal diş dokusunun sahip olduğu biyolojik savunma mekanizmasını taklit edememesi gibi nedenlerden dolayı sonuçların genellenebilirliğini kısıtlamaktadır. Fakat bu çalışmada planlanacak olan yeni çalışmaların *in vivo* koşullarda sürdürülmesine temel oluşturacak bulgular sunulmuştur.
- Klorheksidin Diglukonatin kavite dezenfeksiyonunda altın standart olduğunun bir kez daha kanıtlandığı bu tez çalışmasında; metilen mavisi ve karadut ekstresinin CHX kadar güçlü antibakteriyel etkiye sahip olmadığı görülmüştür.
- Metilen mavisinin yeni çalışmalarda; yukarıda belirtilen parametreleri değiştirilerek antibakteriyel etkisi ve biyofilm kaldırma gücünün anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu düşünülmektedir. CLSM analizinde metilen mavisi grubunun biyofilmi incelendiğinde; cansız bakteri hücre sayısının canlı bakteri hücre sayısına göre daha fazla olması; klinik ortamda kullanılabilir formda geliştirilmesini desteklemektedir.
- Karadut ekstresinin CLSM analizleri incelendiğinde, canlı ve cansız bakteri hücre sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadığı, ancak cansız hücre sayısının daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

- Ekstrenin yukarıda belirtilen parametrelerin değıştirilerek üretileceğı yeni çalışmalarla; klinik ortamda kullanılabilir bitkisel içerikli kavite dezenfeksiyon materyali olarak geliştirilebileceğı öngörülmektedir.



KAYNAKLAR

1. Marsh, P. D. (2009). Dental Plaque as a Biofilm: The Significance of pH in Health and Caries. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 30, 76–78.
2. Newborn, E. (1989). Histopathology of Dental Caries. In *Cariology* (3rd ed., pp. 248–258). Quintessence Publishing Co.
3. Protyusha, G., & Sundharam, B. S. (2021). Analysis of the Association Between Polymorphisms in Vitamin D Receptor Gene and Dental Caries. *Indian Journal of Dental Research*, 32(1), 3. https://doi.org/10.4103/ijdr.IJDR_189_19
4. Turgut Coşgun, M., & Tulga Öz, F. (2019). Current Developments in Chemomechanical Caries Removal Method. *Türkiye Klinikleri Journal of Dental Sciences*, 25(3), 344–350. <https://doi.org/10.5336/dentalsci.2017-59103>
5. Kidd, E. A. M. (2004). How ‘Clean’ Must a Cavity Be Before Restoration? *Caries Research*, 38(3), 305–313. <https://doi.org/10.1159/000077770>
6. Smail-Faugeron, V., Glenney, A. M., Courson, F., Durieux, P., Muller-Bolla, M., & Fron Chabouis, H. (2018). Pulp Treatment for Extensive Decay in Primary Teeth. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2018(5). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003220.pub3>
7. Bjorndal, L., & Kidd, E. A. (2005). The Treatment of Deep Dentine Caries Lesions. *Dental Update*, 32(7), 402–413. <https://doi.org/10.12968/denu.2005.32.7.402>
8. Hilton, T. J., & Summitt, J. B. (2013). Pulpal Considerations. In Hilton, T. J., Ferracane, J. L., & Broome, J. C. (Eds.), *Summitt’s Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (pp. 131–153). Quintessence.
9. Kidd, E. (2000). Caries Removal and the Pulpo-dentinal Complex. *Dental Update*, 27(10), 476–482. <https://doi.org/10.12968/denu.2000.27.10.476>
10. Kidd, E. (2005). The Disease and Its Management. In *Essentials of Dental Caries* (3rd ed.). Oxford University Press.11.
11. Marsh, P. D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(s6), 7–15. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00790.x>
12. Takahashi, N., & Nyvad, B. (2011). The Role of Bacteria in the Caries Process. *Journal of Dental Research*, 90(3),294–303. <https://doi.org/10.1177/0022034510379602>
13. Kim, J. N., & Burne, R. A. (2017). CcpA and CodY Coordinate Acetate Metabolism in *Streptococcus mutans*. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(7). <https://doi.org/10.1128/AEM.03274-16>
14. Englander, H. R., & Keyes, P. H. (1971). Control of *Streptococcus mutans*, Plaque, and Dental Caries in Hamsters with Topically Applied Vancomycin. *Archives of Oral Biology*, 16(4), 469-IN23. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(71\)90171-3](https://doi.org/10.1016/0003-9969(71)90171-3)
15. Nes, I. F., Diep, D. B., & Holo, H. (2007). Bacteriocin Diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *Journal of Bacteriology*, 189(4), 1189–1198. <https://doi.org/10.1128/JB.01254-06>
16. Pangsomboon, K., Bansal, S., Martin G. P., Suntainalert, P., Kaewnopparat, S., & Srichana, T. (2009). Further Characterization of a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus paracasei* HL32. *Journal of Applied Microbiology*, 106(6),1928–1940. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04146.x>
17. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., & Qi, F. (2005). Competition and Coexistence Between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the Dental Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 187(21), 7193–7203. <https://doi.org/10.1128/JB.187.21.7193-7203.2005>
18. Kreth, J., Zhang, Y., & Herzberg, M. C. (2008). Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4632–4640. <https://doi.org/10.1128/JB.00276-08>
19. Shank, E. A., & Kolter, R. (2009). New Developments in Microbial Interspecies Signaling. *Current Opinion in Microbiology*, 12(2), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2009.01.003>
20. Bin-Shuwaish, M. S. (2016). Effects and Effectiveness of Cavity Disinfectants in Operative Dentistry: A Literature Review. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(10), 867–879. <https://doi.org/10.5005/JP-JOURNALS-10024-1946>
21. Uday Mohan, P. V. M., Uloopi, K. S., Vinay, C., & Rao, R. C. (2016). In vivo comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in

- primary teeth. *Contemporary Clinical Dentistry*, 7(1), 45–50. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.177110>
22. Kim, B. R., Oh, M. H., & Shin, D. H. (2017). Effect of cavity disinfectants on antibacterial activity and microtensile bond strength in class I cavity. *Dental Materials Journal*, 36(3), 368–373. <https://doi.org/10.4012/DMJ.2016-283>
 23. Gultz, J., Do, L., Boylan, R., Kaim, J., & Scherer, W. (1999). Antimicrobial activity of cavity disinfectants. *General Dentistry*, 47, 187–190.
 24. Coelho, A., Amaro, I., Rascão, B., Marcelino, I., Paula, A., Saraiva, J., Spagnuolo, G., Ferreira, M. M., Marto, C. M., & Carrilho, E. (2020). Effect of cavity disinfectants on dentin bond strength and clinical success of composite restorations: A systematic review of *in vitro*, *in situ* and clinical studies. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1), 1–27. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010353>
 25. Arjunkumar, R., & Balagopal, S. (2013). Chlorhexidine: The Gold Standard Antiplaque Agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. <https://www.researchgate.net/publication/287637432>
 26. Varoni, E., Lodi, G., & Carrassi, A. (n.d.). Chlorhexidine (CHX) in Dentistry: State of the Art. *FDA.gov*.
 27. Ballal, N. V., Duncan, H. F., Rai, N., Jalan, P., & Zehnder, M. (2020). Sodium Hypochlorite Reduces Postoperative Discomfort and Painful Early Failure After Carious Exposure and Direct Pulp Capping—Initial Findings of a Randomized Controlled Trial. *Journal of Clinical Medicine*, 9(8), 1–11. <https://doi.org/10.3390/jcm9082408>
 28. Türkün, M., Türkün, L. S., Ergucu, Z., & Ates, M. (2006). Is an Antibacterial Adhesive System More Effective than Cavity Disinfectants? <https://www.researchgate.net/publication/6948080>
 29. Han, Y. (2021). Effects of Brief Sodium Fluoride Treatments on the Growth of Early and Mature Cariogenic Biofilms. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/S41598-021-97905-0>
 30. Hicks, J., Garcia-Godoy, F., & Flaitz, C. (2004). Biological Factors in Dental Caries: Role of Remineralization and Fluoride in the Dynamic Process of Demineralization and Remineralization (Part 3). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(3), 203–214. <https://doi.org/10.17796/jcpd.28.3.w06104271746j34n>
 31. Buzalaf, A. R., Pelim Pessan, J., Honório, H. M., & ten Cate, M. J. (2011). Impact of Fluoride in the Prevention of Caries and Erosion. In MAR, Buzalaf, (Ed.), *Fluoride and the Oral Mechanisms of Action of Fluoride for Caries Control*. Environment. Monogr Oral Sci. Basel: Karger, Vol. 22.
 32. Wigdor, H. A., Walsh, J. T., Featherstone, J. D. B., Visuri, S. R., Fried, D., & Waldvogel, J. L. (1995). Lasers in Dentistry. *Lasers in Surgery and Medicine*, 16(2), 103–133. <https://doi.org/10.1002/lsm.1900160202>
 33. Mahabala, K. Y., Shrikrishna, S. B., Natarajan, S., & Nayak, A. P. (2016). Ethanolic Extracts of Aloe Vera and Propolis as Cavity Disinfectants: An In Vitro Study. *Dental Hypotheses*, 7(2), 61–66. <https://doi.org/10.4103/2155-8213.183769>
 34. Prabhakar, A., Karuna, Y., Yavagal, C., & Deepak, B. (2015). Cavity Disinfection in Minimally Invasive Dentistry: Comparative Evaluation of Aloe Vera and Propolis: A Randomized Clinical Trial. *Contemporary Clinical Dentistry*, 6(5), 24. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.152933>
 35. George, D., & Bhat, S. (n.d.). Comparative Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Aloe Vera Tooth Gel and Two Popular Commercial Toothpastes: An In Vitro Study. <https://www.researchgate.net/publication/26885577>
 36. Souza, G. R., Oliveira-Junior, R. G., Diniz, T. C., Branco, A., Lima-Saraiva, S. R. G., Guimarães, A. L., Oliveira, A. P., Pacheco, A. G. M., Silva, M. G., Moraes-Filho, M. O., Costa, M. P., Pessoa, C., & Almeida, J. R. G. S. (2018). Assessment of the Antibacterial, Cytotoxic and Antioxidant Activities of *Morus nigra* L. (Moraceae). *Brazilian Journal of Biology = Revista Brasileira de Biologia*, 78(2), 248–254. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.05316>
 37. Antibacterial Activities of Diospyros blancoi, Phoenix dactylifera and Morus nigra Against Dental Caries Causing Pathogens: An In Vitro Study. (n.d.). Request PDF. Erişim Tarihi (17.09.2024), https://www.researchgate.net/publication/313795196_Antibacterial_activities_of_Diospyros_blancoi_Phoenix_dactylifera_and_Morus_nigra_against_dental_caries_causing_pathogens_An_in_vitro_study

38. Budiman, A., & Aulifa, D. L. (2020). Antibacterial Activity and Mode of Action of Black Mulberry (*Morus nigra*) Fruits Extract Against *Streptococcus mutans*. *Pharmacognosy Journal*, 12(6), 1722–1726. <https://doi.org/10.5530/pj.2020.12.233>
39. AlSunbul, H., & Murriky, A. (2023). Efficacy of Methylene Blue and Curcumin Mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Treatment of Indirect Pulp Capping in Permanent Molar Teeth. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 42. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2023.103598>
40. Aggarwal, B. B., Sundaram, C., Malani, N., & Ichikawa, H. (2007). Curcumin: The Indian Solid Gold. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 595, 1–75. https://doi.org/10.1007/978-0-387-46401-5_1
41. Entezari, S., Moezzimoghadam, N., Lawaf, S., & Azizi, A. (2022). In Vitro Effect of Photodynamic Therapy with Curcumin and Methylene Blue Photosensitizers on *Staphylococcus aureus*. *Journal of Dentistry (Iran)*, 23, 387–392. <https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2021.90146.1470>
42. Konopka, K., & Goslinski, T. (2007). Photodynamic Therapy in Dentistry. *Journal of Dental Research*, 86(8), 694–707. <https://doi.org/10.1177/154405910708600803>
43. Strazzi-Sahyon, H. B., de Oliveira, M. S., da Silva, P. P., Banci, H. A., de Melo, F. S., Martinez, C. M. T., Cintra, L. T. A., Gomes-Filho, J. E., Dezan-Júnior, E., dos Santos, P. H., & Sivieri-Araujo, G. (2020). Does Photodynamic Therapy with Methylene Blue Affect the Mechanical Properties and Bond Strength of Glass-Fiber Posts in Different Thirds of Intraradicular Dentin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, 101673. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101673>
44. Campos, F., Lessa, R., Hebling, J., & Garcia-Godoy, F. (2010). Direct and Transdental Antibacterial Activity of Chlorhexidine. *American Journal of Dentistry*. <https://www.researchgate.net/publication/49730326>
45. Dai, T., Huang, Y.-Y., & Hamblin, M. R. (2009). Photodynamic Therapy for Localized Infections—State of the Art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6(3–4), 170–188. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2009.10.008>
46. Cieplik, F., Buchalla, W., Hellwig, E., Al-Ahmad, A., Hiller, K. A., Maisch, T., & Karygianni, L. (2017). Antimicrobial Photodynamic Therapy as an Adjunct for Treatment of Deep Carious Lesions—A Systematic Review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 18, 54–62. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2017.01.005>
47. de Melo, R. S., Reis, S. A. G. B., Guimarães, A. L., Silva, N. D. D. S., Rocha, J. M., El Aouad, N., & Almeida, J. R. G. da S. (2022). Phytocosmetic Emulsion Containing Extract of *Morus nigra* L. (Moraceae): Development, Stability Study, Antioxidant and Antibacterial Activities. *Cosmetics*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/cosmetics9020039>
48. Minhas, M. A., Begum, A., Hamid, S., Babar, M., Ilyas, R., Ali, S., Latif, F., & Andleeb, S. (2016). Evaluation of Antibiotic and Antioxidant Activity of *Morus nigra* (Black Mulberry) Extracts Against Soil Borne, Food Borne and Clinical Human Pathogens. *Pakistan Journal of Zoology*, 48, 1381–1388.
49. Aulifa, D. L., Fitriansyah, S. N., Ardiansyah, S. A., Wibowo, D. P., Julata, Y. A., & Christy, D. S. (2018). Phytochemical Screening, Antibacterial Activity, and Mode of Action on *Morus nigra*. *Pharmacognosy Journal*, 10(1), 167–171. <https://doi.org/10.5530/PJ.2018.1.28>
50. Tsutsumi, C., Takakuda, K., & Wakabayashi, N. (2016). Reduction of Candida Biofilm Adhesion by Incorporation of Prereacted Glass Ionomer Filler in Denture Base Resin. *Journal of Dentistry*, 44, 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.11.010>
51. Pratten, Wills, Barnett, & Wilson. (1998). In Vitro Studies of the Effect of Antiseptic-Containing Mouthwashes on the Formation and Viability of *Streptococcus sanguis* Biofilms. *Journal of Applied Microbiology*, 84(6), 1149–1155. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00462.x>
52. Babu, J. P., & Garcia-Godoy, F. (2014). In Vitro Comparison of Commercial Oral Rinses on Bacterial Adhesion and Their Detachment from Biofilm Formed on Hydroxyapatite Disks. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 12(4). <https://doi.org/10.3290/J.OHPD.A31674>
53. Røder, H. L., Olsen, N. M. C., Whiteley, M., & Burmølle, M. (2020). Unravelling Interspecies Interactions Across Heterogeneities in Complex Biofilm Communities. *Environmental Microbiology*, 22(1), 5–16. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14834>
54. Kreth, J., Hagerman, E., Tam, K., Merritt, J., Wong, D. T. W., Wu, B. M., Myung, N. V., Shi, W., & Qi, F. (2004). Quantitative Analyses of *Streptococcus mutans* Biofilms with Quartz

- Crystal Microbalance, Microjet Impingement and Confocal Microscopy. *Biofilms*, 1(4), 277. <https://doi.org/10.1017/S1479050504001516>
55. Cho, M. Y., Kang, S. M., Lee, E. S., & Kim, B. Il. (2020). Antimicrobial Activity of *Curcuma xanthorrhiza* Nanoemulsions on *Streptococcus mutans* Biofilms. *Biofouling*, 36(7), 825–833. <https://doi.org/10.1080/08927014.2020.1823376>
 56. Serbiak, B., Fourre, T., Geonnotti, A. R., & Gambogi, R. J. (2018). In Vitro Efficacy of Essential Oil Mouthrinse Versus Dentifrices. *Journal of Dentistry*, 69, 49–54. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2017.08.016>
 57. Verkaik, M. J., Busscher, H. J., Jager, D., Slomp, A. M., Abbas, F., & Van Der Mei, H. C. (2011). Efficacy of Natural Antimicrobials in Toothpaste Formulations Against Oral Biofilms In Vitro. *Journal of Dentistry*, 39(3), 218–224. <https://doi.org/10.1016/J.JDENT.2010.12.007>
 58. Liu, J., Ling, J. Q., Zhang, K., Huo, L. J., & Ning, Y. (2012). Effect of Sodium Fluoride, Ampicillin, and Chlorhexidine on *Streptococcus mutans* Biofilm Detachment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(8), 4532. <https://doi.org/10.1128/AAC.00885-12>
 59. Peterson, S. N., Snesrud, E., Liu, J., Ong, A. C., Kilian, M., Schork, N. J., & Bretz, W. (2013). The Dental Plaque Microbiome in Health and Disease. *PLoS ONE*, 8(3), e58487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058487>
 60. Keyes, P. H. (1968). Research in Dental Caries. *The Journal of the American Dental Association*, 76(6), 1357–1373. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1968.0186>
 61. Sobia Zafar, S. Y. H. A. S. (2009). Early Childhood Caries (ECC): Aetiology, Clinical Considerations and Consequences and Management. *INTERNATIONAL DENTISTRY SA*, 11(4), 24–36.
 62. Klatzky, M., & Klatell, J. S. (1943). Anthropological Studies in Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 22, 267–274.
 63. Clark Spencer Larsen, Rebecca Shavit, & Mark C. Griffin. (1991). Dental Caries Evidence for Dietary Change: An Archaeological Context. *Advances in Dental Anthropology*, 179–202.
 64. Fejerskov, O. (2004). Changing Paradigms in Concepts on Dental Caries: Consequences for Oral Health Care. *Caries Research*, 38(3), 182–191. <https://doi.org/10.1159/000077753>
 65. Belibasakis, G. N. (2018). Microbiological Changes of the Ageing Oral Cavity. *Archives of Oral Biology*, 96, 230–232. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.10.001>
 66. Lof, M., Janus, M., & Krom, B. (2017). Metabolic Interactions Between Bacteria and Fungi in Commensal Oral Biofilms. *Journal of Fungi*, 3(3), 40. <https://doi.org/10.3390/jof3030040>
 67. Grigalauskiene, R., Slabšinskienė, E., & Vasiliauskiene, I. (2015). Biological Approach of Dental Caries Management. *Stomatologija, Baltic Dental and Maxillofacial Journal*, 17(4).
 68. Eren, A. M., Borisy, G. G., Huse, S. M., & Mark Welch, J. L. (2014). Oligotyping Analysis of the Human Oral Microbiome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(28). <https://doi.org/10.1073/pnas.1409644111>
 69. Štšepetova, J., Truu, J., Runnel, R., Nõmmela, R., Saag, M., Olak, J., Nõlvak, H., Preem, J.-K., Oopkaup, K., Krjutškov, K., Honkala, E., Honkala, S., Mäkinen, K., Mäkinen, P.-L., Vahlberg, T., Vermeiren, J., Bosscher, D., de Cock, P., & Mändar, R. (2019). Impact of Polyols on Oral Microbiome of Estonian Schoolchildren. *BMC Oral Health*, 19(1), 60. <https://doi.org/10.1186/s12903-019-0747-z>
 70. Kumar, M., Umashankar, D. N., Viswanath, D., & Girish, G. (2013). Role of the Oral Microflora in Health and Disease. *J Indian Aca Oral Med Radiol*, 25(3).
 71. Dominguez-Bello, M. G., Godoy-Vitorino, F., Knight, R., & Blaser, M. J. (2019). Role of the microbiome in human development. *Gut*, 68(6), 1108–1114. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317503>
 72. Chin, J. R., Kowolik, J. E., & Stookey, G. K. (2016). Dental Caries in the Child and Adolescent. In *McDonald and Avery's Dentistry for the Child and Adolescent* (pp. 155–176). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-28745-6.00009-0>
 73. Rutherford, B. (1995). Dentin Regeneration. *Advances in Dental Research*, 9(3 Suppl), 14. doi: 10.1177/0895937495009003S0501. PMID: 8934942
 74. *Acquired and Developmental Disturbances of the Teeth and Associated Oral Structures. Dentistry for the Child and Adolescent* (9th ed., 2010).
 75. Featherstone, J. D. B. (2000). The Science and Practice of Caries Prevention. *The Journal of the American Dental Association*, 131(7), 887–899. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2000.0307>
 76. Selwitz, R. H., Ismail, A. I., & Pitts, N. B. (2007). Dental Caries. *The Lancet*, 369(9555), 51–59. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)60031-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)60031-2)

77. Fejerskov, O., & Kidd, E. A. M. (2003). *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. Blackwell.
78. Corrêa, S. C. L., Uchôa, S. A. C. L., Corrêa, D. L., & Corrêa, V. C. (2024). Dental Caries in Early Childhood: A Literature Review. In *Health of Tomorrow: Innovations and Academic Research*. Seven Editora. <https://doi.org/10.56238/sevened2023.007-047>
79. Duggal, M. S. (2003). Paediatric Dentistry in the New Millennium: 1. Quality Care for Children. *Dental Update*, 30(5), 230–234. <https://doi.org/10.12968/denu.2003.30.5.230>
80. Ahmed, F. (2011). *Illustrated Dental Embryology, Histology, and Anatomy* (3rd ed.). *British Dental Journal*, 211(11), 575–575. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2011.1047>
81. Hicks, J., Garcia-Godoy, F., & Flaitz, C. (2005). Biological Factors in Dental Caries: Enamel Structure and the Caries Process in the Dynamic Process of Demineralization and Remineralization (Part 2). *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 28(2), 119–124. <https://doi.org/10.17796/jcpd.28.2.617404w302446411>
82. Kudiyirickal, M. G., & Ivančáková, R. (2008). Early Enamel Lesion: Part II – Histomorphology and Prevention. *Acta Medica (Hradec Kralove, Czech Republic)*, 51(3), 151–156. <https://doi.org/10.14712/18059694.2017.17>
83. Robinson, C., Shore, R. C., Brookes, S. J., Strafford, S., Wood, S. R., & Kirkham, J. (2000). The Chemistry of Enamel Caries. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 11(4), 481–495. <https://doi.org/10.1177/10454411000110040601>
84. Mazzoni, A., Tjäderhane, L., Checchi, V., Di Lenarda, R., Salo, T., Tay, F. R., Pashley, D. H., & Breschi, L. (2015). Role of Dentin MMPs in Caries Progression and Bond Stability. *Journal of Dental Research*, 94(2), 241–251. <https://doi.org/10.1177/0022034514562833>
85. Featherstone, J. (2008). Dental Caries: A Dynamic Disease Process. *Australian Dental Journal*, 53(3), 286–291. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00064.x>
86. Pitts, N. B. (2004). Modern Concepts of Caries Measurement. *Journal of Dental Research*, 83(SPEC. ISS. C). <https://doi.org/10.1177/154405910408301S09>
87. Knottnerus, J. A. (2002). *The Evidence Base of Clinical Diagnosis*. London: *BMJ Books*.
88. Hicks, M. J., & Flaitz, C. M. (1986). Caries-Like Lesion Formation in Occlusal Fissures: An In Vitro Study. *Quintessence International (Berlin, Germany: 1985)*, 17(7), 405–410.
89. Rohr, M., Makinson, O. F., & Burrow, M. F. (1991). Pits and Fissures: Morphology. *ASDC Journal of Dentistry for Children*, 58(2), 97–103.
90. Akar, M., Alkış, M. (2023). Koruyucu Diş Hekimliğinde Pit ve Fissür Örtücülere Genel Bakış. *Uşak Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 2(2), 36-40.
91. Choo-Smith, L.-P., Dong, C. C. S., Cleghorn, B., & Hewko, M. (2008). Shedding New Light on Early Caries Detection. *Journal (Canadian Dental Association)*, 74(10), 913–918.
92. Kudiyirickal, M. G., & Ivancáková, R. (2008). Early Enamel Lesion Part I. Classification and Detection. *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 51(3), 145–149.
93. Summitt, J. B., Robbins, J. W., & Schwartz, R. S. (2001). *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (2nd ed., pp. 365–377). Quintessence Publishing Co.
94. Banting, D. W., Ellen, R. P., & Fillery, E. D. (1985). Clinical Science: A Longitudinal Study of Root Caries: Baseline and Incidence Data. *Journal of Dental Research*, 64(9), 1141–1144. <https://doi.org/10.1177/00220345850640090901>
95. Sezgin, Y., & Nişancı Yılmaz, M. N. (2019). Periodontoloji kliniğine başvuran hastaların periodontal durumlarının ve sistemik hastalıklarının değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29(3), 432-439.
96. Machiulskiene, V., Campus, G., Carvalho, J. C., Dige, I., Ekstrand, K. R., Jablonski-Momeni, A., Maltz, M., Manton, D. J., Martignon, S., Martinez-Mier, E. A., Pitts, N. B., Schulte, A. G., Splieth, C. H., Tenuta, L. M. A., Ferreira Zandona, A., & Nyvad, B. (2020). Terminology of Dental Caries and Dental Caries Management: Consensus Report of a Workshop Organized by ORCA and Cariology Research Group of IADR. *Caries Research*, 54(1), 7–14. <https://doi.org/10.1159/000503309>
97. Askar, H., Krois, J., Göstemeyer, G., Bottenberg, P., Zero, D., Banerjee, A., & Schwendicke, F. (2020). Secondary Caries: What Is It, and How It Can Be Controlled, Detected, and Managed? *Clinical Oral Investigations*, 24(5), 1869–1876. <https://doi.org/10.1007/s00784-020-03268-7>
98. Kidd, E. A., Toffenetti, F., & Mjör, I. A. (1992). Secondary Caries. *International Dental Journal*, 42(3), 127–138.

99. Schwendicke, F., Kern, M., Blunck, U., Dörfer, C., Drenck, J., & Paris, S. (2014). Marginal Integrity and Secondary Caries of Selectively Excavated Teeth In Vitro. *Journal of Dentistry*, 42(10), 1261–1268. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.08.002>
100. Ferracane, J. L. (2017). Models of Caries Formation Around Dental Composite Restorations. *Journal of Dental Research*, 96(4), 364–371. <https://doi.org/10.1177/0022034516683395>
101. Kidd, E. A. (2001). Diagnosis of Secondary Caries. *Journal of Dental Education*, 65(10), 997–1000.
102. Kidd, E. A. M., Smith, B. G. N., & Pickard, H. M. (1985). *Pickard's Manual for Operative Dentistry* (6th ed.).
103. Marzouk, M. A., Simonton, A. L., & Gross, R. D. (1985). *Modern Theory and Practice* (1st ed., I. Ishiyaku EuroAmerica, Ed.).
104. Nyvad, B., Machiulskiene, V., & Baelum, V. (1999). Reliability of a New Caries Diagnostic System Differentiating Between Active and Inactive Caries Lesions. *Caries Research*, 33(4), 252–260. <https://doi.org/10.1159/000016526>
105. Santamaria, R. M., Innes, N. P. T., Machiulskiene, V., Evans, D. J. P., & Splieth, C. H. (2014). Caries Management Strategies for Primary Molars. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1062–1069. <https://doi.org/10.1177/0022034514550717>
106. A., Assler, J., & Schou, I. (n.d.). *Dental Caries Experience in Postwar Italy (1945) Among Teen-Age Children in Naples*.
107. Guzmán-Armstrong, S. (2005). Rampant Caries. *Journal of School Nursing: The Official Publication of the National Association of School Nurses*, 21(5), 272–278. <https://doi.org/10.1177/10598405050210050501>
108. Tinanoff, N., Baez, R. J., Diaz Guillory, C., Donly, K. J., Feldens, C. A., McGrath, C., Phantumvanit, P., Pitts, N. B., Seow, W. K., Sharkov, N., Songpaisan, Y., & Twetman, S. (2019). Early Childhood Caries Epidemiology, Aetiology, Risk Assessment, Societal Burden, Management, Education, and Policy: Global Perspective. *International Journal of Paediatric Dentistry*, 29(3), 238–248. <https://doi.org/10.1111/ipd.12484>
109. Reisine, S., & Douglass, J. M. (1998). Psychosocial and Behavioral Issues in Early Childhood Caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 26(S1), 32–44. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1998.tb02092.x>
110. Drury, T. F., Horowitz, A. M., Ismail, A. I., Maertens, M. P., Rozier, R. G., & Selwitz, R. H. (1999). Diagnosing and Reporting Early Childhood Caries for Research Purposes: A Report of a Workshop Sponsored by the National Institute of Dental and Craniofacial Research, the Health Resources and Services Administration, and the Health Care Financing Administration. *Journal of Public Health Dentistry*, 59(3), 192–197. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.1999.tb03268.x>
111. Begzati, A., Bytyci, A., Meqa, K., Latifi-Xhemajli, B., & Berisha, M. (2014). Mothers' Behaviours and Knowledge Related to Caries Experience of Their Children. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 12(2), 133–140. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a31667>
112. Davies, G. N. (1998). Early Childhood Caries — A Synopsis. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 26(S1), 106–116. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.1998.tb02102.x>
113. Berkowitz, R. J. (2003). Clinical Practice: Causes, Treatment, and Prevention of Early Childhood Caries: A Microbiologic Perspective. *Journal of the Canadian Dental Association*, 69(5).
114. Kagihara, L. E., Niederhauser, V. P., & Stark, M. (2009). Assessment, Management, and Prevention of Early Childhood Caries. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 21(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2008.00367.x>
115. Gussy, M. G., Waters, E. G., Walsh, O., & Kilpatrick, N. M. (2006). Early Childhood Caries: Current Evidence for Aetiology and Prevention. *Journal of Paediatrics and Child Health*, 42(1–2), 37–43. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1754.2006.00777.x>
116. Bedos, C., Brodeur, J.-M., Arpin, S., & Nicolau, B. (2005). Dental Caries Experience: A Two-generation Study. *Journal of Dental Research*, 84(10), 931–936. <https://doi.org/10.1177/154405910508401011>
117. Ripa, L. W. (1988). Literature Review: Nursing Caries: A Comprehensive Review. *Journal of Pediatric Dentistry*, 10(4).
118. Erickson, P. R., & Mazhari, E. (1999). Investigation of the role of human breast milk in caries development. *American Academy of Pediatric Dentistry*, 22(2)

119. Tinanoff, N., Kanellis, M. J., & Vargas, C. (n.d.). Current Understanding of the Epidemiology, Mechanisms, and Prevention of Dental Caries in Preschool Children. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/10949674>
120. Zafar, S. (2009). Early Childhood Caries (ECC): Aetiology, Clinical Considerations, Consequences, and Management. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/259457491>
121. Schafer, T. E., & Adair, S. M. (2000). Prevention of Dental Disease. *Pediatric Clinics of North America*, 47(5), 1021–1042. [https://doi.org/10.1016/S0031-3955\(05\)70256-X](https://doi.org/10.1016/S0031-3955(05)70256-X)
122. 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>
123. Zafar, S., Harnekar, S. Y., Siddiqi, A., Walsh, J., & Author, C. (n.d.). Introduction to Early Childhood Caries: Etiology, Clinical Considerations, Consequences, and Management. *International Dentistry SA*, 11(4).
124. Anil, S., & Anand, P. S. (2017). Early Childhood Caries: Prevalence, Risk Factors, and Prevention. *Frontiers in Pediatrics*, 5, 157. <https://doi.org/10.3389/fped.2017.00157>
125. Milgrom, P., Riedy, C. A., Weinstein, P., Tanner, A. C. R., Manibusan, L., & Bruss, J. (2000). Dental Caries and Its Relationship to Bacterial Infection, Hypoplasia, Diet, and Oral Hygiene in 6- to 36-month-old Children. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 28(4), 295–306. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2000.280408.x>
126. Nurelhuda, N. M., Al-Haroni, M., Trovik, T. A., & Bakken, V. (2010). Caries Experience and Quantification of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in Saliva of Sudanese Schoolchildren. *Caries Research*, 44(4), 402–407. <https://doi.org/10.1159/000316664>
127. Qin, M., Li, J., Zhang, S., & Ma, W. (2007). Risk factors for severe early childhood caries in children younger than 4 years old in Beijing, China. *Pediatric Dentistry*, 30(2).
128. Dasanayake, A. P., & Caufield, P. W. (2002). Prevalence of Dental Caries in Sri Lankan Aboriginal Veddha Children. *International Dental Journal*, 52(6), 438–444. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2002.tb00639.x>
129. Kuşgöz, A., & Aydınoglu, S. (2016). Erken Çocukluk Çağı Çürükleri ve Etiyolojisi: Güncel Literatür Derlemesi. *Selcuk Dental Journal*, 3.
130. Dodds, M. W. J., Johnson, D. A., & Yeh, C.-K. (2005). Health Benefits of Saliva: A Review. *Journal of Dentistry*, 33(3), 223–233. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2004.10.009>
131. Fidalgo, T. K. S., Freitas-Fernandes, L. B., Angeli, R., Muniz, A. M. S., Gonsalves, E., Santos, R., Nadal, J., Almeida, F. C. L., Valente, A. P., & Souza, I. P. R. (2013). Salivary Metabolite Signatures of Children with and without Dental Caries Lesions. *Metabolomics*, 9(3), 657–666. <https://doi.org/10.1007/s11306-012-0484-7>
132. Fidalgo, T. K. S., Freitas-Fernandes, L. B., Almeida, F. C. L., Valente, A. P., & Souza, I. P. R. (2015). Longitudinal Evaluation of Salivary Profile from Children with Dental Caries Before and After Treatment. *Metabolomics*, 11(3), 583–593. <https://doi.org/10.1007/s11306-014-0717-z>
133. Mandel, I. D. (1989). The role of saliva in maintaining oral homeostasis. *The Journal of the American Dental Association*, 119(2), 298–304. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1989.0211>
134. Puy, C. L. (2006). E449 Clinical Dentistry Saliva and Oral Health The rôle of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. *E450 Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, 449–455.
135. Agostini, B. A., Cericato, G. O., Silveira, E. R. da, Nascimento, G. G., Costa, F. dos S., Thomson, W. M., & Demarco, F. F. (2018). How common is dry mouth? Systematic review and meta-regression analysis of prevalence estimates. *Brazilian Dental Journal*, 29(6), 606–618. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201802302>
136. Wolgin, M., & Kielbassa, A. M. (2010). Etiologic factors of hyposalivation and consequences for oral health. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/42372823>
137. Saleh, J., Figueiredo, M. A. Z., Cherubini, K., & Salum, F. G. (2015). Salivary hypofunction: An update on aetiology, diagnosis and therapeutics. *Archives of Oral Biology*, 60(2), 242–255. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.10.004>
138. Chiappin, S., Antonelli, G., Gatti, R., & De Palo, E. F. (2007). Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clinica Chimica Acta*, 383(1–2), 30–40. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.011>
139. Santos-Silva, A. R., Feio, P. do S. Q., Vargas, P. A., Correa, M. E. P., & Lopes, M. A. (2015). cGVHD-related caries and its shared features with other ‘dry-mouth’-related caries. *Brazilian Dental Journal*, 26(4), 435–440. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300200>

140. Meyer-Lückel, H., Paris, S., & Ekstrand, K. (2015). Caries management – Science and clinical practice. *STOMATOLOGY EDUCATION JOURNAL*, 2(2), 170. [https://doi.org/10.25241/stomaeduj.2015.2\(2\).bookreview.3](https://doi.org/10.25241/stomaeduj.2015.2(2).bookreview.3)
141. Kawashima, N., & Okiji, T. (2016). Odontoblasts: Specialized hard-tissue-forming cells in the dentin-pulp complex. *Congenital Anomalies*, 56(4), 144–153. <https://doi.org/10.1111/cga.12169>
142. Smith, A. J., Cassidy, N., Perry, H., Bègue-Kirn, C., Ruch, J. V., & Lesot, H. (1995). Reactionary dentinogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 39(1), 273–280.
143. Ekstrand, K. R., Ricketts, D. N. J., & Kidd, E. A. M. (1997). Reproducibility and accuracy of three methods for assessment of demineralization depth on the occlusal surface: An in vitro examination. *Caries Research*, 31(3), 224–231. <https://doi.org/10.1159/000262404>
144. Fisher, J., & Glick, M. (2012). A new model for caries classification and management. *The Journal of the American Dental Association*, 143(6), 546–551. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2012.0216>
145. Young, D. A., Nový, B. B., Zeller, G. G., Hale, R., Hart, T. C., Truelove, E. L., Ekstrand, K. R., Featherstone, J. D. B., Fontana, M., Ismail, A., Kuehne, J., Longbottom, C., Pitts, N., Sarrett, D. C., Wright, T., Mark, A. M., & Beltran-Aguilar, E. (2015). The American Dental Association Caries Classification System for Clinical Practice. *The Journal of the American Dental Association*, 146(2), 79–86. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2014.11.018>
146. Tugce, A., Gürcan, T., & Ozen, B. (2018). Risk factors based on different caries classifications. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/329217917>
147. M.C., & N.G.T. (1973). Wilhelm Conrad Röntgen, 1845–1923. *The British Journal of Radiology*, 46(542), 81–82. <https://doi.org/10.1259/0007-1285-46-542-81>
148. Ekstrand, K. R., Ricketts, D. N. J., Kidd, E. A. M., Qvist, V., & Schou, S. (1998). Detection, diagnosing, monitoring and logical treatment of occlusal caries in relation to lesion activity and severity: An in vivo examination with histological validation. *Caries Research*, 32(4), 247–254. <https://doi.org/10.1159/000016460>
149. Hintze, H., & Wenzel, A. (1999). A two-film versus a four-film bite-wing examination for caries diagnosis in adults. *Caries Research*, 33(5), 380–386. <https://doi.org/10.1159/000016537>
150. Stenlund, H., Mejäre, I., & Källestål, C. (2002). Caries rates related to approximal caries at ages 11-13: A 10-year follow-up study in Sweden. *Journal of Dental Research*, 81(7), 455–458. <https://doi.org/10.1177/154405910208100704>
151. Anusavice, K. J. (2005). Present and future approaches for the control of caries. *Journal of Dental Education*, 69(5), 538–554. <https://doi.org/10.1002/j.0022-0337.2005.69.5.tb03941.x>
152. Klein, H., & Palmer, C. E. (1940). Community economic status and the dental problem of school children. *Public Health Reports*, 55(5).
153. Bodecker, C. F. (1939). The modified dental caries index. *The Journal of the American Dental Association*, 26(9), 1453–1460. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1939.0279>
154. Shulman, J. D., & Cappelli, D. P. (2004). Epidemiology of dental caries. In *Prevention in Clinical Oral Health Care* (pp. 2–13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-03695-5.50005-7>
155. Pitts, N., & Ekstrand, K. (2013). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS) and its International Caries Classification and Management System (ICCMS) – methods for staging of the caries process and enabling dentists to manage caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(1). <https://doi.org/10.1111/cdoe.12025>
156. Ismail, A. I., Sohn, W., Tellez, M., Amaya, A., Sen, A., Hasson, H., & Pitts, N. B. (2007). The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 35(3), 170–178. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0528.2007.00347.x>
157. Dikmen, B. (2015). ICDAS II criteria (International Caries Detection and Assessment System). *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 49(3), 63. <https://doi.org/10.17096/jiufd.38691>
158. Ekstrand, K. R., Martignon, S., Ricketts, D. J. N., & Qvist, V. (2007). Detection and activity assessment of primary coronal caries lesions: A methodologic study. *Operative Dentistry*, 32(3), 225–235. <https://doi.org/10.2341/06-63>
159. Braga, M. M., Mendes, F. M., & Ekstrand, K. R. (2010). Detection, activity assessment, and diagnosis of dental caries lesions. *Dental Clinics of North America*, 54(3), 479–493. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2010.03.006>

160. Gugnani, N., & Pandit, I. (2011). International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): A New Concept. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 4(2), 93–100. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10005-1089>
161. Altarakemah, Y., Al-Sane, M., Lim, S., Kingman, A., & Ismail, A. I. (2013). A new approach to reliability assessment of dental caries examinations. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(4), 309–316. <https://doi.org/10.1111/cdoe.12020>
162. Ismail, A. I., Pitts, N. B., & Tellez, M. (2015). The International Caries Classification and Management System (ICCMS™) An Example of a Caries Management Pathway. *BMC Oral Health*, 15(S1), S9. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-15-S1-S9>
163. Ismail, A. I., Tellez, M., Pitts, N. B., Ekstrand, K. R., Ricketts, D., Longbottom, C., Eggertsson, H., Deery, C., Fisher, J., Young, D. A., Featherstone, J. D. B., Evans, W., Zeller, G. G., Zero, D., Martignon, S., Fontana, M., & Zandona, A. (2013). Caries management pathways preserve dental tissues and promote oral health. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 41(1). <https://doi.org/10.1111/cdoe.12024>
164. Nyvad, B., Machiulskiene, V., & Baelum, V. (1999). Reliability of a New Caries Diagnostic System Differentiating between Active and Inactive Caries Lesions. *Caries Research*, 33(4), 252–260. <https://doi.org/10.1159/000016526>
165. Best Practices: Caries-Risk Assessment and Management. *The Reference Manual of Pediatric Dentistry*, 301. (2007).
166. Singh, R. P. (2018). Cariogram-A Multifactorial Risk Assessment Model for Dental Caries. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/326539271>
167. Featherstone, J. D. B., White, J. M., Hoover, C. I., Rapozo-Hilo, M., Weintraub, J. A., Wilson, R. S., Zhan, L., & Gansky, S. A. (2012). A Randomized Clinical Trial of Anticaries Therapies Targeted according to Risk Assessment (Caries Management by Risk Assessment). *Caries Research*, 46(2), 118–129. <https://doi.org/10.1159/000337241>
168. Bayrak, G. D., Selvi-Kuvvetli, S. (2019). Çürük belirleme yöntemlerine güncel yaklaşımlar. *Selcuk Dental Journal*, 6(1), 82–90. <https://doi.org/10.15311/selcukdentj.322782>
169. Kühnisch, J., Goddon, I., Berger, S., Senkel, H., Bücher, K., Oehme, T., Hickel, R., & Heinrich-Weltzien, R. (2009). Development, methodology and potential of the new Universal Visual Scoring System (UniViSS) for caries detection and diagnosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 6(9), 2500–2509. <https://doi.org/10.3390/ijerph6092500>
170. Ricketts, D., Kidd, E., Innes, N. P. T., & Clarkson, J. E. (2006). Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/14651858.cd003808.pub2>
171. Gruythuysen, R., van Strijp, G., & Wu, M.-K. (2010). Long-term Survival of Indirect Pulp Treatment Performed in Primary and Permanent Teeth with Clinically Diagnosed Deep Carious Lesions. *Journal of Endodontics*, 36(9), 1490–1493. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.006>
172. Yip, H. K., & Samaranayake, L. P. (1998). Caries removal techniques and instrumentation: a review. *Clinical Oral Investigations*, 2, 148–154.
173. Gürçan, A. T. (2018). Güncel çürük temizleme yaklaşımları. *Türkiye Klinikleri Journal of Pediatric Dentistry-Special Topics*, 4(1), 63–67.
174. Stanley, H. R. (1968). Design for a human pulp study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 25(4), 633–647. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(68\)90312-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(68)90312-5)
175. Shovelton, D. S. (1972). The maintenance of pulp vitality. *British Dental Journal*, 133(3), 95–101. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4802880>
176. Stephens, R. R. (1986). The dental handpiece—a history of its development. *Australian Dental Journal*, 31(3), 165–180. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.1986.tb01196.x>
177. Boyde, A. (1984). Airpolishing effects on enamel, dentine, cement and bone. *British Dental Journal*, 156(8), 287–291. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4805346>
178. Black, R. B. (1955). Application and revaluation of air abrasive technic. *The Journal of the American Dental Association*, 50(4), 408–414. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1955.0066>
179. Bjørndal, L., Reit, C., Bruun, G., Markvart, M., Kjældgaard, M., Näsman, P., Thordrup, M., Dige, I., Nyvad, B., Fransson, H., Lager, A., Ericson, D., Petersson, K., Olsson, J., Santimano, E. M., Wennström, A., Winkel, P., & Glud, C. (2010). Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *European Journal of Oral Sciences*, 118(3), 290–297. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2010.00731.x>

180. Marchi, J. J., Froner, A. M., Araújo, F. B., Alves, H. L. R., & Bergmann, C. P. (2008). Analysis of Primary Tooth Dentin After Indirect Pulp Capping. *J Dent Child*, 75.
181. About, I., Murray, P. E., Franquin, J.-C., Remusat, M., & Smith, A. J. (2001). The effect of cavity restoration variables on odontoblast cell numbers and dental repair. *Journal of Dentistry*, 29(2), 109–117. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(00\)00067-1](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(00)00067-1)
182. Oliveira, E. F., Carminatti, G., Fontanella, V., & Maltz, M. (2006). The monitoring of deep caries lesions after incomplete dentine caries removal: results after 14–18 months. *Clinical Oral Investigations*, 10(2), 134–139. <https://doi.org/10.1007/s00784-006-0033-8>
183. Duque, C., Negrini, T. de C., Sacono, N. T., Spolidorio, D. M. P., de Souza Costa, C. A., & Hebling, J. (2009). Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clinical Oral Investigations*, 13(4), 465–471. <https://doi.org/10.1007/s00784-009-0304-2>
184. Lula, E. C. O., Monteiro-Neto, V., Alves, C. M. C., & Ribeiro, C. C. C. (2009). Microbiological Analysis after Complete or Partial Removal of Carious Dentin in Primary Teeth: A Randomized Clinical Trial. *Caries Research*, 43(5), 354–358. <https://doi.org/10.1159/000231572>
185. Featherstone, J. D. B., & Nelson, D. G. A. (1987). Laser Effects On Dental Hard Tissues. *Advances in Dental Research*, 1(1), 21–26. <https://doi.org/10.1177/08959374870010010701>
186. Bona, A., de Azevedo, C. S., da Ana, P. A., Brossi, S., & Maria, D. (2012). Laser Technology for Caries Removal. In *Contemporary Approach to Dental Caries*. InTech. <https://doi.org/10.5772/37227>
187. Orchardson, R., & Gillam, D. G. (2006). Managing dentin hypersensitivity. *The Journal of the American Dental Association*, 137(7), 990–998. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.2006.0321>
188. Jung, Y.-H., Cho, B.-H., Nah, K.-S., Kim, H.-I., & Kwon, Y. H. (2010). Effect of diode-pumped solid state laser on polymerization shrinkage and color change in composite resins. *Lasers in Medical Science*, 25(3), 339–343. <https://doi.org/10.1007/s10103-009-0644-9>
189. Carrasco, T. G., Carrasco-Guerisoli, L. D., & Fröner, I. C. (2008). In vitro study of the pulp chamber temperature rise during light-activated bleaching. *Journal of Applied Oral Science*, 16(5), 355–359. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572008000500010>
190. Bretz, W. A., Corby, P. M., Schork, N. J., Robinson, M. T., Coelho, M., Costa, S., Melo Filho, M. R., Weyant, R. J., & Hart, T. C. (2005). Longitudinal Analysis of Heritability for Dental Caries Traits. *Journal of Dental Research*, 84(11), 1047–1051. <https://doi.org/10.1177/154405910508401115>
191. Nordbø, H., Brown, G., & Tjan, A. H. (1996). Chemical treatment of cavity walls following manual excavation of carious dentin. *American Journal of Dentistry*, 9(2), 67–71.
192. Goldman, M., & Kronman, J. H. (1976). A preliminary report on a chemomechanical means of removing caries. *The Journal of the American Dental Association*, 93(6), 1149–1153. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1976.0249>
193. Ericson, D., Zimmerman, M., Raber, H., Götrick, B., Bornstein, R., & Thorell, J. (1999). Clinical Evaluation of Efficacy and Safety of a New Method for Chemo–Mechanical Removal of Caries. *Caries Research*, 33(3), 171–177. <https://doi.org/10.1159/000016513>
194. Maashi, M. S., Elkhodary, H. M., Alamoudi, N. M., & Bamashmous, N. O. (2023). Chemomechanical caries removal methods: A literature review. *The Saudi Dental Journal*, 35(3), 233–243. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2023.01.010>
195. Pires Corrêa, F. N., Oliveira Rocha, R. de, Rodrigues Filho, L. E., Muench, A., & Delgado Rodrigues, C. R. M. (2007). Chemical Versus Conventional Caries Removal Techniques in Primary Teeth: A Microhardness Study. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 31(3), 187–192. <https://doi.org/10.17796/jcpd.31.3.1440852707v3g1u0>
196. Phantumvanit, P., Songpaisan, Y., Pilot, T., & Frencken, J. E. (1996). Atraumatic Restorative Treatment (ART): a Three-year Community Field Trial in Thailand—Survival of One-surface Restorations in the Permanent Dentition. *Journal of Public Health Dentistry*, 56(3), 141–145. <https://doi.org/10.1111/j.1752-7325.1996.tb02424.x>
197. Küçük, G. (2023). Atravmatik Restoratif Tedavi Atraumatic Restorative Treatment. In *EÜ Dişhek Fak Derg*. <https://orcid.org/0009-0005-1763-846X>
198. Frencken, J. E. (2009). Evolution of the ART approach: highlights and achievements. *Journal of Applied Oral Science*, 17(spe), 78–83. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572009000700014>

199. Frencken, J. E., Leal, S. C., & Navarro, M. F. (2012). Twenty-five-year atraumatic restorative treatment (ART) approach: a comprehensive overview. *Clinical Oral Investigations*, 16(5), 1337–1346. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0783-4>
200. Jakubovics, N. S., Gill, S. R., Iobst, S. E., Vickerman, M. M., & Kolenbrander, P. E. (2008). Regulation of gene expression in a mixed-genus community: Stabilized arginine biosynthesis in *Streptococcus gordonii* by coaggregation with *Actinomyces naeslundii*. *Journal of Bacteriology*, 190(10), 3646–3657. <https://doi.org/10.1128/JB.00088-08>
201. Beighton, D., Al-Haboubi, M., Mantzourani, M., Gilbert, S. C., Clark, D., Zoitopoulos, L., & Gallagher, J. E. (2010). Oral bifidobacteria. *Journal of Dental Research*, 89(9), 970–974. <https://doi.org/10.1177/0022034510369319>
202. Unsal, G., Topcuoglu, N., Ulukapi, I., Kulekci, G., & Aktoren, O. (2017). *Scardovia wiggisiae* and the Other Microorganisms in Severe Early Childhood Caries. *Journal of Dentistry and Oral Care Medicine*, 3, 102.
203. Tanner, A. C. R., Kent, R. L., Holgerson, P. L., Hughes, C. V., Loo, C. Y., Kanasi, E., Chalmers, N. I., & 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>
204. 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. <https://doi.org/10.3402/jom.v4i0.16125>
205. Tanner, A. C. R., Sonis, A. L., Lif Holgerson, P., Starr, J. R., Nunez, Y., Kressirer, C. A., Paster, B. J., & 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>
206. Kressirer, C. A., Smith, D. J., King, W. F., Dobeck, J. M., Starr, J. R., & Tanner, A. C. R. (2017). *Scardovia wiggisiae* and its potential role as a caries pathogen. *Journal of Oral Biosciences*, 59(3), 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.job.2017.05.002>
207. Van Strijp, A. J. P., Van Steenberghe, T. J. M., & Ten Cate, J. M. (1997). Effects of chlorhexidine on the bacterial colonization and degradation of dentin and completely demineralized dentin in situ. *European Journal of Oral Sciences*, 105(1), 27–35. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0722.1997.TB00177.X>
208. Gerardo Maupomé, & Juan Carlos Hernández-Guerrero. (1995). In vivo diagnostic assessment of dentinal caries utilizing acid red and povidone-iodine dyes. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/15720290> In vivo diagnostic assessment of dentinal caries utilising acid red and povidone-iodine dyes
209. Nazan Kocataş Ersin, Ümit Candan, Arzu Aykut, & Cemal Eronat. (2008). No adverse effect to bonding following caries disinfection with chlorhexidine. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/24253164> No adverse effect to bonding following caries disinfection with chlorhexidine
210. McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12(1), 147–179. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.1.147>
211. Raszewski, Z., Nowakowska-Toporowska, A., Weźgowiec, J., & Nowakowska, D. (2019). Design and characteristics of new experimental chlorhexidine dental gels with anti-staining properties. *Advances in Clinical and Experimental Medicine*, 28(7), 885–890. <https://doi.org/10.17219/acem/94152>
212. Schroeder, H. E. (1969). Formation and inhibition of dental calculus. *Hans Huber, Berlin*, 145–172.
213. Löe, H., Von der Fehr, F. R., & Schiött, C. R. (1972). Inhibition of experimental caries by plaque prevention. *European Journal of Oral Sciences*, 80(1), 1–9. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1972.tb00257.x>
214. Vianna, M. E., Gomes, B. P. F. A., Berber, V. B., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., & de Souza-Filho, F. J. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97(1), 79–84. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(03\)00360-3](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(03)00360-3)
215. Rosetti Lessa, F. C., Nogueira, I., Huck, C., Hebling, J., & De Souza Costa, C. A. (2010). Transdental cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine gel applied on acid-conditioned dentin substrate. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 92(1), 40–47. <https://doi.org/10.1002/JBM.B.31487>
216. Tüzüner, T., Ulusoy, A. T., Baygin, O., Yahyaoglu, G., Yalcin, I., Buruk, K., & Nicholson, J. (2013). Direct and transdental (indirect) antibacterial activity of commercially available dental

- gel formulations against *Streptococcus mutans*. *Medical Principles and Practice*, 22(4), 397. <https://doi.org/10.1159/000347234>
217. Subramaniam, P., & Gandhi, R. (2009). Effect of Tooth Mousse Plus and Cervitec gel on *S. mutans*. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/277244077>
218. Erdem, A. P., Sepet, E., Kulekci, G., Trosola, S. C., & Guven, Y. (2012). Effects of two fluoride varnishes and one fluoride/chlorhexidine varnish on *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* biofilm formation in vitro. *International Journal of Medical Sciences*, 9(2), 129–136. <https://doi.org/10.7150/ijms.3637>
219. Kapdan, A., Öztaş, N., & Sümer, Z. (2013). Comparing the antibacterial activity of gaseous ozone and chlorhexidine solution on a tooth cavity model. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, 5(3). <https://doi.org/10.4317/JCED.51130>
220. Daood, U., Burrow, M. F., & Yiu, C. K. Y. (2020). Effect of a novel quaternary ammonium silane cavity disinfectant on cariogenic biofilm formation. *Clinical Oral Investigations*, 24(2), 649–661. <https://doi.org/10.1007/S00784-019-02928-7>
221. Hamilton, I. R. (1990). Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *Journal of Dental Research*, 69(2_suppl), 660–667. <https://doi.org/10.1177/00220345900690S128>
222. Pashley, E. L., Birdsong, N. L., Bowman, K., & Pashley, D. H. (1985). Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *Efecto Citotxico del NaOCl en el Tejido Vital*, 11(12).
223. Cai, C., Chen, X., Li, Y., & Jiang, Q. (2023). Advances in the role of sodium hypochlorite irrigant in chemical preparation of root canal treatment. *BioMed Research International*, 2023(1). <https://doi.org/10.1155/2023/8858283>
224. Berber, V. B., Gomes, B. P. F. A., Sena, N. T., Vianna, M. E., Ferraz, C. C. R., Zaia, A. A., & Souza-Filho, F. J. (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal*, 39(1), 10–17. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01038.x>
225. Yazıcı, A. R., Gorucu, J., & Ertan, A. A. (2011). Effects of different cavity disinfectants on shear bond strength of a silorane-based resin composite. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. <https://www.researchgate.net/publication/51879770>
226. Ohara, P., Torabinejad, M., & Kettering, J. D. (1993). Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics*, 19(10), 498–500. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)81490-1](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)81490-1)
227. Sezgin, Y., & Nişancı Yılmaz, M. N. (2019). Periodontoloji kliniğine başvuran hastaların periodontal durumlarının ve sistemik hastalıklarının değerlendirilmesi. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 29(3), 432–439.
228. Azarpazhooh, A., & Limeback, H. (2008). The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry*, 36(2), 104–116. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2007.11.008>
229. Johansson, E., Claesson, R., & van Dijken, J. W. V. (2009). Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of Dentistry*, 37(6), 449–453. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2009.02.004>
230. Knight, G., McIntyre, J., Craig, G., Mulyani, & Zilm, P. (2008). The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Australian Dental Journal*, 53(4), 349–353. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2008.00077.x>
231. Murat Türkün, Zeynep Ergucu, Lezize Sebnem Türkün, & Mustafa Ates. (2006). Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants? *American Journal of Dentistry*.
232. Imazato, S., Kinomoto, Y., Tarumi, H., Torii, M., Russell, R. R. B., & McCabe, J. F. (1997). Incorporation of Antibacterial Monomer MDPB into Dentin Primer. *Journal of Dental Research*, 76(3), 768–772. <https://doi.org/10.1177/00220345970760030901>
233. Imazato, S., & McCabe, J. F. (1994). Influence of Incorporation of Antibacterial Monomer on Curing Behavior of a Dental Composite. *Journal of Dental Research*, 73(10), 1641–1645. <https://doi.org/10.1177/00220345940730100901>
234. Tischer, M., Pradel, G., Ohlsen, K., & Holzgrabe, U. (2012). Quaternary ammonium salts and their antimicrobial potential: targets or nonspecific interactions? *ChemMedChem*, 7(1), 22–31. <https://doi.org/10.1002/CMDC.201100404>
235. Harkes, G., Dankert, J., & Feijen, J. (1992). Growth of uropathogenic *Escherichia coli* strains at solid surfaces. *Journal of Biomaterials Science. Polymer Edition*, 3(5), 403–418. <https://doi.org/10.1163/156856292X00213>

236. Jawetz, E., Melnick, J., & Aldenberg, E. (2007). Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology: 24th Edition. *Sultan Qaboos University Medical Journal*, 7(3), 273. [/pmc/articles/PMC3074881/](https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.1965.0260)
237. Goldman, L., Gray, J. A., Goldman, J., Goldman, B., & Meyer, R. (1965). Effect of laser beam impacts on teeth. *Journal of the American Dental Association* (1939), 70(3), 601–606. <https://doi.org/10.14219/JADA.ARCHIVE.1965.0260>
238. Coluzzi, D. J. (2000). An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dental Clinics of North America*, 44(4), 753–765. [https://doi.org/10.1016/S0011-8532\(22\)01318-0](https://doi.org/10.1016/S0011-8532(22)01318-0)
239. Usumez, A., & Aykent, F. (2003). Bond strengths of porcelain laminate veneers to tooth surfaces prepared with acid and Er,Cr:YSGG laser etching. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 90(1), 24–30. [https://doi.org/10.1016/S0022-3913\(03\)00235-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3913(03)00235-X)
240. Whitters, C. J., & Strang, R. (2000). Preliminary investigation of a novel carbon dioxide laser for applications in dentistry. *Lasers in Surgery and Medicine*, 26(3), 262–269. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9101\(2000\)26:3<262::AID-LSM3>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9101(2000)26:3<262::AID-LSM3>3.0.CO;2-7)
241. Bader, C., & Krejci, I. (2006). Indications and limitations of Er:YAG laser applications in dentistry. *American Journal of Dentistry*, 19(3), 178–186. PMID: 16838484.
242. Judy, M. M., Matthews, J. L., Aronoff, B. L., & Hults, D. F. (1993). Soft tissue studies with 805 nm diode laser radiation: Thermal effects with contact tips and comparison with effects of 1064 nm Nd:YAG laser radiation. *Lasers in Surgery and Medicine*, 13(5), 528–536. <https://doi.org/10.1002/lsm.1900130506>
243. Sulieman, M. (2005). An Overview of the Use of Lasers in General Dental Practice: 1. Laser Physics and Tissue Interactions. *Dental Update*, 32(4), 228–236. <https://doi.org/10.12968/denu.2005.32.4.228>
244. Mehrvarzfar, P., Saghiri, M. A., Asatourian, A., Fekrazad, R., Karamifar, K., Eslami, G., & Dadresanfar, B. (2011). Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *Journal of Oral Science*, 53(3), 355–360. <https://doi.org/10.2334/josnusd.53.355>
245. Basso, F. G., Oliveira, C. F., Fontana, A., Kurachi, C., Bagnato, V. S., Spolidório, D. M. P., Hebling, J., Costa, C. A. de S. (2011). In vitro effect of low-level laser therapy on typical oral microbial biofilms. *Brazilian Dental Journal*, 22(6), 502–510. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402011000600011>
246. Lee, B., Lin, Y., Chia, J., Hsieh, T., Chen, M., Lin, C., & Lan, W. (2006). Bactericidal effects of diode laser on *Streptococcus mutans* after irradiation through different thickness of dentin. *Lasers in Surgery and Medicine*, 38(1), 62–69. <https://doi.org/10.1002/lsm.20279>
247. Coluzzi, D. J. (2000). An overview of laser wavelengths used in dentistry. *Dental Clinics of North America*, 44(4), 753–765. [https://doi.org/10.1016/S0011-8532\(22\)01318-0](https://doi.org/10.1016/S0011-8532(22)01318-0)
248. Nagata, J. Y., Hioka, N., Kimura, E., Batistela, V. R., Terada, R. S. S., Graciano, A. X., Baesso, M. L., Hayacibara, M. F. (2012). Antibacterial photodynamic therapy for dental caries: evaluation of the photosensitizers used and light source properties. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 9(2), 122–131. <https://doi.org/10.1016/J.PDPDT.2011.11.006>
249. Araújo, N. C., De Menezes, R. F., Carneiro, V. S. M., Dos Santos-Neto, A. P., Fontana, C. R., Bagnato, V. S., Harvey, C. M., & Gerbi, M. E. M. (2017). Photodynamic Inactivation of Cariogenic Pathogens Using Curcumin as Photosensitizer. *Photomedicine and Laser Surgery*, 35(5), 259–263. <https://doi.org/10.1089/PHO.2016.4156>
250. Kömerik, N., & McClure, S. (2004). New Techniques in the Management of the Carious Lesion: The Use of Laser Fluorescence in the Detection of Caries. *Australian Dental Journal*, 49(1), 52–58. <https://doi.org/10.1111/j.1834-7819.2004.tb00191.x>
251. Sridharan, G., & Shankar, A. (2012). Toluidine blue: A review of its chemistry and clinical utility. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 16(2), 251. <https://doi.org/10.4103/0973-029X.99081>
252. Silva, Z. S., Huang, Y. Y., De Freitas, L. F., França, C. M., Botta, S. B., Ana, P. A., Mesquita-Ferrari, R. A., Santos Fernandes, K. P., Deana, A., Lima Leal, C. R., Prates, R. A., Hamblin, M. R., & Bussadori, S. K. (2016). Papain gel containing methylene blue for simultaneous caries removal and antimicrobial photoinactivation against *Streptococcus mutans* biofilms. *Scientific Reports*, 6. <https://doi.org/10.1038/SREP33270>
253. Alshahrani, A., Abrar, E., Maawadh, A. M., Al-Hamdan, R. S., Almohareb, T., AlFawaz, Y., Naseem, M., Vohra, F., & Abduljabbar, T. (2020). Management of caries affected dentin (CAD) with resin modified glass ionomer cement (RMGIC) in the presence of different caries disinfectants

- and photosensitizers. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32, 101978. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101978>
254. Strazzi Sahyon, H. B., Pereira da Silva, P., Silva de Oliveira, M., Angelo Cintra, L. T., Gomes-Filho, J. E., Henrique dos Santos, P., & Sivieri-Araujo, G. (2018). Effect of photodynamic therapy on the mechanical properties and bond strength of glass-fiber posts to endodontically treated intraradicular dentin. *The Journal of Prosthetic Dentistry*, 120(2), 317.e1-317.e7. <https://doi.org/10.1016/j.prosdent.2018.05.009>
255. Jaruga, E., Salvioli, S., Dobrucki, J., Chrul, S., Bandorowicz-Pikuła, J., Sikora, E., Franceschi, C., Cossarizza, A., & Bartosz, G. (1998). Apoptosis-like, reversible changes in plasma membrane asymmetry and permeability, and transient modifications in mitochondrial membrane potential induced by curcumin in rat thymocytes. *FEBS Letters*, 433(3), 287–293. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00919-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00919-3)
256. Somparn, P., Phisalaphong, C., Nakornchai, S., Unchern, S., & Morales, N. P. (2007). Comparative Antioxidant Activities of Curcumin and Its Demethoxy and Hydrogenated Derivatives. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 30(1), 74–78. <https://doi.org/10.1248/bpb.30.74>
257. Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K. (2014). A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International*, 2014, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2014/186864>
258. Martins, C. V. B., da Silva, D. L., Neres, A. T. M., Magalhaes, T. F. F., Watanabe, G. A., Modolo, L. V., Sabino, A. A., de Fatima, A., & de Resende, M. A. (2008). Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 63(2), 337–339. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn488>
259. Aggarwal, B., & Chandra Bharti, A. (n.d.). Anticancer Potential of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. <https://www.researchgate.net/publication/10818418>
260. Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F. M., & Torti, S. V. (2008). Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 65(11), 1631–1652. <https://doi.org/10.1007/s00018-008-7452-4>
261. Anand, P., Kunnumakkara, A. B., Newman, R. A., & Aggarwal, B. B. (2007). Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, 4(6), 807–818. <https://doi.org/10.1021/mp700113r>
262. Prasad, S., Tyagi, A. K., & Aggarwal, B. B. (2014). Recent Developments in Delivery, Bioavailability, Absorption and Metabolism of Curcumin: the Golden Pigment from Golden Spice. *Cancer Research and Treatment*, 46(1), 2–18. <https://doi.org/10.4143/crt.2014.46.1.2>
263. Öznurhan, F., Buldur, B., Ozturk, C., & Durer, A. (2015). Effects of different cavity disinfectant procedures on microtensile bond strength of permanent teeth. *Cumhuriyet Dental Journal*, 18(2), 170–179. <https://doi.org/10.7126/CDJ.58140.5000087546>
264. Mian-Ying Wang, Brett J. West, C. Jarakae Jensen, Diane Nowicki, Chen Su, Afa K. Palu, & Gary Anderson. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin.*, 23(12), 1127–1141.
265. Murray, P. E., Farber, R. M., Namerow, K. N., Kuttler, S., & Garcia-Godoy, F. (2008). Evaluation of *Morinda citrifolia* as an Endodontic Irrigant. *Journal of Endodontics*, 34(1), 66–70. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.016>
266. Kandaswamy, D., Venkateshbabu, N., Gogulnath, D., & Kindo, A. J. (2010). Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, *Morinda citrifolia* juice, 2% povidone iodine, and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 43(5), 419–423. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2591.2010.01696.X>
267. Wu, C. D., Darout, I. A., & Skaug, N. (2001). Chewing sticks: timeless natural toothbrushes for oral cleansing. *Journal of Periodontal Research*, 36(5), 275–284. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2001.360502.x>
268. Loe, H. (2000). Oral hygiene in the prevention of caries and periodontal disease. *International Dental Journal*, 50(3), 129–139. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2000.tb00553.x>
269. El-Latif Hesham, A., & Alrumman, S. A. (2016). Antibacterial activity of Miswak *Salvadora persica* extracts against isolated and genetically identified oral cavity pathogens. *Technology and Health Care*, 24(s2), S841–S848. <https://doi.org/10.3233/THC-161214>
270. Darout, I. A., Journal, I., Christy, A. A., Darout, I. A., Skaug, N., & Egeberg, P. K. (2000). Identification and quantification of some potentially antimicrobial anionic components in Miswak extract. *Indian Journal of Pharmacology*, 32. <https://www.researchgate.net/publication/286955247>

271. Akhtar, J., Siddique, K., Bi, S., & Mujeeb, M. (2011). A review on phytochemical and pharmacological investigations of miswak (*Salvadora persica* Linn). *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 3(1), 113. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.76488>
272. Halawany, H. S. (2012). A review on miswak (*Salvadora persica*) and its effect on various aspects of oral health. *The Saudi Dental Journal*, 24(2), 63–69. <https://doi.org/10.1016/J.SDENTJ.2011.12.004>
273. Erdurak Kılıç. (201 C.E.). *FFD Monografıları Tedavide Kullanılan Bitkiler* (L. ÖMÜR DEMİREZER, Ed.). MN Medikal & Nobel Tıp Kitapevi.
274. Ercisli, S., & Orhan, E. (2007). Chemical composition of white (*Morus alba*), red (*Morus rubra*) and black (*Morus nigra*) mulberry fruits. *Food Chemistry*, 103(4), 1380–1384. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.10.054>
275. Lim, S. H., & Choi, C. I. (2019). Pharmacological properties of *Morus nigra* L. (Black Mulberry) as a promising nutraceutical resource. *Nutrients*, 11(2). <https://doi.org/10.3390/NU11020437>
276. Oki, T., Kobayashi, M., Nakamura, T., Okuyama, A., Masuda, M., Shiratsuchi, H., & Suda, I. (2006). Changes in radical-scavenging activity and components of mulberry fruit during maturation. *Journal of Food Science*, 71(1). <https://doi.org/10.1111/J.1365-2621.2006.TB12382.X>
277. Budiman, A., Aulifa, D. L., Kusuma, A. S. W., & Sulastri, A. (2017). Antibacterial and antioxidant activity of black mulberry (*Morus nigra* L.) extract for acne treatment. *Pharmacognosy Journal*, 9(5), 611–614. <https://doi.org/10.5530/PJ.2017.5.97>
278. Khalid, N., Fawad, S. A., & Ahmed, I. (2011). Antimicrobial activity, phytochemical profile and trace minerals of black mulberry (*Morus nigra* L.) fresh juice. *Pakistan Journal of Botany*, 43(S1), 91-96.
279. Chen, H., Yu, W., Chen, G., Meng, S., Xiang, Z., & He, N. (2018). Antinociceptive and antibacterial properties of anthocyanins and flavonols from fruits of black and non-black mulberries. *Molecules*, 23(1). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES23010004>
280. Pandit, S., Cai, J. N., Jung, J. E., Lee, Y. S., & Jeon, J. G. (2015). Effect of brief cetylpyridinium chloride treatments during early and mature cariogenic biofilm formation. *Oral Diseases*, 21(5), 565–571. <https://doi.org/10.1111/ODI.12312>
281. Kishen, A., & Haapasalo, M. (2010). Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics*, 22(1), 58–78. <https://doi.org/10.1111/J.1601-1546.2012.00285.X>
282. Vadillo-Rodríguez, V., Busscher, H. J., Norde, W., De Vries, J., Dijkstra, R. J. B., Stokroos, I., & Van Der Mei, H. C. (2004). Comparison of atomic force microscopy interaction forces between bacteria and silicon nitride substrata for three commonly used immobilization methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5441–5446. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5441-5446.2004>
283. Hirose, N., Kitagawa, R., Kitagawa, H., Maezono, H., Mine, A., Hayashi, M., Haapasalo, M., & Imazato, S. (2016). Development of a cavity disinfectant containing antibacterial monomer MDPB. *Journal of Dental Research*, 95(13), 1487–1493. <https://doi.org/10.1177/0022034516663465>
284. Tavares, N. C., Gava, S. G., Torres, G. P., de Paiva, C. Ê. S., Moreira, B. P., Lunkes, F. M. N., Montresor, L. C., Caldeira, R. L., & Mourão, M. M. (2020). Schistosoma mansoni FES tyrosine kinase involvement in the mammalian schistosomiasis outcome and miracidia infection capability in *Biomphalaria glabrata*. *Frontiers in Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00963>
285. Ghorbani, J., Rahban, D., Aghamiri, S., Teymouri, A., & Bahador, A. (2018). Photosensitizers in antibacterial photodynamic therapy: an overview. *Laser Therapy*, 27(4), 293–302. doi: 10.5978/islsm.27_18-RA-01. PMID: 31182904; PMCID: PMC6513767.
286. West, N. X., Davies, M., & Amaechi, B. T. (2011). In vitro and in situ erosion models for evaluating tooth substance loss. *Caries Research*, 45(Suppl. 1), 43–52. <https://doi.org/10.1159/000325945>
287. Aydın, B., Pamir, T., Baltacı, A., Orman, M. N., & Turk, T. (2015). Effect of storage solutions on microhardness of crown enamel and dentin. *European Journal of Dentistry*, 9(2), 262–266. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.156848>
288. Tosun, G., Sener, Y., & Sengun, A. (2007). Effect of storage duration/solution on microshear bond strength of composite to enamel. *Dental Materials Journal*, 26(1), 116–121. <https://doi.org/10.4012/dmj.26.116>

289. Erguçu, Z., Hiller, K., & Schmalz, G. (2005). Influence of Dentin on the Effectiveness of Antibacterial Agents. *Journal of Endodontics*, 31(2), 124–129. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000137640.77772.40>
290. Paschoal, M. A., Tonon, C. C., Correia, M., Spolidório, D. M., Bagnato, V. S., Giusti, J. S., & Santos-Pinto, L. (2015). Comparative Effects of Photodynamic Therapy mediated by Curcumin on Standard and Clinical Isolate of *Streptococcus mutans*. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 16(1), 1–6. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1626>
291. Diniz, I. M. A., Horta, I. D., Azevedo, C. S., Elmadjian, T. R., Matos, A. B., Simionato, M. R. L., & Marques, M. M. (2015). Antimicrobial photodynamic therapy: A promise candidate for caries lesions treatment. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(3), 511–518. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.04.006>
292. Manoil, D., Filieri, A., Gameiro, C., Lange, N., Schrenzel, J., Wataha, J. C., & Bouillaguet, S. (2014). Flow cytometric assessment of *Streptococcus mutans* viability after exposure to blue light-activated curcumin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(3), 372–379. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.06.003>
293. Hakimih, N., Khoei, F., Bahador, A., & Fekrazad, R. (2014). The susceptibility of *Streptococcus mutans* to antibacterial photodynamic therapy: a comparison of two different photosensitizers and light sources. *Journal of Applied Oral Science*, 22(2), 80–84. <https://doi.org/10.1590/1678-775720130038>
294. Cura, F., Palmieri, A., Girardi, A., Martinelli, M., Scapoli, L., & Carinci, F. (2012). Dental caries and bacteriological analysis. *Dental Research Journal*, 9(Suppl 2), S139–41. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.109723>
295. Ceburkov, O., & Gollnick, H. (2000). Photodynamic therapy in dermatology. *European Journal of Dermatology*, 10(7), 568–575; PMID: 1105643.
296. Steiner-Oliveira, C., Longo, P. L., Aranha, A. C. C., Ramalho, K. M., Mayer, M. P. A., & de Paula Eduardo, C. (2015). Randomized in vivo evaluation of photodynamic antimicrobial chemotherapy on deciduous carious dentin. *Journal of Biomedical Optics*, 20(10), 108003. <https://doi.org/10.1117/1.JBO.20.10.108003>
297. Poppolo Deus, F., & Ouanounou, A. (2022). Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *International Dental Journal*, 72(3), 269–277. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.01.005>
298. Brookes, Z. L. S., Bescos, R., Belfield, L. A., Ali, K., & Roberts, A. (2020). Current uses of chlorhexidine for management of oral disease: a narrative review. *Journal of Dentistry*, 103, 103497. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103497>
299. Silla, M. P., Maria, J., & Almerich-Silla, J. M. (2008). Article in *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. <https://www.researchgate.net/publication/5474104>
300. Gilbert, P., & Moore, L. E. (2005). Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet. *Journal of Applied Microbiology*, 99(4), 703–715. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02664.x>
301. Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2019). Resistance Toward Chlorhexidine in Oral Bacteria – Is There Cause for Concern? *Frontiers in Microbiology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587>
302. Krithikadatta, J., Indira, R., & Dorothykalyani, A. L. (2007). Disinfection of Dentinal Tubules with 2% Chlorhexidine, 2% Metronidazole, Bioactive Glass when Compared with Calcium Hydroxide as Intracanal Medicaments. *Journal of Endodontics*, 33(12), 1473–1476. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.08.016>
303. Celik, C. (n.d.). KAVİTE DEZENFEKTANİ UYGULAMASININ FARKLI DENTİN ADEZİV SİSTEMLERİN MİKROSİZİNTİSİNA ETKİSİ [Effect of Cavity Disinfectant Application on Microleakage of Different Dentin Adhesive Systems]. <https://www.researchgate.net/publication/332014394>
304. Emilson, C. G. (1994). Potential Efficacy of Chlorhexidine against Mutans Streptococci and Human Dental Caries. *Journal of Dental Research*, 73(3), 682–691. <https://doi.org/10.1177/00220345940730031401>
305. Piksa, M., Lian, C., Samuel, I. C., Pawlik, K. J., Samuel, I. D. W., & Matczyszyn, K. (2023). The role of the light source in antimicrobial photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, 52(5), 1697–1722. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d0cs01051k>
306. Leite, D. P. V., Paolillo, F. R., Parmesano, T. N., Fontana, C. R., & Bagnato, V. S. (2014). Effects of photodynamic therapy with blue light and curcumin as mouth rinse for oral

- disinfection: A randomized controlled trial. *Photomedicine and Laser Surgery*, 32(11), 627–632. <https://doi.org/10.1089/pho.2014.3805>
307. Nemezio, M. A., de Souza Farias, S. S., Borsatto, M. C., Aires, C. P., & Corona, S. A. M. (2017). Effect of methylene blue-induced photodynamic therapy on a *Streptococcus mutans* biofilm model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 20, 234–237. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.10.025>
308. Costa, A. C. B. P., de Campos Rasteiro, V. M., Pereira, C. A., da Silva Hashimoto, E. S. H., Beltrame, M., Junqueira, J. C., & Jorge, A. O. C. (2011). Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. *Archives of Oral Biology*, 56(11), 1299–1305. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2011.05.013>
309. Fekrazad, R., Bargrizan, M., Sajadi, S., & Sajadi, S. (2011). Evaluation of the effect of photoactivated disinfection with Radachlorin® against *Streptococcus mutans* (an in vitro study). *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 8(3), 249–253. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2011.03.337>
310. Zanin, I. C. J., Gonçalves, R. B., Junior, A. B., Hope, C. K., & Pratten, J. (2005). Susceptibility of *Streptococcus mutans* biofilms to photodynamic therapy: an in vitro study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(2), 324–330. <https://doi.org/10.1093/jac/dki232>
311. Mills, R. W., Uhl, A., & Jandt, K. D. (2002). Optical power outputs, spectra and dental composite depths of cure, obtained with blue light emitting diode (LED) and halogen light curing units (LCUs). *British Dental Journal*, 193(8), 459–463. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.4801597>
312. Panhóca, V., Florez, F., de Faria Júnior, N. B., de Souza Rastelli, A. N., Tanomaru, J., Kurachi, C., & Bagnato, V. (2016). Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy against *Streptococcus mutans* Biofilm in situ. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 17(3), 184–191. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-1825>
313. Tekdal, G. P., Gürkan, A., Üniversitesi, E., Hekimliği, D., Periodontoloji, F., & Dalı, A. (2014). Dış Hekimliği ve Periodontolojide Fotodinamik Tedavi Uygulamaları. *EÜ Dışhek Fak Derg*, 35(3).
314. Araújo, N. C., Fontana, C. R., Bagnato, V. S., & Gerbi, M. E. M. (2014). Photodynamic antimicrobial therapy of curcumin in biofilms and carious dentine. *Lasers in Medical Science*, 29(2), 629–635. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1369-3>
315. Alvarenga, L. H., Prates, R. A., Yoshimura, T. M., Kato, I. T., Suzuki, L. C., Ribeiro, M. S., Ferreira, L. R., Pereira, S. A. dos S., Martinez, E. F., & Saba-Chujfi, E. (2015). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm can be inactivated by methylene blue-mediated photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 12(1), 131–135. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.10.002>
316. Méndez, D. A. C., Gutierrez, E., Dionisio, E. J., Oliveira, T. M., Buzalaf, M. A. R., Rios, D., Machado, M. A. A. M., & Cruvinel, T. (2018). Effect of methylene blue-mediated antimicrobial photodynamic therapy on dentin caries microcosms. *Lasers in Medical Science*, 33(3), 479–487. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2379-3>
317. Tokubo, L. M., Rosalen, P. L., de Cássia Orlandi Sardi, J., Freires, I. A., Fujimaki, M., Umeda, J. E., Barbosa, P. M., Tecchio, G. O., Hioka, N., de Freitas, C. F., & Suga Terada, R. S. (2018). Antimicrobial effect of photodynamic therapy using erythrosine/methylene blue combination on *Streptococcus mutans* biofilm. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 23, 94–98. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.05.004>
318. Guglielmi, C. de A. B., Simionato, M. R. L., Ramalho, K. M., Imparato, J. C. P., Pinheiro, S. L., & Luz, M. A. A. C. (2011). Clinical use of photodynamic antimicrobial chemotherapy for the treatment of deep carious lesions. *Journal of Biomedical Optics*, 16(8), 088003. <https://doi.org/10.1117/1.3611009>
319. Diniz, I. M. Árcia A., Teixeira, K. I., Maculada R., Araújo, P. V., Araújo, M. S. S. Silva, Marques, M. M., Poletto, L. T., Chadeu de A., & Cortés, M. E. Esperanza. (2014). Evaluation of antibacterial photodynamic therapy effects on human dental pulp cell cultures. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 11(3), 300–306. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.03.010>
320. Er Karaoglu, G., Uğur Ydın, Z., Erdönmez, D., Göl, C., & Durmuş, M. (2020). Efficacy of antimicrobial photodynamic therapy administered using methylene blue, toluidine blue, and tetra 2-mercaptopyridine substituted zinc phthalocyanine in root canals contaminated with *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102038>

321. Mills, I. J. (2017). A Person-Centred Approach to Holistic Assessment. *Primary Dental Journal*, 6(3), 18–23. <https://doi.org/10.1308/205016817821931006>
322. Wallace, S. (n.d.). The importance of holistic assessment-A nursing student perspective. <https://www.researchgate.net/publication/275893594>
323. Grajek, K., Wawro, A., & Kokocha, D. (2015). BIOACTIVITY OF *Morus alba* L. EXTRACT AN OVERVIEW. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 6(8), 3110. [https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6\(8\).3110-22](https://doi.org/10.13040/IJPSR.0975-8232.6(8).3110-22)
324. Sezik, E., Yeşilada, E., Honda, G., Takaishi, Y., Takeda, Y., & Tanaka, T. (2001). Traditional medicine in Turkey X. Folk medicine in Central Anatolia. *Journal of Ethnopharmacology*, 75(2–3), 95–115. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00399-8](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00399-8)
325. Azaizeh, H., Saad, B., Khalil, K., & Said, O. (2006). The State of the Art of Traditional Arab Herbal Medicine in the Eastern Region of the Mediterranean: A Review. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 3(2), 229–235. <https://doi.org/10.1093/ecam/nel034>
326. ZENI, A. L. B., MOREIRA, T. D., DALMAGRO, A. P., CAMARGO, A., BINI, L. A., SIMIONATTO, E. L., & SCHARF, D. R. (2017). Evaluation of phenolic compounds and lipid-lowering effect of *Morus nigra* leaves extract. *Anais Da Academia Brasileira de Ciências*, 89(4), 2805–2815. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201720160660>
327. Zhou, R., Li, D., Kou, Q., Jiao, Z., & Ning, Z. (2019). Evaluation of anti-inflammatory, antimicrobial and wound healing activity of *Morus nigra*. *South African Journal of Botany*, 124, 540–545. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.06.021>
328. Turan, I., Demir, S., Kilinc, K., Burnaz, N. A., Yaman, S. O., Akbulut, K., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y., & Deger, O. (2017). Antiproliferative and apoptotic effect of *Morus nigra* extract on human prostate cancer cells. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 25(2), 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.002>
329. Budiman, A., Zelika Mega, R., Tajriyani, A., & Aulifa, D. L. (2019). Formulation of chewing candy from black mulberry extract (*Morus nigra* L.) as anticaries drug. *International Journal of Drug Delivery Technology*, 9(2), 172–176. <https://doi.org/10.25258/ijddt.9.2.9>
330. Vukmirović, S., Ilić, V., Tadić, V., Čapo, I., Pavlović, N., Tomas, A., Paut Kusturica, M., Tomić, N., Maksimović, S., & Stilinović, N. (2023). Comprehensive analysis of antioxidant and hepatoprotective properties of *Morus nigra* L. *Antioxidants*, 12(2). <https://doi.org/10.3390/antiox12020382>
331. Polumackanycz, M., Wesolowski, M., & Viapiana, A. (2021). *Morus alba* L. and *Morus nigra* L. leaves as a promising food source of phenolic compounds with antioxidant activity. *Plant Foods for Human Nutrition*, 76(4), 458–465. <https://doi.org/10.1007/s11130-021-00922-7>
332. Padilha, M. M., Vilela, F. C., Rocha, C. Q., Dias, M. J., Soncini, R., dos Santos, M. H., Alves-da-Silva, G., & Giusti-Paiva, A. (2010). Antiinflammatory properties of *Morus nigra* leaves. *Phytotherapy Research*, 24(10), 1496–1500. <https://doi.org/10.1002/ptr.3134>
333. Qadir, M. I., Ali, M., & Ibrahim, Z. (2014). Anticancer activity of *Morus nigra* leaves extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9(4). <https://doi.org/10.3329/bjp.v9i4.19783>
334. Radojković, M., Moreira, M. M., Soares, C., Fátima Barroso, M., Cvetanović, A., Švarc-Gajić, J., Morais, S., & Delerue-Matos, C. (2018). Microwave-assisted extraction of phenolic compounds from *Morus nigra* leaves: Optimization and characterization of the antioxidant activity and phenolic composition. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 93(6), 1684–1693. <https://doi.org/10.1002/jctb.5541>
335. El Maaiden, E., Bouzroud, S., Nasser, B., Moustaid, K., El Mouttaqi, A., Ibouarki, M., Boukcim, H., Hirich, A., Kouisni, L., & El Kharrassi, Y. (2022). A comparative study between conventional and advanced extraction techniques: Pharmaceutical and cosmetic properties of plant extracts. *Molecules*, 27(7). <https://doi.org/10.3390/molecules27072074>
336. Fonmboh, D. J., Abah, E. R., Fokunang, T. E., Herve, B., Teke, G. N., Rose, N. M., Borgia, N. N., Fokunang, L. B., Andrew, B. N., Kaba, N., Bathelemy, N., & Ntungwen, F. C. (2020). An overview of methods of extraction, isolation and characterization of natural medicinal plant products in improved traditional medicine research. *Asian Journal of Research in Medical and Pharmaceutical Sciences*, 31–57. <https://doi.org/10.9734/ajrimps/2020/v9i230152>
337. Carneiro, A. de A., Sinoti, S. B. P., de Freitas, M. M., Simeoni, L. A., Fagg, C. W., Magalhães, P. de O., Silveira, D., & Fonseca-Bazzo, Y. M. (2022). Hydroethanolic extract of *Morus nigra* L. leaves: A dual PPAR- α/γ agonist with anti-inflammatory properties in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Plants*, 11(22). <https://doi.org/10.3390/plants11223147>
338. Chehrit-Hacid, F., Gaceb-Terrak, R., Daoudi, H., Lynda, H., Chehrit-hacid, F., Gaceb-terrak, R., Daoudi, H., Hannachi, L., Metna, B., Mati, A., Limam, F., & Mati-moulti, F. (2021). Effect of

- environmental factors on variation of phenolic compounds in leaves of *Pistacia lentiscus* L. and *Pistacia atlantica* Desf. Retrieved from <https://www.researchgate.net/publication/356646643>
339. Wang, Z., Zhang, J., Zhou, J., Ismail, S., Ahmad, H. A., Awad, H. M., Tawfik, A., & Ni, S.-Q. (2023). Dosage-dependent toxicity of universal solvent dimethyl sulfoxide to the partial nitrification wastewater treatment process. *ACS ES&T Water*, 3(3), 848–856. <https://doi.org/10.1021/acsestwater.2c00607>
340. Wiegand, I., Hilpert, K., & Hancock, R. E. W. (2008). Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols*, 3(2), 163–175. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>
341. Neu, T. R., & Lawrence, J. R. (2014). Advanced techniques for in situ analysis of the biofilm matrix (structure, composition, dynamics) by means of laser scanning microscopy. In *Methods in Enzymology* (pp. 43–64). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0467-9_4
342. Burany, S. (2003). Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. J. Goldstein, D. Newbury, D. Joy, C. Lyman, P. Echlin, E. Lifshin, L. Sawyer, and J. Michael. *Microscopy and Microanalysis*, 9(5), 484–484. <https://doi.org/10.1017/S1431927603030617>



EKLER

EK-1.Etik Kurul Kararı



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAMİDİYE BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi : 16.02.2024
Toplantı Sayısı : 2024/2
Karar Sayısı : 2/8

Kurulumuza değerlendirilmek üzere sunulan Doç. Dr. Bahar Başak Kızıltan Eliaçık'ın sorumlu, Dt. Naime Selen Özdemir'in yardımcı araştırmacı olduğu 24/95 kayıt numaralı **"Karadut ekstresi, metilen mavisi ve klorheksidinin, Streptococcus mutans ve Lactobacillus casei ile kontamine edilmiş dentin diskleri üzerindeki antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi"** başlıklı proje önerisi kurulumuzun 16.02.2024 tarihli toplantısında değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.

Doç. Dr. Yasemin AYDIN KARTAL
Başkan

Doç. Dr. Muzaffer AKDOĞAN
Başkan Yardımcısı

Prof. Dr. Abubekir ELTAS
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Papatya KELEŞ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Erhan ALABAY
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Gamze TEMİZ
Etik Kurul Üyesi

Doç. Dr. Selda RIZALAR
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Esra ÇIKLER
Öğretim Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe ÖZYAZICI
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Banu BAYRAM
Etik Kurul Üyesi

Dr. Öğr. Üyesi Hasan DEMİRCİ
Öğretim Üyesi

21.02.2024 Memur

Feyzanur SEZGİN

EK-2.Bilgilendirilmiş Onam Formu

Aydınlatılmış Onam Formu

Araştırmanın adı:

“Karadut ekstresi, metilen mavisi ve klorheksidinin, Streptococcus mutans ve Lactobacillus casei ile kontamine edilmiş dentin diskleri üzerindeki antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılması olarak değerlendirilmesi ”

“Sayın Gönüllü,
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Çocuk Diş Hekimliği Ana Bilim Dalı tarafından planlanmış olan yukarıda adı yazılı araştırmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunuyorsunuz. Bu araştırmada yer almayı kabul etmeden önce, araştırmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme çerçevesinde özgürce vermeniz gerekmektedir.
Aşağıdaki bilgileri lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınız olursa sorunuz ve açık yanıtlar isteyiniz.

Araştırmanın Amacı: Karadut ekstresi, metilen mavisi ve klorheksidinin diş yüzeyindeki dezenfeksiyon etkisinin karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesidir.

“Bu araştırmada yer almak tümüyle sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da başladıktan sonra yarıda bırakabilirsiniz. Bu araştırmanın sonuçları bilimsel amaçlarla kullanılacaktır. Sizden elde edilen tüm bilgiler gizli tutulacak, araştırma yayınlandığında da varsa kimlik bilgilerinizin gizliliği korunacaktır.”

“Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllülere verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Eksik kaldığını düşündüğüm konularda sorularımı araştırmacılara sordum ve doyurucu yanıtlar aldım.
Yazılı ve sözlü olarak tarafıma sunulan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladığımı kanısındayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğim konusunda karar vermem için yeterince zaman tanındı.

Bu koşullar altında, araştırma kapsamında elde edilen şahsıma ait çekilmiş dişin/dişlerin bilimsel amaçlarla kullanılmasını, gizlilik kurallarına uyulmak kaydıyla sunulmasını ve üzerinde çalışılarak sonuçların yayınlanmasını, hiçbir baskı ve zorlama altında kalmaksızın, kendi özgür irademle kabul ettiğimi beyan ederim.”

İmza/Tarih

Araştırmacının Adı/Soyadı: Naime Selen Özdemir

İmza/Tarih

Katılımcının Adı/Soyadı:

