T.C
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI DENTAL MATERYALLERDE SÜKROZLU ve SÜKROZSUZ İN SİTU OLUŞAN ORAL BİYOFİLMİN KAZEİN FOSFO PEPTİD–AMORF KALSİYUM FOSFAT İLE ETKİLEŞİMİNİN TARAMALI ELEKTRON MİKROSKOBUNDA İNCELENMESİ VE FLUORİD SALIMIYLA İLİŞKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. FERHAN ERTUĞRAL

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Prof. Dr. Ali R. MENTEŞ

İSTANBUL–2012

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Programın seviyesi : Yüksek Lisans ( ) Doktora (✓)

Anabilim Dalı : Pedodonti

Tez Sahibi : Ferhan Ertuğrul

Tez Başlığı :

Sınav Yeri : M.Ü. Diş Hek. fak. Pedodonti A.D.

Sınav Tarihi : 12.01.2012

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden ~~Yüksek Lisans~~/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	Kurumu	İmza
Prof. Dr. Ali MENTEŞ	M.Ü. Diş Hek. fak.	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Ülkü TARBOĞA	M.Ü. Diş Hek. fak.	
Prof. Dr. Işıl ULUKAPI	İ.Ü. Diş Hek. Fak.	
Doç. Dr. Binnaz Hazar	YTÜ Kimya-Met. Müh.	
Prof. Dr. Nimet GENÇOĞLU	M.Ü. Diş Hek. fak.	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü yönetim Kurulu'nun 03/02/2012 tarih ve 11. sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Gülden Z. OMURTAG

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-310510-0179 numaralı proje ile desteklenmiştir.

BEYAN

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

Ferhan ERTUĞRAL

TEŞEKKÜR

M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'na girişimde büyük desteği olan; doktora eğitimim süresince bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, samimi ilgisini, iyi niyetini ve sevgisini bizden hiç esirgemeyen çok değerli hocam sayın **Prof. Dr. İlknur TANBOĞA**'ya,

Doktora eğitimim süresince, tezimin her aşamasında büyük bir sabır ve titizlikle bana yardımcı olan ve yol gösteren; her konuda anlayış ve hoşgörüsüyle desteğini hissettiğim danışman hocam sayın **Prof. Dr. Ali R. MENTEŞ**'e,

Pedodonti Anabilim Dalı'na girdiğim ilk günden beri ilgi ve desteklerini esirgemeyen, Pedodonti'nin esaslarını öğrenmemi sağlayan çok değerli hocalarım sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ**, **Prof. Dr. Lale DÜZDAR** ve **Prof. Dr. Betül KARGÜL**'e,

Hem mesleki tecrübelerini her zaman benimle paylaşan hem de özel hayatımda güzel dostluklarını benden esirgemeyen Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyeleri, Sayın **Yrd. Doç. Dr. Sertaç PEKER, Yrd. Doç. Dr. Işıl Özgül KALYONCU, Yrd. Doç. Dr. Nida HÜROĞLU** ve **Yrd. Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU'** na,

Tez izleme komitemde bulunan İ.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi sayın **Prof. Dr. Işın Ulukapı**'ya,

SEM fotoğraflarımın çekiminde yardımcı olan Y.T.Ü. Kimya-Metalürji Fakültesi öğretim üyesi sayın **Doç. Dr. Afife Binnaz HAZAR**'a ve sayın **Oktay ELKOCA**'ya,

SEM çalışmasında örneklerimin hazırlanmasında büyük emeği geçen, M.Ü. Tıp Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof. Dr. Feriha ERCAN'** a

Yine M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı' nda araştırma görevlisi Sayın **Esin ÇALIŞKAN AK'** a ve tüm elektron mikroskobu ünitesi çalışanlarına,

Doktora tezi laboratuar çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Ar-Ge laboratuarı sorumlusu Biyolog Sayın **Nurhan YAŞLIOĞLU**'na,

Doktora tezimin istatistiksel analizlerinin yapımı ve değerlendirilmesindeki değerli katkıları nedeniyle biyoistatistik uzmanı sayın **Ebru OSMANOĞLU**'na,

Doktora tezimin bilgisayar analiz programını hazırlayan sayın **Metin Türe**'ye

Pedodonti Anabilim Dalı' nda bulunduğum yıllar boyunca bana her zaman anlayış gösteren ve özverili yaklaşımlarıyla yardımlarını benden esirgemeyen, **Yrd. Doç. Dr. Özgür Önder KUŞÇU** ve **Dr. Seçkin SÜSAL**'a, bana destek olan dönem arkadaşlarım **Fatma PEKER'**e, **Burcu Nur DOĞAN**'a, **tüm asistan arkadaşlarıma** ve **Bahtışen ÜRER**'e,

Ayrıca tüm tez çalışmam süresince büyük bir sabır ve özveriyle bana yardımcı olan asistan arkadaşlarım, **Sezin DEMİREL'**e, **Sarp KAYA**'ya, **Didem KURAL**'a, Sevi **AKGÜN**'e, **Ezgi ERARSLAN**'a, **Elif Gizem AKTEPE**'ye **Barhan PEKEL**'e ve de **Şirin GÜNER**'e,

Her zaman yanımda olduklarını hissettiğim arkadaşlarım **Dr.Başak DURMUŞ'a**, **Sezen Dergin'e, Aysun GARAN'a**, **Dr. Pınar KARATABAN'a ve Dr. Gülşad GÜNGÖR'e**, M.Ü. Diş hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı ailesine mensup olmasalarda meslek hayatımın ilk yıllarında tanıştığım ve hala dostluklarıyla beni onore eden canım arkadaşlarım ve de aynı zamanda meslektaşlarım **Dr. Nihal ÇETİN TURAN'a, Dr. Işıl KISAKÜREK'e, Dr. İrem AKSU'ya, Dt. Berna MERCANGÖZ'**e **ve Dr. Koray ERYILMAZ'a,**

Uzun yıllar önce tanışmış olmamıza rağmen, geç bulduğum ama sonsuza kadar devam etmesini istediğim çok değerli dostluğunu benden hiçbir zaman esirgemeyen, iyi, kötü her günümde yanımda olan candostum **Dr. Figen EREN GİRAY**'a ve çok değerli ailesine,

Bu zor doktora süreci boyunca beni anlayışla karşılayan, maddi manevi her türlü desteğini tüm içtenliğiyle bana sunmaktan kaçınmayan **Dt. Bora KORKUT**'a,

Beni her durum ve şartta en iyi koşullarda büyütüp yetiştiren, her zaman daha iyiye ulaşma çabası içinde olmamı sağlayıp bana başarma gücü veren, yanımda olamasalar da hayatım boyunca bana sürekli destek olup bugünlere gelmemi sağlayan, varlığımı borçlu olduğum teşekkürlerin yetmeyeceği kendileri de birer eğitimci olan sevgili anneciğim **Rahime ERTUĞRAL**'a, ve canım babam **Naci ERTUĞRAL'a,** doktora eğitimim süresince aynı evi paylaştığım ve şimdi onsuz geçirdiğim her gün eksikliğini hissettiğim canım kardeşim **Çağrıhan ERTUĞRAL'a ,** kuzenlerim **Betül AKSOY'**a, **Can AKSOY**'a, **Ayşegül KELEŞ TÜRE**'ye ve **tüm aileme,**

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNUYORUM.

İÇİNDEKİLER

BEYAN
TEŞEKKÜR…….....iii
İÇİNDEKİLER……...…. v
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ……viii
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... …..x
RESİMLERLİSTESİ……..xi
TABLOLAR LİSTESİ……..xiii
1.ÖZET……1
2. SUMMARY..... 2
3. GİRİŞ ve AMAÇ…….3
4. GENEL BİLGİLER..... 7
4.1. Biyofilm 7
4.1.1. Tanımı ve tarihçesi..... 7
4.1.2. Biyofilmin yapısı ve oluşumu 10
4.1.3. Biyofilmin gelişim evreleri 12
4.1.4. Biyofilm içindeki bakterilerin özellikleri..... 14
4.1.5. Mikroorganizmaların biyofilm oluştuma nedenleri 16
4.2. Oral Biyofilm 17
4.2.1. Pelikıl oluşumu 19
4.2.2. Bakterilerin yapışması..... 20
4.2.3. Yapışan bakterilerin gelişimi ve farklı mikrokolonilerin oluşumuna öncülük etmesi……23
4.2.4. Mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişimine öncülük etmesi ve olgun biyofilm oluşumu 26
4.2.5. Oral biyofilmin oluşumuna etki eden faktörler..... 27
4.3. Biyofilm incelemede kullanılan yöntemler..... 28
4.4. Fluorid ve mikroorganizma ilişkisi 30
4.4.1. Fluoridin biyofilm üzerine etkileri……30
4.4.2. Biyofilmlerdeki fluoridin biyolojik etkilerini arttırıcı stratejiler……..32
4.5. Dental materyaller…….33

4.5.1. Cam iyonomerler……...…….33
4.5.1.1. Cam iyonomerlerin sertleşme mekanizması…… .34
4.5.1.2. Fluorid salım mekanizması……36
4.5.1.3. Cam iyonomerlerin fluorid salımı……..36
4.5.2. Poliasit modifiye kompozit rezinler (PMKR)…….....40
4.5.3. Fissür örtücüler……41
4.6. CPP-ACP (kazein fosfopeptid amorf kalsiyum fosfat)……44
5. GEREÇ VE YÖNTEM…….47
5.1.Örneklerin toplanması ve hazırlanması…….47
5.1.1.Dental materyallerin hazırlanması……47
5.1.1.1.Fuji Triage……...47
5.1.1.2.Fuji IX GP Extra…….48
5.1.1.3.Helioseal F……..48
5.1.1.4.Dyract Extra……49
5.1.2.Doğal dişlerin hazırlanması…….49
5.2.Biyofilm tabakasının ağız içi ortamda oluşturulması……...51
5.2.1. Apareylerin hazırlanması…...……51
5.2.2. Grupların belirlenmesi 52
5.3. Biyofilmin mikroskobik incelenmesi……54
5.4. Biyofilmin çekilmiş fotoğraflar üzrinden sayısal olarak değerlendirilmesi….56
5.5.Araştırmada kullanılan dental materyallerin fluorid salımının değerlendirilmesi…….59
5.5.1.Örneklerin hazırlanması 59
5.5.2.Fluorid salımının ölçülmesi 60
5.6. İstatistiksel analiz 62
6. BULGULAR 63
6.1. Mine ve dental materyallerin değerlendirilmesi 63
6.2. Normal, sükrozlu ve CPP-ACP varlığında sükrozlu floranın değerlendirilmesi…….67
6.2.1.Mine ve dental materyallerin gruplar arası değerlendirilmesi……67
6.2.2.Mine ve dental materyallerin grup içi değerlendirilmesi……68
6.3. Dental materyallerin fluorid salımlarının değerlendirilmesi..... 70

6.4. Dental materyallerin fluorid salımı ile biyofilm arasındaki ilişkinin……75
6.5. Örnekler üzerinde oluşan biyofilm tabakasının SEM görüntüleri 77
7. TARTIŞMA 81
8. SONUÇLAR 98
EKLER..... 101
KAYNAKLAR.....105
ÖZGEÇMİŞ……120
ETİK KURUL ONAYI

KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ

EPS: Ekstrasellüler polisakkarit

IgA: İmmunoglobin A

IgG: İmmunoglobin G

S. Sanguis: Streptococcus Sanguis

S. Oralis: Streptococcus Oralis

S. Mitis: Streptococcus Mitis

S. Mutans: Streptococcus Mutans

GTF: Glikoziltransferaz

SEM: Scanning electron microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

TEM: Transmission electron microscope (Geçirmeli Elektron Mikroskobu)

CLSM: Confocal laser scanning microscope (Konfokal Lazer Taramalı Mikroskobu)

FISH: Fluorescence in situ hybridization (Floresans in situ Hibridizasyonu)

VF: Vital Fluorescence (Vital Floresans)

ppm: Part per million (Milyonda Bir Ünite)

NIH: National Institutes of Health

FAS: Fluoroaluminosilikat

RMCI: Rezin modifiye cam iyonomer

PMKR: Poliasit modifiye kompozit rezin

HEMA: Hidroksietil Methakrilat

μm: Mikron metre

BIS-GMA: Bis-fenol A glisidil metakrilat

TEG-DMA: Trietilen glikol dimetakrilat

ADA: American Dental Association

CPP-ACP: Kazeinfosfopeptit amorf kalsiyumfosfat

ACFP: Amorf kalsiyumfluorofosfat

Ca: Kalsiyum

P: Fosfor

TISAB II: Total Ionic Strength Adjusment Buffer

DMFT: Decay-missing-filling-tooth (Çürük-eksik-dolgulu diş sayısı)

M: Mine

FT: Fuji Triage

FIX: Fuji IX GP Extra

HF: Helioseal F

DE: Dyract Extra

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Biyofilmin ilk tanımı

Şekil 2: Biyofilmin oluşum süreci

Şekil 3: Adezin-reseptör ilişkisi

Şekil 4: Adezin reseptörlere bağlanması

Şekil 5: Pelikıl üzerine bakteri kolonizasyonu

Şekil 6: Oral biyofilmin birincil ve ikincil kolonizasyon oluşum modeli

Şekil 7: Geleneksel cam iyonomerlerin sertleşme mekanizması

Şekil 8: Cam iyonomer-dentin ara yüzeyindeki iyon transferi

Şekil 9: Tri-cure cam iyonomer sistemi sertleşme reaksiyonu

Şekil 10: 3 ayrı grupta 4 farklı materyal ve mine örneklerinde oluşan biyofilm miktarının ortalama ve standart sapma değerleri

Şekil 11: 3 farklı grupta dental materyaller ve mine üzerinde oluşan biyofilm tabakasında görülen değişim eğrileri

Şekil 12: Tüm materyallerin ve mine örneklerinin 3 farklı grupta tespit edilen biyofilm miktarı ortalamaları ve standart sapmaları

Şekil 13: Dental materyaller ve mine üzerinde oluşan biyofilm tabakasının her 3 grupta görülen ortalama değerleri

Şekil 14: Dental materyallerin 4 günlük fluorid salım düzeyleri (ppm)

Şekil 15: Fluorid içeren dental materyallerin 4 gün boyunca görülen fluorid salım eğrileri (ppm)

RESİMLER LİSTESİ

Resim 1: Biyofilmin gelişim evreleri

Resim 2: Silikon kalıplar ve 5x5mm boyutundaki materyaller

Resim 3: GC Fuji Triage Capsule

Resim 4: GC Fuji IX GP Extra Capsule

Resim 5: Helioseal F

Resim 6: Dyract Extra

Resim 7: Doğal dişlerin hazırlanması

Resim 8: Dişlerin 5x5 mm boyutunda kesilmesi

Resim 9: Apareylerin hazırlanması

Resim 10: Örneklerin apareylere yerleştirilmesi

Resim 11: Sükroz

Resim 12: GC Tooth Mousse

Resim 13: Apareylerden çıkarılan örneklerin plastik tüplere yerleştirilmesi

Resim 14: Altın kaplama için hazırlanan örnekler

Resim 15: Örneklerin kaplanması ve SEM cihazı

Resim 16: Örneklerin x50 büyütmede çekilen SEM görüntüsü

Resim 17: Magic wand tool programı ile boyanmış SEM fotoğrafı

Resim 18: Renk yoğunluklarının hesaplanması

Resim 19: Elde edilen yoğunlukların toplamı (% olarak)

Resim 20: Hazırlanmış örneklerin santrifüj tüplerine yerleştirilmesi

Resim 21: Santrifüj tüpüne yerleştirilen örneklerin etüvde bekletilmesi

Resim 22: 0,1 M Fluorid ve TISAB II

Resim 23: Materyallerin fluorid salımının ölçülmesi

Resim 24: Sükrozlu florada x50 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü

Resim 25: Sükrozlu florada x150 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü

Resim 26: Sükrozlu florada x500 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü

Resim 27: Sükroz + CPP-ACP varlığında x50 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü

Resim 28: Sükroz + CPP-ACP varlığında x150 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü

Resim 29: Sükroz + CPP-ACP varlığında x500 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1: Mikroorganizma-reseptör-adezin ilişkisi

Tablo 2: Grup içi ve gruplar arası materyallerin biyofilm miktarının değerlendirilmesi

Tablo 3: Mine ve dental materyallerin gruplar arası post hoc değerlendirme sonuçları

Tablo 4: Gruplar arası mine ve dental materyallerin değerlendirilmesi

Tablo 5: Mine ve dental materyallerin grup içi post hoc değerlendirme sonuçları

Tablo 6: Grup içi ve gruplar arası dental materyallerin fluorid salım düzeylerinin değerlendirilmesi

Tablo 7: Dental materyallerin fluorid salımlarının gruplar arası post hoc değerlendirme sonuçları

Tablo 8: Dental materyallerinin fluorid salım düzeylerinin grup içi post hoc değerlendirme sonuçları

Tablo 9: Gruplarda dental materyaller ile fluorid salım düzeylerinin değerlendirilmesi

1. ÖZET

Bu çalışmanın amacı, çocuk diş hekimliğinde kullanılan dental materyallerin üzerinde normal, sükrozlu ve sükroz+CPP-ACP'li ortamda oluşan biyofilm tabakasının miktarını mine ile kıyaslamalı olarak incelemek ve bu dental materyallerdeki fluorid salımının biyofilm oluşumuna etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla çalışmanın ilk bölümünde 7 kişinin üst çenesi için hazırlanan apareylerin palatinal kısımlarına 5x5x2 mm boyutlarında 1 er adet Fuji Triage, Fuji IX, Helioseal F, Dyract Extra dental materyal örnekleri ve kontrol grubu olarak da insan diş minesi yerleştirildi. Aynı apareyler aynı bireylere her seferinde örnekler değiştirilerek üç farklı koşulda 4'er gün süreyle kullandırıldı. Grup I'de; normal florada Grup II'de sükrozlu florada ve Grup III' te ise sükroz+ CPP ACP'li florada dental materyaller ve diş minesi üzerinde oluşan biyofilm tabakası içeren örnekler apareylerden çıkarılarak SEM görüntüleme yöntemi ile değerlendirildi. Çalışmanın ikinci bölümünde ise aynı dental materyallerin 4 gün süre ile fluorid salımları fluorid elektrodu ile ölçüldü. Bu dental materyaller üzerinde oluşan biyofilm tabakası ve fluorid salımları arasındaki korelasyon değerlendirildi. En az biyofilm oluşumu mine üzerinde gözlendi. Tüm örneklerde sükroz kullanımı ile biyofilm oluşumu anlamlı derecede artarken ($p<0.05$) Fuji Triage hariç tüm dental materyaller ve minede CPP-ACP kullanımıyla biyofilm tabakası oluşumunun anlamlı derecede azaldığı görüldü. Gruplar arasında, oluşan biyofilm tabakası miktarında Fuji Triage ve Dyract Extra dental materyallerinde bir fark bulunmazken, Fuji IX GP Extra, Helioseal F ve mine örneklerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p<0.05$). Dental materyallerin 4 gün boyunca fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulundu ($p<0.01$**).** Tüm dental materyallerin fluorid salım düzeyleri 4. günün sonunda başlangıçtaki fluorid salım düzeyine göre yüksek bulundu. En fazla fluorid salımı yapan materyalin Fuji IX olduğu ve bunu sırasıyla Fuji Triage, Dyract Extra ve Helioseal F'in takip ettiği gözlendi. Her 3 grupta da dental materyaller üzerinde oluşan biyofilm miktarı ile materyallerin fluorid salımları arasında anlamlı bir ilişki bulunmadı.

Anahtar sözcükler: Oral biyofilm, dental materyaller, CPP-ACP, SEM, fluorid salımı

2. SUMMARY

***In situ* evaluation of biofilm formation on dental materials and the correlation between their fluoride release: A SEM study**

The aim of this study was to evaluate the the amount of biofilm that was formed in presence of Sucrose, Sucrose+CCP ACP and normal oral enviroment on dental materials used in pediatric dentistry as compared to enamel and also to assess the correlation between the fluoride release of these dental materials and biofilms. In the first part of this study dental material samples from Fuji Triage, Fuji IX Extra, Helioseal F , Direct Extra and human enamel as a control, 5x5x2 in size were placed to palatinal part of removable appliance prepared for upper jaws of seven people.The same appliance was used in three different conditions for 4 days in each person. Samples from dental materials and enamel on which biofilm was formed in Group I normal flora, Group II Sucrose flora and Group III Sucrose+CCP ACP flora were taken of from appliances and analyzed by SEM imaging. In the second part of the study fluoride release from the same dental materials were measured by fluoride ione selective electrode for 4 days.The correlation between biofilm formed on dental materials and fluoride fluoride released was evaluated. In the groups the least biofilm formation was seen on enamel, whereas with the use of sucrose, the biofilm formation in all the samples was significantly increased ($p<0.05$) and with the use of CPP-ACP it was significantly decreased on dental materials except Fuji Triage and enamel. Under the three conditions, there was no significantly difference between Fuji Triage and Dyract Extra, whereas the amount of the biofilms on Fuji IX Extra, Helioseal F and enamel were statistically significant ($p<0.05$). There was a statistically significant difference between the fluoride release levels of dental materials ($p<0.01$**)**. At the end of the forth day, fluoride release measurements of all dental materials were higher than the levels in the initial day.The maximum fluoride release was observed at Fuji IX followed by Fuji Triage , Dyract Extra and Helioseal F. In all the groups there was no correlation between the biofilm formed on dental materials and fluoride release.

Key words: Oral biofilm, dental materials, CPP-ACP, SEM, fluoride release

3. GİRİŞ VE AMAÇ

Bir süre öncesine kadar mikroorganizmalar, planktonik olarak da adlandırılan hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak bilinirken, araştırmacıların yaptıkları çalışmalar sonucunda, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve farklı bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiği gözlenmiştir (27). Polisakkarit bir matriksin çevrelediği, mikroorganizmalar içeren, yüzeylere bağlanabilen, kısmen organize olmuş, bu kompleks yapıdaki polimikrobiyal topluluğa biyofilm adı verilmiştir (124).

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilmektedir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman almaktadır (4, 29).

Biyofilmlere, endüstriyel ya da evsel su sistemleri, ısı değiştiriciler, su ileten borular, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesisleri, soğutma kuleleri, kağıt makineleri, tıbbi cihazlar ve diş ünitleri gibi cansız yüzeylerde rastlanabildiği gibi canlı organizmalarda da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda biyofilm oluşumu görülmektedir (4,146). Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir (4,92).

Diş minesi, kök yüzeyi, dental materyaller ve dental implantlar gibi yüzeyler üzerine yapışan ve bir ekstrasellüler polisakkarit matriks (EPS) içerisine gömülü halde bulunan üç boyutlu bakteriyel bir topluluğa ise oral biyofilm adı verilmektedir (160). Oral kavitede diş yüzeyinde oluşan biyofilm tabakası 'dental plak' olarak da bilinmektedir (124). Oral biyofilm ağızda diş çürüğü ve periodontal hastalıkların etyolojisinin temelini oluşturmaktadır (81).

Oral kavitedeki sert doku yüzeylerinde oral biyofilm oluşması çok aşamalı bir süreçtir. Diş fırçalamadan sonraki birkaç dakika içinde, diş ve biyomateryallerin yüzeyinde, fosfoproteinler ve glikoproteinler gibi makromoleküller içeren ve pelikıl olarak adlandırılan bir tükürük filmi birikir. Bu aşamayı, planktonik bakterilerin

pelikıla tutunması izler. Başlangıç kolonizasyonu gösteren bakteri türlerinin bölünmesiyle mikrokoloniler oluşur ve daha sonra kolonize olan türlerin de tutunmasıyla matrikse gömülü bir çok bakteri türü içeren oral biyofilm tabakası meydana gelir ve bu tabaka mekanik temizlik veya başka faktörlerle uzaklaştırılmadığında zamanla olgunlaşır. Oral biyofilmin olgunlaşması, monosakkaritler, özellikle sakkaroz olarak da bilinen sükroz gibi disakkaritler ve polisakkaritler gibi substratlar, pelikıl ve bakteriler arasındaki karmaşık fiziksel ve hücresel etkileşimler sonucu oluşur. Bu etkileşimler pek çok seviyede olur ve fiziksel yakınlık, metabolik alışveriş, işaret molekülü aracılı iletişim, genetik materyal alışverişi, inhibitör faktörlerin üretimi ve ko-agregasyon (genetik olarak farklı hücre tipleri arasındaki özel hücre-hücre tanımaları) şeklinde görülebilir (124).

Kompleks ve dinamik mikrobiyal bir ekosistem olarak tanımlanan oral biyofilm, diş ve çevre dokularında olduğu kadar restoratif yüzeylerde de rahatlıkla oluşabilir (13). Bu nedenle klinikte plak oluşumunu aktive veya inhibe edebilecek dental materyallerin kullanımına ilgi giderek artmakta ve oral biyofilmin farklı dental materyaller tarafından nasıl etkilendiği hakkında bilgi sağlamak günümüzde büyük önem kazanmaktadır (2,129)

Yıllarca süren araştırmalara rağmen dental materyallerin yüzeyindeki bakteri adezyonu ve oral biyofilm oluşumunun kesin mekanizmaları henüz belirlenememiştir ama çok sayıda etkene bağlı karmaşık süreçler olduğu kabul edilmektedir. Tükürük proteinleri, substrat hidrofobikliği, dental materyallerin içeriğindeki organik ve inorganik elementler, yüzey serbest enerjisi, yüzey gerilimi ve yüzey pürüzlülüğü gibi etkenlerin, bakterilerin adezyonu ve oral biyofilm oluşumu arasındaki korelasyonu araştırmak çalışmalar yapılmaktadır (124).

Çocuk diş hekimliğinde koruyucu ve restoratif amaçlı en sık kullanılan dental materyaller; kompomerler, cam iyonomerler ve fissür örtücülerdir. Bu materyaller ile biyofilm arasındaki ilişkiyi incelemek için bugüne kadar *in vitro, in vivo* ve *in situ* araştırmalar yapılmıştır. *İn vitro* çalışmalarda özellikle cam iyonomerlerin oral biyofilm içerisindeki karyojenik bakterilerin gelişimini inhibe edici potansiyele sahip olduklarını gösteren bulgular elde edilmiş olsa da *in vivo* ve *in situ* araştırmaların bu

dental materyallerin antikaryojenik etkileri ile ilgili sonuçları tartışmaya açık olup bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır (135).

Çürük oluşumunu engellemede kullanılan en etkili ajanlardan biri de fluorid olarak kabul edilmektedir. Oral kavitede bulunan fluoridin, tükürükte ve plak biyofilminde bir rezervuar oluşturduğu ve zamanla salım yaparak mineye bağlanması sonucunda mine yapısını güçlendirerek çürük oluşumunu engellediği gösterilmiştir. (21). Fluoridin oral biyofilm üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemekle birlikte; biyofilm yüzeyine yakın alanlara lokalize olmuş anaerobik ve asidik mikro çevreleri hedef alarak, karyojenik biyofilmlerde rol oynayan, asit ortamı seven bakterilerin artmasını engellemesi olarak bahsedilebilir (8). Fluorid, çürük önleyici etkisinden yararlanmak amacıyla dental materyallerin içerisine katılmaya başlanmıştır.

Fluorid güçlü bir ajan olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalar açısından tedavi edici bir ürün olarak kabul edilmemektedir. Çocuklarda yüksek doz fluoridin toksik etki riski nedeniyle çürük önleyici aktivite gösteren ve fluorid ile birlikte kullanılabilecek daha güvenilir ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur (132). Bu ajanlardan biri olan kazeinfosfopeptid amorf kalsiyumfosfat (CPP-ACP) 'ın çürük önleyici etkisi yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda gösterilmiştir (131).

CPP-ACP bir kalsiyum fosfat remineralizasyon teknolojisidir. CPP-ACP içeren ağız diş sağlığı ürünleri koruyucu diş hekimliğinde hidroksiapatitlerin rejenerasyonu için gerekli olan Ca ve P iyonlarının birikimini sağlar, tamponlama kapasitesi sayesinde oral biyofilme, diş ve yumuşak dokulara iyi bağlanabilme kapasitesi ve devamlı iyon salımı yapabilme özelliğine sahiptir. Oral biyofilmin yapısına katılarak plağın kalsiyum ve fosfat iyon seviyesini anlamlı bir şekilde arttırdığı ve biyofilm içindeki bakteri hücrelerinin yüzeylerine bağlanarak diş üzerinde kolonize olmalarını da engellediği düşünülmektedir (5,139). Ancak oral biyofilme etkisi konusunda yapılmış az sayıda araştırma bulunmaktadır.

Bu nedenle tez çalışmamızın amacı; çocuk diş hekimliğinde kullanılan dental materyallerin üzerinde normal, sükrozlu ve sükroz+CPP-ACP'li ortamda oluşan oral biyofilmin miktarını mine ile kıyaslamalı olarak incelemek ve bu dental

materyallerdeki fluorid salımının oral biyofilm oluşumuna etkisi olup olmadığını araştırmaktır.

4. GENEL BİLGİLER

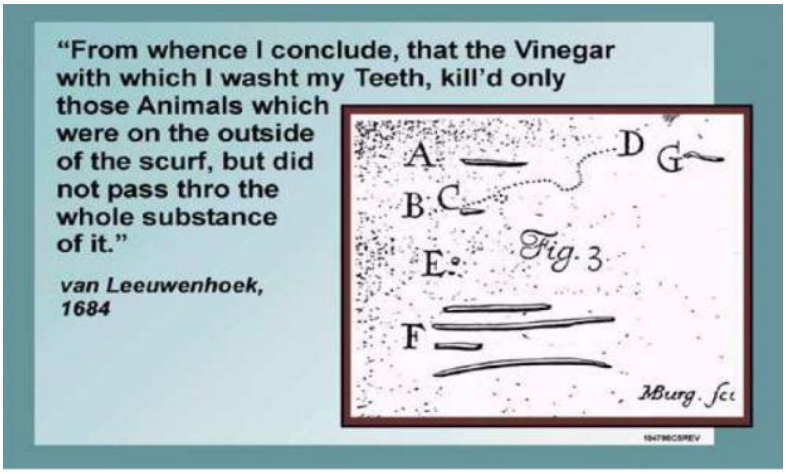
4.1. Biyofilm

4.1.1. Tanımı ve tarihçesi

Mikroorganizmalar bir süre öncesine kadar, hızlı çoğalan ve tek başlarına hareket ederek serbestçe dolaşan canlılar olarak görülmekteydi. Araştırmacılar bu yüzden bugüne kadar, planktonik olarak da adlandırılan ve diğer bakterilerden bağımsız olarak, tek başlarına dolaşan mikrobiyal hücrelerin davranışlarını incelemiş ve araştırmalarını bu yönde geliştirmişlerdir. Bununla beraber, bakterilerin planktonik formdan çok, bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen bir yapı oluşturarak hayatlarını devam ettirdiğine dair kanıtların ortaya konduğu bir çok çalışma gerçekleştirilmiştir (27).

Günümüze kadar biyofilm bir çok bilim adamı tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. İlk olarak 17. Yüzyılda Anton von Leewenhoek'un kendi dişinden almış olduğu örnekteki birikintiler içinde yaşayan mikroorganizmalardan bahsetmesinden sonra 1978 yılına kadar biyofilm varlığından söz edilmemiştir (Şekil 1)(35,121,125). 1978 yılında, bakterilerin, yeterli yiyecek bulunan yüzeylere yapışan bir matriks ile çevrili biyofilm içinde ürediği tezi ortaya atılmıştır ve ilk defa '***biyofilm***' terimi **Costerton** tarafından kullanılmıştır (35).

O dönemde, bakterinin büyük bir kısmının biyofilm adı verilen besleyici bir oluşum içerisinde olduğu ve bakterinin yapışmış şekli ile serbest bulunan şekli arasında farklılık olduğu gösterilmiştir. Daha sonra yapılan mikroskobik gözlemlerde bakterilerin, derin yer altı suları ve okyanusların derinlikleri hariç, doğadaki su ekosistemi başta olmak üzere, tüm tabii ekosistemde oluşabildiği ve farklı yüzeylere yapışarak çoğalmasının %99.9 oranında biyofilm aracılığıyla olduğu anlaşılmıştır (27, 35, 125,157).



Şekil 1: Biyofilmin ilk tanımı (35)

Biyofilmin tanımı son 30 yılda elde edilen bilgiler ışığında geliştirilmiştir. 1976 yılında Marshall, biyofilmin çok ince bir ekstrasellüler polimer fibril olduğunu ve bakterinin yüzeye tutunmasında önemli olduğunu bildirmiştir (35).

Costerton ve arkadaşları, bakterilerin polisakkarit yapıda bir glikokaliks matriks içerisinde bulunduğunu ve bu yapının canlı veya cansız yüzeylere adezyonu kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir (35).

Yine Costerton 1987'de biyofilmlerin yüksek oranda sulu (hidrate) anyonik ekzopolimer matriks içinde bulunan mikrokoloniler olduğunu belirtmiştir (35).

Elder ve arkadaşları, biyofilmi, mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığıyla oluşturdukları yapısal birlik olarak tanımlarken, Carpentier ve Cerf de çok basitçe biyofilmin, bakterilerin gömülü olarak bulunduğu ve yüzeye yapışmış olan organik polimer matriks olduğunu belirtmişlerdir (18, 37).

Biyofilmin en yeni tanımı ise; '**Canlı ya da cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekstrasellüler polimerik maddeden oluşmuş, ekstrasellüler polisakkarit matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye, geri dönüşümsüz olarak tutunmuş genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen farklı fenotip gösterebilen yapıda olan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk**' olarak belirtilmektedir (4,29,35,60,120,123,145,146,147).

Biyofilm tabakasına; su ile temas eden tüm yüzeylerde, örneğin; endüstriyel ya da evsel su sistemlerinde, ısı değiştiricilerde, su ileten borularda, su arıtma, depolama, işleme ve dağıtım tesislerinde, soğutma kulelerinde, kağıt makinelerinde, tıbbi cihazlarda ve diş ünitlerinde rastlanabilmektedir (4,146). Bu ortamlarda biyofilm tabakası, bakterileri başta klor olmak üzere dezenfektanlardan, besinsizlikten, kuraklıktan, pH dalgalanmalarından ve toksinlerden korumaktadır. Bu cansız yüzeylerin yanı sıra biyofilm canlı organizmada da çeşitli koşullarda, çeşitli dokularda oluşmaktadır. Biyofilmlerin bir kısmı organizma açısından koruyucu bir rol üstlenirken, özellikle immün sistemi baskılanmış hastalarda ve kalıcı tıbbi araç ya da kateteri olan hastalarda ciddi enfeksiyonlara yol açabilmektedir. Biyofilmler insan vücudunda kateterler, kontakt lens, protez kalp kapakçıkları ve kalp pilleri, rahim içi araç, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir (4,92).

Biyofilm içindeki bakterilerin en büyük avantajları, konak savunma mekanizması gibi çevresel faktörlerden ve antibiyotik gibi toksik maddelerden korunmalarıdır (105,134). Ayrıca biyofilm gıda alımı ve işlenmesini, bir türün diğeri için yararlı besini üretmesi anlamına gelen çapraz beslenmeyi, yine bir türün diğeri için zararlı olan metabolik ürünü ortamdan uzaklaştırmasını ve daha elverişli bir ortam oluşturulmasını kolaylaştırmaktadır (134). Bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturdukları her tabakaya biyofilm denilmemelidir. Gerçekte biyofilm olmayan bu topluluklar, bulundukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam ederler. Hiç birinde biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özellikler gözlenmemektedir. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki hücrelerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve dolaşıma geçtikleri unutulmamalıdır. Dolaşıma geçen bu hücreler, planktonik formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm direnç karakterlerini taşımaktadırlar (27, 35). Biyofilm bakterileri, çevre koşullarına karşı serbest bulunan planktonik bakterilerden daha dirençlidirler (29,77,91, 92,93,120,142).

Biyofilmin planktonik bakteriden üstünlükleri Donlan (2002) tarafından dört madde altında toplanmıştır. Bunlar sırasıyla:

1. EPS çevreden besin maddelerini konsantre ederek bakterilerin kullanımına sunar.

2. Biyofilm oluşumunda bulunan bakteriler antimikrobiyal maddeler, yüzey gerilimi değiştiren ajanlar, sıcaklık, konakçıya ait fagositler, konakçı oksijen radikalleri, proteazlar gibi çeşitli koşullara ve maddelere karşı dirençlilik geliştirirler. Bu direnç, gelişimin durdurulup canlılığın korunmasından, genetik düzenleme ile yukarı ya da aşağıya doğru düzenleme ile modifikasyona kadar değişen reaksiyonlar halinde gözlemlenir.

3. Tabakalı dizilim sonucu yüzeyde bulunan çeşitli bakteriler mekanik kalkan etkilerinin yanısıra; katalaz, peroksidaz, proteaz ve lipaz inhibitörleri salgılayarak antimikrobiyallere karşı iç yüzeyde bulunan bakterileri korurlar.

4. Biyofilm parçaları koparak yeni yüzeylere yayılır. Planktonik bir hücrenin tutunmasından daha kolay bir tutunma gerçekleştirirler (34).

Biyofilm uzun yıllardır endüstriyel su ve petrol boru sistemlerinde önemli bir sorun olarak bilinirken, son dönemlerde tıpta da önemi sadece dişteki birikintilerden ibaret olmayıp özellikle yabancı cisim enfeksiyonları başta olmak üzere bir çok kronik enfeksiyonda rol oynadığı gösterilmiştir (24). Buna ek olarak adherans, antibiyotik direnci ve fagositozda rolü olduğunun bilinmesi, biyofilmin son yıllarda tıbbi önemini daha da artırmıştır (98).

4.1.2. Biyofilm yapısı ve oluşumu

Biyofilm, bir yüzeye yapışarak, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde toplu halde yaşayan ve birbirleriyle haberleşerek varlıklarının devamı için gerekli işlevlerin yerine getirilmesini sağlayan bakterilerin oluşturduğu karmaşık bir organizasyondur. Bakteriler ekstrasellüler polimerik maddeler olarak da bilinen ve bir dizi polisakkarit, nükleik asit ve protein içeren çamur veya balçık benzeri bir matriks içerisinde gömülü olarak bulunurlar (27).

Biyofilmler inert veya canlı yüzeylerde oluşabilirler. Bu yüzeyler arasında canlı dokular, medikal implantlar, endüstriyel veya içme suyu sistemlerinin boruları veya doğal akuatik sistemler yer alır. Bakteriler bir yüzeye yapıştıktan ve biyofilm

oluşturduktan sonra o yüzeyden hafif durulama ile uzaklaştırılamazlar. Biyofilm matrikslerinin içerisinde hücresel olmayan mineral kristalleri, korozyon partikülleri, kil veya çamur parçaları ya da kan bileşenleri bulunabilir (35). Yapılan araştırmalar, biyofilmlerin sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmadığını, bakterilerin belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan fonksiyonel toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemler olduğunu ortaya koymuştur (29).

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşamamaktadır. Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler, biyofilmin ana ekstrasellüler komponentini oluşturmaktadırlar (92).

Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilmektedir. Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmıştır. Bu su kanalları içinde devam eden su akışı besin maddelerinin ve oksijenin difüzyonunu sağlar. Sistemin yapısına, mikroorganizmanın türüne ve çevresel faktörlere bağlı olarak olgun bir biyofilmin oluşması birkaç saat ile birkaç hafta zaman almaktadır (4,29).

Biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (27). Tam hidrate ve canlı biyofilm volümlerinin %15 hücre , % 85 matriks materyali tarafından oluşturulduğu ve hücrelerin matrikslerinin çevrelediği farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' veya 'mantarlar' içerisinde bulundukları anlaşılmıştır (35).

Biyofilm içindeki bakteriler ve mikrokoloniler, birbirleriyle iletişim kurabilme yeteneğine sahiptirler. İletişim sinyali olarak çeşitli kimyasal mekanizmaları kullanmaktadırlar (60,123,126). Mikroorganizmaların hücre yoğunluğu belli bir seviyeyi aşınca bakteriler *autoinducer* adı verilen sinyal molekülleri salgılar, böylece çevredeki bakterilerde gen ekspresyonu aktive olur (79,105). Bakteriler ürettikleri

sinyal moleküllerinin yoğunluğunu ölçebilmekte, böylece çevrelerindeki diğer mikroorganizmaların miktarını hissedebilmektedir. **Quorum sensing** olarak adlandırılan bu iletişim hücre yoğunluğuna bağlıdır, birkaç hücre ile sinyaller düşük seviyede kalırken, hücre miktarı arttıkça iletişim için ideal ortam oluşur (79).

"Quorum: salt çoğunluk" ve "sense: hissetme, algılama" kelimelerinden oluşturulmuştur (12). İlk Quorum Sensing (çoğunluğu algılama) incelemeleri, 1960'lara dayanmaktadır ve serbest yaşayan iki deniz vibriosu olan *Vibrio fischeri* ve *Vibrio harveyi* üzerinde gerçekleştirilmiştir (60, 63).

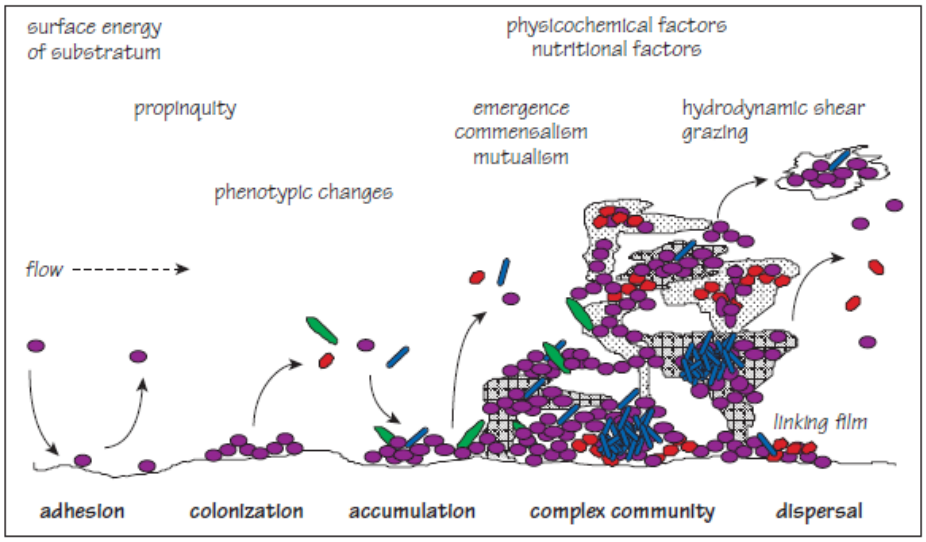
Bu iletişim yoluyla bir bakterinin fizyolojik özellikleri bile değiştirilebilir, ya da topluluğa yararlı türlerin gelişimi uyarılabilir. "Quorum sensing" sisteminin bakteriye getirdiği pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Besin için yarışan diğer bakterilere karşı savaşabilir. En önemlisi, infeksiyon sırasında virülans faktörlerinin düzenlenmesi sonucu konakta immün yanıttan kaçabilmektedir (126).

Sinyal iletimi, biyofilm içinde bilgi taşınması için tek yol değildir. Bakteriyel hücrelerin yoğunluğu yüksek olduğunda, aynı tür veya farklı türler arasında genetik bilgi değişimi söz konusu olabilmektedir (79).

4.1.3. Biyofilmin gelişim evreleri

Biyofilm oluşturan bakteriler, yaşadıkları ekosistem ne olursa olsun, aynı şekilde biyofilm oluşturmaktadırlar (28). Biyofilm gelişimi 5 evrede gerçekleşmektedir (Şekil 2)(Resim 1).

Resim 1: Biyofilmin gelişim evreleri SEM görüntüsü (28)



Şekil 2: Biyofilmin oluşum süreci (*Trends in Microbiology* (2001) 9: 9–10)

1. Tutunma

Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir (27, 44). Bu tutunma sonucu biyofilm fenotipinin ortaya çıkmasına neden olan bir dizi genetik işlem başlatılır. Bakterilerin bir yüzeye tutunabilmeleri için, kendilerinin bir yüzey ile ne zaman temas kurduklarını anlamaları gereklidir. Bakteriler bu çevresel stimulusları fenotipik değişiklere çevirebilmek amacı ile, bir verici ve bir alıcıdan oluşan düzenleyici bir sisteme sahiptir. Tutunma işleminden sonra biyofilm oluşturmak yönünde farklılaşma işleminin başlaması, 'Quorum Sensing' sisteminden gelen yanıtlara bağlıdır. Bu sistem ile bakteriler çevrelerindeki bakteriyel popülasyonun yoğunluğunu belirlerler. Bir yüzeye tutunan her bakteri, ortama 'Ben buradayım' mesajı veren bir molekül salgılar. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları artmaktadır. Bu sinyal molekülünün konsantrasyonundaki artışı ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur. Yani, biyofilm içerisindeki bakteriler intersellüler, düşük molekül ağırlıklarına sahip haberciler aracılığı ile haberleşmektedirler (27,44). Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye geri dönüşür özellikte tutunur (4,92). Bakterinin hareketi ya da bakteri yüzeyi ile tutunulan yüzey arasındaki elektrostatik ya da fiziksel etkileşimler bu evrede rol oynamaktadır (4).

2. Yapışma

Bakterilerin yüzeye yapışma ya da kuvvetli bir şekilde tutunma işlemidir. Yüzeye tutunan hücreler, bakteri hücre zarındaki proteinlerin uyarımı sonucunda ekstrasellüler polisakkarit yapıda materyal sentezlemeye başlar ve bu da hücrelerin birbirine ve yüzeye tutunmasını sağlar. Ekstrasellüler polisakkarit yapıdasındaki materyal, zamanla bakterinin olumsuz çevre koşullarından korunmasını sağlamaktadır (4,27,29,44,92).

3. Kolonizasyon

Yüzeye tutunan bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük organizasyon birimi olan mikrokolonileri oluşturmaktadırlar (27).

4. Olgunlaşma

Mikrokoloniler ürerler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara ya da kulelere dönüşürler. Konfokal lazer taramalı mikroskop ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks ekstrasellüler polisakkarit matriks ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuşlardır. Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (27,29,44,123).

5. Kopma ya da Ayrılma

Bu evrede tek bir bakteri ya da bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılır. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin ya da bir çok hücrenin emboli şeklinde kopmasının bir sonucu olarak olabilmektedir (27,44).

4.1.4. Biyofilm içindeki bakterilerin özellikleri

Biyofilm ve onu oluşturan bakteriler biyofilm oluşumu sonucu birtakım özellikler kazanmaktadırlar:

1. Çevresel faktörlere direnç

Biyofilmler bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel koşullardaki değişimlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korumaktadırlar. Biyofilm kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılık göstermektedir. Ortamın besin durumu dışında, sıcaklık, osmolarite, pH, demir ve oksijen gibi diğer çevresel faktörler de biyofilm oluşumu üzerinde rol oynamaktadır (27,29,44).

2. Besinlerin depolanması ve atıkların uzaklaştırılması

Biyofilm içerisindeki mikrokolonileri çevreleyen alanlarda yüksek geçirgenliğe sahip, dolaşım sistemine benzeyen su kanalları bulunmaktadır. Bu sistem hem besinlerin biyofilm içerisinde eşit bir şekilde dağıtılması, hem de potansiyel olarak toksik metabolitlerin uzaklaştırılması görevini üstlenmektedir (27,44,47).

3. Fagositozdan ve antibiyotiklerden korunma

Bakterilerin kümeler halinde ve ekstrasellüler polisakkarit matriks içerisinde bulunmaları sonucu fagosite edilmeleri güçleşmekte ve hümoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmaları engellenmiş olmaktadır. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekstrasellüler polisakkaritler savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. Ekstrasellüler polisakkaritler bulunduğu bakteriyi güç alanlarından (elektrik çekimi) uzaklaştırarak inflamatuar hücrelerin fagositozundan korumaktadırlar. Biyofilme sahip organizmalar, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençli olmaktadır (27,29,44,77,91,92,93).

4. Metabolik işbirliği, yeni genetik özelliklerin kazanılması

Bakterilerin ortama adaptasyonundaki birlik biyofilm oluşturmada sıklıkla görülmektedir. Bakteriler biyofilm oluşturdukları gibi ortamdan aldıkları uyaranlar (besin, pH, ısı vs.) sonucu hızla planktonik hale geçebilmektedirler. Bu durum ortama uygun olarak salgıladıkları genler aracılığı ile olmaktadır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri ortak yaşamlarının en önemli göstergesidir. Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum

özellikle çoklu ilaç-dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında önemlidir. Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam, konjügasyonun kolaylıkla yapılabilmesine imkan sağlamaktadır (27,29,44,80,123,142).

4.1.5. Mikroorganizmaların biyofilm oluşturma nedenleri

Bakterilerin biyofilm oluşturan formları ile planktonik formu arasında ciddi bir gelişme geriliği olmasına karsın bakterinin biyofilm oluşturmasını gerektiren durumlar vardır. Bunlar:

1. Savunma:

Biyofilmin kan akımı ve tükürüğün yıkama gücü gibi bir takım fiziksel güçlere karşı dayanıklılığı vardır. Biyofilme sahip organizmalar, besin yoksunluğu, Ph değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoza ve antibiyotiklere karşı planktonik hücrelerden daha dirençlidir. Bu nedenle biyofilm kronik seyirli infeksiyonlarda bu özelliği kazandıran önemli bir faktör olarak bilinmektedir. Biyofilmin büyük bir bölümünü oluşturan ekstarsellüler polisakkaritler (EPS) savunmada önemli rol oynayan moleküllerdir. EPS bulunduğu bakteriyi inflamatuar hücrelerin fagositozundan korumaktadır. Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır (29,77,92,98,125).

2. Adezyon ve kolonizasyon:

Yaşam için gerekli ortamda kalabilmenin en bilinen yolu biyofilm oluşturmaktır. İnsan ve hayvanlar mikroorganizmaların sürekli bir şekilde vücutlarında bulunmaları sayesinde bilinen karmaşık immun sistemlerini geliştirmektedirler. Vücudun en azından bir bölümü bakterinin yaşama ve üremesi için besinden zengin ve su içeriği, O_2 olanağı ve ısı gibi ortamda devamlı bulunan faktörlerle sabit bir yapı oluşturmaktadır. Tüm bunların sonucu vücudun immun sistemi ile bakteri arasında vücudu istila etmesine karşı bir yarış gerçekleşmektedir. Bazı durumlarda uzlaşma olarak belli bölgelerde büyük miktarlarda kommensal bakterilerin yaşamasına müsaade edilmektedir ve bu bakterilerin çoğu biyofilm oluşturmaktadırlar.

Vücut, bilindiği gibi bakterilerin yaşaması için çekici bir ortam olup, bakterinin bu bölgede biyofilm oluşturarak yaşaması için primer bir motivasyon oluşturmaktadır. Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesini sağlamak için bir takım stratejileri vardır. Bakteri yüzey proteinleri, konağın fibrinojen, fibronektin, vitronektin, elastin gibi ekstrasellüler matriks proteinlerine yapışmaktadır. Bu adezin ve matriks proteinleri konak ile bakterinin yapışmasında anahtar rol oynamaktadır. Yapışma sonrası bu bölgeye yerleşen bakteriler bir yandan belli bir populasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlamaktadır. Biyofilm bakterinin yapışmasını (tutunmasını) arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte bakteri yapışma ve hareket (motilite) faktörlerinin salgılanmasında da bir baskılama olmaktadır (29,77,92,98,125).

3. Yaşanabilir çevre geliştirme:

Özellikle ortamdaki glukozun bakteri tarafından kullanılabilir olmasının Pseudomonaslar, *Vibrio Cholerae*, *Escherichia Coli* ve *Staphylococcus'* ların EPS salgılanması ve biyofilm oluşturmalarını belirgin bir şekilde artırdığı gösterilmiştir. Karbon katabolitlerinin konakta yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indükleyerek biyofilm oluşumunda kritik rol oynaması, bakterinin konakda uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesindeki mekanizmalar için biyofilm gerekliliği hipotezini desteklemektedir .

4. Kommün (topluluk) oluşturmak:

Kazançların ortak paylaşımıdır. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri kommünal yaşamlarının en önemli göstergesidir (98,125).

4.2. Oral Biyofilm

Oral biyofilm, diş minesi, kök yüzeyi, dental materyaller ve dental implantlar gibi solid yüzeyler üzerine yapışan ve bir ekstrasellüler polisakkarit matriks (EPS) içerisine gömülü halde bulunan üç boyutlu bakteriyel bir topluluktur (160). Oral kavitede diş yüzeyinde oluşan oral biyofilm tabakası 'dental plak' olarak da bilinmektedir (124).

Kompleks ve dinamik mikrobiyal bir ekosistem olarak tanımlanan oral biyofilm, diş çürüklerinin ve periodontal hastalıkların gelişiminde önemli rol oynamaktadır. En çok çalışılan biyofilm sistemlerinden biri olduğu bilinmektedir. Son 40 yıldır oral biyofilmlerle ilgili önemli çalışmalar yapılmıştır. Geniş çaplı olan bu araştırmalarla; oral biyofilmin yapısı, bakteriyel içeriği, bakteriyel tutunma mekanizmaları, immun yanıtlar gibi konular incelenmiştir. Oral biyofilm biyolojisi ile ilgili yapılan çalışmalar, doğa, tıp ya da endüstri gibi herhangi bir alanda yapılan çalışmalarla paralellik göstermektedir (13).

Oral biyofilm yüzlerce bakteri içermesi nedeniyle kısmen karışık bir yapıya sahiptir (29,97). Oral biyofilmin ayırt edici özelliklerinden bir tanesi, bir çok mikroorganizmanın ekstrasellüler polisakkaritleri hem sentez edip hem de yıkabilmesidir. Ekstrasellüler polisakkaritlerin kimyasal içeriği ve yapısı, etkili bir adezyon yapılmasını etkilemekte, mikrobiyal hücrelerin zararlı ajanlardan korunmasına ve spesifik mikroorganizmalar için gereken bazı önemli besinlerin bağlanmasına da yardımcı olmaktadır (79,134).

Marsh and Bradshaw (1995), oral biyofilm oluşum sürecini; bakterilerin yapışması, gelişimi, uzaklaşması ve tekrar yapışması olaylarının aynı anda yaşandığı dinamik bir süreç olarak tanımlamışlardır (77).

Bakterilerin yeni yaşam alanlarını kolonize edebilmesi için biyofilmden hücrelerin kopması gerekmektedir. Ancak bu kopma, henüz en az anlaşılabilmiş olan biyofilm fenomenidir. Kopma, erozyon olarak adlandırılan teker teker hücre ayrılması şeklinde olabilir, daha büyük hücre grupları şeklinde ya da biyofilmin büyük parçalar halinde birbirinden ayrılması şeklinde meydana gelebilir. Oral biyofilmden kopma olayının sürekli devam eden bir süreç olduğu düşünülmektedir. Tükürükteki ortalama bakteri sayısının ml de 10^8 olduğu ve günde yaklaşık 1500 ml tükürük salgılandığı düşünülürse, her gün en azından 1.5 x 10^{11} bakteri yutulmaktadır. Bu kadar bakterinin kaynağının diş ve yumuşak dokulardaki biyofilm olduğu düşünülmektedir (134).

Oral biyofilm oluşumu belli bir sıra içermektedir (81):

- ❖ pelikıl oluşumu
- ❖ bakterilerin yapışması (0-4 saat)

❖ yapışan bakterilerin gelişimi ve farklı mikrokolonilerin oluşumuna öncülük etmesi (4-24 saat)

❖ mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişimine öncülük etmesi (1-14 gün)

❖ olgun biyofilm oluşumu (2 hafta ve sonrası)

4.2.1. Pelikıl oluşumu:

Mikroorganizmalar mineralize diş yüzeyi üzerine direkt olarak kolonize olmazlar. Dişler sürer sürmez ya da temizlendikten hemen sonra çıplak diş yüzeyi **pelikıl** adı verilen aselüler proteinöz yapıda bir film tabakasıyla kaplanır. Bakteri kolonizasyonu gerçekleşmemiş alanlarda ilk 24 saat içerisinde pelikılın kalınlığı 0,01-1 μm'ye ulaşır (81). Bu film tabakaya 'kazanılmış pelikıl' adı da verilmektedir (96). Pelikılın içeriğini çoğunlukla; tükürük glikoproteinleri, fosfoproteinler, lipidler oluşturur. Bunların yanı sıra pelikılın yapısında, dişeti oluk sıvısından gelen komponentler, ölü bakterilerin hücre duvarı artıkları ve diğer mikrobiyal ürünlere de rastlanmıştır. Pelikıl, çoğunlukla prolinden zengin protein içeren tükürük bileşenlerinden oluşan organik bir mine örtüsüdür ve mineyi asit ataklarına karşı korumaktadır. Pelikıl oluşumunun ilk aşamaları netlik kazanmamasına rağmen iki mekanizma öne sürülmektedir. Birincisi çözünmüş tükürük bileşenlerinin yüzeye yapışması, ikincisi ise supramoleküler pelikıl habercilerinin mine yüzeyine yapışması ve kümelenmesidir (39).

Diş yüzeyinden bakteriler ve bütün organik materyalin profesyonel olarak kaldırılmasından hemen sonra yeni organik materyal birikmeye başlar. İki saat içinde, hücresiz, yapısız organik film tabakası pelikıl, diş yüzeyini tamamen örtebilir. Pelikıl öncelikle tükürüğün çeşitli komponentlerinin seçici çökelmesiyle şekillenir. Pelikılın fonksiyonları:

- mineyi asitlere karşı korumak,
- dişler arasındaki sürtünmeyi azaltmak,
- remineralizasyon için matriks sağlamak,
- diş yüzeyine spesifik mikroorganizmanın tutunmasını sağlamak ve

- diş yüzeyine kolonize olan mikroorganizmalar için besin kaynağı olmasıdır.

Pelikılın yapısındaki proteinler, birçok temel gruba sahiptir ve sonuç olarak fosfat iyonlarını adsorbe eder; buna karşın diğer asidik proteinler, kalsiyum iyonlarını adsorbe eder. Pelikıldan izole edilen tükürük proteinleri arasında lizozim, albumin ve immunoglobin A (IgA) ve immunoglobulin G (IgG) bulunur. Bu proteinlerin bazıları biyolojik olarak aktiftir ve diş yüzeyine kolonize olmaya girişen mikroorganizmalar üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (67,119).

4.2.2. Bakterilerin yapışması:

Oral kavitede 700 den fazla farklı bakteri filotipi bulunmaktadır (32). Her mikroorganizma oral biyofilm oluşturmayabilir. Bazı mikroorganizmalar ise belirli özel şartlar altında oral biyofilm oluşturabilmektedir. Oral biyofilm formasyonu, substrat, pelikıl ve bakteriler arasındaki karmaşık fiziksel ve hücresel etkileşimler sonucu oluşur. Bu etkileşimler pek çok seviyede olur ve;

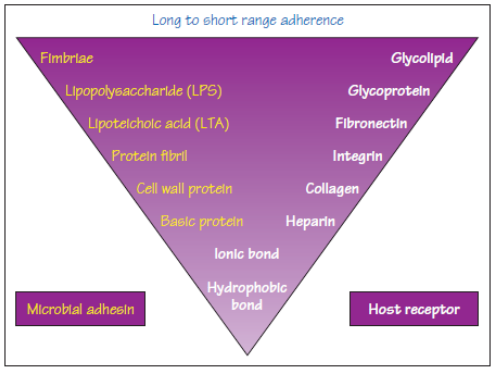
- fiziksel yakınlık,
- metabolik alışveriş,
- işaret molekülü aracılı iletişim,
- genetik materyal alışverişi,
- inhibitör faktörlerin üretimi
- koagregasyon (genetik olarak farklı hücre tipleri arasındaki özel hücre-hücre tanımaları: adezin-reseptör ilişkisi) şeklinde meydana gelebilir (124).

Biyofilm oluşumu içi bakteri tutunması gereklidir, devamındaki adezyon ise tutunan bakterilerin bölünmesi, büyümesi ve akümülasyonu ile sağlanır. Bakteri kolonizasyonunun temeli **adezin-reseptör** mekanizmasına dayanır (72). Bakterilerin yüzeye tutunmalarını sağlayan faktörlere adezin adı verilir. Adezinler hücre yüzeyine bağlı protein ve karbohidratlar olabildikleri gibi, hücre yüzeyinde bulunan yapısal komponentler de olabilir. Adezinler her mikroorganizma için değişkenlik gösterebilir (Şekil 3)(Tablo 1). Bu adezinler pelikılda bulunan reseptörlerin de yardımıyla bakterilerin pelikıla tutunmasını sağlarlar (96). Pelikıl farklı bakteri türlerinin

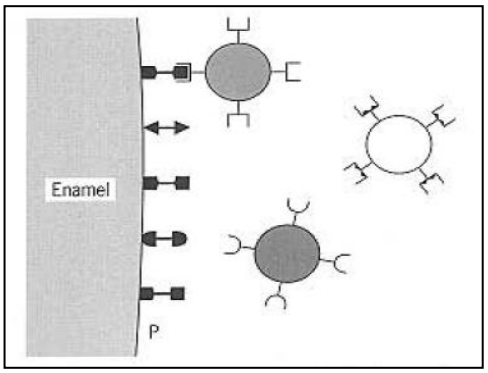
yapışması için gereken spesifik reseptörler içermektedir (Şekil 4). Oral bakteriler sıklıkla Tip I (bazen Tip II) fimbriyalarıyla diş yüzeyine ve/veya adezinleriyle yüzeydeki pelikıla bu reseptörler aracılığıyla tutunurlar (51,78,136). Bu evrede kazanılmış pelikıl, primer kolonizan bakteriler için bir substrat görevi görmektedir (27,29,145). Farklı adezinlerin farklı reseptörlere bağlanması oral biyofilm oluşumundaki bakterilerin tutunma sırasını da etkiler (72).

Tablo1: Mikroorganizma-reseptör-adezin İlişkisi (72)

Konak reseptörü	Adezin	Mikroorganizma
Glikolipid	Fimbriyal (tip 1)	Escherichia coli
Glikoprotein	Lipopolisakkarit(LPS)	Pseud.aeruginosa
B1 İntegrin	Hemaglutinin (Fha)	Bordetella pertussis
Fibronektin	Lipotelkoik asit(LTA)	Strep. Pyogenes
CEACAM(CD66)	Opa	N. meningitidis
Fibronektin	PrtF (Sfb)	S. pyogenes
Fibrinojen	ClfA	Staph. Aureus
Heparin	Temel protein (HipA)	Streptococcus spp.
Bağlı Ca +2	Elektrostatik (-ve)	Strep. Sanguinis
Hidrofobik	Hidrofobik	Candida albicans



Şekil 3: Adezin-reseptör ilişkisi (72)



Şekil 4: Adezin reseptörlere bağlanması (72)

Mine veya kök yüzeyi fark etmeksizin, oral mikrofloranın çoğunlukla ilk kolonize olan mikroorganizmalarını *S. Sanguis, S. Oralis* ve *S. Mitis* oluşturur (81). Bu üç *Streptococcus* türü başlangıç mikroflorasının % 56'sının , *Streptococcus*'ların da % 95'ini oluşturmaktadır. Oral biyofilm oluşumu yanak ve mukoza yüzeyinde oluyorsa ilk önce *Leptothrischia buccalis* ve *Streptococcus salivarius* tutunur. Daha sonra sayı ve çeşitlikleri artar. **Birincil (erken) kolonizasyon** olarak adlandırılan bu evrede bakteriler yapıştıkları yüzeyde mikrokoloniler oluşturmaya başlarlar. Her bir mikrokoloni genellikle saf bakteri kümeleridir. Bu safhadaki biyofilmler aralıklı olarak yerleşen bakteri kolonileri gibidir (79). *Streptococcus*'ların kolonizasyonunu *Actinomyces* türlerinin ve *Haemophilus* ve *Neisseria* türleri gibi gram negatif bakterilerin kolonizasyonu takip eder. Bu seçici biçimlenme, pelikıldaki reseptörlerle bakterilerin yüzeyinde bulunan adezinlerin birbirini tanıma sisteminden kaynaklanmaktadır (81). Örneğin *S. Sanguis* ve *S. Oralis* spesifik olarak tükürük glikoproteinlerinden açığa çıkan terminal sialik asit artıklarına bağlanır. Ayrıca *S.Oralis* galaktoz bağlayabilen adezinlere de sahiptir. *Actinomyces Naeslandii* pelikıla yapışmak için ortamdaki sakkaritlerin varlığına bağımlı değildir, statherin ve proline-rich proteinlere adezyon gösterir. Ancak protein reseptörlerinin bulunmadığı durumlarda; bakterilerin enzimatik aktivitesi sonucunda glikoproteinlerde elde edilen galaktozal artıklara da bağlanabilirler. Buradan çıkan sonuç şudur ki; mikrobiyal enzimatik aktivite sonucunda pelikıl içeriği modifiye edilerek bazı reseptörler yok edilirken diğer mikroorganizma türleri için yeni reseptörler oluşturulabilir. Böylece kolonizasyonun regülasyonu sağlanmış olur (81).

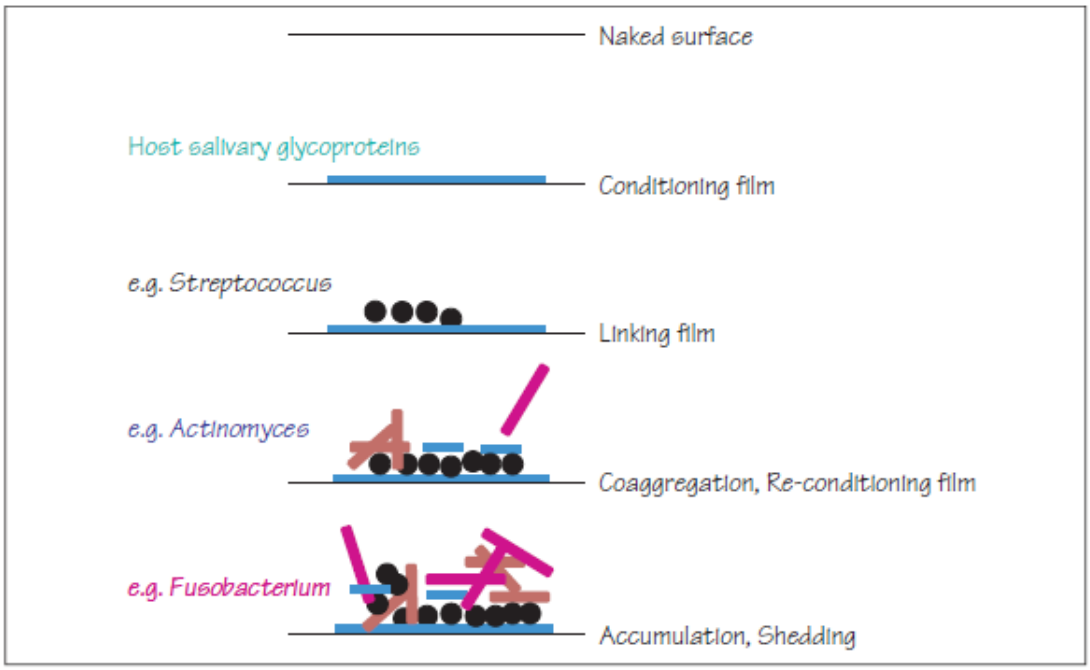
Uzun yıllar boyunca *S. Mutans*'ların, sakkaroz olarak da bilinen sükrozdan elde edilen yapışkan ekstrasellüler polisakkaritleri ayrıştırabilmeleri nedeniyle başlangıç mikroflorasında çok önemli bir yer teşkil ettiğine inanılmıştır. Ancak çalışmalar *S. Mutans*'ların, ortamdaki sükroz miktarı fark etmeksizin başlangıç *Streptococcal* mikrofloranın sadece % 2 veya daha azını oluşturduklarını ortaya koymuştur. Buradan çıkan sonuca göre, sükrozdan elde edilen glukan üretiminin diş yüzeyi üzerindeki *S. Mutans*'ların kolonizasyonunu arttırmadığı ve *S. Mutans*'ların, *S. Sanguis*lere oranla diş yüzeyine tutunmada daha az etkili olduğu söylenmektedir (81). Ancak yine de *S. Mutans* diş çürüklerinin etyolojisinde ana patojen olarak rol oynadığı yapılan çalışmalarla kanıtlanmıştır. Oral biyofilm içerisindeki bakteriyel

adezyonun sağlanması için gerekli glukanların ekstrasellüler sentezlenmesi, *S. Mutans*'lar tarafından üretilen glikoziltransferaz enzimi sayesinde olmaktadır (82,130).

Mikrobiyata olgunlaştıkça gözlenen en belirgin değişiklik *Streptococcus* ağırlıklı biyofilm tabakasının *Actinomyces* ağırlıklı bir yapıya dönüşmesidir.

4.2.3. Yapışan bakterilerin gelişimi ve farklı mikrokolonilerin oluşumuna öncülük etmesi:

Oral biyofilm içindeki bakteriler bakteriyel adezin ve reseptörler sayesinde moleküler ilişki kurarak spesifik, güçlü bir bağlantı oluştururlar. Erken kolonize olan bakteriler gelişirler ve ortam koşullarını diğer bakteriler için uygun hale getirirler (39). *Streptococcus* ve *Actinomyces* türlerinin diş yüzeyine kolonizasyonunu takiben bu bakteriler çevresel koşulları değiştirerek *Fusobacterium* ve türlerinin yapışmasını sağlarlar (Şekil 5)(19,104,116).



Şekil 5: Pelikıl üzerine bakteri kolonizasyonu (72)

Streptococcal floranın erken kolonizasyonu diğer mikroorganizmaların prolifere olması için oldukça gereklidir. Bu olaya mikrobiyal sıralanma adı verilir. Mikrobiyal sıralanmanın prensibi; öncü bakterilerin, hem ikincil istilacı bakteriler için daha uygun olan hem de ortamdaki besin yetersizliği ve metabolik artıkların birikimi sonucu kendileri için giderek uygunluğu azalan yeni bir ortam yaratmaları şeklinde özetlenebilir. Böylece eski mikrobiyal topluluk, modifiye habitat daha uygun olan yeni türlerle büyük oranda yer değiştirir (81).

İkincil (geç) kolonizasyon olarak adlandırılan bu evrede de adezin-reseptör mekanizmasına benzer bir bağlanma şekli görülmektedir. Hücreler arası iletişimi sağlayan ve **koagregasyon** adı verilen bu bağlanma şekli; genetik olarak farklı olan bakterilerin birbirini tanıması ve yapışması olarak tanımlanmıştır (29,35,51,78).

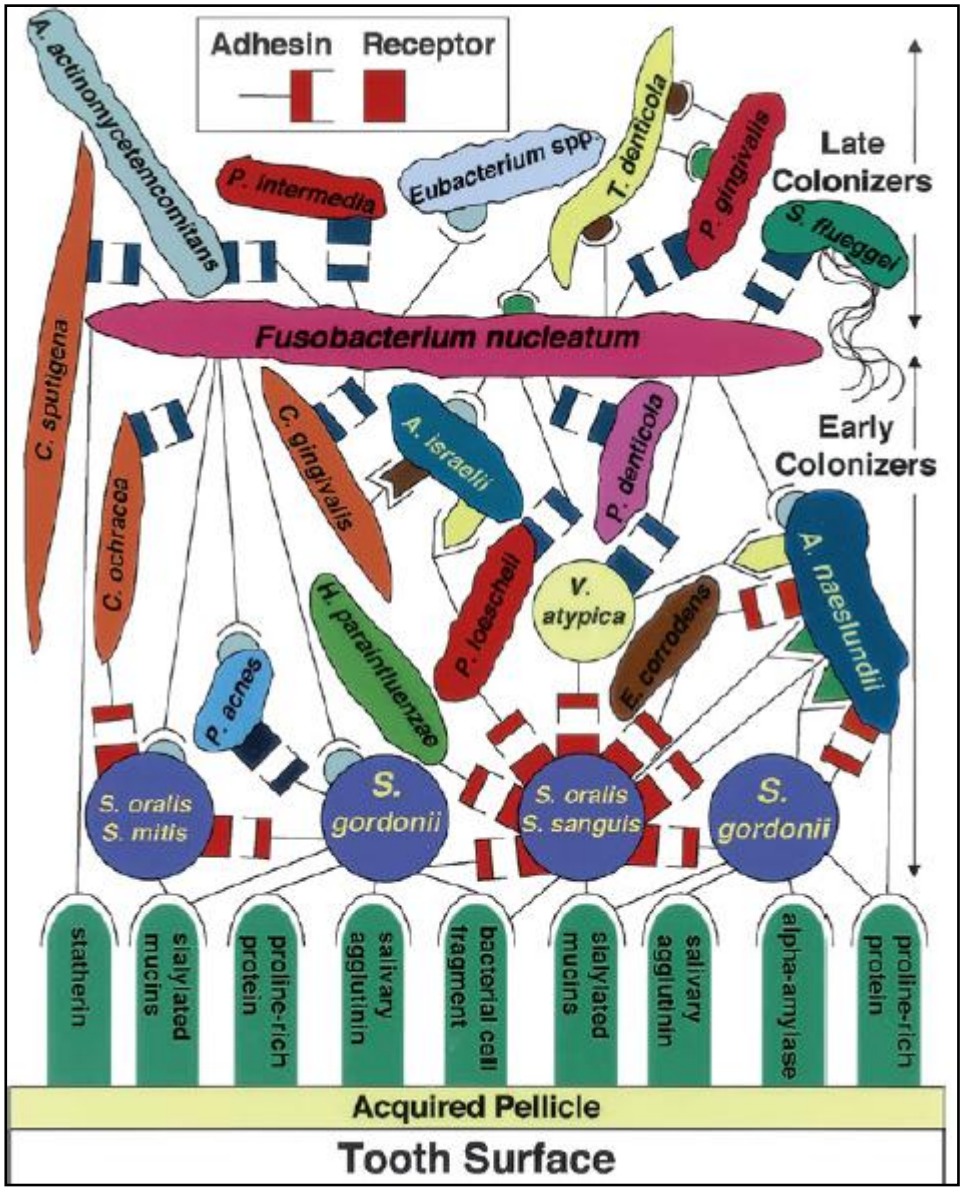
Bakteriyal birikim kalınlaştıkça oksijen konsantrasyonunun azalması mikrobiyal sıralanmada en önemli faktörlerden biri haline gelmektedir. Bu yüzden erken kolonizasyon evresinde aerobik ve fakültatif anaerobik türler baskınken, geç kolonizasyon evresinde anaerobik türler baskın hale gelir (81)

Streptococcus'lar anaerop bakterilerin üremesini önleyen hidrojen peroksit üretirler. *Actinomyces naeslundii* ise ürettiği katalaz ile hidroken peroksiti inaktive ederek anaerobik *fusobacterium*'ların üremesine yardımcı olmaktadır. *Fusobacterium*'lar bu sebeple tek başlarına biyofilm oluşturamamaktadırlar. Biyofilm oluşumu için *Actinomyces* türlerine ihtiyaç duymaktadırlar (104).

Oral biyofilm oluşumu sırasında en önemli olaylardan biri de; ikincil kolonize olan bakterilerin adezyonunu sağlayan ekstrasellüler polisakkarit (EPS) maddenin üretiminin artmasıdır (116). *S. Mutans*'lar diyetle birlikte alınan karbohidratlar sayesinde EPS sentezine devam eder ve şekerleri metabolize ederek organik asitleri açığa çıkarır. EPS' nin miktarının artması oral biyofilmin yapısal stabilitesini de artırır (103).

Oral biyofilm içindeki bakterilerin ortak davranış şekli oldukça spesifiktir. Birincil kolonize olan bakteriler kendi aralarında koagregasyon gösterirlerken, genelde ikincil kolonize olan bakteriler ile göstermemektedirler. Aynı zamanda ikincil kolonize olan bakteriler *Fusobacterium Nucleatum* ile koagregasyon sağlarken genelde birbirleri ile birleşme gerçekleştirmemektedirler. *F. nucleatum*'un

yokluğunda ikincil kolonize olan bakteriler oral biyofilmin bir parçası olamamaktadırlar (116). *F.nucleatum* bu sebeple birincil ve ikincil bakteri kolonileri arasında köprü görevi görmekte ve oral biyofilm oluşumunda temel organizma olarak kabul edilmektedir (Şekil 6) (19, 116, 145).



Şekil 6: Oral biyofilmin birincil ve ikincil kolonizasyon oluşum modeli (124)

4.2.4. Mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişimine öncülük etmesi ve olgun biyofilm oluşumu:

Oral biyofilmin gelişmesi ve olgunlaşması koagregasyon ile sağlanan hücreler arası iletişime dayanır. Adezin tabaka kalınlaşarak bakteri kümelerini içerisine alır ve bir örtü gibi kuşatır. Bu safha bakteri hücrelerinin bölünmesinin en fazla olduğu dönemdir (34). Hücreler bölünerek diş yüzeyine dikey uzanan koloniler meydana getirirler. Ayrıca tükürükten adsorbe edilen serbest mikroorganizmalar da bakteriyel atıkların çoğalmasına katkıda bulunarak oral biyofilm tabakasının genişlemesini sağlarlar. Yüzey tabakada bulunan mikroorganizmalar diğer türlerle koagrege olur. Filamantöz bakterilerin üzerinde biriken küresel mikroorganizmalar mısır koçanı 'corn-cob' şeklinde bir görüntü oluştururlar (81).

Kolonizasyon süreci devam ettikçe bakteriler bir yandan saldıkları ekzoenzim ve mediyatörler ile birbirlerinin bölünmesini indükler diğer yandan yeni adezinler sentez ederek çevrelerini gruplar halinde bir intermikrobiyal matriks ile örterler. Her bir bakteri kümesinin ortasında ve en içeride kalan bakteri hücreleri beslenmelerini temin edebilmek için adezin örtünün üzerinde oluklar oluştururlar. Bu oluklar bakteri adacıkları arasında su ve besin maddesi sirkülasyonu için gereklidir. Yeni oluşan mimari aralarından su kanalları geçen bakteri adacıkları şeklindedir (34). Kanallar biyofilm yapısının canlı bir parçası olup oluşumuna önemli katkıda bulunmaktadır. Oral biyofilm üzerine dışarıdan yeni bakteriler eklenir ve ölen bakteriler diğerleri tarafından besin maddesi olarak kullanılır. Biyofilm tabakası giderek kalınlaşır. Aslında böyle bir yapı, spontan organize olmuş, simbiyotik bir bakteri dokusudur (29). Zirveye ulaşmış olan biyofilm topluluğu, eğer zarara uğramazsa 2-3 hafta içerisinde gelişmekte ve 50-100 μm kalınlığa ulaşmaktadır (35).

İki hafta veya daha olgun biyofilmlerde gözlenen en belirgin değişiklik diş yüzeyine yakın bölgede gram (+) pleomorfik bakterilerde yoğun bir iç tabaka oluşumudur. Bu bakteriler *Actinomyces* türlerine benzer ultrastrüktürel özellikler gösterir. Oral biyofilmin dış tabakası ise genellikle içerik açısından değişkenlik gösterir ve bu tabakanın yapısal bütünlüğünde bozulmalar gözlenmektedir (81).

4.2.5. Oral biyofilmin oluşumuna etki eden faktörler:

- *Yüzey pürüzlülügü ve yüzey enerjisi*

Yapılan incelemelerde, oral biyofilmin oluşumu sırasında bakterilerinin ilk olarak mine üzerinde pit ve fissürler gibi retantif alanlara tutunduğu gözlemlenmiş ve böylece yüzey yapısının önemli olduğu düşünülmüştür. Biyofilm oluşumunda dişin yüzey enerjisinin de önemli oldugu bildirilmektedir. Buna bağlı olarak pürüzlü yüzeylerin yüzey enerjisinin fazla olması nedeniyle biyofilm oluşumuna daha yatkın oldugu belirtilmektedir. Aynı zamanda hidrofobik maddelerin biyofilm oluşumunu hızlandırdığı, ağız içindeki bakterilerin bir çoğunun hidrofobik yüzey özelliklerine sahip olmasının da biyofilm oluşumunu artırdığı bildirilmektedir (9,17,129).

- *Ortamdaki beslenme faktörlerinin etkisi*

Diyetteki sükroz ya da diğer ismiyle sakkaroz, ağız içerisinde biyofilm oluşumu için gerekli besin kaynağını sağlamaktadır. Sınırlı oranda bulunduğu zaman enerji kaynağı olmakta, senteziyle *Veillonella* için gereken laktik asit üretilmekte, fazla miktarda bulunduğunda ortam pH'sını düşürmekte ve *Streptococcal* glikoziltransferaz (GTF) için substrat oluşturarak çözünebilen ve çözünemeyen glukanların oluşumunu sağlamaktadır (13). Diyetteki diğer mono-di-polisakkaritlerin de oral biyofilmin gelişimi için besin kaynağı olduğu bilinmektedir (81).

Oral biyofilm matriksini daha pürüzlü bir yapıya çevirmesi nedeniyle en çok çürüğe neden olan karbonhidratın sükroz olduğu bildirilmektedir. Buna ilave olarak, *in situ* ortamda yüksek konsantrasyonda sükroz varlığında oluşturulan oral biyofilmin kalsiyum, fosfor ve fluorid gibi inorganik iyon konsantrasyonlarının az olduğu saptanmıştır. Sükrozun aynı zamanda fermente edilebilen bir karbonhidrat olması, oral biyofilm pH'sını değiştirmekte ve *S. Mutans*'ların (SM) sayılarının yükselmesine neden olmaktadır (100).

- *Materyallerin antibakteriyel özellikleri*

Amalgam, altın ve bileşikleri gibi materyallerin salgıladıkları iyonların; cam iyonomer simanların da salgıladıkları fluoridin yapışan bakterinin üremesini ve canlılığını engellediği belirtilmektedir. Materyallere ayrıca antibakteriyel ajanlar katılmaya çalışılmaktadır (9).

- *Tükürük*

Oral biyofilm oluşumunda tükürüğün önemli fonksiyonları bulunmaktadır (3,123). Tükürük içindeki proteinler tüm oral yüzeylerde film şeklinde oluşabilmektedir. Bu kazanılmış pelikıl, mikrobiyal tutunma için pozitif bir seçme (pozitif seleksiyon) oluşturmaktadır. Tükürük planktonik faz sırasında farklı türler arasındaki koagregasyonu sağlamaktadır (123).

Tükürükle kaplı yüzeyin ne oranda değiştiği ve bu değişimin yüzeye biriken mikroorganizmaları ne oranda etkilediği önemlidir. Tükürük proteinlerinin bakterinin cinsine göre yapışmayı kolaylaştırabileceği ya da engelleyebileceği bildirilmektedir (137). Ayrıca tükürük; bakteri yoğunluğunun kritik noktaya gelindiğinin anlaşılmasını sağlayan kimyasal haberciler taşımaktadır. Kritik noktaya gelindiği anlaşıldıktan sonra üreme başlamakta ve biyofilm kalınlaşarak antimikrobiyal ajanlara karşı dirençli bir hal almaktadır (123).

4.3. Oral Biyofilm İncelemede Kullanılan Yöntemler:

Oral biyofilmlerin *in vivo* incelenmesi oldukça güçtür. Oldukça ince ve erişilemez bir yapıya sahiptirler ve inceleme yapılabilmesi için gerekli olan kimyasal ve radyoaktif işaretleyicilerin oral kavitede kullanımı uygun değildir. Bu kırılgan ve hassas tabakanın diş yüzeyinden uzaklaştırılması sırasında da biyofilm içerisinde meydana gelen bozulmalar, orijinal tabakanın yapısal özellikleri hakkında doğru bilgiye ulaşımı engeller. Bu nedenle bu konudaki hemen hemen tüm çalışmalar *in vitro*dur. Yapılan çalışmalar doğrultusunda biyofilmin *in situ* oluşturularak modern tekniklerle incelenmesinin daha etkili sonuçlar ortaya koyduğu gözlenmiştir (9).

Biyofilmle ilgili çalışmalarda; ışık (stereo) mikroskobu, taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır (9).

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), diş dokuları ile restoratif sistemler arasındaki dinamik ve kimyasal etkileşimi değerlendirmede kullanılan yüzey analiz tekniklerinden birisidir (40). Yüksek çözünürlük görüntüleme tekniği sayesinde hücrelerinin, dokuların, intrasellüler yüzeylerin, virüslerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin incelenmesini sağlar (36,48). SEM' de görüntü oluşturma örnek üzerine

gönderilen elektron demetinin örnekten yansıması ve yansıyan sinyallerin algılanması esasına dayanır. SEM tekniklerinin kullanılması görüntülerde mükemmel alan derinliği sağlar ve morfolojiyi tanımlamaya oldukça elverişlidir (156).

SEM ve stereo mikroskop arasındaki en büyük fark; stereo mikroskop görüntüyü büyütmek için ışığı kullanırken, SEM' in elektron ışınını kullanmasıdır. Her ikisinde de çözünme gücü dalga boyuna bağlıdır. SEM örnekleri vakum içinde gözlenirken, stereo mikroskobun sıvı ve katı örnekleri atmosfer ortamında rahatlıkla gözlenir. SEM'de, elektron lensleri tarafından odaklanan elektron ışını örneğin üzerini tarar, sinyaller görüntü olarak algılanır ve görüntü elde edilir (40).

Transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ise biyofilm içerindeki ekstrasellüler matriks yapısı ve bunun hücrelerle olan ilişkisinin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. Örnekler fiksasyon işlemine tabi tutulduktan sonra epoksi rezinler içerisine gömülür ve ultramikrotomlarla kesilerek mikroskopta incelenecek boyutlara getirilir (61). Ancak dehidratasyon ve gömme işlemleri sırasında bakteriyel glikokaliksi oluşturan hidrate polisakkaritler ve diğer intersellüler komponentlerde büzülmeler meydana gelebilir (110).

1980'lerde yeni bir görüntüleme tekniği olan konfokal lazer taramalı mikroskopi yönteminin (CLSM) geliştirilmesiyle birlikte bakterilerin 'üç boyutlu ve canlı' incelenme imkanları sağlanmıştır (23,145).

CLSM yöntemi genellikle floresan mikroskoplarıyla birlikte kullanılmaktadır. Floresan boyalarla işaretleme yapılarak (fluorescence *in situ* hybridization; FISH) spesifik genlerin varlığı gözlenebilmektedir (145). Spesifik hücre fonksiyonları için spesifik dalga boyunda floresan boyalar dizayn edilmiştir, böylelikle bazı hücre fonksiyonlarının da değerlendirilmesi mümkün olmuştur. Daha sonra ise hücre canlılığını gösteren boyalar geliştirilmiştir. Bu sayede araştırmacılar hangi hücrenin canlı olup olmadığını belirleme imkanına kavuşmuşlardır. Floresan antiserumlar ve FISH yöntemi sayesinde de çok türden oluşan biyofilm oluşumları içerisinde spesifik mikroorganizmaların tanınması sağlanmıştır (157).

Başlangıç biyofilm oluşumunun, *Streptococcus* ve *Actinomycesler* arasındaki koagregasyon sonucu meydana geldiği *in vivo* olarak ilk defa FISH yöntemi kullanılarak gözlenmiştir (160).

Ayrıca bu yöntemlerin dışında Vital Floresens Tekniği (VF) sayesinde de diş minesi ve dental restoratif materyaller üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki vital ve devital biyofilm mikroorganizmaları arasındaki ilişki tespit edilebilmektedir (9).

Listgarten ve ark. 1975 yılında epoksi rezin kuronlar ve çekilmiş dişler üzerinde oluşan biyofilmin yapısını ışık ve elektron mikroskobuyla tanımlamışlardır. Uzun aksları mine yüzeyine dik gelecek şekilde uzanan supragingival mikrokoloniler gözlemlemişlerdir. Başlangıçta gram (+) kokların baskın olarak görüldüğü mikrokolonilerin 3 hafta sonunda filamentöz bir yapı halini aldıklarını ve etrafını çevreleyen koklarla birlikte mısır koçanı (corn cob) gibi bir görüntü sergilediklerini bildirmişlerdir. 2 ayın sonunda biyofilmi saran spiroketlerin olduğunu ve bu görüntünün deney tüpü (test-tube) fırçaları şeklinde izlendiğini fark etmişlerdir ve sonuç olarak elektron mikroskop çalışmalarındaki en büyük engelin biyofilm içindeki türlerin belirlenmesi sırasında ortaya çıktığını bildirmişlerdir (160).

Ten cate ve ark. 2001 yılında yaptıkları bir çalışmada, CLSM ile vital boyama tekniğini kombine kullanarak biyofilmin, oluştuğu substrat üzerinde gözlenebileceğini ve antimikrobiyal ajanların biyofilm üzerindeki etkilerinin kantitatif değerlendirebileceğini bildirmişlerdir (158).

4.4. Fluorid ve Mikroorganizma İlişkisi

4.4.1. Fluoridin oral biyofilm üzerine etkileri

Fluorid, bilinen en etkili antikaryojenik ajandır (69). Fluoridin çürük önleyici etkisi demineralizasyonu azaltarak, remineralizasyonu artırma mekanizmasıyla özetlenebilir. Fluoridin oral biyofilm üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemekle birlikte bu konuda çalışmalar yapılmaktadır.

Fluoridin oral biyofilm fizyolojisi üzerindeki etkisinden; biyofilm yüzeyine yakın alanlara lokalize olmuş anaerobik ve asidik mikro çevreleri hedef alarak, karyojenik biyofilmlerde rol oynayan, asit ortamı seven bakterilerin artmasını engellemek olarak bahsedilebilir (8).

Stoodley ve ark. yaptıkları bir çalışmada damlamalı reaktöre ve sonrasında akışkan hücre sistemine yerleştirilen, hidroksiapatit ile kaplanmış slaytlarda (diş

yüzeyindeki mineyi taklit amaçlı) *S. mutants* biyofilm gelişimine, çözünmüş oksijen düzeyinde 1000 ppm fluorid eklenmesinin etkisini ölçmek amaçlı oksijen elektrodları kullanmışlardır. Fluorid, çözünmüş oksijen seviyesini biyofilmdeki hava saturasyonunu % 35' ine çıkartarak patolojik anaeroblar için daha az elverişli olan bir ortam oluşmasını sağlamıştır (138).

Topikal olarak uygulanan fluoridin çürükleri azaltmadaki etkinliği; fluoridin plak biyofilmine ve altındaki mineye nasıl geçtiğini anlamanın gerekliliğini daha da ortaya çıkarmaktadır. Plağın fluoridli içme suyuna ya da diş macununa çok kez maruz kalması, fluoridin biyofilmdeki yapışkan polisakkaritlere bağlanmasını sağlar (122). Fluorid kaynağı ortadan kalksa dahi biyofilme bağlı fluorid zaman içinde yavaşça uzaklaşır ki bu da antikaryojenik aktivite süresini uzatabilir. Oral biyofilm güçlü bir fluorid (ve kalsiyum, fosfat gibi diğer iyonlar) rezervuarı görevi görerek, fluoridin tutunabilirliğini arttırır ve bu iyonlar ve diş minesi arasındaki alışverişlerle çürüklerle savaşmak için gerekli remineralizasyon zamanını arttırır (138). Fakat hala fluoridin gerçekte sıvı akışı olmaksızın biyofilmin hareketsiz kısımlarına pasif difüzyonla geçişi dışında, biyofilmin kompleks tabakalarına geçişinin aktif olarak nasıl bir mekanizma ile kontrol edildiği net olarak bilinmemektedir. Fluorid gibi iyonların ya da küçük moleküllerin difüzyon ile taşınması dakikalara göre oldukça hızlı gerçekleşir, fakat biyofilmin tabanındaki belli bir konsantrasyona erişmek için gerekli süre biriken biyofilmin kalınlığı arttıkça artar. Oral biyofilm hücrelerinin kümeleşmesi, hücre kümeleri boyunca sıvı akışını ve dolaylı olarak da fluorid mobilitesini engeller ve böylece diş minesi yüzeyi fluorid aktivitesinin ana hedefi olur (8).

Genel olarak fluoridin mikrobik hücrelere etkisi temelde iki şekilde olduğu iddia edilmektedir:

1- Sağlam hücrelerdeki çeşitli enzimlerin direkt olarak ya da submilimolar düzeyde metal kompleksleri şeklinde direkt inhibisyonu ile

2- Transmembran proton taşıyıcısı olarak HF formunda etki ederek hücre membranlarının proton geçirgenliğine etki ederek (69).

Ayrıca fluoridin, biyofilm formasyonuna engel olacak başka mekanizmaları da olabilir. *S. Mutans'* ların fluoridli ortamda üremesinin, üretilen EPS

kompozisyonunun değişikliğine yol açtığı belirtilmiştir (16). Geçmişteki çalışmalar göstermiştir ki, düşük konsantrasyonlardaki fluoridin (0.2mM' ye kadar), süspansiyon kültüründe gelişen *S. mutanslar* tarafından üretilen ve salgılanan glikoziltransferaz (GTF) enzimini lokal olarak azalttığı belirtilmiştir ancak bu azalma aktivitesi, üremedeki azalmayı ya da beslenememeyi içermemektedir. Fluoridin ayrıca glukan üretimini de azaltıcı etkisi gözlenmiştir (70).

4.4.2. Oral biyofilmlerdeki fluoridin biyolojik etkilerini artırıcı stratejiler

'Hayat Boyu Diş Çürüklerinin Teşhisi ve Yönetimi' ile ilgili NIH Antlaşma Beyanı' na göre, fluoridin etkinliği karyostatik ajanların eklenmesi ile arttırılabilir (94). Buna ek olarak, etkinliği artırıcı ajanların eklenmesi ile fluorid preparasyonlarının daha düşük konsantrasyonlarda olmasını sağlayarak, özellikle çocuklarda dental fluorozis ve akut fluorid toksisite riski azaltılabilir. Biyofilmlere karşı biyolojik aktivitesi olan kimyasal ajanların, fluorid ile kombinasyonda kullanılabilecek potansiyel maddeler olabilmesi için aşağıdaki bazı etkilerden bir ya da daha fazlasını içermesi gerekmektedir:

- bakteriyal tutunma ve kolonizasyonun inhibisyonu,
- EPS sentezinin inhibisyonu,
- karbohidrat metabolizmasının inhibisyonu,
- virulans genlerin etkisinin inhibisyonu,
- yerleştirilen/olgun biyofilmlerin iyonlarının engellenmesi,
- biyofilmlerin biyokimyasal kompozisyonunun modifikasyonu,
- oral patojenlerin selektif baskılanması.

Yani, preparasyonlara materyal eklenerek fluoridin koruyucu etkilerinin arttırılması, *S. mutans*' ın karyojenitesini ve biyofilm formasyon yeteneğinin ayarlanmasına yol açarak, diş çürüğü prevalansını azaltacak bir girişim sağlar. Fakat, fluoridin biyolojik aktivitesini arttırıcı kemoterapötik stratejilerin çoğu, yerleşik florayı baskılayıcı klorheksidin triklosan ve metal iyonları/katyonları gibi geniş spektrumlu antimikrobiyallerin kullanımı esasına dayanır. Klinik düzeyde bu yaklaşımın etkilerini incelemek ve fluoridin *S. mutans* ve diğer oral patojenler

üzerine fizyolojik etkilerini arttırabilen başka biyoaktif bileşikler de var mıdır diye araştırılması amaçlı yeni çalışmalar gerekmektedir (69).

4.5. Dental Materyaller

4.5.1. Cam iyonomerler

1969 yılında bulunmuş ve diş hekimliğine ilk defa 1972 yılında Wilson ve Kent tarafından tanıtılmıştır (26). Wilson ve Kent tarafından geliştirilen ilk cam iyonomerler, fluoroaluminosilikat (FAS) cam toz ve poli-karboksilik asit arasındaki sulu ortamda meydana gelen asit-baz reaksiyonu sonucu oluşan bir üründür. Bu nedenle, cam iyonomerler, genelde FAS cam tozu ve poliasidin sulu solüsyonu arasındaki asit-baz reaksiyonu ile sertleşen, su bazlı, self adeziv bir materyal olarak tanımlanabilmektedir (154). Cam iyonomerler;

- Geleneksel cam iyonomerler
- Rezin modifiye cam iyonomerler olarak 2 grupta sınıflandırılırlar (124).

Cam iyonomer sistemlerde, fluoroaluminosilikat cam ile reaksiyona giren poliasit, genelde polialkenoik asitlerdir. Poliakrilik asit, cam iyonomer simanlar içindeki ana poliasittir ve bununla beraber, başka poliasitler de eklenebilmektedir.

Bu asitler;

- Polimaleik asit,
- Akrilik asit-itakonik asit kopolimer,
- Akrilik asit-maleik asit kopolimer,
- Akrilik asit-2 butan dikarboksilik asit kopolimer,
- Polivinil fosforik asit olabilir.

Poliasidin reaksiyona girme derecesi, kopolimerin içeriğine, moleküler ağırlığına ve konsantrasyonuna bağlıdır. Poliasit, solüsyonun bir parçası veya simanın tozuna donmuş, kurutulmuş toz olarak katılabilmektedir. Bu ikinci formunda sıvı olarak su kullanılır ve karıştırma esnasında donmuş poliasit çözünmektedir (30).

Cam iyonomerlerin, fluorid salımı ve adeziv özellikleri açısından avantajları sebebiyle restoratif, kaide ve yapıştırma materyali olarak yaygın kullanım alanları mevcuttur. Çocuk diş hekimliği pratiğinde önemli bir yeri olan cam iyonomerlerin avantajları arasında;

- fluorid salımı ve fluorid rezervuarı olarak görev yapması,
- diş yapısına kimyasal bağlanması,
- düşük ısısal genleşme katsayısı,
- uygulama kolaylığı,
- biyouyumluluğu
- kenar sızıntısını azaltması ve ayrıca flor salımından dolayı komşu dişlerin çürüğe yatkın yüzeylerinde çürük önleyici etkisi sayılabilir (141).

En yaygın bilinen dezavantajları ise:

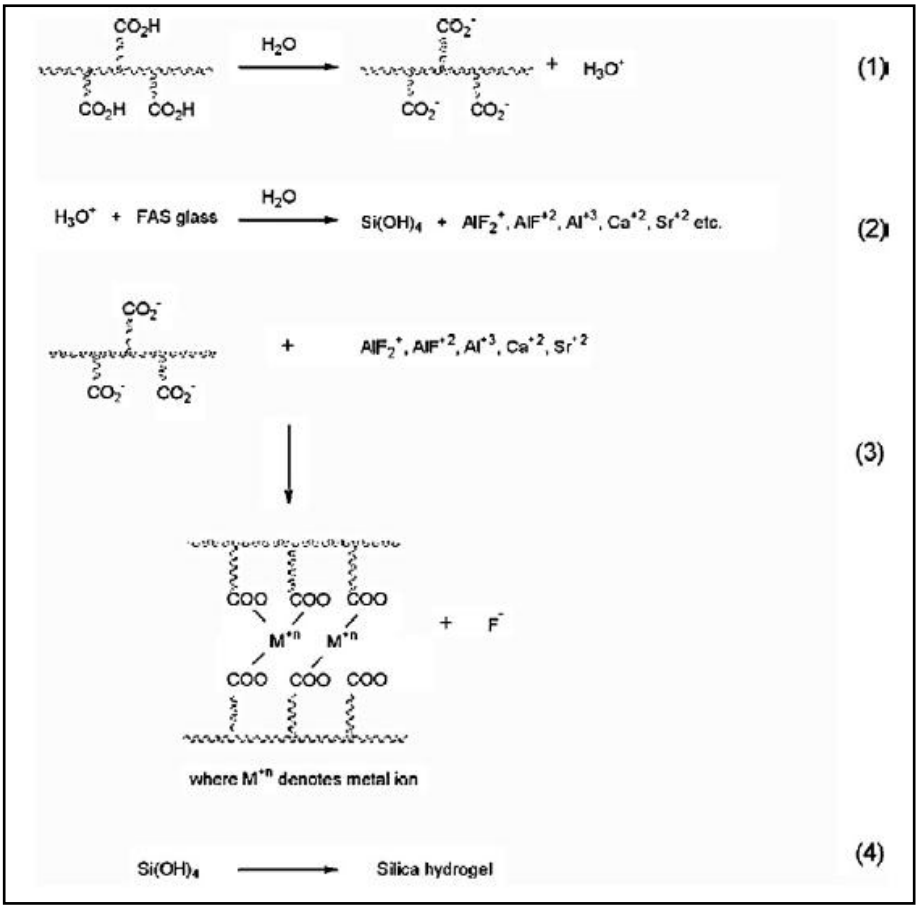
- İlk uygulama esnasında kuruluğa ve neme hassasiyeti,
- zayıf fiziksel özellikleri ,
- opak olması nedeniyle dişin doğal görüntüsünü taklit edememesi
- yüzey aşınma direncinin zayıf olması olarak bilinmektedir (30,141).

4.5.1.1. Cam iyonomerlerin sertleşme mekanizması;

Cam iyonomer simanların sertleşme reaksiyonu, fluoroaluminosilikat cam tozu ve poliakrilik asit içeren sulu solüsyonun karıştırılması ile başlar ve FAS cam tozunun temelini oluşturduğu bir asit-baz reaksiyonudur. Başlangıç reaksiyonu karıştırma sırasındaki ilk 3-4 dakikada tamamlanır ancak iyonik reaksiyon ise 24 saat boyunca devam eder ve olgunlaşma safhası tamamlanır (124). Asitte bulunan hidrojen iyonları, suyun varlığında cam partiküllerine geçerken kalsiyum, stronsiyum, alüminyum, sodyum ve fluorid iyonları açığa çıkar (30).

Poliakrilik asit zincirleri, katı bir kütle oluşturmak için kalsiyum iyonları ile bağ yapmaktadır. 24 saat sonra, alüminyum iyonlarının karışıma bağlanmasıyla, daha sağlam, sertleşmiş bir siman meydana getiren safha gerçekleşir. Sodyum ve fluorid iyonları, simanın çapraz bağlanma işlemine katılmazlar. Bununla beraber, bir kısım sodyum iyonu, karboksilik gruplardaki hidrojen iyonlarının yerini alırken, diğer

kısım sertleşmiş siman içerisinde sodyum fluorid oluşturmak için fluorid iyonları ile birleşir. Olgunlaşma safhasında, reaksiyon aracı olarak kullanılan su, çapraz bağlanma safhasında da hidratasyonu sağlamaktadır. Reaksiyona katılmayan cam partikülleri, yüzeylerinden katyonların uzaklaşması sırasında meydana gelen silika jel kılıfı ile çevrelenmiştir. Bu nedenle, sertleşmiş simanın son hali, hidratasyonu uğramış kalsiyum ve alüminyum poli tuzlarından oluşan amorf bir matriks içinde, silika jel ile çevrelenmiş, reaksiyona girmemiş toz veya cam partikül kütlesinden meydana gelmektedir (Şekil 7) (55, 124).



Şekil 7: Geleneksel cam iyonomerlerin sertleşme mekanizması (124)

İyi bir cam iyonomer restoratif simanın özellikleri (kıvamı, sıvılar içinde çözünürlüğü, kuvvetler karşısında parçalanması, sıkışmaya direnci vb.) ısı ve nem değişiklikleri ile uyum içerisinde olması gerekmektedir. Cam iyonomer simanların

aşınmaya direncinin, neme hassasiyetinin, zayıf fiziksel özelliklerinin en aza indirilebilmesi için üreticinin önerdiği miktarda toz ve likit birbiriyle karıştırılmalıdır. Elde karıştırılan cam iyonomer simanlarda bu oran yeterince sağlanamayabilir. Bu yüzden en iyi fiziksel özellikler elde etmek için cam iyonomer simanların makinede karıştırılan kapsül formları geliştirilmiştir (141).

4.5.1.2. Fluorid salım mekanizması

Fluorid salım mekanizması kompleks bir olaydır ve iki reaksiyondan meydana geldiği kabul edilmektedir. Birinci reaksiyon olan yüksek fluorid çıkışının kısa dönem reaksiyonu, sertleşme sonrası matürasyon sürecine bağlıyken, ikinci reaksiyon, uzun süreli düşük salım, difüzyon denge süreciyle ilişkilidir. Fluorid salımını etkileyen faktörler arasında;

- malzemenin kimyasal kompozisyonu,
- karıştırılma şekli ve karıştırma zamanı,
- tükürük pH değeri,
- plak ve
- pelikıl formasyonu sayılabilir (153).

Düşük pH değerlerinde fluorid salımında anlamlı bir artış meydana gelmesi, bu koşullarda aşındırıcı bir mekanizmanın aktive olarak, matriksteki cam partiküllerini çözdüğünü göstermektir. Fluorid salımını etkileyen diğer bir faktör ise restorasyonun çevresindeki fluorid konsantrasyonudur. Tersine bir fluorid konsantrasyonu eğilimi var ise cam iyonomerler çevreden fluorid absorbe ederler, bu da eski cam iyonomerlerin tekrar şarj olabildiği düşüncesini desteklemektedir (30).

Kinetik bulgular, fluorid salım mekanizmasının tüm materyaller için aynı olduğunu, sadece günlük miktarının ve akümülasyonunun değişkenlik gösterdiğini bildirmektedir (153).

4.5.1.3. Cam iyonomerlerden fluorid salımı

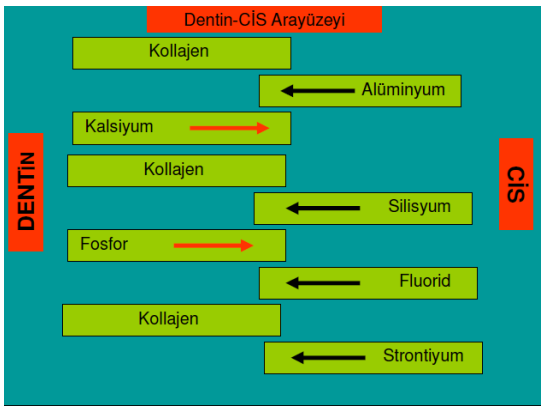
Cam iyonomerlerde çok çeşitli fluorid kaynakları mevcuttur. Bunlar kalsiyum fluorid, strontiyum fluorid, lanthanum fluorid, sodyum heksafluoroaluminat ve alüminyum fluoriddir. Tam olarak sertleşmiş cam iyonomerlerde, fluorid genellikle,

kısmen niteliğini kaybetmiş olan camların oluşturduğu cam çekirdeğinde ve alumino kompleksleri formunda olan polituz matriks içinde bulunmaktadır (30). Bir kısım fluorid ise, polikenoik asidin etkisiyle cam tozdan salınmakta ve matriksin içinde, sodyum fluorid mikro damlacıkları formunda bulunmaktadır (89). Tam olarak sertleşmiş cam iyonomerler, doğal solüsyonlara maruz kalınca, su absorbe etmekte ve aralarında fluoridinde bulunduğu birçok iyon açığa çıkarmaktadır. Bununla beraber, sertleşmiş olan simandaki toplam fluorid miktarından sadece az bir bölümü salım için uygundur. Bu, simanın içeriğindeki toplam fluorid miktarına bağlı değil, fluorid salımı sonrasında simanın elektron nötrlüğünü koruyan sodyum miktarına bağlıdır (30).

Cam iyonomerlerden salınan fluorid miktarı ilk 24 saat içinde maksimumdur ve zamanla materyalin miktarına göre kademeli olarak azalıp düşük bir seviyeye gelir. Fluorid salımı, *in vivo* ve *in vitro* olarak ölçülmüş, cam iyonomerlerin bu salım özelliğini 5 yıl gibi uzun bir zaman koruduğu gözlenmiştir (26,153).

Cam iyonomer restorasyonlardan elde edilen fluorid miktarı, çürük lezyonunun oluşumunu engellemek için tükürükte olması gereken fluorid seviyesine çok yakındır (89,90). Fluorid alım ve salım mekanizması su bazlı bir sistem olduğu için, fluoridli gargaraların ve ağız sularının kullanımını ve profesyonel fluorid uygulamalarını takiben, tükürükteki fluorid iyonları ile cam iyonomerin içine fluorid alımı ve restorasyondan fluorid salımı gerçekleşir (26).

Sennou ve ark. (128), cam iyonomer siman ve dentin arasında meydana gelen iyon alışverişinde sadece fluoridin değil, başka iyonlarında rol oynadığını göstermiştir (Şekil 8).



Şekil 8: cam iyonomer-dentin ara yüzeyindeki iyon transferi (128)

Sermetler, geleneksel cam iyonomerlerin mekanik özelliklerini kuvvetlendirmek amacıyla cam tozu içerisine; altın, gümüş ve titanyum gibi metaller eklenerek elde edilmiştir. Okluzal kuvvetlere karşı aşınma direnci geleneksel cam iyonomerlerden daha iyi olmasına rağmen, bükülme kuvveti ve abrazyon direnci ve fluorid salımı geleneksel cam iyonomerler yüksek değildir. Ayrıca sertleşme reaksiyonundaki metal faz nedeniyle sermetler gri renklidir (124).

Geleneksel cam iyonomerlerin neme hassasiyeti ve düşük mekanik dayanıklılık gibi dezavantajlarını ortadan kaldırmak amacıyla; **rezin modifiye cam iyonomerler (RMCI)** ve **poliasit modifiye kompozit rezinler (PMKR=kompomer)** geliştirilmiştir. Geleneksel kompozitlerden farklı olarak yapılarına eklenen ilave komponentlere rağmen temelde iki materyal (RMCİ ve PMKR) de hidrofobik özelliktedir ve polimerizasyon reaksiyonu ile sertleşirler. Setleşme genellikle ışıkla başlatılır ve başlatıcı 470 nm dalga boyundaki mavi ışığa hassas amin hızlandırıcılı kamporokinondur (95).

Geleneksel cam iyonomerlerin çalışma süresini uzatabilmek ve sertleşme reaksiyon süresini kısaltabilmek amacıyla 1980'lerin sonlarına doğru RMCI'lerin üretimine başlanmıştır (124). Temel içerikleri geleneksel cam iyonomerlerle aynı olan RMCI'lerin içeriklerinde;

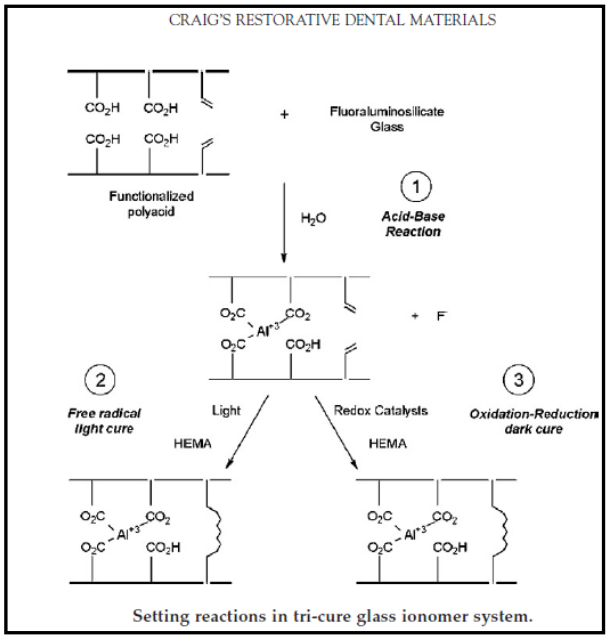
- polikarboksilik asit polimerleri,
- fluoroaliminosilikat cam,
- su,
- hidrofilik metakrilat monomerler ve
- serbest radikal başlatıcıları bulunur.

Poliakrilik asite HEMA (*Hidroxyethyl Methacrylate*) gibi suda çözünür metakrilat komponentlerinin eklenmesi, asit baz reaksiyonunu desteklemek amaçlı ışıkla polimerizasyonu gerektirir . Hibrid iyonomerler olarak da bilinen rezin modifiye cam iyonomerler, yüksek çürük riski olan ancak düşük strese maruz kalınan alanlarda kullanılımı tercih edilen bir materyaldir. RMCI'ler dişe herhangi bir bonding materyali kullanılmadan uygulanır çünkü bondingin RMCI'lerden dentin ve minenin fluorid alımını engellediği iddia edilmektedir (124).

Rezin modifiye cam iyonomerler kompomerler ve kompozitlerden daha fazla, geleneksel cam iyonomerler ile ise yaklaşık olarak aynı miktarda fluorid salımı yapabilir ancak bu miktar, ortaya çıkan kompleks fluorid bileşiklerinden ve bu bileşiklerin poliakrilik asitle olan etkileşiminden, ayrıca da fotokimyasal polimerizasyon reaksiyonu için kullanılan rezinin miktar ve tipinden etkilenebilir (124).

Metakrilat grupların çapraz bağlanmaları için sadece ışık başlatıcı olarak kullanıldığında RMCI'leri tabaka tabaka yerleştirmek gerekir çünkü görünür ışığın penetrasyon derinliği sınırlıdır. RMCI'ler kaide olarak kullanıldığı durumlarda bu bir dezavantaj değilken, restoratif amaçlı kullanımlarında sertleşme reaksiyonunun tamamlanmasında eksiklik oluşur. Bu problemi çözmek amacıyla **Tri-cure Cam İyonomer Sistemi** geliştirilmiştir. Bu sistemde ışık aktivatörlerine ek olarak materyale self-cure redox başlatıcılar eklenir. Böylece ışığın yetersiz kaldığı bölgelerde metakrilat polimerizasyonu devam eder (Şekil 9). Bu sistemdeki 3 sertleşme reaksiyonu;

- asit-baz cam iyonomer reaksiyonu
- ışıkla aktive edilmiş pollimerizasyon
- kimyasal aktive edilmiş polimerizasyon olarak özetlenebilir (124).



Şekil 9: Tri-cure cam iyonomer sistemi sertleşme reaksiyonu (124)

RMCI'lerin dezavantajlarını ortadan kaldırmak için geliştirilen bir diğer materyal de nanoiyonomerlerdir. 2007'den beri piyasada bulunan nanoiyonomerlerin içerikleri ve sertleşme mekanizmaları RMCI'lerle aynıdır. Tek farkı cilalanabilirliğini ve sertleşmiş iyonomerin optik özelliklerini artırmak amacıyla FAS cama nanomer ve nanocluster gibi nanopartiküller eklenmiştir (124).

4.5.2. Poliasit modifiye kompozit rezinler (PMKR)

RMCİ'in geliştirilmesinden kısa bir süre sonra, 1990'ların başlarında 'kompomer' olarak da bilinen PMKR piyasaya sunulmuştur. Bu isim McLean ve ark (1994) tarafından önerilmiş, araştırıcılar ve üretici firmalar tarafından geniş bir şekilde kabul görmüştür. Bu materyal, kompozitlerin estetik özelliklerini ve cam iyonomerlerin dişe kimyasal olarak bağlanabilme ve fluorid salabilme özelliklerini tek bir materyalde toplama düşüncesiyle üretilmiştir (84).

Kompomerler, poliasit modifiye monomerlere fluorid salımı yapan silikat camlar eklenerek formüle edilmiştir. Bazı kompomerler daha fazla fluorid salımı yapabilmeleri için modifiye monomerler içerir. Doldurucu oranı % 42 - % 67 arasında değişir. Doldurucu partikül büyüklükleri ortalama 0,5 – 0,8 μm'dir (124). Bu materyalin kompozisyonunda su bulunmaz ve bileşenlerinin büyük bir çoğunluğu kompozit rezinlerle aynıdır. Bunlar, BISGMA veya türevleri ve/veya TEG-DMA (*triethylene glycol dimethacrylate*) gibi büyük moleküllü makro-monomerlerdir. Bu polimer sistemlere kuartz veya silikat camı gibi reaktif olmayan inorganik doldurucular da eklenmiştir. Ayrıca geleneksel kompozitlerden farklı olarak asidik fonksiyonel grupları olan bazı ek monomerler de içerebilirler (95).

Sertleşme reaksiyonu ışıkla polimerizasyon sonucu meydana gelir ancak kaviteye yerleştirildikten sonra tükürük ile temas eden ve su adsorbe eden kompomerlerde asit-baz reaksiyonu oluşur. Ayrıca sulu ortam fluorid transferi için de oldukça önemlidir. Kompomerlerin fluorid salım mekanizması cam iyonomerlerle aynıdır ancak içeriğindeki cam iyonomer miktarının az olması nedeniyle daha az fluorid salımı yaparlar ve reşarj edilemezler (124).

4.5.3. Fissür örtücüler

Koruyucu diş hekimliğinin önemli bir parçasını oluşturan fissür örtücüler, premolar ve molar dişlerde okluzal yüzey çürüğünün önlenmesinde otuz yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. On sekizinci yüzyıl başlarında Hunter, azı dişlerinin okluzal yüzeylerindeki fissür ve pitlerin uygun materyalle kapatılması durumunda, bu bölgede gelişmesi muhtemel çürüklerin önlenebileceğini ileri sürmüştür. Wilson 1895 yılında fissür ve pitlerin çürükten korunması için simanla örtülmesini önermiştir (87).

Hyatt 1923'te, çürük şüphesi bulunan tüm pit ve fissürleri içine alacak şekilde hazırlanmış sığ sınıf I kavitelerin amalgamla doldurulduğu profilaktik restorasyonları savunmuştur. Bodecker 1929'da bundan daha konservatif bir metot önermiş, önceleri fissürleri sondla temizleyip içlerine oksifosfat siman akıtırken daha sonra "profilaktik odontotomi" olarak adlandırılan alternatif bir teknik tanıtarak retantif, derin fissürleri mekanik olarak genişletip temizlenebilirliğini sağlamayı amaçlamıştır. Fissür örtücülerin geliştirilmesi, restoratif rezinlerin fosforik asitle pürüzlendirilmiş mineye daha iyi tutunduğunun keşfine dayanmaktadır.

Asitle pürüzlendirmenin mine üzerindeki etkilerine dair ilk çalışmalar 1955'te Buonocore tarafından yapılmış olup bu tekniğin kullanıldığı ilk fissür örtücüler 1960'ların ortalarında siyanoakrilatlarla gerçekleştirilmiştir. Siyanoakrilatlar, deri ve mukozada oluşturdukları toksik etki ve ağız sıvılarında çözülmeye uğramaları gibi olumsuz özelikleri nedeniyle fissür örtücü olarak uzun süre popüler kalamamıştır. Fissür örtücü olarak poliüretan türevleri ve polikarboksilat siman da kullanılmış fakat fissür detaylarına nüfuz edemeyecek kadar akışkanlıklarının düşük olması ve aşınma dirençlerinin de yeterli olmaması gibi nedenlerle fazla ilgi görmemişlerdir (124).

Fissür örtücü olarak kullanılması önerilen diğer bir materyal de cam iyonomer simanlardır. Wilson ve Kent tarafından formüle edilen ve dişlere fizikokimyasal olarak bağlanabilen bir materyal olarak sunulan cam iyonomer, 1970'lerde Mclean ve Wilson tarafından geliştirilmiştir. Yapısında fluorid ihtiva ettiği için dişleri çürüğe karşı dirençli hale getirebilen bir materyal olan cam iyonomer simanı fissür örtücü olarak da ilk kullananlar McLean ve Wilson'dur (85). Cam iyonomerler, fluorid kaynağını yapısında bulunan fluoroalüminosilikat camından alır. Cam iyonomerler

sertleştikten sonra uzun süre fluorid salabildiği, diş dokularına fizikokimyasal yolla bağlanabildiği ve nem kontaminasyonuna rezin esaslı materyaller kadar hassas olmadığı bilinmektedir (90).

Cam iyonomerler genellikle visköz yapıda olduğu için fissürlere penetrasyonları oldukça güçtür. Bu nedenle dişe mekanik olarak tutunmaları da zorlaşır. Ayrıca cam iyonomerler oldukça kırılgan ve de okluzal aşınmalara karşı daha az dirençlidir. Yapılan çalışmalar cam iyonomer içerikli fissür örtücülerin rezin bazlı fissür örtücülere göre daha az retansiyon sağladıklarını ama daha fazla fluorid saldıklarını göstermiştir. Bu nedenle fissür örtücüler düştükten sonra bile çürük önleyici etkileri kalan diş dokusu üzerinde bir süre daha devam etmektedir (124).

Cam iyonomerlerin geliştirilmesinden sonra bu materyale, olumsuz özelliklerini ortadan kaldırmak amacıyla rezin ilavesi yapılmış ve hibrid iyonomerler diye sınıflandırdığımız RMCİ (rezin modifiye cam iyonomer) ve PMKR (poliasit modifiye kompozit rezin) materyallerin de fissür örtücü tipleri üretilmiştir ve bu ürünler günümüzde halen kullanılmaktadır (124).

Çok sayıda rezin materyal üzerinde yapılan deneylerden sonra 1960'ların sonlarında restoratif işlemlere oldukça elverişli olan BIS-GMA (*bis-phenol A glycidyl methacrylate*) rezinleri geliştirilmiştir. ADA (American Dental Association) tarafından fissür örtücü materyaller değerlendirilmiş ve 1983 tarihinde BIS-GMA rezinlerin fissür örtücü olarak kullanımına onay verilmiştir. Günümüzde bilinen en yaygın kullanılan fissür örtücüler BIS-GMA içeren ve ışıkla sertleşen rezin bazlı örtücülerdir. Kimyasal özellikleri kompozitlerle benzer olan bu fissür örtücüler, pit ve fissürlere kolayca diffüze olmaları için içeriklerine TEG-DMA (trietilenglikol dimetakrilat) katılarak daha akışkan bir kıvama sahip hale getirilmiştir (124). BIS-GMA rezinler minenin asitlenmesini takiben güçlü bir şekilde mineye tutunmaktadır ve fissürlere iyi bir şekilde diffüze olan rezin bazlı fissür örtücüler kapanışta yükseklik oluşturmaz (15,106).

Rezin bazlı fissür örtücüler arasındaki en önemli farkı polimerizasyon tipleri oluşturur. İlk olarak ultraviyole ışıkla polimerize olan fissür örtücüler geliştirilmiştir ve bunlar birinci jenerasyon fissür örtücüler olarak bilinir. İkinci jenerasyon fissür örtücüler ise otopolimerizandır yani; kimyasal olarak, katalizör baz karıştırılmak

suretiyle polimerize olurlar. Üçüncü jenerasyon fissür örtücüler ise görünür ışıkla polimerize olanlardır (41). Bu materyallerin esasını 170 nm dalga boyundaki ışıkla aktive olan aromatik ketonlar ve diketonlar oluşturur. Bunlar diğer ışık kaynaklarından etkilendikleri için uygulama esnasında reflektör kapatılmalıdır. Fissür örtücü ile ışık kaynağı arasındaki mesafe 1–2 mm kadar olmalıdır. Materyal ışık kaynağının 20 saniye tutulmasıyla sertleşmesini tamamlar. Polimerizasyon ışığının dalga boyu, görünür ışıkla aynı spektrumda olmasına rağmen monokromatik ışık kaynağı kullanıldığı için göze zararlıdır. Bu nedenle hekim ve hastayı korumak için turuncu gözlük kullanılmalıdır. Sertleşme tamamlandıktan sonra, yüzeyde kalan artık monomerin uzaklaştırılması için materyal ıslak bir pamuk peletle silinir. (41,49,106).

Rezin esaslı fissür örtücülerin klinik uygulama ve takiplerinin daha iyi yapılabilmesi için opak, şeffaf ve renkli olanları da üretilmiştir. Renkli ve opak fissür örtücülerin klinik takiplerinin daha kolay yapılabildiği, şeffaf fissür örtücülerin ise, altında çürük gelişip gelişmediği konusunda kontrolünün kolay olduğu bildirilmiştir. Bu avantajlarının yanında bu tip fissür örtücülerin klinik olarak benzer başarılı sonuçlar verdiği belirtilmiştir (54,88,151). Polimerizasyon büzülmesinin azaltılması ve aşınma direncinin artırılması amacıyla fissür örtücülere doldurucu ilave edilmesi gündeme gelmiştir. Fissür örtücülere doldurucu olarak kuartz, cam ve porselen gibi maddeler katılmaktadır. Ağırlıkça % 40'lık doldurucu içeren fissür örtücülerin, doldurucu içermeyenlere oranla sıkışma, germe,kopma, elastik modül ve su emilimi açısından daha başarılı olduğu *in vitro* çalışmalarla gösterilmiştir (106,124).

Fissür örtücülerin içerisine doldurucu katılması ile materyalin akışkanlığında düşüş olacağı ve bunun sonucu olarak da materyalin fissür ayrıntılarına iyi penetre olamayacağı endişesi doğmuş olsa da yapılan çalışmalarda, doldurucu içeren fissür örtücülerin diğerlerine göre fissür penetrasyonunda önemli farklılıklarının olmadığı bulunmuştur. Bununla birlikte fissür örtücülerin içerdikleri doldurucuların, fissür ayrıntılarına daha iyi penetre olması ve kırılma dayanımının da yeterli olabilmesi için ağırlıkça % 30–65 oranında olması gerektiği belirtilmiştir (42,152).

4.6. CPP-ACP (Kazeinfosfopeptid Amorf Kalsiyumfosfat)

Süt ve süt ürünlerinin çürük önleyici özelliğe sahip oldukları bilinmesine rağmen doğal olarak kullanıldıklarında bu etkilerini gösterebilmeleri için çok büyük miktarlarda tüketilmeleri gerekmektedir. Bu nedenle araştırmacılar, çürüğü önlemek amacıyla sütün içerisindeki koruyucu faktörleri ayırarak kişisel hijyen ürünleri içerisinde kullanmaya yönelik çalışmalara odaklanmışlardır (1).

CPP-ACP yeni bir kalsiyum fosfat remineralizasyon teknolojisidir (112). Reynolds ve ark (1994), CPP'lerin, seçici çökelme metodu kullanılarak kazeinin tripsin enzimi ile parçalanması sonucunda elde edildiğini bildirilmişlerdir (115). CPP'leri, Ser(P)-Ser(P)-Ser(P)-Glu-Glu-Glu şeklindeki aminoasit dizilimi içermektedir ve dikkate değer bir biçimde ACP'yi stabilize etme yeteneğine sahiptir. Kazein fosfopeptidleri içerdikleri fosfoseril uzantılar boyunca ACP'yi küçük kümeler halinde bağlayarak solüsyon içerisinde çökelmeleri için gerekli boyuta ulaşmalarını engellemektedirler. Böylece CPP-ACP nanokompleksi meydana gelmektedir (111).

CPP-ACP'nin olası çürük önleyici etkisi 3 farklı mekanizmayla açıklanmaktadır:

- CPP-ACP içeren ağız diş sağlığı ürünleri koruyucu diş hekimliğinde hidroksiapatidlerin rejenerasyonu için gerekli olan Ca ve P iyonlarının birikimini sağlar, tamponlama kapasitesi sayesinde oral biyofilme, diş ve yumuşak dokulara iyi bağlanabilme kapasitesi ve devamlı iyon salımı yapabilme özelliğine sahiptir. Oral biyofilmin yapısına katılarak plağın kalsiyum ve fosfat iyon seviyesini anlamlı bir şekilde arttırmaktadır. Bu mekanizma demineralizasyonu önlemesinde önemli bir mekanizmadır çünkü biyofilm kalsiyum ve fosfat seviyesiyle çürük oluşumu arasında ters bir ilişki mevcuttur.
- Diş yüzeyine lokalize olan CPP-ACP biyofilm içindeki serbest kalsiyum ve fosfatı bağlayarak diş yüzeyini aşırı doygun hale getirmektedir ve böylece demineralizasyonu önleyip remineralizasyonu arttırmaktadır.
- Biyofilm içindeki bakteri hücrelerinin yüzeylerine bağlanarak diş üzerinde kolonize olmalarını da engellemektedir (5,139).

CPP-ACP'nin tavsiye edilen klinik uygulamaları şunlardır:

- Çocuklarda çürükten korunmada (özellikle yutma riski olan 6 yaş öncesi çocuklar)
- Yüksek çürük riski olan çocuklarda
- Minenin remineralizasyonunda
- Orta ve şiddetli dental fluorozis lezyonlarında
- Ortodontik braketlerin sökümünden sonra ortaya çıkan ve geri dönüşümü olan beyaz leke lezyonlarda
- Diş beyazlatmasından önce ve sonra
- Dentin hassasiyetinde
- Diştaşı temizliği ve root planning uygulamalarından sonra (62).

Günümüzde CPP-ACP, topikal etkisinden yararlanmak için şekersiz sakız, gargara, pastil, pat, spor içecekleri ve restoratif materyal gibi çeşitli ürünlerin içerisine katılarak piyasaya sunulmuştur (101).

Shen ve ark. (131), yaptıkları bir çalışmada, başlangıç çürüklerinin remineralizayonunda CPP-ACP içeren sakızlar kullanmışlar ve başlangıç çürüklerinin remineralizasyonunda kullanılan doza bağlı olarak bir artış olduğunu bulmuşlardır.

Reynolds ve ark. (113), ise yaptıkları bir çalışmada CPP-ACP içeren şekersiz sakızlar ve ağız gargaralarını kullanmışlar ve % 2 ve % 6'lık CPP-ACP içeren gargaraların biyofilm içerisindeki kalsiyum ve inorganik fosfat düzeyini arttırdığını ayrıca da CPP-ACP içeren şekersiz sakızların mine dış yüzeyindeki lezyonlarda remineralizasyonu arttırıcı etkisi olduğunu bildirmişlerdir.

Yamaguchi ve ark. (155), pat kullanarak yaptıkları bir çalışmada günde 2 kere mine üzerine % 1'lik CPP-ACP içeren pat uygulamasının ultrasonik cihazlar kullanarak ölçümü sonucunda mine demineralizasyonunu engellediğini bildirmişlerdir.

Mazzaoui ve ark. (83), tarafından yapılan bir çalışmada CPP-ACP cam iyonomer siman içerisinde ve kullanılmış sonuçta cam iyonomer simanın sıkışma ve

bağlanma kuvvetlerinde artış olduğu, nötral ve asidik koşullarda materyalden kalsiyum, fosfat ve fluorid salımının arttığı rapor edilmiştir.

Yapılan araştırmalarda CPP-ACP ile fluorid arasında da bir etkileşim olduğu sonucuna varılmıştır. Reynolds tarafından yapılan bir çalışmada pH' sı 7 olan ve %1 CPP içeren solüsyonla 500 ppm içeren solüsyon ve birlikte kullanımlarının etkileri değerlendirilmiş ve birlikte kullanımları sonucu fluoridin yaklaşık yarısının CPP-ACP'ye bağlandığı rapor edilmiştir. Sonuç olarak ortaya CPP-ACFP bileşiği çıkmıştır (114).

Cochrane ve ark. (22), CPP-ACP ve fluoridin çürük önlemedeki etkilerinde birbirlerine katkıda bulunduklarını, fluoridin çürük önleyici mekanizmasını açıklayan fluorapatitin, kalsiyum ve fosfatla birlikte diş yüzeyine lokalize olduğunu ve bunun da diş yüzeyinde ACFP olarak bulunmalarından kaynaklandığını bildirmişlerdir .

5. GEREÇ VE YÖNTEM

Araştırmamızın deneysel bölümleri, Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı ve Ar-Ge Laboratuarında, deneysel incelemeleri ise Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuarı ve Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji Laboratuarında yapılmıştır.

Araştırma öncesinde araştırmaya dahil edilen tüm bireyler çalışma hakkında bilgilendirilmiştir. Araştırmamız sırasıyla belirtilen aşamalardan oluşmaktadır:

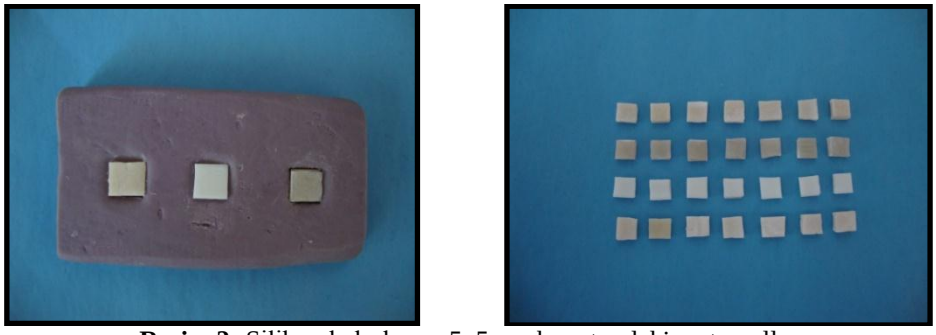
- Örneklerin toplanması ve hazırlanması
- Biyofilmin ağız içi ortamında oluşturulması
- Biyofilmin mikroskobik incelenmesi (SEM takibi)
- Biyofilmin sayısal olarak değerlendirilmesi
- Dental materyallerin fluorid salımlarının değerlendirilmesi
- Sonuçların istatistiksel analizi

5.1. Örneklerin Toplanması ve Hazırlanması

5.1.1. Dental materyallerin hazırlanması

5.1.1.1. Fuji Triage

Araştırmamızda kullanılan **Fuji Triage Capsule** (GC Fuji Triage, GC Corporation, Europe) dental materyali üretici firma talimatları doğrultusunda aktive edilip, kapsül karıştırıcısına yerleştirilerek 10 saniye süreyle karıştırıldı ve özel uygulama aparatı yardımıyla önceden hazırlanan 5x5x2 mm ebatlarındaki silikon kalıplara uygulandı. Hafif parmak basıncıyla son şekilleri verilerek sertleşmeye bırakıldı. Sertleşme süresi tamamlandıktan sonra silikon kalıplardan çıkarılan örnekler toplamda 21 adet olacak şekilde hazırlandı (Resim 2).



Resim 2: Silikon kalıplar ve 5x5mm boyutundaki materyaller

5.1.1.2. Fuji IX GP Extra

Araştırmamızda kullanılan Fuji IX GP Extra Capsule (GC Corporation, Europe) dental materyali üretici firma talimatları doğrultusunda aktive edilip, kapsül karıştırıcısına yerleştirilerek 10 saniye süreyle karıştırıldı ve özel uygulama aparatı yardımıyla önceden hazırlanan 5x5x2 mm ebatlarındaki silikon kalıplara uygulandı. Hafif parmak basıncıyla son şekilleri verilerek sertleşmeye bırakıldı. Sertleşme süresi tamamlandıktan sonra silikon kalıplardan çıkarılan örnekler toplamda 21 adet olacak şekilde hazırlandı (Resim 4).

Resim 3: GC Fuji Triage Capsule

Resim 4: GC Fuji IX GP Extra Capsule

5.1.1.3. Helioseal F

Araştırmamızda kullanılan **Helioseal F** (Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) üretici firma talimatları doğrultusunda, önceden hazırlanmış 5x5x2 mm boyutlarındaki silikon kalıplar içerisine uygulandı ve bir halojen ışık cihazı kullanılarak (Bluephase C5, Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) 20 saniye

süreyle polimerize edildi. Polimerizasyonu tamamlandıktan sonra silikon kalıplardan çıkarılan örnekler bir lastik bitim frezi (Kenda , Germany) yardımıyla cilalandı ve toplamda 21 adet olacak şekilde hazırlandı (Resim 5).

5.1.1.4.Dyract ® eKStra

Araştırmamızda kullanılan **Dyract ® eKStra (** Dentsplay, DeTrey, Germany) kompomer materyal uçları , üretici firma talimatları doğrultusunda taşıyıcılarına yerleştirildi ve yine önceden hazırlanmış 5x5x2 mm boyutlarındaki silikon kalıplar içerisine uygulandı. Bir siman fulvarı yardımıyla son şekilleri verilerek halojen bir ışık cihazı kullanılarak (Bluephase C5, Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) 20 saniye süreyle polimerize edildi. Polimerizasyonu tamamlandıktan sonra silikon kalıplardan çıkarılan örnekler bir lastik bitim frezi (Kenda, Germany) yardımıyla cilalandı ve toplamda 21 adet olacak şekilde hazırlandı (Resim 6).

Resim 5: Helioseal F

Resim 6: Dyract Extra

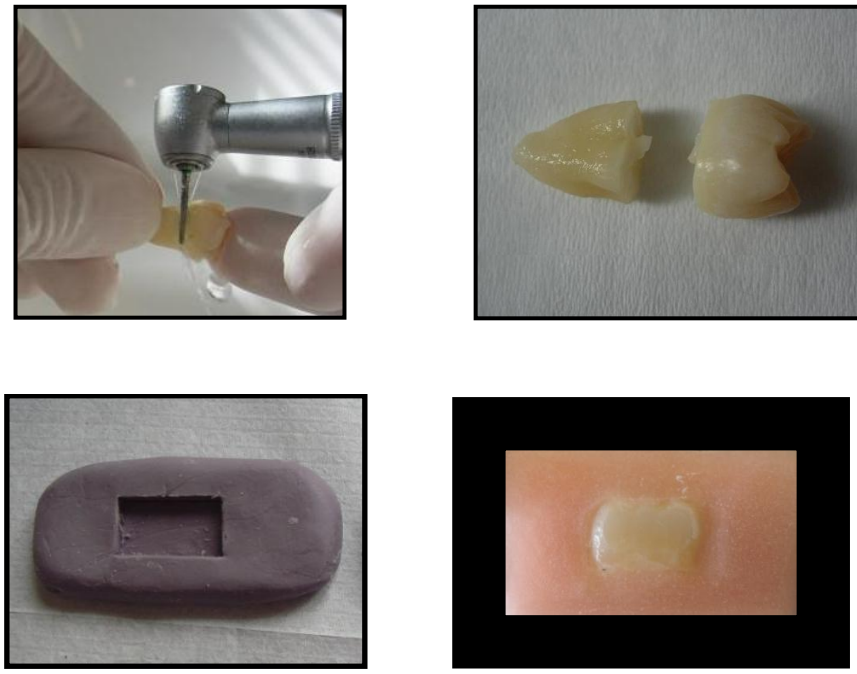
5.1.2. Doğal dişlerin hazırlanması

Çalışmamızda M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Cerrahi A.D.' ndan temin edilen ve yaşları 25-40 arası bireylerden çekilen 11 adet alt ve üst (maksiler ve mandibuler) tam gömük insan 3. molar dişleri kullanıldı. Dişler çekildikten sonra üzerlerindeki doku artıkları el aletleri ve fırça yardımı ile musluk suyu altında uzaklaştırıldı. Temizliğin ardından dişler % 0,01'lik timol solüsyonunda 4°C derecede 1 ay boyunca bekletildi. Dişlerin kuronları, ilk önce mine-sement sınırından elmas frez (Meizen, Germany) ve aeratör (Kavo, Germany) kullanılarak su soğutması altında köklerinden ayrıldı. Daha sonra kuron pulpaları bir ekskavatör yardımıyla temizlendi

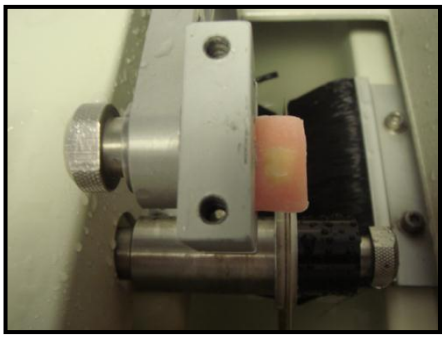
ve kuronlar yine elmas separe yardımıyla bukkal ve lingual 2 parçaya ayrıldı. Böylece 22 adet diş örneği elde edildi.

Distile su içerisinde bekleyen diş örnekleri, mine yüzeyleri dışarıda kalacak şekilde, önceden hazırlanmış 3x2 cm boyutunda ve 1cm derinliğinde silikon kalıplara, kendiliğinden sertleşen pembe akrilik rezin içine (üretici firma talimatları doğrultusunda 10 gr. toz için 5 gr. likit olacak şekilde 1 dk. boyunca karıştırılarak) (Panacryl, Kent Dental, Türkiye) gömüldü ve dehidratasyonu engellemek amacıyla tekrar distile su içerisine yerleştirildi (Resim 7).

Akrilik içerisine gömülü dişlerden, Marmara Üniversitesi AR-GE bölümünde bulunan kesim cihazı (ISOMET 1000, Precision Saw, Beuhler) kullanılarak su soğutması altında 5x5x2 mm boyutlarında mine örnekleri elde edildi ve toplamda 21 adet olacak şekilde hazırlandı (Resim 8).



Resim 7: Doğal dişlerin hazırlanması



Resim 8: Dişlerin 5x5 mm boyutunda kesilmesi

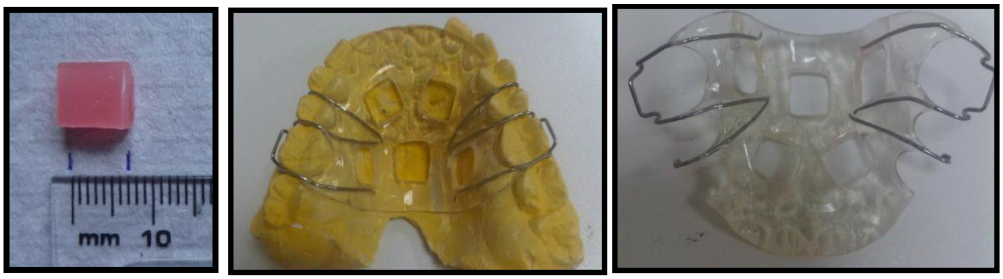
Hazırlanan tüm örnekler 1 atmosfer basınç altında 121°C derecede 40 dakika süreyle otoklavda steril edildi (Nüve Steam Art OT18B En 13060 B Class, Ankara). Bu şekilde hazırlanan dişler deney düzeneği hazırlanana kadar distile su içerisinde saklandı.

5.2. Biyofilm Tabakasının Ağız İçi Ortamında Oluşturulması

5.2.1. Apareylerin hazırlanması

Araştırmamız için Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonu'ndan onay alındı. Araştırmamıza, cinsiyet ayrımı gözetmeksizin, yaşları 20-30 arasında değişen, herhangi bir sistemik rahatsızlığı bulunmayan, son 3 ay içerisinde antibiyotik kullanmamış, sigara kullanmayan, aktif çürüğü olmayan ve herhangi bir ortodontik aparey kullanmayan 7 birey dahil edildi.

Araştırmaya katılan gönüllülerin üst çenelerinden aljinatla (BMS Dental, Italy) ölçü alındı ve sert alçıdan (Glidur, Germany) modelleri hazırlandı. Her bir gönüllü için 7x7x3 mm ebatlarında 5'er adet mum (DentsPly Pinacle, Germany) kalıplar hazırlanarak alçı modellerin palatinal bölgelerine yerleştirilmiştir. Bu modeller üzerine laboratuar ortamında şeffaf akrilikten (BMS Dental, Italy) hawley apareyleri hazırlandı ve daha sonra aparey içerisindeki mumlar eritilerek 7x7x3 mm 5 adet boşluğa sahip 7 adet aparey elde edildi (Resim 9).



Resim 9: Apareylerin hazırlanması

5.2.2. Grupların belirlenmesi

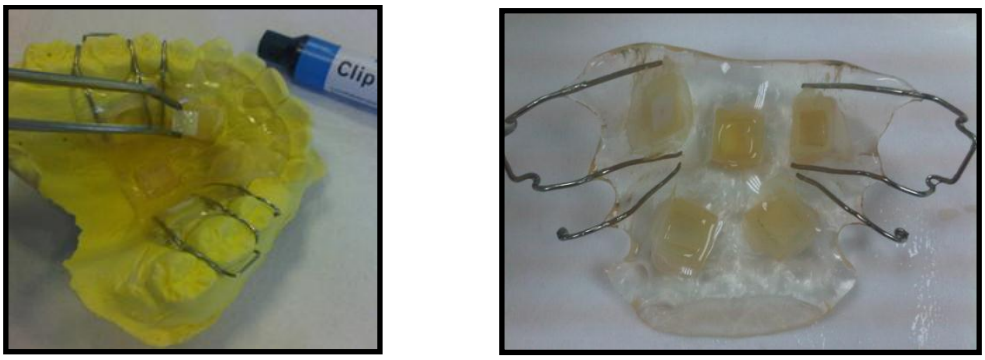
Her bir materyal grubundan hazırlanan 5x5x2 mm boyutlarındaki 21 örnek ve 21 adet doğal diş, her grupta 7 adet olacak şekilde 3 gruba ayrıldı:

Grup I: sükrozsuz normal florada kullanılacak örnekler

Grup II: sükrozlu florada kullanılacak örnekler

Grup III: sükrozlu florada + CPP-ACP'li pat ile kullanılacak örnekler

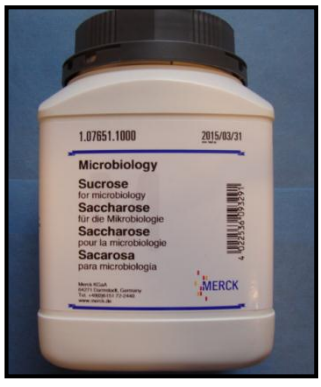
Grup I (normal flora)'de kullanılmak üzere; her apareye daha önceden hazırlanan örneklerden 1 adet Fuji Triage, 1 adet Fuji IX GP Extra, 1 adet Helioseal F, 1 adet Dyract Extra ve 1 mine örneği aynı 7 apareyde de aynı yerlere gelecek şekilde ışıla sertleşen bir geçici dolgu materyali (Clip , Voco, US) kullanılarak aparey yüzeyinden 1mm aşağıda olacak şekilde yerleştirildi ve halojen bir ışık (Bluephase C5, Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) yardımıyla Clip 20 saniye polimerize edildi (Resim 10).



Resim 10: Örneklerin apareylere yerleştirilmesi

Hazırlanan apareyler bireylerin ağızlarına yerleştirildi ve biyofilm oluşturmak amacıyla 4 gün süreyle sadece yemek yerken çıkarılmak koşuluyla bireyler tarafından kullanıldı. Apareyler yemek süresince biyofilm dehidratasyonunu engellemek için musluk suyu ile dolu aparey saklama kutularında bekletildi. Deney süresi boyunca gönüllülere dişleri fluorid içermeyen bir macunla (Sensodyne,GlaxoSmithKline,UK) fırçalatıldı ve apareyler kesinlikle fırçalanmadı. Bireyler deney süresi boyunca normal beslenmelerine devam ettiler.

Grup II (sükrozlu flora)'de aynı bireylerin bir önceki grupta kullandıkları aynı apareyleri temizlendikten sonra, yine ilk gruptaki gibi önceden hazırlanan örneklerden 1 adet Fuji Triage, 1 adet Fuji IX GP Extra, 1 adet Helioseal F, 1 adet Dyract Extra ve 1 mine örneği 7 apareyde de aynı yerlere gelecek şekilde, ışıkla sertleşen geçici bir dolgu materyali (Clip , Voco, US) kullanılarak aparey yüzeyinden 1mm aşağıda olacak şekilde yerleştirildi ve halojen bir ışık (Bluephase C5, Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) yardımıyla 20 saniye polimerize edildi. Apareyler ilk grup ile aynı şartlarda 4 gün süreyle kullandırıldı. Bu grupta ilk gruptan farklı olarak bireyler 4 gün boyunca yemek esnasında çıkardıkları apareylerini önce 10 ar dakika süreyle % 10 luk hazırlanmış sükrozlu distile suda, daha sonra yine musluk suyunda beklettiler (Resim11).



Resim 11: Sükroz

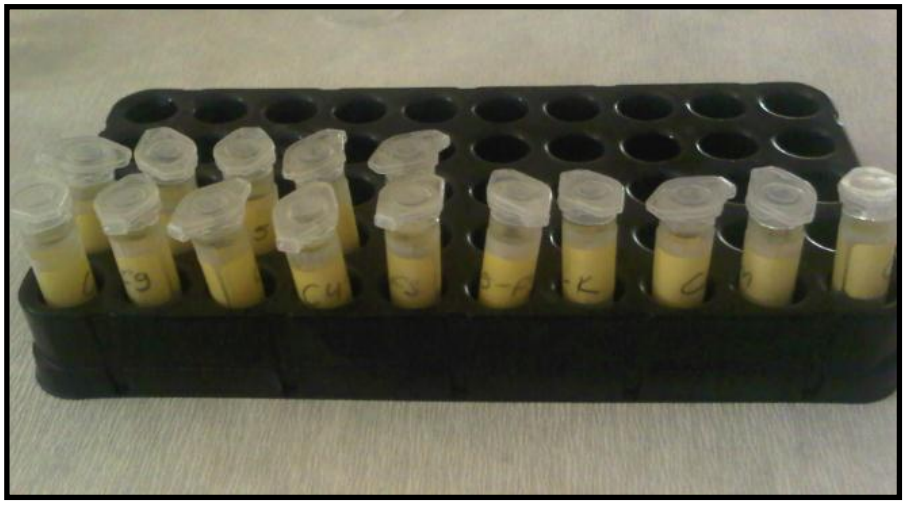
Resim 12: GC Tooth Mousse

Grup III (sükroz+CPP-ACP'li flora)'de ilk iki grupta kullanılan aynı apareyler temizlendikten sonra, önceden hazırlanan örneklerden 1 adet Fuji Triage, 1 adet Fuji

IX GP Extra, 1 adet Helioseal F, 1 adet Dyract Extra ve 1 mine örneği yine aynı sıralamada, ışıkla sertleşen geçici bir dolgu materyali (Clip , Voco, US) kullanılarak aparey yüzeyinden 1mm aşağıda olacak şekilde yerleştirildi ve halojen bir ışık (Bluephase C5, Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) yardımıyla 20 saniye polimerize edildi. Tüm bireyler apareylerini 4 gün süreyle sadece yemek esnasında çıkarmak koşuluyla kullandılar. Yemek sonrasında dişlerini fluoridsiz bir macunla fırçaladılar. İlk iki gruptan farklı olarak bu grupta gönüllüler apareylerini her yemek sırasında çıkardıklarında önce %10 luk sükroz solüsyonunda ardından musluk suyunda beklettiler ve dişlerini fırçaladıktan sonra apareylerini takmadan önce her defasında CPP-ACP içeren bir ürünü (Fluoridsiz GC Tooth Mousse**)** dişlerine sürerek kullandılar (Resim 12).

5.3. Oral biyofilmin Mikroskobik İncelenmesi

Her üç grupta da 4. günün sonunda apareyler gönüllülerin ağızlarından çıkarıldı ve örnekler, oluşan biyofilm tabakasına zarar vermeden bir ağız spatülü yardımıyla clip kenarlarından ittirilerek apareyden ayrıldı. Her bir örnek üzerlerine kod numaraları yazılarak içerisine fiksasyon amaçlı taze hazırlanmış % 2,5'luk (0.1 M fosfat tampon (PBS) içinde, pH 7.4) glutheraldehit solüsyonu koyulmuş plastik tüpler içerisine yerleştirildi (Resim 13).

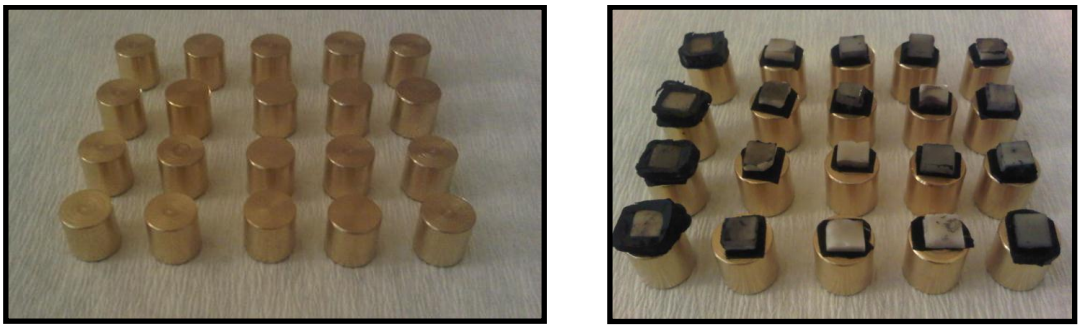


Resim 13: Apareylerden çıkarılan örneklerin plastik tüplere yerleştirilmesi

Örnekler 4 saat fikse edildikten sonra taze hazırlanmış PBS tampon (pH 7.4) solüsyonuna aktarılarak 12 saat boyunca buz dolabında +4 derecede bekletildi. 12 saatin sonunda tampon solüsyonundan çıkarılıp SEM takibi için hazırlandı.

SEM takibi

12 saat süreyle tamponla yıkanan örneklerin SEM takibi, Marmara Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalında yapıldı. Tampondan çıkarılan örnekler 1 saat süreyle osmiumda bekletildi. Yükselen alkol serilerinden geçirilerek yapılan dehidratasyon işleminden sonra amilasetat takibi (2alkol/1amilasetat, 1alkol/1amilasetat, 1alkol/2amilasetat, sırasıyla) yapıldı. Kritik nokta kurutucusu (Bio-Rad E 3000, Hertfordshire, UK) ile sıvı CO_2, de kurutulan örnekler taşıyıcılara yerleştirildi (Resim 14).



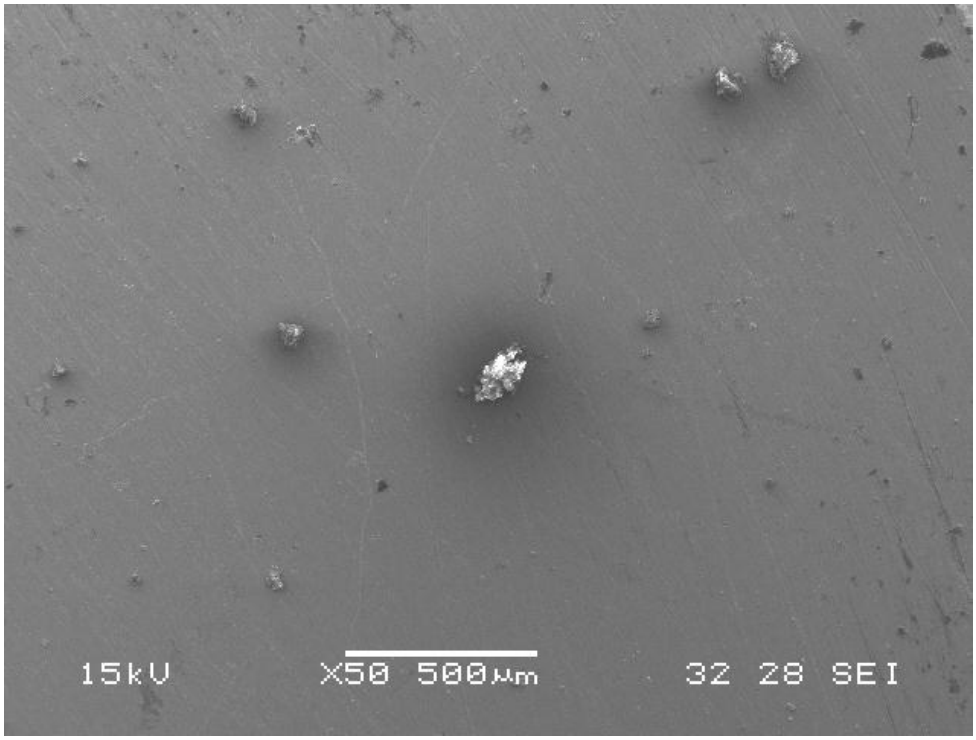
Resim 14: Altın kaplama için hazırlanan örnekler

Kurutma işleminden sonra altın partikülleri ile kaplanan (Bio-Rad SC502, Hertfordshire, UK) örnekler Yıldız Teknik Üniversitesi Merkez Laboratuarında SEM' de (Jeol 5600 JSM, Tokyo, Japan) incelendi ve fotoğraflandı (Resim 15).

Resim 15: Örneklerin kaplanması ve SEM cihazı

5.4. Oral Biyofilmin Çekilmiş Fotoğraflar Üzerinden Sayısal Olarak Değerlendirilmesi

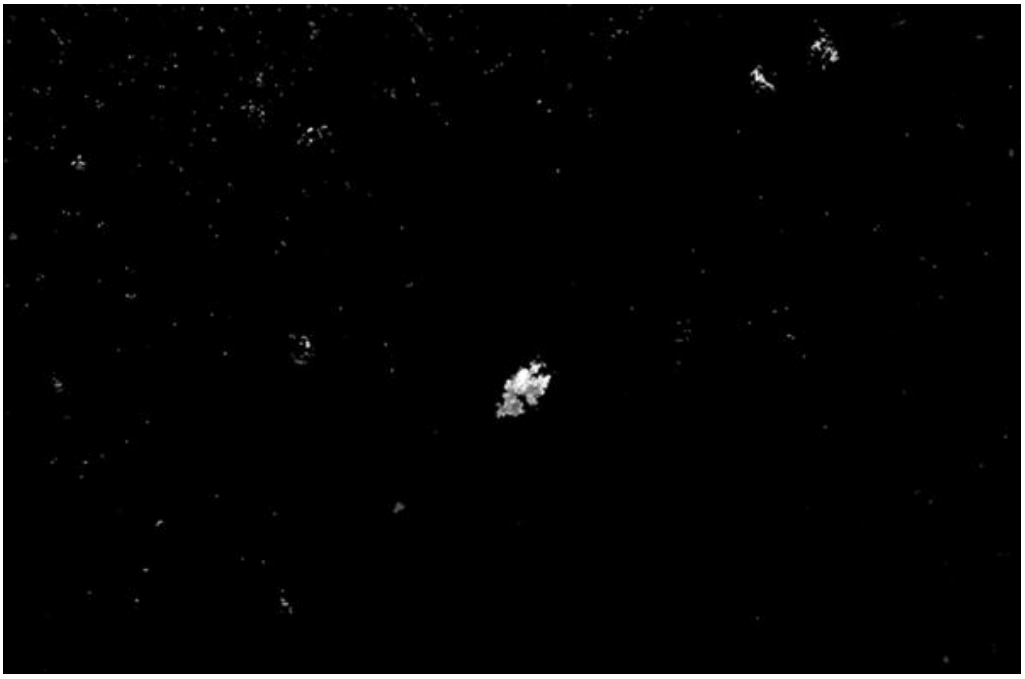
SEM'de incelen her bir örneğin x50, x150, x350 ve x500 büyütmede fotoğrafları çekildi. Araştırmamızda yapılacak sayısal ölçümler için örneklerin tüm yüzeylerini kapsayan x50 büyütmedeki fotoğrafları kullanıldı (Resim 16).



Resim 16: Örneklerin x50 büyütmede çekilen SEM görüntüsü

Her bir örnekten x 50 büyütmede çekilen fotoğraflar Adobe Reader Photoshop Magic Wand Tool Programı ile orijinal resmin tonlamasına uygun ve farklılıkları belirtecek şekilde yeniden renklendirildi. Daha sonra **Renk Yoğunluğu** adı verilen bu çalışma için özel olarak yazılmış bir bilgisayar programı kullanılarak renk yoğunluk tonlarına piksel bazında ayrıştırıldı. Kontrast renkler işaretlenerek açık renkte boyanan biyofilm alanlarının fotoğrafın tamamına olan yoğunluk oranları proglamla hesaplatıldı ve her bir örnek için yüzeye yayılmış homojen olmayan biyofilm alanlarının tüm örnek alanına olan yüzde değerleri kaydedildi (Resim 17,18,19).

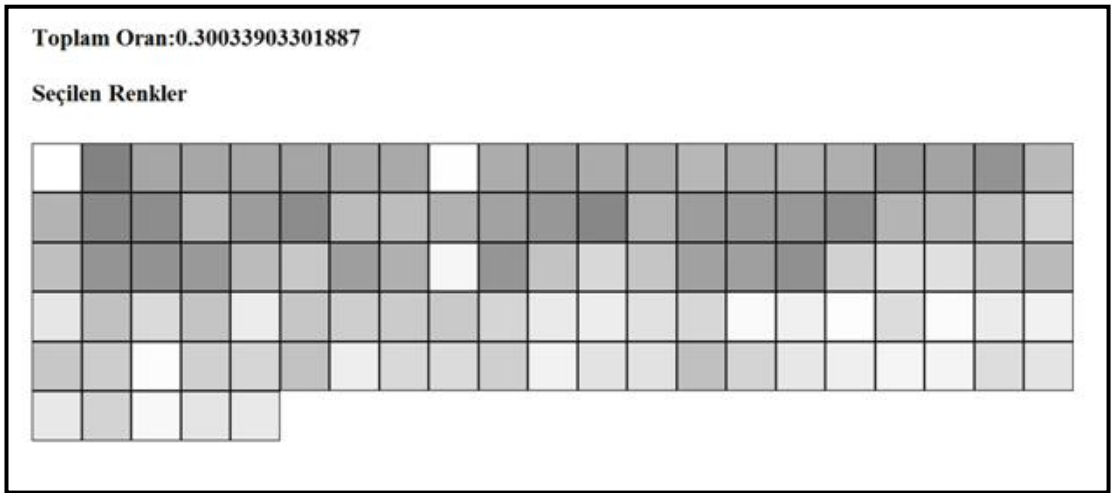
Her üç gruptan da elde edilen sayısal değerler Excel tablosuna kaydedildi.



Resim 17: Magic wand tool programı ile boyanmış SEM fotoğrafı

Sıra	Exam	RGB	HEX	Oran	Seç
1		0 0 0	000000	%97.892099056604	☐
2		1 1 1	010101	%1.3764003537736	☐
3		2 2 2	020202	%0.030955188679245	☐
4		255 255 255	FFFFFF	%0.025427476415094	☑
5		12 12 12	0C0C0C	%0.024690448113208	☐
6		5 5 5	050505	%0.022110849056604	☐

Resim 18: Renk yoğunluklarının hesaplanması

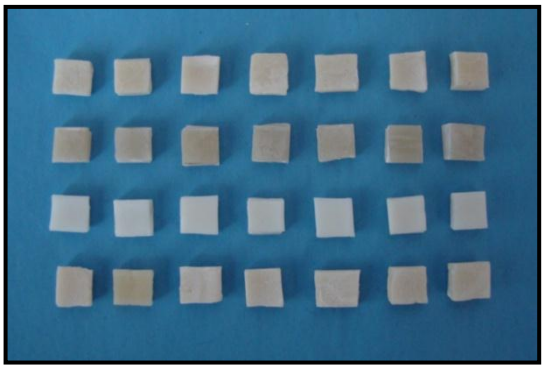


Resim 19: Elde edilen yoğunlukların toplamı (% olarak)

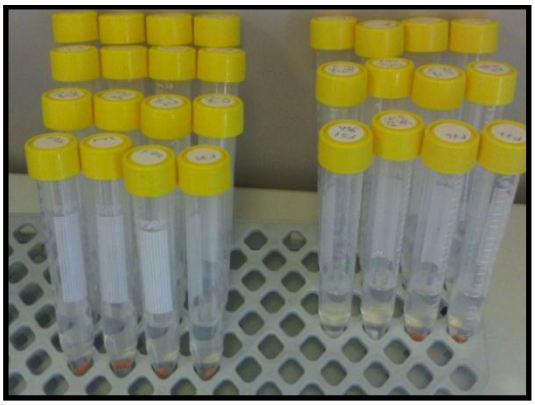
5.5. Araştırmada Kullanılan Dental Materyallerin Fluorid Salımının Değerlendirilmesi

5.5.1. Örneklerin hazırlanması

Araştırmamızda kullanılan Fuji VII Capsule (GC Fuji Triage, GC Corporation, Europe) fissür örtücü, Fuji IX GP Extra Capsule (GC Corporation, Europe) cam iyonomer siman, Helioseal F (Ivoclar, Vivadent, Schaan, Liechtenstein) fissür örtücü ve Dyract ® eKStra (Dentsplay, DeTrey, Germany) kompomer materyallerinden 5x5x2 mm boyutlarında üretici firma talimatları doğrultusunda 28'er adet olacak şekilde örnekler hazırlandı. Her bir örnek 2 ml'lik distile su içeren santrifüj tüplerine 1'er tane olacak şekilde yerleştirildi ve örnekler 37°C derecede etüvde saklandı (Resim 20).



Resim 20: Hazırlanmış örneklerin santrifüj tüplerine yerleştirilmesi

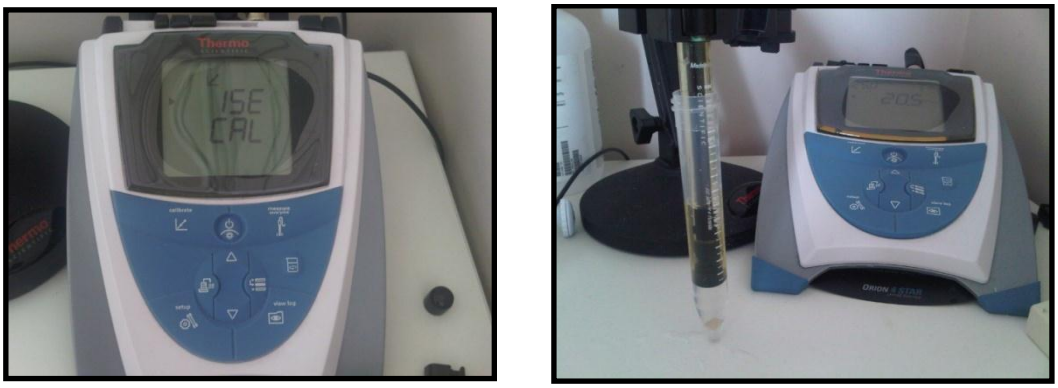


Resim 21: Santrifüj tüpüne yerleştirilen örneklerin etüvde bekletilmesi

5.5.2 Fluorid salımının ölçülmesi

İlk 24 saatin sonunda her materyalden 7'şer örnek içeren santrifüj tüpleri etüvden alındı ve 2'şer ml TISAB II (Total Ionic Strength Adjusment Buffer, Orion Ionplus Application Solution) her bir tüpe eklendi. Tüplerdeki sıvılar iyice karıştırıldıktan sonra 0,19 ile 19 ppm aralığında kalibre edilmiş Orion iyon spesifik fluorid elektrodunda her bir materyalin fluorid salım miktarı ölçülüp not edildi (Resim 22,23).

Resim 22: 0,1 M Fluorid ve TISAB II



Resim 23: Materyallerin fluorid salımının ölçülmesi

48. saatin sonunda her bir materyalden 7'şer adet daha etüvden alınarak her örneğe 2 ml TISAB II eklenerek karıştırılıp iyice çalkalandı ve yine fluorid salımları ölçülüp not edildi.

72. saatin sonunda her bir materyalden yine 7'şer adet etüvden alınarak her örneğe 2 ml TISAB II eklenerek karıştırılıp iyice çalkalandı ve yine fluorid salımları ölçülüp not edildi.

96. saatin sonunda son örnekler etüvden çıkarıldı ve her bir örnek üzerine 2 ml TISAB II eklenerek karıştırılıp iyice çalkalandı ve yine fluorid salımları ölçülüp not edildi.

5.6. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 15.0 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılıma uygun olmadığı saptanmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken niceliksel verilerin karşılaştırılmasında parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında Friedman testi ve anlamlılığa neden olan parametrenin tespitinde Wilcoxon işaret testi kullanıldı. Anlamlılık $p<0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

6. BULGULAR

Araştırmamıza yaşları 20-30 arasında değişen, 5'i kız ve 2'si erkek 7 kişi dahil edilmiştir. Bu kişilerin DMFT ortalamaları 1.14 olarak tespit edilmiştir.

6.1. Mine ve Dental Materyallerin Değerlendirilmesi

Araştırmamızda kullanılan mine ve dental materyaller üzerinde oluşan biyofilm tabakası, 3 farklı grup içinde ve gruplar arasında Kruskal Wallis ve Friedman Testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

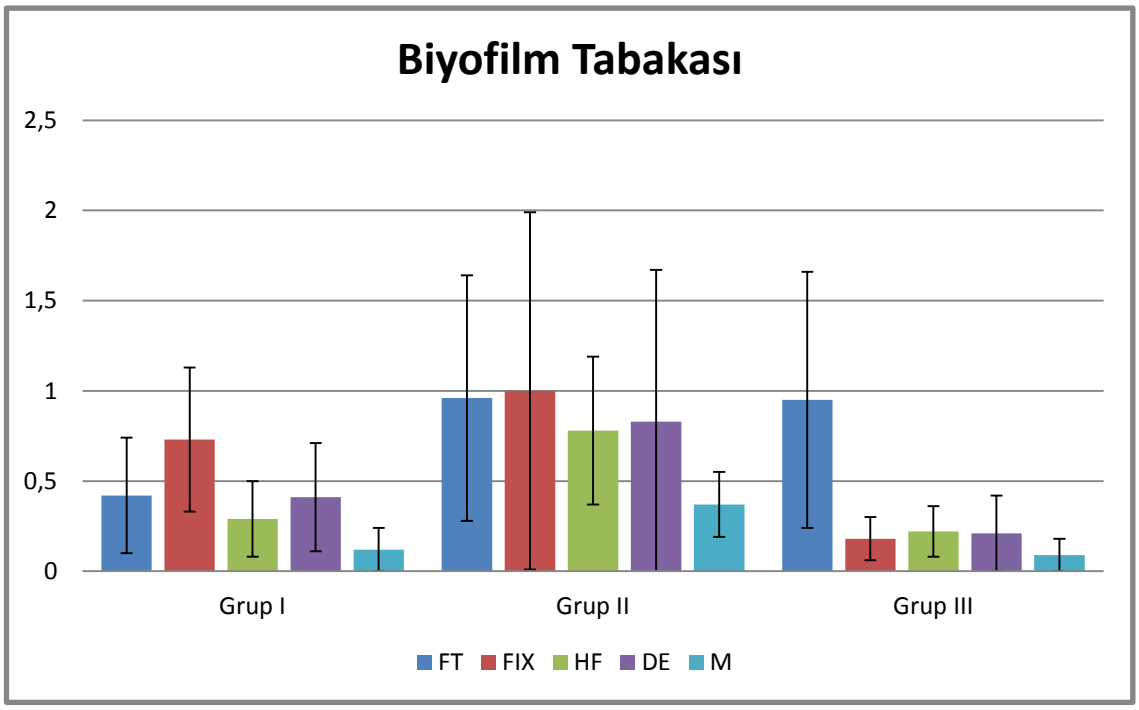
Grup içi ve gruplar arası mine ve dental materyallerdeki biyofilm miktarının ortalama değerleri, standart sapma değerleri, meydanları ve istatistiksel anlamlılık dereceleri Tablo 2' de gösterilmiştir.

Tablo 2: Grup içi ve gruplar arası materyallerin biyofilm miktarının değerlendirilmesi

	Grup I: normal flora Ort±SS (Medyan)	**Grup II: sükrozlu flora Ort±SS (Medyan)**	**Grup III: sükroz+ CPP-ACP'li flora Ort±SS (Medyan)**	**^{+}p**
Fuji Triage	0,428±0,32 (0,27)	0,961±0,68 (0,78)	0,953±0,71 (0,72)	***0,081***
Fuji IX GP Extra	0,735±0,40 (0,58)	0,998±0,99 (0,71)	0,189±0,12 (0,15)	***0,017****
Helioseal F	0,290±0,21 (0,26)	0,784±0,41 (0,89)	0,224±0,14 (0,21)	***0,024****
DyractExtra	0,419±0,30 (0,32)	0,832±0,84 (0,65)	0,214±0,21 (0,13)	***0,066***
Mine	0,124±0,12 (0,06)	0,374±0,18 (0,38)	0,092±0,04 (0,08)	***0,033****
^{++}p	***0,004*** **	***0,058***	***0,002*** **	

$^{+}$ *Kruskal Wallis Test* $^{++}$ *Friedman Test*

* $p<0.05$ ** $p<0.01$



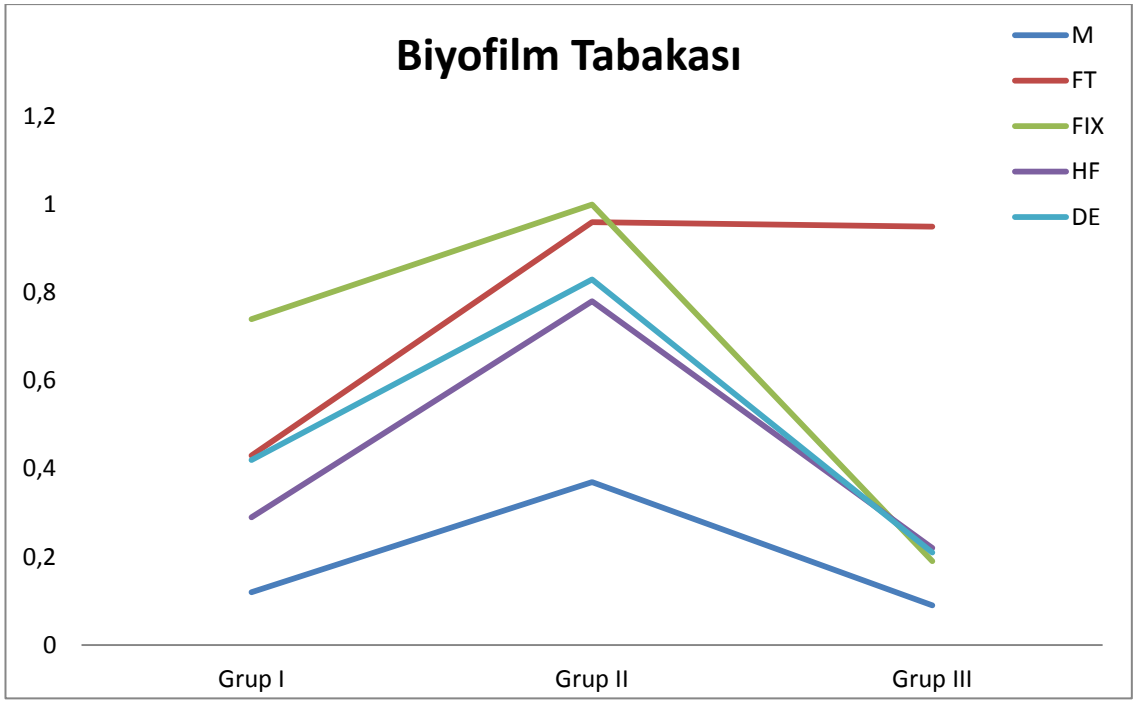
Şekil 10 : 3 ayrı grupta 4 farklı materyal ve mine örneklerinde oluşan biyofilm miktarının ortalama ve standart sapma değerleri

Tablo 2'de test için istatistiksel olarak farklılığı işaret eden anlam düzeyi, * ve ** şeklinde gösterilmiştir. Gruplar arasında Fuji Triage cam iyonomer ve Dyract Extra kompomer dental materyallerinde bir fark bulunmazken, Fuji IX GP Extra cam iyonomer, Helioseal F fissür örtücü ve mine örneklerinde istatistiksel anlamlılık tespit edilmiştir ($p<0.05$). Normal flora ve sükroz +CPP-ACP'li flora gruplarında, materyaller ve mine arasında anlamlı fark bulunurken ($p<0.05$), sükrozlu flora grubunda materyaller ve mine arasında anlamlı fark tespit edilmemiştir (şekil 10).

Tablo 3: Mine ve dental materyallerin gruplar arası post hoc değerlendirme sonuçları

	Grup I-II	Grup I-III	Grup II-III
	p	P	P
Fuji Triage	*0,035**	*0,085*	*0,949*
Fuji IX GP Extra	*0,949*	*0,004***	*0,048**
Helioseal F	*0,025**	*0,482*	*0,018**
DyractExtra	*0,277*	*0,180*	*0,025**
Mine	*0,035**	*0,848*	*0,018**

Mann Whitney U Test **p<0.05* *** p<0.01*



Şekil 11: 3 farklı grupta dental materyaller ve mine üzerinde oluşan biyofilm tabakasında görülen değişim eğrileri

Materyaller ve mine örneklerinin gruplar arası post hoc sonuçlarının değerlendirilmesinde Mann Whitney U testi kullanılmış ve sonuçlar Tablo 3'de verilmiştir**.**

Mine (M) bu araştırmada kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Mine üzerinde oluşan biyofilm miktarı açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). Sükroz varlığında (Grup II) mine üzerinde biyofilm oluşumu anlamlı derecede artmıştır ve sükroz ve CPP-ACP kullanımında (Grup III) ise sükrozlu ortama göre biyofilm miktarında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). Grup I ve Grup III arasında minede oluşan biyofilm miktarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3) (Şekil11).

Fuji Triage (FT) materyali açısından üç grup arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2). Üç grup arasında anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte, yapılan ikili değerlendirmelerde sükroz kullanımında (Grup II) biyofilm oluşumunun anlamlı derecede arttığı ancak sükroz ve CPP-ACP kullanımında (Grup III) biyofilm miktarında azalma olmadığı görülmüştür ($p<0.05$). Grup II ve III arasında Fuji Triage materyali açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo3) (şekil 11).

Fuji IX GP Extra (FIX) materyali açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). Sükrozlu (Grup II) ve normal floraya (Grup I) sahip her iki grupta da yüksek oranda biyofilm oluşumu tespit edilmiş olup sükroz ve CPP-ACP varlığında biyofilm miktarının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$, $p<0.01$). Grup I ve Grup II arasında Fuji IX materyalinde oluşan biyofilm miktarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3) (Şekil11).

Helioseal F (HF) materyali açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). Sükroz varlığında (Grup II) HF materyali üzerinde biyofilm oluşumu anlamlı derecede artmıştır ve sükroz ve CPP-ACP kullanımında (Grup III) ise sükrozlu ortama göre biyofilm miktarında anlamlı bir düşüş görülmüştür ($p<0.05$). Grup I ve Grup III arasında HF materyalinde oluşan biyofilm miktarında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3) (şekil 11).

HF materyali üzerinde oluşan biyofilm miktarı kontrol grubu mineyle benzer sonuçlar göstermiştir.

Dyract Extra (DE) materyali açısından üç grup arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 2). Üç grup arasında anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte, yapılan ikili değerlendirmelerde sükroz varlığında oluşan biyofilm miktarının, sükroz ve CPP-ACP kullanımında oluşan biyofilm miktarından anlamlı düzeyde yüksek olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Grup II ve III arasında DE materyali açısından anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 3) (şekil 11).

6.2. Grup I-II-III'ün Değerlendirilmesi

6.2.1. Mine ve dental materyallerin gruplar arası değerlendirilmesi

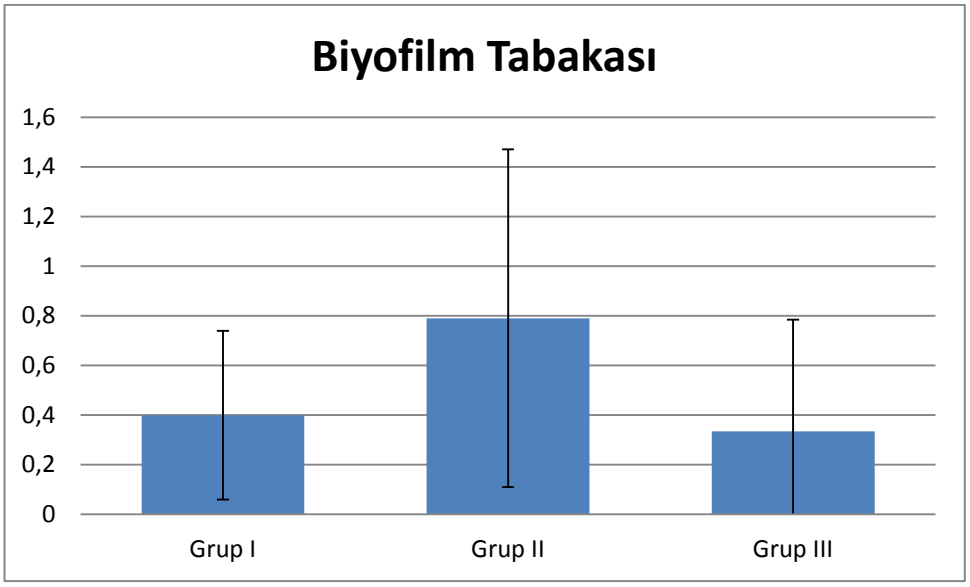
Materyaller üzerinde oluşan biyofilm tabakası gruplar arası değerlendirmeleri Kruskal Wallis ve Mann Whitney U Testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Tablo 4).

Tablo 4: Gruplar arası mine ve dental materyallerin değerlendirilmesi

	Biyofilm Tabakası Ort±SS (Medyan)	***Grup I-II*** ^{++}p	***Grup I-III*** ^{++}p	***Grup II-III*** ^{++}p
Grup I	0,399±0,34 (0,31)			
Grup II	0,790±0,68 (0,63)	***0,002*****	***0,096***	***0,001*****
Grup III	0,334±0,45 (0,17)			
^{+}p	***0,001*****			

$^{+}$ *Kruskal Wallis Test* $^{++}$ *Mann Whitney U Test*

* $p<0.05$ ** $p<0.01$



Şekil 12: Tüm materyallerin ve mine örneklerinin 3 farklı grupta tespit edilen biyofilm miktarı ortalamaları ve standart sapmaları

Grupların biyofilm tabakası düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Grup II'de sükroz varlığında oluşan biyofilm tabakası, Grup I'de normal florada ve Grup III'de CPP-ACP varlığında oluşan biyofilm tabakasından istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek iken ($p<0.01$); Grup I'de ve Grup III'de oluşan biyofilm tabakası miktarları arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Şekil 12).

6.2.2. Mine ve dental materyallerin grup içi değerlendirilmesi

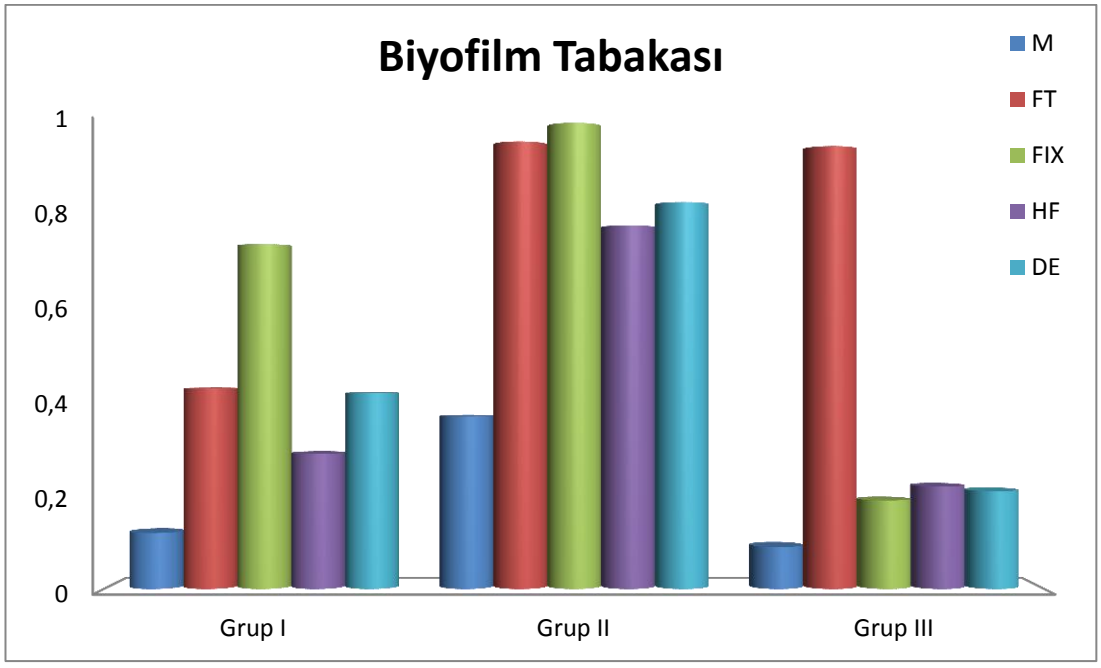
Materyaller üzerinde oluşan biyofilm tabakası grup içi değerlendirmeleri Wilcoxon Sign Testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Biyofilm tabakası ölçümlerinde elde edilen değerlerin standart sapma değerleri ortalamaya çok yakın olduğundan ve ortalama değer tek başına yeterli bir gösterge olmadığından sonuçlar ortanca değer (medyan) ile desteklenmiştir. Tablo 5'te materyallerin post hoc değerlendirmeleri için medyan değerleri kriter alınmıştır.

Tablo 5: Mine ve dental materyallerin grup içi post hoc değerlendirme sonuçları

	Grup I	Grup II	Grup III
FT - FIX	*0,128*	*0,672*	*0,018**
FT – HF	*0,310*	*0,237*	*0,018**
FT – DE	*0,735*	*0,612*	*0,018**
FT – M	*0,043**	*0,018**	*0,018**
HF - FIX	*0,091*	*0,612*	*0,499*
FIX – DE	*0,128*	*0,866*	*0,866*
FIX – M	*0,018**	*0,091*	*0,063*
HF – DE	*0,310*	*0,735*	*0,933*
HF – M	*0,018**	*0,018**	*0,023**
M - DE	*0,028**	*0,091*	*0,176*

Wilcoxon sign test ** p<0.05*



Şekil 13: Dental materyaller ve mine üzerinde oluşan biyofilm tabakasının her 3 grupta görülen ortalama değerleri

Grup I (normal flora)'de M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). Mine üzerinde oluşan ortalama biyofilm miktarı, FT, FIX, HF ve DE materyallerinde oluşan biyofilm miktarından anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Grup I' de diğer materyallerin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte ortalamalar bakıldığında en fazla biyofilm oluşumunun sırasıyla FIX, FT, DE, HF ve M şeklinde olduğu görülmektedir. ($p>0.05$) (Tablo 5) (Şekil 13).

Grup II (sükrozlu flora)'de M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). Mine üzerinde oluşan biyofilm miktarının ortalaması, FT ve HF materyallerinden anlamlı düzeyde düşük bulunmuştur ($p<0.05$). FIX ve DE ile mine arasında bir fark tespit edilmemiştir ($p>0.05$). Bu gruptaki diğer materyallerin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte ortalamalar bakıldığında en fazla biyofilm oluşumunun sırasıyla FIX, FT, DE, HF ve M şeklinde olduğu görülmektedir ($p>0.05$) (Tablo 5) (Şekil 13).

Grup III (CPP-ACP kullanılan sükrozlu flora)'de M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$) (Tablo 2). FT materyali üzerinde oluşan biyofilm miktarı ortalaması, FIX, HF, DE ve Mineden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). HF materyali biyofilm ortalaması, Mineden anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$). Bu gruptaki diğer materyallerin ortalamaları arasında anlamlı farklılık bulunmamakla birlikte ortalamalar bakıldığında en fazla biyofilm oluşumunun sırasıyla FT, FIX, DE, HF ve M şeklinde olduğu görülmektedir ($p>0.05$) (Tablo 5) (Şekil 13).

6.3. Dental Materyallerin Fluorid Salımlarının Değerlendirilmesi

Araştırmamızda kullanılan materyallerin grup içi ve gruplar arası fluorid salım düzeyleri Kruskal Wallis ve Friedman Testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

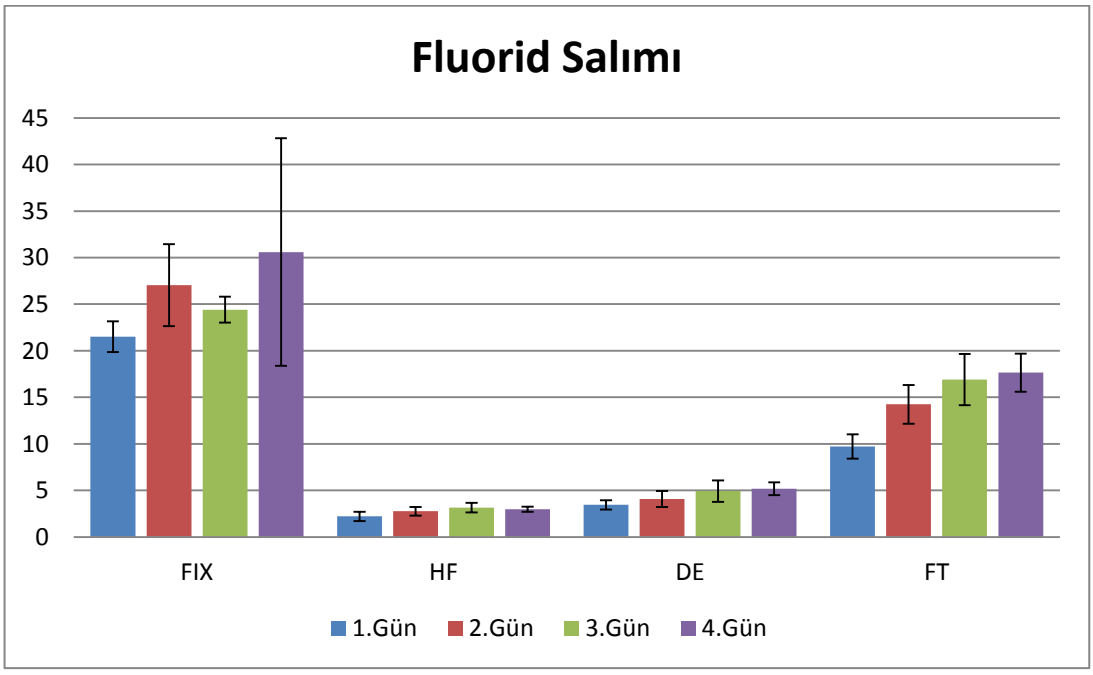
Grup içi ve gruplar arası materyallerdeki fluorid salım ortalama değerleri ve standart sapma değerleri Tablo 6' da gösterilmiştir.

Tablo 6: Grup içi ve gruplar arası dental materyallerin fluorid salım düzeylerinin değerlendirilmesi

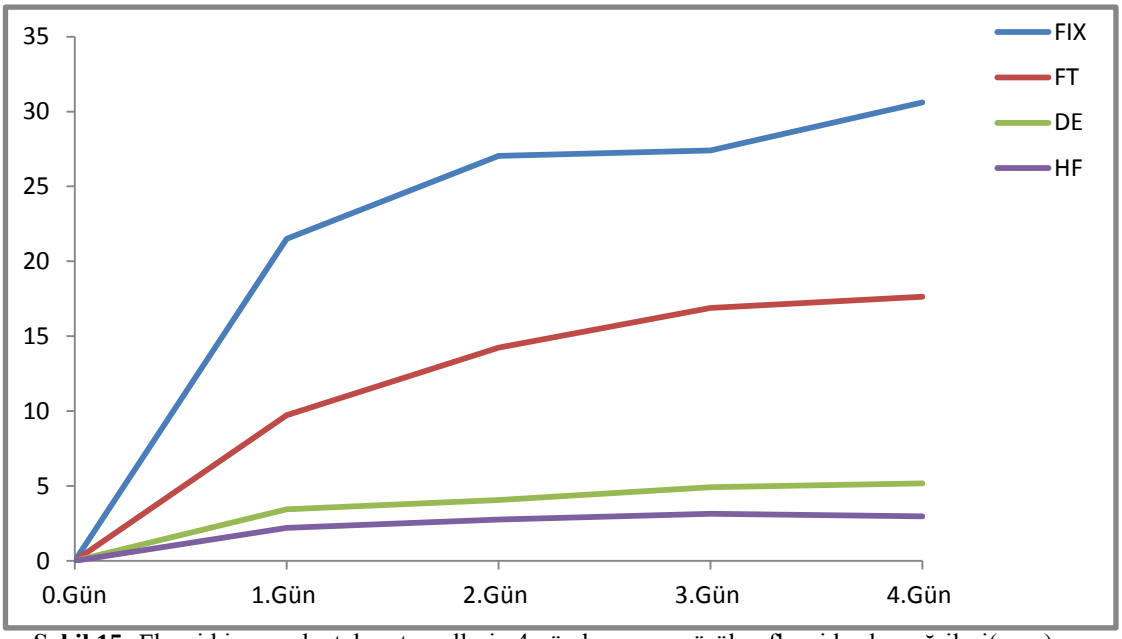
	FIX Ort±SS (Medyan)	HF Ort±SS(Medyan)	DE Ort±SS (Medyan)	FT Ort±SS (Medyan)	^{+}p
1.Gün	21,514±1,65 (20,8)	2,208±0,51 (2,31)	3,455±0,50 (3,47)	9,730±1,31 (9,56)	***0,001****
2.Gün	27,043±4,40 (26,8)	2,760±0,47 (2,71)	4,077±0,86 (4,43)	14,242±2,07 (13,9)	***0,001****
3.Gün	24,414±1,38 (24,3)	3,155±0,51 (3,06)	4,928±1,16 (5,09)	16,900±2,74 (17,9)	***0,001****
4.Gün	30,600±12,23 (26,8)	2,984±0,27 (3,01)	5,190±0,68 (5,53)	17,643±2,06 (18,3)	***0,001****
^{++}p	***0,006****	***0,045****	***0,047****	***0,001****	

$^{+}$ *Kruskal Wallis Test* $^{++}$ *Friedman Test*

* $p<0.05$ ** $p<0.01$



Şekil 14: Dental materyallerin 4 günlük fluorid salım düzeyleri (ppm)



Şekil 15: Fluorid içeren dental materyallerin 4 gün boyunca görülen fluorid salım eğrileri(ppm)

Materyallerin fluorid salımlarının gruplar arası ve grup içi post hoc değerlendirmeleri Mann Whitney U ve Wilcoxon Sign Testleri kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir (Tablo 7 ve 8).

Tablo 7: Dental materyallerin fluorid salımlarının gruplar arası post hoc değerlendirme sonuçları

	1.Gün	2.Gün	3.Gün	4.Gün
FIX-HF	*0,002***	*0,002***	*0,002***	*0,002***
FIX-DE	*0,002***	*0,002***	*0,002***	*0,002***
FIX-FT	*0,002***	*0,002***	*0,002***	*0,002***
HF-DE	*0,003***	*0,009***	*0,006***	*0,002***
HF-FT	*0,002***	*0,002***	*0,002***	*0,002***
DE-FT	*0,002***	*0,002***	*0,002***	*0,002***

Mann Whitney U Test *** p<0.01*

Materyallerin **1. Gün** fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 6). FIX materyalinin 1. Gün fluorid salım düzeyi, diğer tüm materyallerden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). FT materyalinin 1. Gün fluorid salım düzeyi, DE ve HF materyallerinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). DE materyalinin 1. Gün fluorid salım düzeyi, HF materyalinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$) (Tablo 7) (Şekil 14 ve 15).

Materyallerin **2. Gün** fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 6). FIX materyalinin 2. Gün fluorid salım düzeyi, diğer tüm materyallerden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). FT materyalinin 2. Gün fluorid salım düzeyi, DE ve HF materyallerinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). DE materyalinin 2. Gün fluorid salım düzeyi, HF materyalinin fluorid salım düzeyinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$) (Tablo 7) (Şekil 14 ve 15).

Materyallerin **3. Gün** fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 6). FIX materyalinin 3. Gün fluorid salım düzeyi, diğer tüm materyallerden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). FT materyalinin 3. Gün fluorid salım düzeyi, DE ve HF materyallerinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). DE materyalinin 3. Gün fluorid salım düzeyi, HF materyalinin fluorid salım düzeyinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$) (Tablo 7) (Şekil 14 ve 15).

Materyallerin **4. Gün** fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$) (Tablo 6). FIX materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi, diğer tüm materyallerden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). FT materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi, DE ve HF materyallerinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$). DE materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi, HF materyalinin fluorid salınım düzeyinden anlamlı şekilde yüksektir ($p<0.01$) (Tablo 7) (Şekil 14 ve 15).

Tablo 8: Dental materyallerinin fluorid salım düzeylerinin grup içi post hoc değerlendirme sonuçları

	FIX	HF	DE	FT
1. gün-2.gün	*0,018**	*0,176*	*0,176*	*0,018**
1. gün-3.gün	*0,027**	*0,028**	*0,028**	*0,018**
1.gün-4.gün	*0,018**	*0,028**	*0,018**	*0,018**
2.gün-3.Gün	*0,128*	*0,237*	*0,176*	*0,063*
2.gün-4.Gün	*0,672*	*0,398*	*0,176*	*0,018**
3.gün-4.gün	*0,176*	*0,496*	*0,499*	*0,933*

Wilcoxon sign test ** p<0.05*

FIX materyalinin 1. Gün, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.01) (Tablo 6). 1. Gün fluorid salım düzeyine göre, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeylerinde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). FIX materyalinin 2. Gün, 3. Gün ve 4. Günlerdeki fluorid salım düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 8).

HF materyalinin 1. Gün, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.05) (Tablo 6). 1. Gün fluorid salım düzeyine göre, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeylerinde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). HF materyalinin diğer günlerdeki fluorid salım düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 8).

DE materyalinin 1. Gün, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.05) (Tablo 6). 1. Gün fluorid salım düzeyine göre, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeylerinde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur (p<0.05). DE materyalinin diğer günlerdeki fluorid salım düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05) (Tablo 8).

FT materyalinin 1. Gün, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı farklılık bulunmaktadır (p<0.01)

(Tablo 6). 1. Gün fluorid salım düzeyine göre, 2. Gün, 3. Gün ve 4. Gün fluorid salım düzeylerinde görülen artışlar istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). 2. Gün fluorid salım düzeyine göre 4. Gündeki fluorid salım düzeyinde görülen artış istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Diğer günlerdeki fluorid salım düzeyleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 8).

6.4. Dental Materyallerin Fluorid Salımı ile Biyofilm Arasındaki İlişkinin Değerlendirilmesi

Dental materyallerin fluorid salımı ile materyaller üzerinde oluşan biyofilm tabakası arasındaki ilişki Spearman's Rho testi kullanılarak istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Araştırmamızda kullanılan dental materyallerin 4. Gün sonunda fluorid salım düzeyleri ile normal florada, sükrozlu florada ve CPP-ACP varlığında sükrozlu florada, dental materyaller üzerinde 4 günde oluşan biyofilm tabakasının miktarı arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi Tablo 9' da görülmektedir.

Tablo 9: Gruplarda dental materyaller ile 4. Günde fluorid salım düzeylerinin değerlendirilmesi

	Grup I		**Grup II**		**Grup III**	
	r	**P**	**r**	**P**	**r**	**p**
FT	-0,143	***0,760***	-0,250	***0,589***	0,571	***0,180***
FIX	-0,679	***0,094***	-0,464	***0,294***	0,429	***0,337***
HF	0,107	***0,819***	0,607	***0,148***	0,143	***0,760***
DE	-0,667	***0,102***	0,487	***0,268***	-0,613	***0,144***

Spearman's rho test

Grup I'de;

FT materyalindeki biyofilm tabakası ile FT materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

FIX materyalindeki biyofilm tabakası ile FIX materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

HF materyalindeki biyofilm tabakası ile HF materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

DE materyalindeki biyofilm tabakası ile DE materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Grup II'de;

FT materyalindeki biyofilm tabakası ile FT materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

FIX materyalindeki biyofilm tabakası ile FIX materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

HF materyalindeki biyofilm tabakası ile HF materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

DE materyalindeki biyofilm tabakası ile DE materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

Grup III'de;

FT materyalindeki biyofilm tabakası ile FT materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

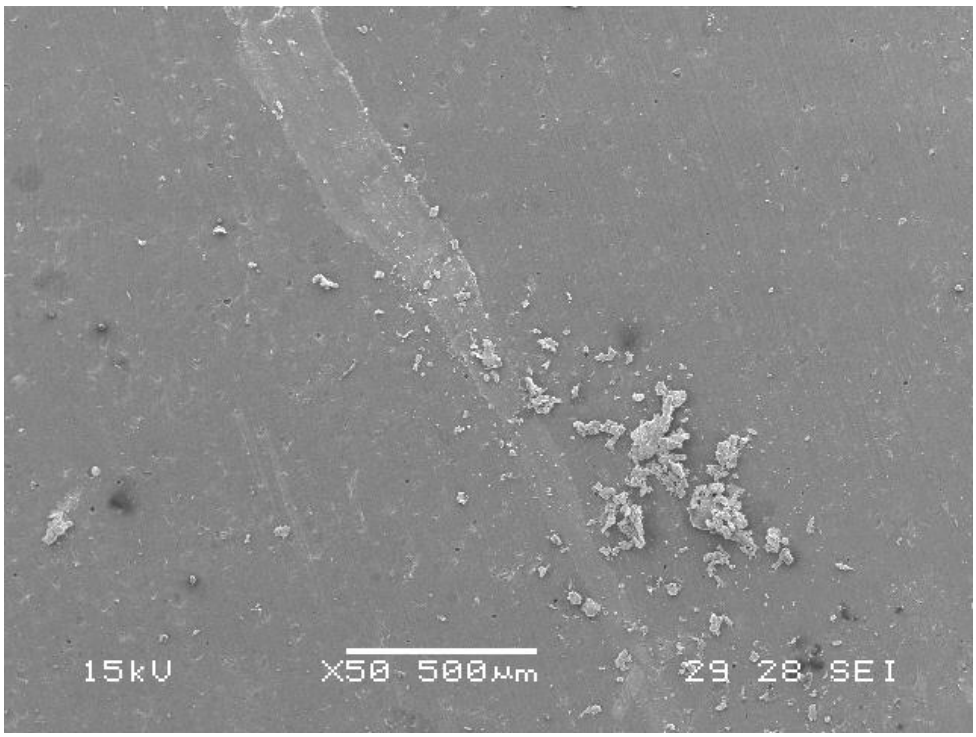
FIX materyalindeki biyofilm tabakası ile FIX materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

HF materyalindeki biyofilm tabakası ile HF materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

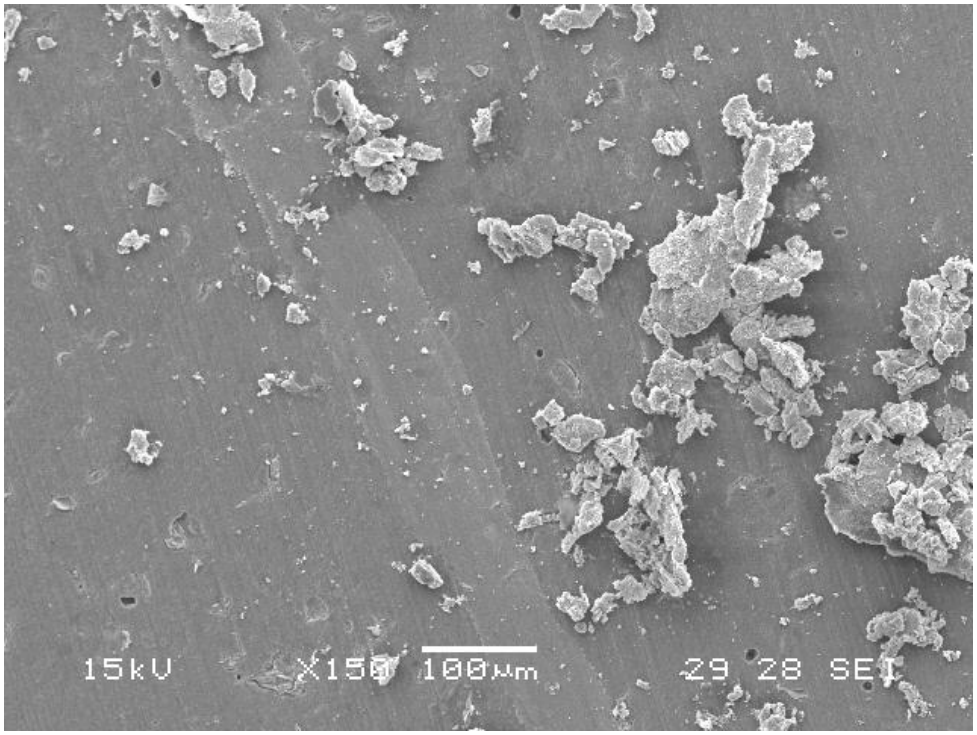
DE materyalindeki biyofilm tabakası ile DE materyalinin 4. Gün fluorid salım düzeyi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki bulunmamaktadır ($p>0.05$) (Tablo 9).

6.5. Örnekler Üzerinde Oluşan Biyofilm Tabakasının SEM Görüntüleri

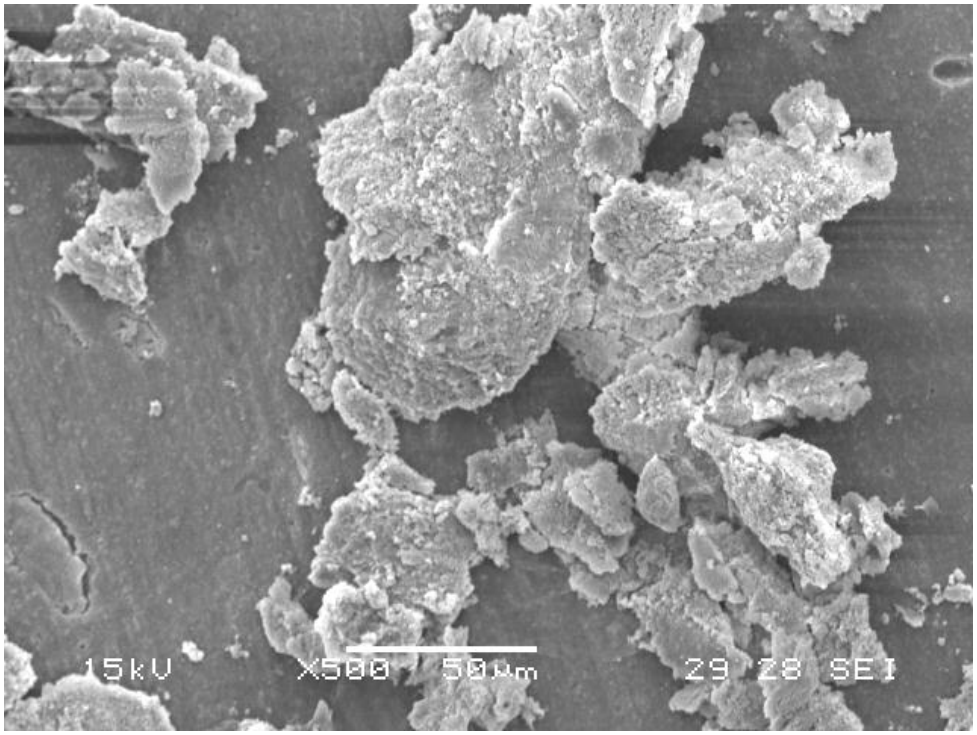
Ağız içerisinde üzerinde biyofilm oluşturulan bir örneğin sükroz varlığında farklı büyütmelerdeki görüntüleri incelendiğinde oluşan biyofilm tabakası net bir şekilde görülmektedir (Resim 24,25,26).



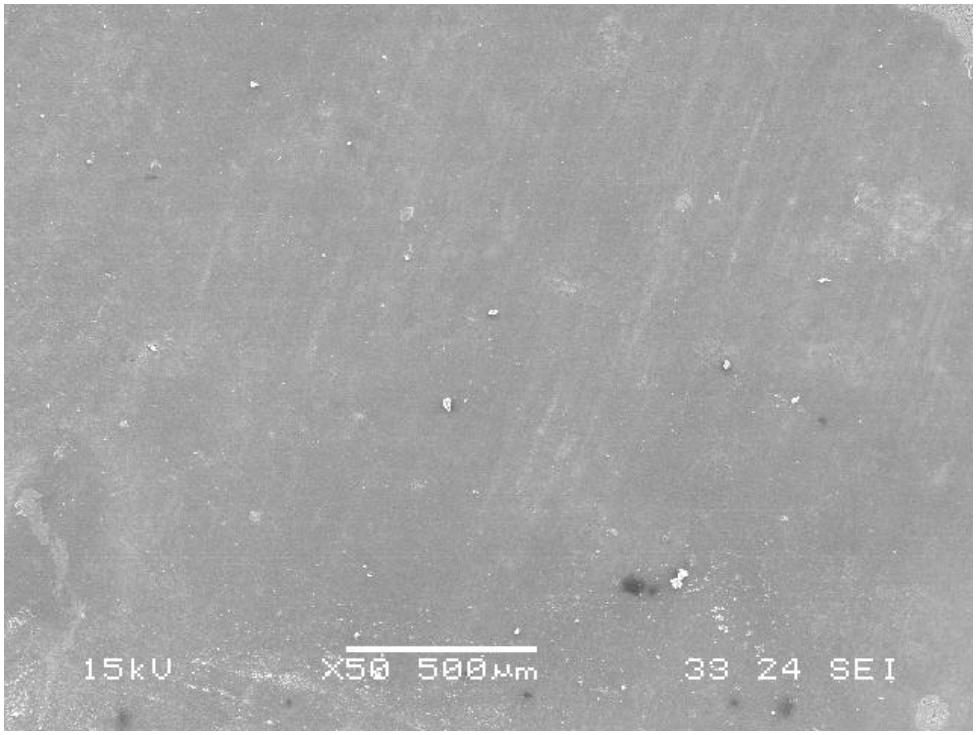
Resim 24: Sükrozlu florada x50 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü



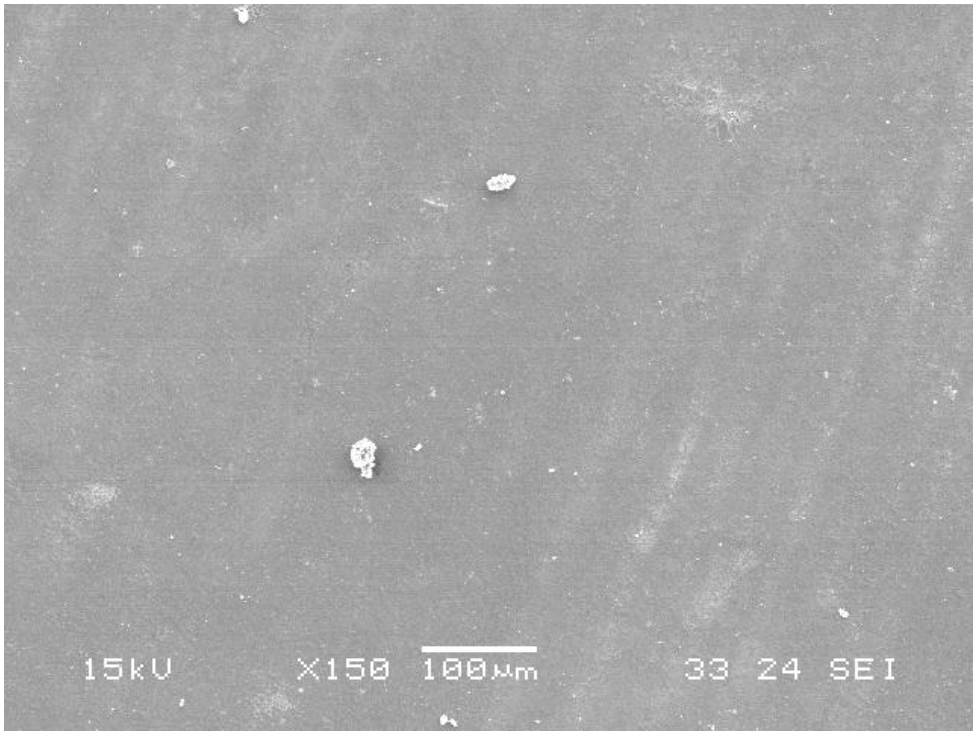
Resim 25: Sükrozlu florada x150 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü



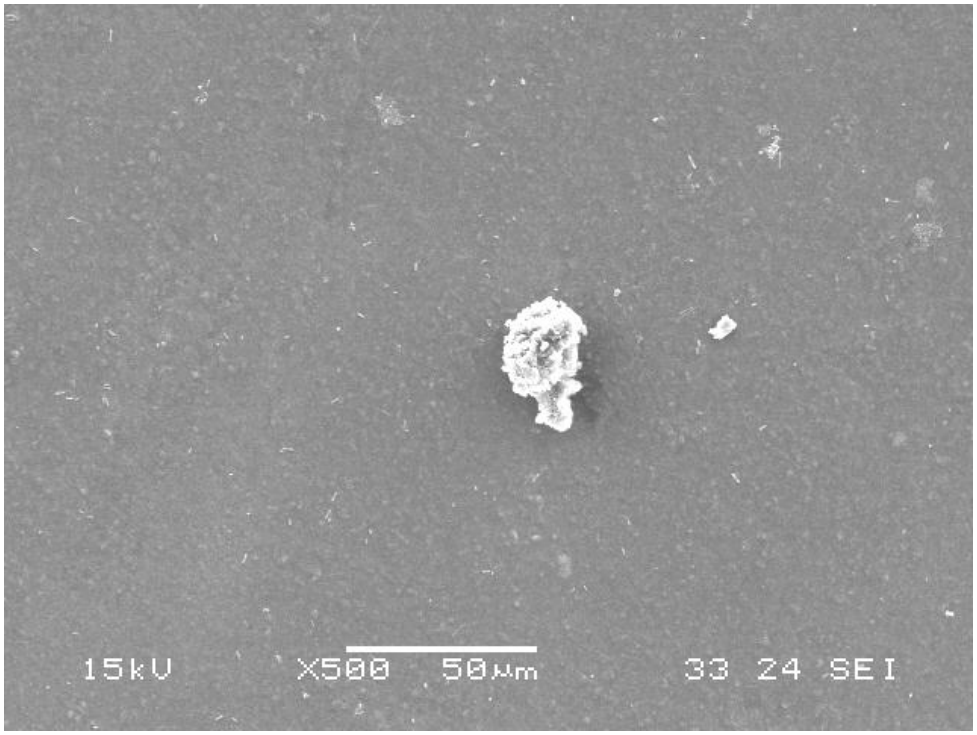
Resim 26: Sükrozlu florada x500 büyütmede örnek üzerindeki biyofilmin SEM görüntüsü



Resim 27: Sükroz + CPP-ACP varlığında x50 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü



Resim 28: Sükroz + CPP-ACP varlığında x150 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü



Resim 29: Sükroz + CPP-ACP varlığında x500 büyütmede örnek üzerindeki biyofilm görüntüsü

Sükroz ve CPP-ACP varlığında ağız içerisinde üzerinde biyofilm oluşturulan bir örneğin farklı büyütmelerdeki görüntüleri incelendiğinde oluşan biyofilm tabakası net bir şekilde görülmektedir (Resim 27,28,29).

7. TARTIŞMA

Oral biyofilm, diş minesi, kök yüzeyi, dental materyaller ve dental implantlar gibi yüzeyler üzerine yapışan biyolojik birikintiler olarak tanımlanır ve ekstrasellüler polisakkarit bir matriks (EPS) içerisine gömülü halde bulunan bakteri topluluklarını içermektedir (160).

Oral biyofilm ile ilgili bugüne kadar yapılan çalışmalarda biyofilmin bakteriyel içeriği, bakteriyel tutunma mekanizmaları, antibakteriyal ajanlarla etkileşimleri, immun yanıtlar gibi özellikler araştırılmıştır. Oral biyofilm sahip olduğu karmaşık yapısı nedeniyle ve yüzlerce bakteri içermesinden dolayı hala araştırılması gereken bir konudur. Bu karmaşık yapının anlaşılması yönünde *in vitro* koşullarda tek veya bir çok bakterinin bir arada bulunduğu biyofilm sistemleri üzerinde çalışılmaktadır ve *in vitro* koşullarda oluşturulan biyofilmin doğada oluşan biyofilm arasında benzerlik gösterdiği bildirilmektedir (13,29).

Biyofilm mekanizmasının daha net anlaşılabilmesi için model sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu amaçla insan ağız ortamını taklit edebilen intra-oral model sistemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu modellerin mikrobiyolojik açıdan önemi, deney yüzeylerinde doğal biyofilm oluşumunu sağlayabilmeleridir. Doğal biyofilm kompozisyonuyla benzer yapıda mikroflora oluşumuna imkan vermeleri nedeniyle *in situ* modellerin gerekliliği giderek artmaktadır (77).

İn situ modeller kontrolsüz doğal klinik olgular ile kontrolü oldukça yüksek laboratuar olguları arasında bir köprü gibidirler (159). İn vitro çalışmalar biyoadezyon mekanizmasını tam olarak yansıtamaz, bu nedenle daha ayrıntılı bilgiye sahip olmak için *in situ* ve *in vivo* çalışmalar önerilmektedir. Oral kavite noninvaziv olarak protein ve substrat etkileşimini incelemek için mükemmel bir *in vivo* modeldir (52).

Auschill ve ark. (10), *in situ* bir çalışmalarında, klorheksidin ve amin/kalay fluoridin içeren solüsyonların oral biyofilme etkisini su ile kıyaslamışlardır. 7 katılımcıya steril cam plakalar içeren apareyleri 48 saat boyunca kullandırmışlar ve vital floresan boyama yöntemiyle vital ve devital bakterileri, CLSM görüntüleme tekniğiyle de biyofilm kalınlığını incelemişlerdir.

Jentsch ve ark. (61), 3 farklı ağız gargarasının oral biyofilme etkisini incelemek için *in situ* bir çalışma planlamışlardır. 21 katılımcının 36 ve 46 numaralı dişlerine 3 er adet sığır mine örnekleri taşıyan akrilik splintleri bir rezin materyali yardımıyla yerleştirmişlerdir ve 72 saat süreyle kullandırmışlardır. Çalışmanın sonucunda biyofilm kalınlığı TEM görüntüleme tekniğiyle kantitatif olarak incelemişlerdir.

İn vitro çalışmalarda ağız içi koşulların tam olarak taklit edilememesi nedeniyle çalışmamızda oral biyofilm tabakası oluşturmak için *in situ* koşullarda bir araştırma yapmayı hedefledik. 7 katılımcıyla planladığımız *in situ* çalışmamızda çocuk diş hekimliğinde yaygın kullanım alanına sahip farklı dental materyaller üzerinde 3 farklı koşulda oluşan biyofilm tabakasını inceledik . Örnekler üzerinde oluşan biyofilm tabakasını ölçmek için SEM görüntüleme yönteminden yararlandık ve dental materyaller üzerinde farklı koşullarda oluşan biyofilm miktarında anlamlı farklılıklar olduğunu gözlemledik.

İn situ çalışmalarda standardizasyonu sağlamak amacıyla katılımcıların yaş ve cinsiyet haricinde bazı spesifik kriterlere de sahip olmaları gerekmektedir. Literatürlerde intra-oral modeller ile yapılacak çalışmalarda yer alabilecek katılımcıların;

- Ağız içerisinde herhangi bir başka protetik veya ortodontik aparey kullanmayan,
- Çalışmanın takibi açısından kontrolleri aksatmayan,
- Tükürük akışını ve florayı etkileyebilecek herhangi bir antibiyotik veya ilaç kullanmayan,
- Tükürük akış hızı normal ve herhangi bir sistemik rahatsızlığa sahip olmayan,
- Aktif çürük veya periodontal hastalığı olmayan kişiler olmaları gerektiği belirtilmektedir (144).

Bu kriterler göz önüne alınarak tez çalışmamızdaki katılımcıları; randevuların takibi, diet ve fırçalama alışkanlıklarının kontrolü ve intra-oral aparey kullanımını tolere edebilmeleri açısından cinsiyet ayrımı yapmaksızın yaşları 20 ile 30 arasında değişen kişilerden seçmeyi tercih ettik.

İntra-oral apareylerin planlanması, çalışmada kullanılacak örneklerin sayısı, araştırılmak istenen materyaller, kullanım süresi ve biyofilm birikiminin nasıl olacağı kriter alınarak planlanmalıdır (144). Bu bilgiler doğrultusunda çalışmamızda kullanılacak materyal sayısının çokluğu ve biyofilm oluşumu için tükürükle temasının yeterli derecede sağlanabilmesi nedeniyle palatal aparey modeli kullandık.

Dişler sürer sürmez ya da temizlendikten hemen sonra çıplak diş yüzeyi **pelikıl** adı verilen aselüler proteinöz yapıda bir film tabakasıyla kaplandığı ve mikroorganizmaların pelikıl üzerine kolonizasyonunun ilk 24 saat içerisinde olduğu bilinmektedir. Mikrobiyal yığılım ve koagregasyonla farklı mikrokoloni türlerinin gelişim ise 1-14 gün içerisinde belirgin bir şekilde gözlenmiştir (81).

Auschill ve ark. 2002 yılında biyofilmin dental restoratif materyaller üzerindeki etkisini inceledikleri *in situ* çalışmalarında katılımcılara 5 gün süreyle, aynı araştırmacıların 2005 yılında antimikrobiyal ajanların biyofilm oluşumuna etkisini değerlendirdikleri başka bir *in situ* çalışmalarında 48 saat süreyle, yine Dige ve ark. 2007' de yaptıkları bir *in situ* araştırmada katılımcılara 48 saat süreyle intra-oral apareyler kullandırmışlardır (9,10,33). Bu çalışmalar baz alınarak biz de çalışmamızda hem biyofilm oluşumu için yeterli bir süre olması ve SEM takibi açısından hem de katılımcıların palatal apareylerin uzun süreli kullanımında yaşayabilecekleri sıkıntılar nedeniyle deney süremizi 4 gün olarak belirledik.

Dişler sürer sürmez ağız ortamında mikroorganizmalar ile kontamine olmaktadır (78). Dişlerin sahiplerinin yaşları, kültürleri, diyet alışkanlıkları ve sağlık durumları gibi değişkenleri kontrol etmenin mümkün olmaması, dişlerin yapısını standardize etmeyi zorlaştırmaktadır. Tüm bu faktörleri göz önüne alarak çalışmamızda, yaşları 25-40 arası bireylerden çekilen, tam gömük insan 3. molar dişlerini kullandık.

Dental araştırmalarda kullanılan çekilmiş dişlerin sterilizasyonunu sağlamak ve bakteri kontaminasyonunu engellemek için pek çok farklı sterilizasyon yöntemi ve saklama koşulları bulunmaktadır. CDC (Central for disease control and prevention)'nin standart prensiplerine göre araştırmalarda kullanılacak çekilmiş dişlerin enfeksiyon kontrolü için otoklavda 40 dakika steril edilmesi uygun görülen yöntemlerden biridir (65). Biz de çalışmamızda çekilmiş insan 3. tam gömük

dişlerini 121°C derecede 15 atm basınçta 40 dakika steril ettik ve sonrasında apareylere yerleştirinceye kadar distile suda beklettik.

Yapılan çalışmalarda biyofilmin ultrastrüktürel yapısını, içeriğindeki mikroorganizmaları, yüzeylere adzeyonunu, EPS ve mikroorganizma ilişkilerini incelemek için farklı görüntüleme yöntemlerinin kullanıldığı bilinmektedir (61,110,150).

Jentsch ve ark. (61), klorheksidin diglukonat, amin/kalay fluorid ve sodyum kloridin biyofilm üzerine etkilerini inceledikleri *in situ* bir çalışmada oluşan biyofilm kalınlığını ve kompozisyonunu incelemek için TEM yöntemini kullanmışlar ve 24, 48 ve 72 saat sonundaki biyofilm kalınlığını ve kompozisyonunu kantitatif olarak analiz etmişlerdir.

Auschill ve ark. 2002 yılında farklı dental materyaller üzerinde oluşan biyofilmin vitalite yüzdesini belirlemek amacıyla yaptıkları bir çalışmada VF tekniği uyguladıkları biyofilmi CLSM yöntemi kullanarak incelemişler ve 6 farklı dental materyal üzerinde oluşan biyofilmin vitalitesi, kapladıkları yüzey alanı ve biyofilm yüksekliği hakkında sonuçlar elde etmişlerdir (9).

Yine Auschill ve ark. 2005 yılında yaptıkları başka bir *in situ* çalışmada, VF ve CLSM yöntemlerini birlikte kullanmışlardır. Klorheksidinli (CHX) ve amin/kalay fluoridli (ASF) iki gargaranın biyofilm kalınlığı ve biyofilm vitalitesi üzerindeki etkilerini incelemişlerdir (10).

Vitkov ve ark. (150), klorheksidinin oral biyofilm üzerindeki etkilerini incelemek için yaptıkları bir elektron mikroskop çalışmasında, üzerinde biyofilm oluşmuş diş eti epitel hücrelerine 1-5 dakika boyunca % 0.1lik klorheksidin uygulamışlar ve SEM incelemesi sonunda bakteriyel glikokaliks ve biyofilm matriksini incelemişler ancak klorheksidine bağlı herhangi bir değişikliğe rastlamamışlardır. Yine aynı çalışmada TEM ile yapılan inceleme sonucunda ise birkaç bakterinin bakteriyel membran bütünlüğünde bozulmalar olduğunu bildirmişlerdir.

Dige ve ark. (33), biyofilm içerisindeki çoklu bakteri topluluğu içerisindeki spesifik bakteri türlerinin birbirleriyle olan ilişkilerini inceleyebilmek amacıyla

CLSM ve FISH yöntemlerini kombine kullanmışlar ve streptokokları diğer bakteri topluluğundan ayrıştırarak inceleme imkanı elde etmişlerdir.

Reese ve ark. (110), yaptıkları *in vitro* bir çalışmada TEM yöntemini kullanarak farklı türlerin biyofilm tabakasını incelemişlerdir. İşlemler sırasında EPS'de meydana gelen büzülmeyi engellemek için klasik dehidratasyon ajanlarının yerine etilen glikol ve 1,2-pentanediol kullanmışlar ve sonuç olarak *in vitro* biyofilm modeli içerisindeki 6 farklı türü ultrasütrüktürel seviyede incelemeyi başarmışlardır.

Taramalı elektron mikroskobu (SEM), diş dokuları ile restoratif sistemler arasındaki dinamik ve kimyasal etkileşimi değerlendirmede kullanılan yüzey analiz tekniklerinden birisidir (40). Yüksek çözünürlük görüntüleme tekniği sayesinde hücrelerinin, dokuların, intrasellüler yüzeylerin, virüslerin, proteinlerin ve nükleik asitlerin incelenmesini sağlar (36,48). SEM' de görüntü oluşturma örnek üzerine gönderilen elektron demetinin örnekten yansıması ve yansıyan sinyallerin algılanması esasına dayanır. SEM tekniklerinin kullanılması görüntülerde mükemmel alan derinliği sağlar ve morfolojiyi tanımlamaya oldukça elverişlidir (156). Tekrarlanabilir ölçümler yapabilmek ve örneklerimizin tamamını görüntülemek amacıyla çalışmamızda biyofilm inceleme yöntemi olarak SEM kullanmayı tercih ettik.

Bugüne kadar yapılan araştırmalarda incelendiğinde, oral biyofilmle ilgili pek çok *in vitro* çalışmaya rastlanmıştır. *İn vivo* ve *in situ* çalışmalar ise oldukça azdır. Çalışmalarda biyofilmin içeriğinde bulunan bakteri tipler ve morfolojileri, oluşum mekanizmaları, karyojeniteleri, antibakteriyel ajanlarla olan ilişkileri, çürük ve periodontal hastalıkların oluşumundaki etkileri, adezyon tipleri incelenmiş ve çok oral biyofilm hakkında önemli bulgular elde edilmiştir.

Oral kavitede biyofilmlerin sadece diş yüzeyinde değil, dental materyaller üzerinde de oluştuğu bilinmektedir (17). Farklı mikroorganizmaların farklı dental materyallere adezyonunu incelemek amacıyla *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmıştır (86). İn vitro çalışmalar bazı dental materyallerin karyojenik bakterilerin gelişimini inhibe ettiğine dair bulgular ortaya koymuş olsa da *in vivo* ve *in situ* çalışmaların sonuçları farklılık göstermektedir. Bu nedenle dental materyallerin biyofilm ile ilişkisini değerlendirmek için laboratuar çalışmalarının sonuçlarını

destekleyici araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır (135). Biz de bu amaçla çalışmamızda çocuk diş hekimliğinde en sık kullanılan dental materyallerin biyofilm ile olan ilişkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Bugüne kadar yapılan araştırmalar, dental materyaller ile mikroorganizma ilişkisinin anlaşılması hakkında bilgiler ortaya koymuştur (2,118,135,137,). Ancak dental materyaller üzerinde ağız içinde doğal oluşan biyofilm tabakasının, materyal üzerindeki yayılımının ve birikinti miktarının doğrudan incelendiği bir çalışmaya literatürlerde rastlanılmamıştır. Bu nedenle çalışmamızda, *in vivo* şartlar altında dental materyaller üzerinde doğrudan oluşturduğumuz biyofilm miktarını incelemeyi ve farklı koşulların biyofilm üzerindeki etkilerini incelemeyi hedefledik.

Cam iyonomerler karmaşık yapıdadır ve piyasada bulunan sistemlerin hepsi kimyasal veya mekanik olarak birbirinden farklıdır. Fluorid salımı ve adeziv özelliklerinden kaynaklanan avantajları cam iyonomerlerin restoratif, kaide ve yapıştırma materyali gibi değişik formlarda ve amaçlarda yaygın olarak kullanımını sağlamıştır. Cam iyonomerlerin fiziksel özelliklerini artırmak için makinede karıştırılan kapsül formları da geliştirilmiştir (141).

Shahal ve ark. (129)'nın yaptıkları, *S. Mutans*'ların 3 farklı kompozit ile 2 farklı cam iyonomere adezyonunun mineyle karşılaştırıldığı bir çalışmada, *in situ* toplanan ral biyofilm materyalleri tükürük ile kaplanarak *in vitro* inkübe edilmiş ve sintilasyon sayım yöntemiyle değerlendirilmiştir. SEM görüntüleme yöntemi ile de sonuçlar desteklenmiştir. Elde edilen bulgulara göre kullanılan materyaller ile mine üzerinde oluşan *S. Mutans* miktarı arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Ancak SEM görüntülerinde mine ve cam iyonomerlerin yüzeylerinin kompozitlere göre daha pürüzlü olduğu görülmüştür.

Carlen ve ark. (17), yaptıkları *in vitro* bir çalışmada cilalanmış ve cilalanmamış cam iyonomerler ve kompozit rezinlerin yüzey karakteristikleri ile biyofilm oluşumu incelemişlerdir. Çalışmanın sonunda cam iyonomerlerin kompozitlerden daha pürüzlü bir yüzeyi olduğunu, cilalama sonrası kompozit rezinlerin yüzeyindeki inorganik komponentlerin belirgin derecede parçalandığını, farklı tipte tükürük inkübasyonu sonrası cilalanmamış kompozite göre cilalanmamış cam iyonomer üzerinde daha çok bakteri tutulumu olduğunu bildirmişlerdir.

Sükroz asidojenik olması ve bakteriler tarafından EPS sentezi için uygun bir substrat olması nedeniyle bilinen en karyojenik karbohidrattır. Ekstrasellüler matriks içerisindeki biyokimyasal değişiklikleri, sükroz konsantrasyonu, sükroza maruz kalma süresi ve biyofilm oluşum süresi etkilemektedir (99).

Arthur ve ark. (7)'ı in situ bir çalışmalarında sükroz ve onun monosakkaritleri früktoz ve glukozun biyofilm içindeki *S. Mutans'*ların genotipik cinslerine etkilerini değerlendirmişler. 7 katılımcının tükürükleri *S. Mutans* izolasyonu için toplanmış ve katılımcılara üzerine mine örnekleri yerleştirilmiş apareyler 14 gün süreyle kullandırılmıştır. Katılımcılar bu süre boyunca günde 8 kere ağızlarını % 20'lik sükroz solüsyonu, % 10'luk früktoz + % 10'luk glukoz solüzyonu ve kontrol grubu olarak da distile ve deiyonize su ile çalkalamışlardır. Deney süresi sonunda örneklerden biyofilmler toplanmış ve *S. Mutans* kolonileri izole edilmiştir. PCR incelemeleri sonrasında tükürük ve biyofilm örneklerindeki genotipler değerlendirilmiştir. Çalışmanın sonucunda *in situ* modellerin *S. Mutans'*ların genotipik cinslerini değerlendirmek için faydalı bir yöntem olabileceği ancak bu deney koşullarında sükroz metabolizmasının veya monosakkaritlerinin basit fermentasyonunun biyofilm içindeki spesifik genotiplerin açıkça görülmesinin mümkün olamadığını bildirmişlerdir.

Paes Leme ve ark. planladıkları bir çalışmada bir katılımcıya içerisinde mine örnekleri içeren palatal bir apareyi 14 gün süreyle kullandırmışlardır. Bu süre boyunca günde 8 kere mine örneklerinin üzerine ekstraoral olarak % 20'lik sükroz solüsyonu ve kontrol grubu olarak da distile ve deiyonize su damlatmışlardır. Örneklerden toplanan biyofilm tabakasından iki boyutlu elektroforez yöntemiyle ekstrasellüler matriks proteinleri ayrıştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda sükrozun biyofilm içerisindeki ekstrasellüler matriks proteinlerinin kompozisyonunu etkilediği görülmüştür (99).

Fucio ve ark. (45), *S. Mutans* biyofilmi ile dental materyallerin yüzey pürüzlülüğü, yüzey sertliği ve morfolojileri arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla 4 farklı materyali incelemişlerdir. Konvansiyonel cam iyonomer, RMCI, kompozit ve cam seramik materyallerinden hazırlanan 25'er diski 3 besi yerinde inkübe etmişlerdir. 1. Grupta diskler %100 mutlak nemli besi yerinde, 2. Grupta %1

sükroz içeren mikroorganizmasız BIH besi yerinde, 3. Grupta ise *S. Mutans*'la kontamine edilmiş şekilde yine BIH besi yerine 30 gün süreyle bırakılmıştır. 30. günün sonunda yapılan testler ve incelemeler sonucunda, cam seramik ve kompozit materyallerinin yüzey sertlikleri ve pürüzlülükleri arasında 3 grupta da anlamlı bir farklılık görülmemiştir. Ancak RMCI ve geleneksel cam iyonomerin yüzey sertlik ve pürüzlülük ölçümleri ise ilk 2 gruba göre 3. grupta anlamlı derecede düşük çıkmıştır. Bu çalışmaya, göre RMCI ile geleneksel cam iyonomerin yüzey pürüzlülüğünün biyofilm ve materyal etkileşiminden, yüzey sertliğinin zamandan etkilendiği, cam seramik materyali ise *S.Mutans* biyofilminden etkilenmediği sonucuna varılmıştır.

Sousa ve ark. (135)'nın yaptıkları *in situ* bir çalışmada 3 farklı cam iyonomer, amalgam ve kompozit materyallerinin üzerinde oluşan biyofilm tabakasını ve mikrosertliklerini incelemişlerdir. Katılımcılara 5 insan mine örneği taşıyan palatal apareyler kullandırmışlar ve bu mine örneklerinin her birini araştırmada kullanılan dental materyallerden biriyle restore etmişlerdir. Katılımcılar 7 gün süreyle fluorid içeren bir gargarayla dişlerini fırçalamışlar ve günde 8 defa apareyler üzerindeki örneklere %20'lik sükroz solüsyonundan bir damla damlatmışlardır. Deney süresinin sonunda örnekler üzerindeki biyofilm toplanarak 3 farklı agarda inkübe edilmiştir. Çalışmanın sonunda örnekler üzerindeki biyofilm oluşumunda anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ancak en az demineralizasyon cam iyonomerin kapsül formunun bulunduğu örneklerde ölçülmüştür.

Yine Arthur ve ark. (6) sükrozun *S. Mutans* genotiplerine etkisini *in vivo* değerlendirmek istemişlerdir. Katılımcılardan 3 gün boyunca günde 8 defa sükroz solüsyonu ve kontrol grubu olarak da distile su ile gargara yapmaları istenmiştir. 3. Günün sonunda toplanan tükürükten ve biyofilmden ayrıştırılan *S. Mutans*'ların genotipleri PCR yöntemi ile incelenmiştir. İncelemeler sonrasında sükroz varlığında oluşan genotiplerin daha asidojenik ve asidürik oldukları sonucuna varmışlar ve sükrozun biyofilm karyojenitesini etkilediğini bildirmişlerdir.

Çocuk diş hekimliğinde yaygın kullanımı olan, kapsül formundaki Fuji IX GP Extra cam iyonomer, Fuji Triage cam iyonomer içerikli fissür örtücü, Helioseal F rezin içerikli fissür örtücü ve Dyract Extra kompomer materyalleri üzerinde oluşan biyofilmi incelediğimiz çalışmamızda farklı yöntem kullanmamıza rağmen biz de

benzer sonuçlar elde ettik. 4 materyali mine ile kıyasladığımızda en fazla biyofilm oluşumunun Fuji Triage ile Fuji IX GP Extra üzerinde oluştuğunu gözlemledik. Bunun nedeninin Fucio ve ark. (45)'nın, yüzey pürüzlülüğü ve sertliği çalışmalarında belirttiği gibi materyallerin yüzey özelliklerinden kaynaklı olduğu düşünülebilir. Çalışmamızda sükroz varlığının mine ve tüm dental materyal yüzeylerinde oluşan oral biyofilm miktarının anlamlı derecede arttırdığını gördük. Sükroz varlığının, biyofilmin artmasına ve ortam pH'sının düşmesine dolayısıyla demineralizasyona sebep olduğu bilindiğinden bulgularımızın literatürlerle örtüştüğünü söyleyebiliriz (6,99,135).

Koruyucu diş hekimliğinin önemli bir parçasını oluşturan fissür örtücü materyallerin klinik başarıları ile ilgili literatürde birçok çalışma yer almaktadır. Araştırıcılar fissür örtücülerin klinik başarılarının en önemli kriterlerinden birisinin materyalin retansiyon durumu olduğunu bildirmişlerdir (133).

Poulsen ve ark. (107) , bir cam iyonomer esaslı (Fuji III) ve bir rezin esaslı (Delton) fissür örtücünün 3 yıl boyunca retansiyon durumlarını karşılaştırmalı olarak değerlendirdikleri çalışmalarında, Fuji III materyalinin 12 ay sonunda % 10, Delton'un ise % 85 tam retansiyon gösterdiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar Fuji III materyalinde görülen bu düşük retansiyon değerini, uygulayıcı hekimlerin bu materyali ilk kez kullanmış olmalarına bağlamışlardır.

Yapılan bir çok çalışmada cam iyonomer esaslı fissür örtücülerin düşük retansiyon gösterdikleri; bununla birlikte çürükten korunmada rezin esaslı fissür örtücüler kadar etkin oldukları bildirilmiştir (124). Bunun nedeni olarak da, fissür tabanında kalan az miktarda cam iyonomer simanın bile mineye fluorid geçişi sayesinde remineralizasyonu arttırdığı düşünülmektedir. Cam iyonomer simanlarda kırılgan yapıya bağlı olarak daha çok koheziv kopmalar olduğu görülmektedir (57).

Lobo ve ark. (74)'nın, bir adet rezin modifiye cam iyonomer (Vitremer), bir adet fluorid içeren rezin esaslı fissür örtücü (Clinpro Sealant) ve bir adet fluorid içermeyen rezin esaslı fissür örtücü (Concise) materyalin, ortodontik sebeplerden çekilmiş üçüncü molar dişlere uygulanması sonrası, asit biyopsisi yöntemiyle (3 mine katı çözerek) mine fluorid düzeyini araştırdıkları çalışmalarında, fluorid içeren

fissür örtücü materyallerden mine fluorid seviyesinde artış olduğunu gözlemişlerdir. Araştırıcılar rezin modifiye cam iyonomer materyalin diğer materyallere oranla mine fluorid seviyesinde daha fazla artış sağladığını vurgulamışlardır.

Hicks ve ark. (58), çürük benzeri mine lezyonu oluşturdukları insan dişlerinde, fluorid içeren ve içermeyen rezin esaslı fissür örtücü materyalinin remineralizasyona etkisini polarize ışık mikroskobuyla incelemişler. Maksimum çürükten koruyucu etkinin, fluorid salımı yapan materyale en yakın bölgede olduğu tespit edilmiştir.

Tanaka ve ark. (143), üç deneysel fluorid içeren rezin esaslı fissür örtücüyü, ortodontik olarak çekilme kararı alınmış dişlere ağız içerisinde uyguladıkları ve çekim sonrası dişlerin mine fluorid konsantrasyonunu araştırdıkları çalışmalarında, materyallerin uygulandığı mine yüzeyinde fluorid artışının, kontrol grubu olarak alınan dişlere ve materyallerin uygulandığı bölgeye komşu mine dokusuna göre fazla olduğunu gözlemlemişlerdir. Araştırıcılar çalışmalarında, fissür örtücü materyallerin uygulandığı bölgeye komşu mine dokusunda da kontrol grubuna göre fluorid konsantrasyonunda artış olduğunu belirlemişlerdir.

Yine Lobo ve ark. (74), üç farklı fissür örtücünün (RMCİ,Vitremer, 3M ESPE), fluorid içeren rezin esaslı (Clinpro Sealant, 3M ESPE) ve fluorid içermeyen rezin esaslı (Concise, 3M ESPE) karyostatik etkisini; fissür yan duvarında, örtülenmiş ve örtülenmemiş minede, materyale yakın ve uzak bölgelerin mikrosertlik verilerini inceleyerek değerlendirmişlerdir. RMCİ grubunda demineralizasyonun daha az olduğunu ve fissür yan duvarına yakın bölgede mikrosertliğin daha yüksek bulunduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda rezin bazlı fissür örtücü materyali olarak Helioseal F'i ve cam iyonomer içerikli fissür örtücü olarak Fuji Triage'ı kullandık. Ve her 3 grubumuzda da Fuji Triage fissür örtücü materyali ile Helioseal F fissür örtücü materyalinde oluşan biyofilm miktarının mine ile kıyaslandığında anlamlı derecede daha yüksek olduğunu gözlemledik. Her ikisi de fluorid salımı yapan materyaller olmasına rağmen biyofilm adezyonunun yüksek olmasının nedeninin materyallerin yüzey özelliklerinden kaynaklanabileceğini düşünmekteyiz.

Kompomerler de çocuk diş hekimliğinde sıkça kullanılan restoratif materyallerden biridir. Kompozitlerin estetik özelliklerini ve cam iyonomerlerin dişe kimyasal olarak bağlanabilme ve fluorid salabilme özelliklerini tek bir materyalde toplama düşüncesiyle üretilmiştir (124). Literatürde kompomerler ile biyofilm arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalara fazla rastlanmamıştır.

Gömeç ve ark (50) , Fuji IX GP, Vitremer, Dyract AP ve Prodigy restoratif materyallerinin yüzey sertliklerinin değerlendirildiği çalışmalarında, kompozit rezin mateyalinin en yüksek yüzey sertliği değerine sahip olduğunu, RMCİ'in ise en düşük yüzey sertliği değerine sahip olduğunu bildirmişlerdir. Kondanse edilebilen cam iyonomer ile kompomer materyalinin yüzey sertlik değerleri benzer bulunmuştur.

Kolada ve ark (66)'nın Fuji IX ve Dyract AP'nin fluorid salımını ve antibakteriyel aktivitelerini değerlendirmek için yaptıkları bir çalışmada agar difüzyon testi uygulanan örnekler hazırlandıktan hemen sonra ve 7 gün sonundaki büyüme inhibisyon zonları değerlendirildi. Çalışmanın sonucunda Her iki materayelinde fluorid salımı yaptığı ancak Fuji IX'un Dyract AP'den daha yüksek değerler sahip olduğu, ilk 24 saatin sonunda Fuji IX'un S. Salivarius ve S. Sanguis'in büyümesini inhibe ettiği, Dyract AP'nin ise polimerizasyondan sonraki ilk 24 saat içinde bakteri inhibisyonuna etki etmediği ancak 8 günün sonunda S. Salivarius ve S. Sanguis' e karşı antibakteriyel aktivitenin arttığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda cam iyonomerlerden Fuji Triage'ın Dyract Extra'ya benzer sonuçlar gösterdiğini ancak Fuji IX'un daha yüksek biyofilm oluşturduğunu gördük. Sükroz kulanımında ise her iki cam iyonomerin de kompomere göre daha fazla biyofilm oluşturduğunu tespit ettik. Ancak Kolada ve ark. (66)'nın bulgularından farklı olarak, fluorid salım düzeyleri diğer örneklere göre daha fazla bulunan Fuji IX ve Fuji Triage örneklerindeki biyofilm tutulumunun yüksek çıkması nedeniyle materyallerden salınan fluorid miktarının biyofilm ile ilişkisi olmadığı sonucunu elde ettik. Bu farklılığın bizim çalışmamızın *in situ* olmasından kaynaklandığı düşüncesindeyiz.

Koruyucu diş hekimliğinde kullanılabilecek ve fluoride alternatif olması amacıyla geliştirilen bir materyal olan kazeinfosfopeptid amorf kalsiyumfosfat CPP-

ACP'ın çürük önleyici etkisi yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda gösterilmiştir (131,132). CPP-ACP'nin diş üzerindeki remineralizasyon ve biyofilm oluşumuna etkilerinin değerlendirilmesini amaçlayan çalışmalar yapılmıştır. Ancak CPP-ACP'nin sükroz varlığında dental materyaller üzerinde meydana gelen biyofilme etkisini araştıran *in situ* bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Iijima ve ark (59) tarafından yapılan bir klinik çalışmada, CPP-ACP içeren şekersiz sakızlarla remineralizasyonu sağlanan mine lezyonlarının asit dirençleri araştırılmıştır. CPP-ACP içeren şekersiz sakızların CPP-ACP içermeyen şekersiz sakızlarla karşılaştırıldığı çalışmanın sonucunda, CPP-ACP'li sakızların remineralizasyon derecesini kontrol grubuna göre 2 kat arttırdığı ayrıca CPP-ACP ile remineralizasyonu sağlanmış minenin demineralizasyona karşı normal mineden daha dirençli olduğu gösterilmiştir.

Schupbach ve ark. (127), *in vitro* koşullar altında CPP ile tedavinin *S. Mutans* ve *S. Sobrinus* gibi karyojenik bakterilerin diş yüzeyine tutunmasında belirgin bir şekilde düşüş olduğunu göstermişlerdir ve bu etkiyi biyofilmde bulunan kalsiyum ve fosfatın bakterilerin dişe tutunmasını engellediği şeklinde açıklamışlardır .

Reynolds ve ark. (113)'nın CPP-ACP içerikli sakız ve gargara kullandıkları başka bir *in situ* çalışmada CPP-ACP içeren sakızların en yüksek seviyede mine remineralizasyonu meydana getirdiği ve sakızların kullanımından 3 saat sonra bile CPP'nin diş yüzeyinde bulunduğu gösterilmiştir. CPP-ACP içerikli gargaraların ise biyofilm kalsiyum ve fosfat seviyesini anlamlı derecede arttırdığı ve CPP'nin supragingival plaktaki bakteri hücrlerinin duvarında lokalize olduğu rapor edilmiştir.

Rahiotis ve ark. (108), yaptıkları *in situ* bir çalışmada katılımcılara germenyum kristalleri yerleştirdikleri ortodontik apareyleri 1'er hafta aralıklarla olacak şekilde, 30 dakika, 8 saat, 24 saat ve 1 hafta süreyle kullandırmışlardır. Çalışmanın devamında aynı katılımcılara 5 dakika süreyle CPP-ACP uygulanmış germenyum kristallerini aynı sürelerde kullandırtmışlardır. Çalışmanın sonucunda CPP-ACP'ye maruz kalmış germenyum yüzeylerinde biyofilm oluşumunda gecikme olduğu bildirilmiştir.

Yine Reynolds, yaptığı bir başka çalışmada, süt komponentlerinden biri olan ve anti karyojenik özelliği bulunan Kazeinfosfopeptidin (CPP), yüksek konsantrasyonda kalsiyum ve fosfat iyonlarını fluorid iyonları ile stabilize ederek pelikıl ve biyofilm üzerine bağlanmasını sağladığını bildirmiştir (112).

Çalışmamızda bu çalışmalarla benzer sonuçlar elde ettik. Sükroz varlığında CPP-ACP'nin dental materyaller üzerindeki biyofilme etkisini değerlendirdiğimiz çalışmamızda CPP-ACP kullanımının, rezin içerikli fissür örtücü ve restoratif cam iyonomer materyalleri ile minede sükroz varlığında bile biyofilm oluşumunu anlamlı derecede azalttığını gözlemledik.

Fluoridin bilinen çürük önleyici etkisinden restoratif diş hekimliğinde de faydalanmak amacıyla restoratif materyallere fluorid ilavesi gündeme gelmiştir. Restoratif materyallere fluorid ilavesiyle, hem sekonder çürüğün önlenmesi hem de dişin yapılan restorasyona komşu dokularının fluoridin bu etkisinden faydalanması amaçlanmıştır. Oral kavitede bulunan fluorid, tükürükte ve biyofilmde bir rezervuar oluşturur ve zamanla salım yaparak mineye bağlanması sonucunda mine yapısını güçlendirerek çürük oluşumunu engellediği gösterilmiştir (21). Fluoridin biyofilm üzerindeki etkisi ise tam olarak bilinmemekle birlikte; biyofilm yüzeyine yakın alanlara lokalize olmuş anaerobik ve asidik mikro çevreleri hedef alarak, karyojenik biyofilmlerde rol oynayan, asit ortamı seven bakterilerin artmasını engellediği düşünülmektedir (8). Biyofilmin dental materyallere adezyonuna fluoridin etkisini değerlendirebilmek için tez çalışmamızda kullanılan tüm materyalleri fluorid içeren materyallerden seçtik. Bu dental materyallerin fluorid salım düzeyleri ile materyaller üzerinde oluşan biyofilm miktarı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek için de tez çalışmamızda kullandığımız 4 materyalin fluorid salım düzeylerini ölçmeyi hedefledik.

Materyallerin fluorid salımı için hazırlanan örneklerin standart boyutlarda olması gerekmektedir. Standardizasyonu sağlanması amacıyla çalışmalarda çeşitli boyutlarda standart metal, teflon, plastik kalıplar kullanılmaktadır (20,53,109). Biz de çalışmamızın ilk bölümüyle standardizasyonu sağlamak amacıyla silikon kalıplar kullanmayı tercih ettik.

Restoratif materyallerin fluorid salım ölçümleri için *in vitro* çalışmalarda yapay tükürük, deiyonize su solüsyonları veya distile su kullanılmaktadır (20,53,109). Bizim çalışmamızda dental materyallerin fluorid salım ölçümleri distile su kullanılarak yapılmıştır.

Materyallerin fluorid salımı, ısı, mekanik çalkalama gibi etkenlerle değişkenlik gösterdiğinden yapılan bir çok *in vitro* çalışmada hazırlanan örneklerin 37°C derecede etüvde bekletilmesi gerekmektedir (20,53). Bu nedenle tez çalışmamızda hazırladığımız örnekler deney süresince 37°C derecede etüvde bekletildi.

Fluorid salım değerlerinin belirlenmesinde iyon analizörü ve spesifik fluorid elektronu kullanılması ve ölçümlerden önce standart fluorid solüsyonlarında farklı konsantrasyonlarda solüsyonlar hazırlanarak elektrodun kalibrasyonu gerekmektedir (20,53). Tez çalışmamızda iyon spesifik fluorid elektrodu kullandık ve kalibrasyon işlemini standart fluorid solüsyonları ile her ölçüm gününden önce tekrarladık.

Fluorid elektrodu pH değişikliklerine oldukça hassastır. Ölçümü yapılacak örneklerin içerisinde bulundukları suya pH'nın düzenlenmesi ve sudaki fluoridin iyonize edilmesi için TISAB solüsyonunun belirli konsantrasyonlarda ilave edilmesi gerekmektedir (20,53,109). Biz de çalışmamızda örneklere 1:1 oranında TISAB II solüsyonu ilave ederek ölçümlerimizi gerçekleştirdik.

Çeşitli restoratif ve fissür örtücü materyallerden salınan fluorid miktarının değerlendirildiği çalışmalar incelendiğinde, özellikle geleneksel cam iyonomer esaslı materyallerin fluorid salım özelliklerinin spesifik bir model sergilediği gözlenmektedir. Bu modelde, cam iyonomer simanın birinci gün yüksek düzeyde (patlama etkisi) fluorid saldığı, ikinci gün materyalden salınan fluorid miktarında keskin bir düşüş yaşandığı ve onu izleyen günlerde de daha stabil bir yol izlediği bildirilmektedir (56). Araştırıcılar materyallerden bu şekilde fluorid salımının gerçekleşmesinin iki ana nedeni olduğunu bildirmişlerdir. Bunlardan birincisi; materyalin sertleşmesinin ardından yüzeyde kalan fluoridin yıkama etkisiyle salımının gerçekleşmesi (patlama etkisi), ikincisi ise difüzyon yoluyla materyalden fluorid salınması şeklindedir. Difüzyon yoluyla materyalden fluorid salınması düşük miktarlarda olmakta fakat uzun zaman devam edebilmektedir (148).

Vermeersch ve ark. (149), yedi geleneksel cam iyonomer, beş RMCI, iki kompomer ve iki kompozit rezin materyalinin fluorid salım değerlerini inceledikleri çalışmalarında geleneksel cam iyonomerlerin fluorid salım değerlerinin en yüksek olduğunu saptamışlardır. Araştırmacılar geleneksel cam iyonomer, RMCİ, kompomer ve kompozit rezin materyallerinin sırasıyla en yüksekten düşüşe doğru değişen fluorid salım değerlerine sahip olduklarını bildirmişlerdir. İlk 24 saatteki fluorid salımının materyallerden salınan en yüksek düzeyde fluorid olduğu ve sonrasında ani bir düşüşle fluorid salımının azaldığı saptanmıştır. Ancak bu ani düşüşün kompomer ve kompozit rezinlerde daha az olduğu görülmüştür.

Helvatjoglu-Antoniades ve ark. (56) ,biri fissür örtücü olarak kullanılan dört adet cam iyonomer esaslı (Miracle-Mix, Fuji III, Fuji II LC ve Ketac-Silver), iki adet rezin esaslı fissür örtücü (Fissurit F ve Helioseal F), bir PMKR esaslı (Compoglass Flow), bir cam iyonomer esaslı yapıştırıcı siman (Ketac-Cem) ve bir kompozit rezin (Tetric) materyalin uzun dönem (112 gün) fluorid salım özelliklerini inceledikleri çalışmalarında, cam iyonomer esaslı materyallerin en yüksek fluorid salımını ilk yirmidört saat içerisinde yaptığını ve daha sonra keskin bir düşüş görüldüğünü; stabil bir şekilde fluorid salımının devam ettiğini bildirmişlerdir. Araştırıcılar ayrıca çalışma periyodu boyunca cam iyonomer içerikli materyallerin diğer materyallere oranla bütün ölçüm günlerinde daha fazla fluorid salımı gerçekleştirdiklerini göstermişlerdir.

Daha önce yapılmış çalışmalar incelendiğinde, fissür örtücü olarak kullanılan cam iyonomer, PMKR ve kompozit rezin materyallerin, diş macunu ve profesyonel fluorid uygulamaları gibi fluorid içeren ürünlerle tekrar yüklenebilen sistemler olarak görev yaptıkları ve yapılarına geçen fluoridi tekrar salabildikleri gözlenmektedir (46,140).

Koga ve ark. (64), ikisi fluorid içeren rezin (Helioseal F ve Teethmate F-1) bir geleneksel cam iyonomer esaslı (Fuji III) ve bir adet rezin modifiye cam iyonomer esaslı (Fuji II LC) fissür örtücünün sertleşmesini takiben yedi gün sonra % 1,23'lük APF jel ile fluorid yüklemesinin ardından materyallerden salının fluorid miktarını değerlendirdikleri çalışmalarında bütün materyallerin fluoridle yüklenebildiklerini ve yükleme sonrası fluorid salım miktarında artış olduğunu göstermişlerdir. Araştırıcılar

fluorid salımındaki artışın çoktan aza sırasıyla; Fuji III, Fuji II LC, Teethmate F-1 ve Helioseal F materyallerinde meydana geldiğini göstermişlerdir.

Markovic ve ark. (75), beş adet konvansiyonel CİS (Fuji Triage (Fuji VII), Fuji II LC, Fuji VIII, Fuji IX GP ve Ketac N100) ve rezin esaslı fissür örtücünün (Helioseal F) fluorid içeriği ve yeniden şarj edilebilme özelliğini inceledikleri çalışmalarında; 7 günün sonunda Fuji VII'nin en yüksek oranda fluorid içerdiğini tespit etmişlerdir. Asidik solüsyon içinde saklanan örneklerde daha yüksek fluorid salındığı ve sonradan NaF solüsyonuna konulan örneklerde fluorid salımının da arttığı görülmüştür.

Çalışmamızda kullandığımız dental materyallerin fluorid salım değerleri literatürle benzer sonuçlar göstermiştir. Tüm materyallerden 4 günlük süre boyunca fluorid salımı gerçekleşmiştir ve en yüksek fluorid salımı değerleri tüm materyaller için 1. gün ölçümlerinde görülmüştür. 1. 2. 3. ve 4. gün sonundaki fluorid salım değerleri kıyaslandığında en fazla fluorid salımı firma tarafından da özellikle belirtildiği gibi Fuji IX GP Extra ve sonra Fuji Triage'da görülmüştür. Bu değerleri sırasıyla Dyract Extra ve Helioseal F takip etmiştir.

Oral biyofilmler ağız içerisinde tüm yüzeyler üzerinde oluşabilmektedir. Bu nedenle tedavi planlaması yaparken materyal seçimimize dikkat etmemiz ve çocuk hastanın oral hijyen alışkanlıklarını göz önünde bulundurmamız gerekmektedir. Çalışmamız dental materyaller üzerinde oluşan oral biyofilmin her zaman mine üzerinde oluşan oral biyofilmden daha yoğun olduğunu göstermiştir. Bulgularımız doğrultusunda, oral florada sükroz varlığının, ağız içerisinde doğal oluşan oral biyofilmin, çocuk diş hekimliğinde sıkça kullanılan dental materyaller üzerinde birikimini arttırdığını tespit ettik. Çalışmamızdaki önemli bulgulardan biri de de-remineralizasyon üzerinde etkinliği bilinen CPP-ACP kullanımının sükroz varlığında oral biyofilm birikimini azaltabileceği şeklindedir. İn situ olarak düzenlediğimiz çalışmamızın bu sonuçlarına göre ayrıca, her ne kadar fluoridin antikaryojenik etkileri biliniyor olsa da, materyallerin içerdikleri fluorid konsantrasyonunun yüksek olmasının, dental materyallerin üzerinde biriken oral biyofilm miktarına etki etmediğini söyleyebiliriz. Yine de dental materyaller ve oral biyofilm arasındaki ilişkiye fluoridin ve CPP-ACP'nin etkisinin daha net anlaşılabilmesi için bu konuyla

ilgili özellikle *in situ* ve *in vivo* daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir. Biz de bundan sonra, *in situ* ve *in vivo* oluşturulan oral biyofilmin organik ve inorganik komponentlerini daha iyi tanımlayacak çalışmalar planlamaktayız.

8. SONUÇLAR

Çocuk diş hekimliğinde kullanılan dental materyallerin üzerinde normal sükrozsuz, sükrozlu ve sükroz+CPP-ACP'li ortamda oluşan oral biyofilm tabakası miktarının mine ile kıyaslamalı olarak incelendiği çalışmamızda sonuçlar aşağıdaki gibidir.

Gruplar arası mine ve dental materyaller değerlendirildiğinde;

1- Mine üzerinde oluşan biyofilm miktarı açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Sükroz varlığında mine üzerinde biyofilm oluşumu anlamlı derecede arttığı, sükroz ve CPP-ACP kullanımında ise sükrozlu ortama göre biyofilm oluşum miktarının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür ($p<0.05$).

2- Fuji Triage materyali açısından üç grup arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. ($p>0.05$). Sükroz kullanımı biyofilm oluşumunu anlamlı derecede arttırmıştır ancak CPP-ACP kullanımında biyofilm miktarında azalma olmadığı görülmüştür.

3- Fuji IX GP Extra materyali açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Hem normal florada hem de sükroz varlığında materyal üzerinde yüksek oranda biyofilm oluşumu tespit edilmiş olup sükroz ve CPP-ACP varlığında biyofilm miktarının anlamlı derecede azaldığı görülmüştür

4- Helioseal F materyali açısından üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). Sükroz varlığında HF materyali üzerinde biyofilm oluşumu anlamlı derecede artmıştır ve sükroz ile CPP-ACP kullanımında ise sükrozlu ortama göre biyofilm miktarında anlamlı bir düşüş görülmüştür.

5- Dyract Extra materyali açısından üç grup arasında anlamlılığa yakın olmakla birlikte istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$). Ancak sükroz varlığının materyal üzerinde oluşan biyofilm miktarını arttırdığı gözlenmiştir.

Grup içi mine ve dental materyaller değerlendirildiğinde;

6- Bütün gruplarda mine üzerinde oluşan oral biyofilm miktarı dental materyallere göre daha düşük tespit edilmiştir.
7- Normal sükrozsuz flora (Grup I) grubunda; M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan oral biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). En düşük oral biyofilm oluşumu mine üzerinde gözlenmiştir.
8- Sükrozlu flora (Grup II) grubunda; M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan oral biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). En düşük oral biyofilm oluşumu mine üzerinde gözlenmiştir.
9- CPP-ACP kullanılan sükrozlu flora (Grup III) grubunda; M, FT, FIX, HF ve DE materyalleri üzerinde oluşan oral biyofilm miktarlarının ortalamaları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur ($p<0.05$). En düşük oral biyofilm oluşumu mine üzerinde, en fazla oral biyofilm oluşumu FT materyali üzerinde gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan dental materyallerin fluorid salımları değerlendirildiğinde;

10- Materyallerin 1. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.01$**).** Materyallerin 1. Gün fluorid salım düzeylerinin en yüksekten en düşüğüyle sırasıyla; Fuji IX GP Extra, Fuji Triage, Dyract Extra ve Helioseal F şeklinde olduğu gözlenmiştir.
11- Materyallerin 2. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.01$**).** Materyallerin 2. Gün fluorid salım düzeylerinin en yüksekten en düşüğüyle sırasıyla; Fuji IX GP Extra, Fuji Triage, Dyract Extra ve Helioseal F şeklinde olduğu gözlenmiştir.
12- Materyallerin 3. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.01$**).** Materyallerin 3. Gün fluorid salım düzeylerinin en yüksekten en düşüğüyle sırasıyla; Fuji IX GP Extra, Fuji Triage, Dyract Extra ve Helioseal F şeklinde olduğu gözlenmiştir.

13- Materyallerin 4. Gün fluorid salım düzeyleri arasında istatistiksel olarak ileri düzeyde anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0.01$**).** Materyallerin 4. Gün fluorid salım düzeylerinin en yüksekten en düşüğüyle sırasıyla; Fuji IX GP Extra, Fuji Triage, Dyract Extra ve Helioseal F şeklinde olduğu gözlenmiştir.

Çalışmada kullanılan dental materyallerin fluorid salımı ile oral biyofilm arasındaki ilişki değerlendirildiğinde;

14- Normal florada materyaller üzerinde oluşan oral biyofilm miktarı ile materyallerin fluorid salımları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
15- Sükroz kullanımında materyaller üzerinde oluşan oral biyofilm miktarı ile materyallerin fluorid salımları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.
16- Sükroz ile CPP-ACP beraber kullanıldığında materyaller üzerinde oluşan oral biyofilm değerleri ile materyallerin fluorid salımları arasında anlamlı bir ilişki bulunmamıştır.

EK-1 BİLGİLENDİRİLMİŞ ONAM FORMU

Araştırma projesinin adı:

Farklı dental materyallerde sükrozlu VE sükrozsuz in situ oluşan oral biyofilmin kazein fosfo peptid–amorf kalsiyum fosfat ile etkileşiminin taramalı elektron mikroskobunda incelenmesi ve fluorid salımıyla ilişkisinin değerlendirilmesi

Araştırmanın yürütüleceği kuruluş:

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı
Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Metalurji Anabilim Dalı Merkez Laboratuarı

Sorumlu Araştırıcılar:

Prof. Dr. Ali MENTEŞ
Dt. Ferhan ERTUĞRAL

Araştırmayı hazırlayan kuruluş:

Bu araştırma Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı'nda görevli olan Prof. Dr. Ali Menteş ve Dt. Ferhan Ertuğral tarafından hazırlanmıştır.

Amaç:

Oral kavitede diş yüzeyinde oluşan ve 'dental plak' olarak da bilinen oral biyofilm tabakası ağızda diş çürüğü ve periodontal hastalıkların etyolojisinin temelini oluşturmaktadır. Kompleks ve dinamik mikrobiyal bir ekosistem olarak tanımlanan oral biyofilm, diş ve çevre dokularında olduğu kadar restoratif yüzeylerde de rahatlıkla oluşabilir.

Dental materyallerin antikaryojenik etkileri ile ilgili sonuçları tartışmaya açık olup bu konuda yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle klinikte plak oluşumunu aktive veya inhibe edebilecek dental materyallerin kullanımına ilgi giderek artmakta ve oral biyofilmin farklı dental materyaller tarafından nasıl etkilendiği hakkında bilgi sağlamak günümüzde büyük önem kazanmaktadır.

Oral hijyen alışkanlıkları ve beslenme faktörleri göz önünde tutulacak olursa çocuk diş hekimliğinde koruyucu uygulamaların önemi giderek arttığı görülmektedir. Çürük oluşumunu engellemede kullanılan en etkili ajanlardan biri fluorid olarak kabul edilmektedir. Ancak fluorid güçlü bir ajan olmasına rağmen yüksek konsantrasyonlarda bile mikroorganizmalar açısından tedavi edici bir ürün olarak kabul edilmemektedir.

Çocuklarda yüksek doz fluoridin toksik etki riski nedeniyle çürük önleyici aktivite gösteren ve fluorid ile birlikte kullanılabilecek daha güvenilir ajanların geliştirilmesine ihtiyaç duyulmuştur. Bu ajanlardan biri olan kazeinfosfopeptid amorf kalsiyumfosfat (CPP-ACP) 'ın çürük önleyici etkisinin yapılan çalışmalarda gösterilmiş olmasına rağmen oral biyofilme etkisi konusundaki çalışmalar sınırlı sayıdadır. Bu nedenle çalışmamızdan elde edilen araştırma verilerinin hem koruyucu hem de tedavi edici önlemlerin alınmasına ilişkin prensipler oluşturması hedeflenmektedir.

Bu araştırma, insan üzerindeki araştırmalarda, insan haklarını ve sağlığını korumak amacı ile Dünya Tıp Birliğince ilan edilmiş olan Helsinki Deklerasyonunun son şekline uygun hazırlanmış ve Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Komisyonunun onayını almıştır.

Bu araştırmaya katılmak için niçin seçildiniz?

Ağzı içerisinde diş dokusu ve restoratif dental materyaller üzerinde oral biyofilm oluşturmak ve elde edilen biyofilmi incelemek için katılımcılara palatal apareyler kullandırılacaktır. Çalışmamızda standardizasyonu sağlamak açısından katılımcıların, ağız hijyeni iyi, aktif çürüğü bulunmayan, herhangi bir sistemik rahatsızlığı olmayan, ortodontik aparey kullanmayan ve randevu takiplerini aksatmayan bireylerden seçilmesinin gerekliliği sebebiyle bu çalışmaya katılmanız uygun görülmüştür.

Araştırmada kullanılacak yöntem:

Araştırmada aşağıdaki basamaklar sırasıyla izlenecektir.

1) Üst çenelerinizden ölçü alınacak ve sizlere özel palatal apareyler hazırlanacaktır.

2) Apareylere deney örnekleri yerleştirilecektir ve sizden farklı 3 zamanda 4 gün süreyle kullanmanız istenecektir.
3) Deney süresi boyunca apareyler sadece yeme esansında çıkarılacak ve size verilen saklama kutularında musluk suyu içerisinde bekletilecektir.
4) Deney süresi boyunca yemek sonrası katılımcılar dişlerini fırçalayabilecektir ancak oluşan biyofilmin bozulmaması açısından apareyler kesinlikle fırçalanmayacaktır.

Araştırmaya katılmakla meydana gelebilecek yan etkiler ve olumsuzluklar:

Çalışma süresince katılımcıların oral hijyen alışkanlıklarını devam ettirebilecek olmaları ve kullanılan tüm malzemelerin güvenilir olması nedeniyle çalışmamızda hiçbir yan etki ve olumsuzluk beklenmemektedir.

Araştırma sürecinde dikkat edilmesi gereken konular:

Deney süresince apareylerin düzenli ve verilen talimatlar doğrultusunda kullanımı çalışma sonunda doğru sonuçların elde edilmesi açısından oldukça önemlidir.

Ayrıntılı bilgi sizlere Dt. Ferhan Ertuğral tarafından, en iyi anlayabileceğiniz tarzda verilecektir.

Araştırmadan beklenen faydalar:

Elde edilen araştırma verileri, çocuk diş hekimliğinde kullanılan dental materyaller, koruyucu ajanlar ile oral biyofilm arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi sonucunda, hem koruyucu hem de tedavi edici önlemlerin alınmasına ilişkin prensipleri oluşturacaktır.

Gizlilik

Araştırmaya katılan bireylerin isimleri gizli tutulacak ve kendi rızası olmadan açıklanmayacaktır.

EK-2 HASTA ONAM FORMU

Proje adı:

Farklı dental materyallerde sükrozlu VE sükrozsuz in situ oluşan oral biyofilmin kazein fosfo peptid–amorf kalsiyum fosfat ile etkileşiminin taramalı elektron mikroskobunda incelenmesi ve fluorid salımıyla ilişkisinin değerlendirilmesi

Araştırmaya ait hasta / kişi numarası: _____

Üniversite hastanesi protokol numarası: _____

Arastırmacı adı:_____

Marmara Üniversitesi Diş hekimliği Fakültesi, Pedodonti Anabilim Dalı Araştırma Projesi Bilgilendirme yazısını okudum ve anladım. Sorularıma Dt. Ferhan Ertuğral tarafından beni tatmin eden cevaplar verildi. Adı geçen projeye kendi rızam ile hiçbir baskı altında kalmadan katılmayı kabul ediyorum. İstediğim anda çalışmadan çıkabileceğim ve çalışmadan kendi isteğimle çıkmam halinde tıbbi ve hukuki haklarımın saklı olduğunu biliyorum.

_____	_____	_____
Hasta kişi	**Tarih**	**imza**
_____	_____	_____
Velayet yada vesayet altında Bulunanlar için veli veya vasi	**Tarih**	**imza**
_____	_____	_____
Onam ve Açıklama yapan	**Tarih**	**imza**
_____		_____
Tanık	**Tarih**	**imza**

KAYNAKLAR

1. Aimutis WR. (2004). Bioactive properties of milk proteins with particular focus on anticariogenesis. J Nutr, 134(4):989-995.
2. Akça AE, Akça G, Gökçe S, Sultan N, Özdemir A. (2005). Farklı sabit protetik restorasyon maddelerinde bakteri tutunmasının incelenmesi. Gülhane Tıp Dergisi, 47:251-255.
3. Al-Ahmad A, Wunder A, Auschill TM, Follo M, Braun G, Hellwig E, Arweiler NB. (2007). The in vivo dynamics of Streptococcus spp., Actinomyces naeslundii, Fusobacterium nucleatum and Veillonella spp. in dental plaque biofilm as analysed by five-colour multiplex fluorescence in situ hybridization. J Med Microbiol, 56:681-687.
4. Altun HU, Şener B. Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. (2008). Hacettepe Tıp Dergisi, 39:82-88.
5. Ardu S, Castioni NV, Benbachir N, Krejci I. (2007). Minimally invasive treatment of white spot enamel lesions. Quintessence Int, 38(8):633-636.
6. Arthur RA, Cury AA, Graner RO, Rosalen PL, Vale GC, Paes Leme AF, Cury JA, Tabchoury CP. (2011). Genotypic and phenotypic analysis of S. mutans isolated from dental biofilms formed in vivo under high cariogenic conditions. Braz Dent J, 22(4):267-274.
7. Arthur RA, Tabchoury CP, Mattos-Graner Rde O, Del Bel Cury AA, Paes Leme AF, Vale GC, Cury JA. (2007). Genotypic diversity of S. mutans in dental biofilm formed in situ under sugar stress exposure. Braz Dent J, 18(3):185-191.
8. Aspiras M, Stoodley P, Nistico L, Longwell M, De Jager M. (2010). Clinical implications of power toothbrushing on fluoride delivery: effects on biofilm plaque metabolism and physiology. Int J Dent, 2010:651869. Epub 2010 Apr 15.
9. Auschill TM, Arweileer NB, Reich E, Sculean A, Netuschill L. (2002). The effect of dental restorative materials on dental biofilm. Eur J Oral Sci, 110(1):48-53.

10. Auschill TM, Hein N, Hellwig E, Follo M, Sculean A, Arweiler NB. (2005). Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. J Clin Periodontol, 32(2):147-152.
11. Aydın M. (2004). Mikrobiyal biyofilmler ve aerosoller. İçinde Cengiz AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitapevi Ltd. Şti. 176-179.
12. Baskın H. (2005). Mikroorganizmanın çevreye uyumu ve biyofilm: 'quorum sensing' (çoğunluğu algılama). Klimik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve Enfeksiyon Hastalıkları Kongresi Konuşmacı Özetleri s:9-10.
13. Bowden GHW, Li YH. (1997). Nutritional influences on biofilm development. Adv Dent Res, 11(1): 81-99.
14. Bowen WH. (1976). Nature of plaque. Oral Sci Rev, 9:3-21.
15. Bowen RL. (1982). Composite and sealant resins-past, present, and future. Pediatr Dent, 4(1):10-15.
16. Bowen WH, Hewitt MJ. (1974). Effect of fluoride on extracellular polysaccharide production by Streptococcus mutans. J Dent Res, 53:627-629.
17. Carlen A, Nikdel K, Wennerberg A, Holmberg K, Olsson J. (2001). Surface characteristics and in vitro biofilm formation on glass ionomer and composite resin. Biomaterials, 22(5):481-7.
18. Carpentier B, Cerf O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J Appl Bacteriol, 75(6):499-511.
19. Chalmers NI, Palmer RJ, Cisar JO, Kolenbrander PE. (2008). Characterization of a Streptococcus sp.-Veillonella sp. community micromanipulated from dental plaque. J Bacteriol, 190(24):8145–8154.
20. Chan WD, Yang L, Wan W, Rizkalla AS. (2006). Fluoride release from dental cements and composites: A mechanistic study. Dent Mater, 22(4):366–373.
21. Chow LC. (1990). Tooth-bound fluoride and dental caries. J Dent Res, 69 (SpecIss):595-600.

22. Cochrane NJ, Saranathan S, Cai F, Cross KJ, Reynolds EC. (2008). Enamel subsurface remineralization with casein phosphopeptide stabilised solution of calcium, phosphate and fluoride. Caries Res, 42(2):88-97.
23. Costerton JW, Lewandowski L, Debeer D, Caldwell D, Korber D, James G. (1994). Biofilms, the customized microniche. J Bacteriol, 176(8): 2137-2142.
24. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science, 284(5418):1318-1322.
25. Cowan AJ, Wilson NH, Wilson MA and Watts DC. (1996). The application of ESEM in dental materials research. J Dent, 24(5):375-377.
26. Croll TP, Nicholson JW. (2002). Glass ionomer cements in pediatric dentistry: review of the literature. Pediatr Dent, 24(5):423-429.
27. Çiftçi Z. (2005). Kronik tonsilitte biyofilmin rolü. Taksim Eğitim Araştırma Hastanesi KKB Kliniği, uzmanlık tezi, İstanbul.
28. Danhorn T, Fuqua C. (2007). Biofilm formation by plant-associated bacteria. Annu Rev Microbiol, 61:401-422.
29. Davey ME, O'toole GA. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. Microbiol Mol Biol Rev, 64:847-867.
30. Davidson CL, Mjor IA. (1999). Advances in glass-ionomer cements. Illinois: Quintessence Publishing Co, Inc. Dental cements and related materials, Quintessence Int, 25(9): 587-589.
31. Davidson CL. (2006). Advances in glass ionomer cements. J Appl Oral Sci. 14(sp.issue):3-9.
32. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. (2006). Molecular characterization of subject-specific oral microflora during ınitial colonization of enamel. Appl Environ Microbiol, 72(4):2837-2848.
33. Dige I, Nilsson H, Kilian M, Nyvad B. (2007). In situ identification of streptococci and other bacteria in initial dental biofilm by confocal laser scanning microscopy and fluoroscence in situ hybridization. Eur J Oral Sci, 115(6):459-467.

34. Donlan RM. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. Emerg Infect Dis, 8(9):881-890.
35. Donlan RM, Costerton JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev, 15(2):167-193.
36. Drummond SP, Allen TD. (2008). From live-cell imaging to scanning electron microscopy (SEM): the use of green fluorescent protein (GFP) as a common label. Methods Cell Biol, 88:97–108.
37. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. (1995). Biofilm-related infections in ophtalmology. Eye (Lond), 9(Pt 1):102-109.
38. Emilson CG. (1994). Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. J Dent Res, 73(3):682-691.
39. Erdem AP. (2006). Streptococcus mutans ve Streptococcus sobrinus biyofilmlerinde üç farklı fluorid verniğinin fluorid konsantrasyonlarının ve antibakteriyel etkilerinin incelenmesi. İ.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. Elif Sepet).
40. Eren F. (2009). Er,Cr:YSGG ve Er:YAG lazer ile hazırlanan dentin yüzeylerine, farklı rezin simanlarla uygulanan seramiklerin bağlanma kuvvetlerinin in-vitro olarak incelenmesi. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, İstanbul, (Danışman: Prof. Dr. Lale Düzdar).
41. Eronat N. (1995). Fissür örtücülerin diş çürüklerinin önlenmesindeki yeri. İzmir Dişhekimleri Odası Dergisi, 7(4):15-18.
42. Feldens EG, Feldens CA, de Araujo FB, Souza MA. (1994). Invasive technique of pit and fissure sealants in primary molars: a SEM study. J Clin Pediatr Dent, 18(3):187-190.
43. Foster JS, Kolenbrander PE. (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. Appl Environ Microbiol, 70(7):4340-4348.
44. Fraud S, Maillard JY, Denyer SP, Kaminski MA, Hanlon GW. (2007). A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of Streptococcus mutans biofilms. Eur J Oral Sci, 115(1):71-76.

45. Fúcio SB, Carvalho FG, Sobrinho LC, Sinhoreti MA, Puppin-Rontani RM. (2008). The influence of 30-day-old Streptococcus mutans biofilm on the surface of esthetic restorative materials-an in vitro study. J Dent, 36(10):833-839.
46. Gao W, Smales RJ. (2001). Fluoride release/uptake of conventional and resinmodified glass ionomers, and compomers. J Dent, 29(4):301-306.
47. Godoy GF, Hicks MJ. (2008). Maintaining the integrity of the enamel and remineralization preventive agents in enamel demineralization surface: The role of dental biofilm, saliva and remineralization. J Am Dent Assoc, 139:25-34.
48. Goldberg M. (2008). In vitro and in vivo studies on the toxicity of dental resin components: A review. Clin Oral Investig, 12(1):1-8.
49. Gökalp A. (1991). Fissür örtücüler. Selçuk Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Dergisi, 1(2):33-39.
50. Gömeç Y, Dorter C, Ersev H, Guray Efes B, Yildiz E. (2004). Effects of dietary acids on surface microhardness of various tooth-colored restoratives. Dent Mater J, 23(3):429-435.
51. Hajishengallis G, Michalek SM. (1999). Current status of a mucosal vaccine against dental caries. Oral Microbiol Immunol, 14:1-20.
52. Hannig C, Hannig M. (2009). The oral cavity-a key system to understand substratum-dependent bioadhesion on solid surfaces in man. Clin Oral Invest, 13:123-139.
53. Hattab FN, Amin WM. (2001). Fluoride release from glass ionomer restorative materials and the effects of surface coating. Biomaterials, 22:1449-1458.
54. Heifetz SB, Yaari A, Proskin HM. (2004). Retention of a fluoride-releasing sealant compared with its non-fluoride analogue: interim results of a clinical study after an average of eight months. J Clin Dent, 15(1):1-5.
55. Helal A. (2002). Cavity surface interaction with rezin-modified glass ionomer: surface morphology, interface adaptation, tooth demineralization and fluoride uptake. University of Iowa.

56. Helvatjoglu-Antoniades M, Karantakis P, Papadogiannis Y, Kapetanios H. (2001). Fluoride release from restorative materials and a luting cement. J Prosthet Dent, 86(2)156-164.
57. Herle GP, Joseph T, Varma B, Jayanthi M. (2004). Comparative evaluation of glass ionomer and resin based fissure sealant using noninvasive and invasive techniques-A SEM and microleakage study. J Indian Soc Pedo Prey Dent, 22(2):56-62.
58. Hicks MJ, Flaitz CM, Garcia-Godoy F. (2000). Fluoride releasing sealant and caries-like enamel lesion formation in vitro. J Clin Pediatr Dent, 24(3):215-219.
59. Iijima Y, Cai F, Shen P, Walker G, Reynolds EC. (2004). Acid resistance of enamel subsurface lesions remineralized by a sugar-free chewing gum containing casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate. Caries Res, 38(6):551-556.
60. Jayaraman A, Wood TK. (2008). Bacterial quorum sensing: signals, circuits, and implications for biofilms and disease. Annu Rev Biomed Eng, 10:145-167.
61. Jentsch H, Hombach A, Beetke E, Jonas L. (2002). Quantitative transmission electron microscopic study of dental plaque-an in vivo study with different moutuhrinses. Ultrastruct pathol, 26(5):309-313.
62. Kargül B. (2006). Koruyucu diş hekimliğinde yeni bir yaklaşım: Kazeinfosfopeptid Amorf Kalsiyumfosfat (CPP-ACP). TDBD, 97:92-95.
63. Kempner ES, Hanson FE. (1968). Aspects of light production by Photobacterium fischeri. J Bacteriol, 95:975-979.
64. Koga H, Kameyama A, Matsukubo T, Hirai Y, Takaesu Y. (2004). Comparison of short-term in vitro fluoride release and recharge from four different types of pit-and fissure sealants. Bull Tokyo Dent Coll. 45(3):173-179.
65. Kohn W, Collins A, Cleveland J, Harte J, Eklund K, Malvitz D. (2003). Centers for disease control and prevention. Guidelines for infection control in dental health-care settings. MMWR Recomm Rep, 52(RR-17):1-61.

66. Kolada GM, Jakoniuk P, Mystkowska J, Łuczaj-Cepowicz E, Waszkiel D, Dąbrowski JR, Leszczyńska K. (2004). Fluoride release and antibacterial activity of selected dental materials. Postepy Hig Med Dosw, 60:416-420.
67. Kolenbrander PE. (2000). Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. Annu Rev Microbiol, 54:413–437.
68. Kolenbrander PE. (2011). Multispecies communities: interspecies interactions influence growth on saliva as sole nutritional source. Review Int J Oral Sci, 3:49-54.
69. Koo H. (2008). Strategies to enhance the biological effects of fluoride on dental biofilms. Adv Dent Res, 20:17-21.
70. Koo H, Sheng J, Nguyen PTM, Marquis RE. (2006). Co-operative inhibition by fluoride and zinc of glucosyltransferase production and polysaccharide synthesis by mutans streptococci in suspension cultures and biofilms. FEMS Microbiol Lett, 254:134-140.
71. Koray F, Güven Y, Külekçi G, Çintan S. (2002). "Ağız Biyolojisi ve Bireysel Profilaksi Uygulamalı Egitim Programı''. İstanbul Üni. Diş Hekimliği Fakültesi.
72. Lamont RJ, Jenkinson HF. (2010). Oral Microbiology at a Glance 1st Ed. Wiley-Blackwell, USA, UK.
73. Larsson KS, Borgström MK. (2001). Effect of an antimicrobial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. Clin Oral Investig, 5(2):118-121.
74. Lobo MM, Pecharki GD, Tengan C, Silva DD, Tagliaferro PS. (2005). Fluoride-releasing capasity and cariostatic effect provided by sealants. J Oral Sci, 47(1):35-41.
75. Markovic DL, Petrovic BB, Peric TO. (2008). Fluoride content and recharge ability of five glass ionomer dental materials. BMC Oral Health, 8:21-28.
76. Marsh PD. (1992). Microbilogical aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. J Dent Res, 71(7):1431-1438.
77. Marsh PD. (1995). The role of microbiology in models of dental caries. Adv Dent Res, 9(3):244-254.

78. Marsh PD. (2003). Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology, 149(Pt2): 279-294.
79. Marsh PD. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. J Clin Periodontol, 32(6):7-15.
80. Marsh PD. (2006). Dental plaque as a biofilm and a microbial community-implications for health and disease. BMC Oral Health, 6(1):1-14.
81. Marsh PD, Nyvad B. (2003). The oral microflora and biofilms on teeth. In: Fejerskov O, Kidd E. Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management. Denmark, Copenhagen: Blackwell Publishing Ltd.; 2003:29-48.
82. Mattos-Graner RO, Napimoga MH, Fukushimo K, Duncan MJ, Smith DJ. (2004). Comparative analysis of Gtf isozyme production and diversity in isolated of Streptococcus mutans with different biofilm growth phenotypes. J Clin Microbiol, 42(10): 4586-4592.
83. Mazzaoui SA, Burrow MF, Tyas MJ, Dashper SG, Eakins D, Reynolds EC. (2003). Incorporation of casein phospopeptide-amorphus calcium phosphate into a glass- ionomer cement. J Dent Res, 82(11): 914-918.
84. McLean JW, Nicholson JW, Wilson AD. (1994). Proposed nomenclature for glassionomer dental cement and related materials. Quintessence Int. 25(9):587-589.
85. McLean JW, Wilson AD. (1974). Fissure sealing and filling with an adhesive glassionomer cement. Br Dent J, 136(7): 269-76.
86. Meier R, Hauser-Gerspach I, Lüthy H, Meyer J. (2008). Adhesion of oral streptococci to all-ceramic dental restorative materials in vitro. J Mater Sci Mater Med, 19(10):3249-3253.
87. Mejare I, Lingström P, Petersson LG, Holm AK, Twetman S, Kallestal C, Nordenram G, Lagerlöf F, Söder B, Norlund A, Axelsson S, Dahlgren H. (2003). Caries preventive effect of fissure sealants: a systematic review. Acta Odontol Scand, 61(6):321-330.
88. Morphis TL and Toumba KJ. (1998). Retention of two fluoride pit-and-fissure sealants in comparison to a conventional sealant. Int J Paediatr Dent, 8(3):203-208.

89. Mount G.J. (1994). Glass ionomer cements and future research. Am J Dent, 7(5):286- 92.
90. Mount GJ. (2002). An atlas of glass-ionomer cements; a clinician's guide. 3rd Ed. Martin Dunitz Ltd, London.
91. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. (2007). Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. Eur J Oral Sci, 115(1):77–80.
92. Nadell CD, Xavier JB, Foster KR. (2009). The sociobiology of biofilms. FEMS Microbiol Rev, 33(1):206-224.
93. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. (2004). Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. Oral Microbiol Immunol, 19(4):240-6.
94. National Institutes of Health. (2001). Diagnosis and management of dental caries throughout life. NIH Consensus Statement, 18:1-30.
95. Nicholson JW. (2007). Polyacid-modified composite resins ("compomers") and their use in clinical dentistry. Dent Mater, 23(5):615-22.
96. Onisei D, Onisei D, Feier I, Rusu D, Stratul SI. (2008). The biofilm: formation and removal. TMJ, 58(1 – 2):111-117.
97. Overman PR. (2000). Biofilm: A new view of plaque. J Contemp Dent Pract, 1(3):18-29.
98. Öztürk ŞB, Sakarya S, Öncü M, Ertuğrul MB. (2008). Biyofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. Klinik Derg, 21(3):79-86.
99. Paes Leme AF, Bellato CM, Bedi G, Del Bel Cury AA, Koo H, Cury JA. (2008). Effects of sucrose on the extracellular matrix of plaque-like biofilm formed in vivo, studied by proteomic analysis. Caries Res, 42(6):435–443.
100. Paes Leme AF, Koo H, Bellato CM, Bedi G, Cury JA. (2006). The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. J Dent Res, 85(10): 878-887.
101. Pai D, Bhat SS, Taranath A, Sargod S, Pai VM. (2008). Use of laser fluorosence and scanning electron microscope to evaluate remineralization of incipient enamel lesions remineralized by topical

application of casein phospo peptide amorphus calcium phosphate (CPP-ACP) containing cream. J Clin Ped Dent, 32(3):201-206.

102. Palmer RJ Jr, Diaz PI, Kolenbrander PE. (2006). Rapid succession within the Veillonella population of a developing human oral biofilm in situ. J Bacteriol 188(11):4117-4124.
103. Pandit S, Kim G, Lee M, Jeon J. (2011). Evaluation of Streptococcus mutans biofilms formed on fluoride releasing and non fluoride releasing resin composites. J Dent, 39(11):780-787.
104. Periasamy S, Chalmers NI, Du-Thumm L, Kolenbrander PE. (2009). Fusobacterium nucleatum ATCC 10953 requires Actinomyces naeslundii ATCC 43146 for growth on saliva in a three-species community that includes Streptococcus oralis 34. Appl Environ Microbiol, 75(10): 3250-3257.
105. Petersen FC, Tao L, Scheie AA. (2005). DNA binding-uptake system: A link between cell-to-cell communication and biofilm formation. J Bacteriol, 187(13): 4392-4400.
106. Pinkham JR. (1994). Pediatric dentistry: infancy through adolescence W.B. Saunders Company, USA.
107. Poulsen S, Beiruti N, Sadat N. (2001). A comparison of retention and the effect on caries of fissure sealing with a glass-ionomer and a resin-based sealant. Community Dent Oral Epidemiol, 29(4):298-301.
108. Rahiotis C, Vougiouklakis G, Eliades G. (2008). Characterization of oral films formed in the presence of a CPP–ACP agent: an in situ study. J Dent, 36(4): 272-280.
109. Rao A, Rao A, Sudha P. (2011). Fluoride rechargability of a non-resin auto-cured glass ionomer cement from a fluoridated dentifrice: an in vitro study. J Indian Soc Pedod Prev Dent, 29(3):202-204.
110. Reese S, Guggenheim B. (2007). A novel TEM contrasting technique for extracellular polysaccharides in in vitro biofilms. Microsc Res Tech, 70(9):816–822.

111. Reynolds EC. (1998). Anticariogenic complexes of amorphous calcium phophate stabilized by casein phosphopeptides: a review. Spec Care Dentist, 18(1):8-16.
112. Reynolds EC. (2009). Casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate: the scientific evidence. Adv Dent Res, 21(1):25-29.
113. Reynolds EC, Cai F, Shen P, Walker GD. (2003). Retention in plaque and remineralization of enamel lesions by various forms of calcium in a mouthrinse or sugar-free chewing gum. J Dent Res, 82(3):206-211.
114. Reynolds EC, Cain CJ, Webber FL. (1995). Anticariogenity of calcium, phospate complexes of trytic casein phosphopeptides in the rat. J Dent Res, 74(6):1272-1279.
115. Reynolds EC, Riley PF, Adamson N. (1994). A selective precipitation purification procedure for multiple phosphoseryl-containing peptides and methods for their identification. Anal Biochem, 217(2):277-284.
116. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. Trends Microbiol, 11(2):94-100.
117. Rickard AH, Palmer RJ Jr, Blehert DS, Campagna SR, Semmelhack MF, Egland PG, Bassler BL, Kolenbrander PE. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. Mol Microbiol, 60(6):1446-1456.
118. Rinastiti M, Özcan M, Siswomihardjo W, Busscher HJ, Van der Mei HC. (2010). Effect of biofilm on the repair bond strengths of composites. J Dent Res, 89(12):1476-1481.
119. Roberson TM, Heymann OH, Swift EJ. (2010). Sturdevant's art and science of operative dentistry. Gürgan S, Yalcin Cakir F.3. Bölüm: Karyoloji: Lezyon, Etyoloji, Önleme ve Kontrol (Cariology: The Lesion, Etiology, Prevention and Control), Güneş Tıp Kitabevleri, Ankara p. 67- 134.
120. Rolland SL, McCabe JF, Robinson C, Walls AW. (2006). In vitro biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives. Eur J Oral Sci, 114(3): 243-249.

121. Rosan B, Lamont RJ. (2000). Dental plaque formation. Microbes Infect, 2(13):1599- 1607.
122. Rose RK, R,Shellis RP, Lee AR. (1996). The role of cation bridging in microbial fluoride binding. Caries Res, 30(6):458–464.
123. Rudney JD. (2000). Saliva and dental plaque. Adv Dent Res, 14:29-39.
124. Sakaguchi RL, Powers JM. (2012). Craig's restorative dental materials. 13th Ed. The Mosby, Philadelphia.
125. Sakarya S. (2005). Biyofilm yapısı ve infeksiyon hastalıklarının virülans ve tedavisindeki rolü. Klinik 2005 XII. Türk Klinik Mikrobiyoloji ve infeksiyon Hastalıkları Kongresi, 3-8.
126. Saraçlı MA. (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. Gülhane Tıp Dergisi, 48:244-250.
127. Schupbach P, Ostervalder V, Guggenheim B. (1996). Human root caries: micro-biota of a limited number of root caries lesions. Caries Res, 30:52–6.
128. Sennou HE, Lebugle AA, Gregoire GL. (1999). X-ray photoelectron spectroscopy study of the dentin-glass ionomer cement interface. Dent Mater, 15(4):229-237.
129. Shahal Y, Steinberg D, Hırschfeld Z, Bronshteyn M, Kopolovic K. (1998). In vitro bacterial adherence onto pellicle-coated aesthetic restorative materials. J Oral Rehabil, 25(1):52-58.
130. Shemesh M, Tam A, Steinberg D. (2007). Expression of biofilm-associated genes of Streptococcus mutans in response to glucose and sucrose. J Med Microbiol, 56(Pt 11):1528-1535.
131. Shen P, Cai F, Nowicki A, Vincent J, Reynolds EC. (2001). Remineralization of enamel subsurface lesions by sugar-free chewing gum containing casin phospopeptideamorphus calcium phosphate. J Dent Res, 80(12):2066-2070.
132. Shirahatti RV, Ankola AV, Nagesh L, Hallikerimath S. (2007). The effects of three different paste on enamel caries formation and lesion depth progression-An in vitro study. J Oral Health Com Dent, 1(1):1-6.

133. Simonsen RJ. (2002). Pit and fissure sealant: review of the literature. Pediatr Dent, 24(5):393-414.

134. Socransky SS, Haffajee AD. (2000). Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol, 28:12-55.

135. Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrão HC, Rodrigues LK. (2009). In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. J Dent, 37(1):44-51.

136. Sönmez S. (2004). Mikrobiyal dental plak. İçinde Cengiz AT. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Ankara: Güneş kitapevi Ltd. Sti., 182-199.

137. Steinberg D, Mor C, Dogan H, Zacks B, Rotstein I. (1999). Effect of salivary biofilm on the adherence of oral bacteria to bleached and non-bleached restorative material. Dent Mater, 15(1):14-20.

138. Stoodley P, Wefel J, Gleseke A, deBeer D, C. von Ohle. (2008). Biofilm plaque and hydrodynamic effects on mass transfer, fluoride delivery and caries. J Am Dent Assoc, 139(9):1182–1190.

139. Sudjalim TR, Woods MG, Manton DJ. (2006). Prevention of white spot lesions in orthodontic practice: a contemporary review. Aust Dent J, 51(4):284-289.

140. Suljak JP, Hatibovic-Kofman S. (1996). A fluoride release-adsorption-release system applied to fluoride-releasing restorative materials. Quintessence Int, 27(9):635-638.

141. Şener Y, Koyutürk AE. (2006). Üç farklı cam iyonomer simanın yüzey sertliklerinin karşılaştırılması. C Ü Diş Hek Fak Derg, 9(2):91-94.

142. Takinami H. (2007). Effets d'agents antimicrobiens sur un modèle de biofilm dentaire in vitro. Geneve: Faculte de medecine section de médecine dentaire département de prévention et thérapeutique, Division de médecine dentaire préventive, Uzmanlık Tezi, 1-47.

143. Tanaka M, Ono H, Kadoma Y, And Imaı Y. (1987). Incorporation into human enamel of fluoride slowly released from a sealant in vivo. J Dent Res, 66(10):1591-1593.

144. Ten cate JM. (1992). Patient selection and appliance design in intra-oral models. J Dent Res, 71:908-910.

145. Ten Cate JM. (2006). Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. Odontology, 94(1):1-9.

146. Thomas JG, Nakaishi LA. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. J Am Dent Assoc, 137:10-15.

147. Thurnheer T, Ploeg JR, Giertsen E, Guggenheim B. (2006). Effects of Streptococcus mutans gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. Caries Res, 40(2):163–171.

148. Verbeeck RMH, De Maeyer EAP, Marks LAM, De Moor RJG, De Witte AMJC, Trimpeneers LM. (1998). Fluoride release process of (resin modified) glass ionomer cements versus (polyacid-modified) composite resins. Biomaterials, 19(6):509-519.

149. Vermeersch G, Leloup G, Vreven J. (2001). Fluoride release from glass-ionomer cements, compomers and resin composites. J Oral Rehabil, 28(1):26-32.

150. Vitkov L, Hermann A, Krautgartner WD, Herrmann M, Fuchs K, Klappacher M, Hannig M. (2005). Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. Microsc Res Tech, 68:85-89.

151. Waggoner WF, Siegal M. (1996). Pit and fissure sealant application: updating the technique. J Am Dent Assoc, 127(3):351-361.

152. Welbury R, Raadal M, Lygidakis NA. (2004). EAPD guidelines for the use of pit and fissure sealants, Eur J Paediatr Dent, 5(3):179-184.

153. Wiegand A, Buchalla W, Attin T. (2007). Review on fluoride-releasing restorative materials-fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. Dent Mater, 23(3):343-362.

154. Wilson AD, Kent BE. (1972). A new translucent cement for dentistry. The glass ionomer cement. Br Dent J, 132(4):133-135.

155. Yamaguchi K, Miyazaki M, Takamizawa T, Inage H, Moore BK. (2006). Effect of CPP-ACP paste on mechanical properties of bovine enamel as determined by an ultrasonic device. J Dent, 34(3):230-236.

156. Yanez MJ, Barbosa, SE. (2003). Changes in particle area measurements due to SEM accelerating voltage and magnification. Microsc Res Tech, 61(5):463–468.
157. Yüksel A. (2006). Yaygın nasal polipozis hastalarında biyofilm oluşumunun araştırılması. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Uzmanlık Tezi, Ankara.
158. Zaura-Arite E, Van Marle J, Ten Cate JM. (2001). Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine treated dental biofilm. J Dent Res, 80(5):1436-1440.
159. Zero DT. (1995). In situ caries models. Adv Dent Res, 9(3):214-230.
160. Zijnge V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. Plos One, 5(2): 1-9.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Ferhan	**Soyadı**	ERTUĞRAL
Doğum Yeri	Vakfıkebir	**Doğum Tarihi**	11.10.1980
Uyruğu	T.C.	**TC Kimlik No**	
E-mail	dtertugral@yahoo.com	**Tel**	5357915746

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Doktora/Uzmanlık		
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2003
Lisans		
Lise	Kocaeli Körfez Fen Lisesi	1998

İş Deneyimi (Sondan geçmişe doğru sıralayın)

	Görevi	**Kurum**	**Süre (Yıl - Yıl)**
1.	Doktora Öğrencisi	M.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi	2006-2012
2.			
3.			-

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	Çok İyi	İyi	İyi
Almanca	Orta	Zayıf	Zayıf

***** Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

Yabancı Dil Sınav Notu #								
KPDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	70.00							

Başarılmış birden fazla sınav varsa, tüm sonuçlar yazılmalıdır

KPDS: Kamu Personeli Yabancı Dil Sınavı; ÜDS: Üniversitelerarası Kurul Yabancı Dil Sınavı; IELTS: International English Language Testing System; TOEFL IBT: Test of English as a Foreign Language-Internet-Based Test TOEFL PBT: Test of English as a Foreign Language-Paper-Based Test; TOEFL CBT: Test of English as a Foreign Language-Computer-Based Test; FCE: First Certificate in English; CAE: Certificate in Advanced English; CPE: Certificate of Proficiency in English

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office	İyi
Microsoft Power Point	İyi

*****Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendirin

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Klinik Araştırmalar
Ön Değerlendirme Komisyonu

Sayı : 06
Konu : M.Ü.Klinik Araştırmalar Ön Değerlendirme Raporu

İstanbul, 19/07/2010

Sayın Prof.Dr. Ali MENTEŞ

04 protokol nolu "Farklı dental materyaller üzerinde in situ oluşan biofilm tabakasının Taramalı Elektron Mikroskobu ve Geçirmeli Elektron Mikroskobu' nda in vitro incelenmesi" isimli projeniz Enstitümüzün ön değerlendirme komisyonunda incelenmiş ve araştırmanın Komisyonumuzun ön değerlendirme kriterlerine uygunluğuna karar verilmiştir.

Doç.Dr. Ümit ŞEHİRLİ
Komisyon Başkanı

Öğrenci: Ferhan ERTUĞRUL

Marmara Üniversitesi Haydarpaşa Kampüsu
34668 Üsküdar/ İSTANBUL
0 (216) 414 44 23
0 (216) 414 44 2 912 (Faks)
saglikogrenci@marmara.edu.tr
http://saglik.marmara.edu.tr