



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



**OZONUN BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ANTİBAKTERİYEL
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Burcu NAMAZOĞLU

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Firdevs TULGA ÖZ

2014-ANKARA

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

OZONUN BİYOFİLM ÜZERİNDEKİ ANTİBAKTERİYEL
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Burcu NAMAZOĞLU

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Firdevs TULGA ÖZ

2014-ANKARA

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Pedodonti doktora programı

çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından

Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir

Tez Savunma Tarihi: / / 2013

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversite
Jüri Başkanı

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi
Raportör

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

Ünvanı, Adı ve Soyadı
Üniversitesi

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	v
Simgeler ve Kısaltmalar	vi
Şekiller	viii
Çizelgeler	xi
1.GİRİŞ	1
1.1.Biyofilm Tanımı ve Tarihçesi	2
1.2.Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri	6
1.2.1.Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturmaktadırlar?	9
1.2.2.Biyofilm İçindeki Bakterilerilerin Özellikleri ve Serbest Halde Bulunan Bakterilerle Karşılaştırılması:	11
1.2.3.Bakteriyel Biyofilmler Neden Antimikrobiyal İlaçlara Dirençlidir?	12
1.2.3.a.Biyofilm İçine Düşük Penetrasyon	13
1.2.3.b.Biyofilmi Oluşturan Mikroçevrede Değişiklik	13
1.2.3.c.Biyofilm İçinde Fenotipik Değişikliklerin Oluşumu	14
1.3.Biyofilmin Gelişim Evreleri	15
1.4.Biyofilm Oluşumunda Quorum Sensing: Çoğunluğu Algılama (QS) Mekanizmaları	17
1.5.Oral Biyofilm	20
1.6.Biyofilm Tabakasının Görüntülenmesi	22
1.7.Dış Çürüğü	24
1.8. Antiplak Ajanlar	26
1.8.1.Fluor	27
1.8.1.1.Dış Plakındaki Fluor Varlığı ve Dağılımı	28
1.8.2.Klorheksidine (Chx)	31
1.8.2.1.Klorheksidinin Plak Oluşumunu Önleyici Etkisi	32
1.8.2.2.Klorheksidinin Oluşmuş Plağa Etkisi,	34
1.8.3.Ozon	35
1.8.3.1.OzonyTronX	37
1.9.İn-situ Çalışmalar	39
1.10.Yapılan Çalışmalar	41
1.10.1.Fluorun Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Araştıran Çalışmalar:	41
1.10.2.Klorheksidinin Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Değerlendiren Çalışmalar	42
1.10.3.Fluor ve Chx' in Antimikrobiyal Ajan Olarak Birbirleriyle Karşılaştırdıkları Çalışmalar	44
1.10.4.Ozonun Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Değerlendiren Çalışmalar	47
1.11.Amaç	50

2.GEREÇ VE YÖNTEM	54
2.1. Etik Kurul Onayı	54
2.2. Çalışmada Kullanılan Materyaller	54
2.3. Araştırmaya Dahil Edilen Katılımcıların Seçim Kriterleri	55
2.4. Dişlerin Hazırlanması	56
2.5. Dişlerden Elde Edilen Örneklerin Hazırlanması	56
2.6.Örneklerin Plaklara Yerleştirilmesi ve Katılımcılar Tarafından Kullanılması	57
2.7. Biyofilm Örneklerine Uygulanan Tedavi Prosedürleri	61
2.8. Boyaların Hazırlanması	65
2.9. Örneklerin Boyama ve Sabitleme İşlemi	66
2.10.Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu İle Değerlendirme	67
2.11. İstatistiksel Değerlendirme	68
3. BULGULAR	69
4. TARTIŞMA	94
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	136
ÖZET	141
SUMMARY	143
KAYNAKLAR	145
EKLER	166
Ek- 1	166
Ek- 2	167
Ek- 3	168
Ek- 4	169
Ek- 5	170
Ek-6	171
Ek-7	172
ÖZGEÇMİŞ	173

ÖNSÖZ

Ozonun biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisini değerlendirmeyi amaçladığımız tez çalışmamızın her aşamasında sabırlı, anlayışlı ve özverili yaklaşımlarıyla bana yardımcı olan, doktora eğitimim boyunca çok şey öğrendiğim, özel hayatımda her zaman desteğini hissedeceğim, çok şeyi borçlu olduğum ve öğrencisi olmaktan gurur duyduğum çok sevdiğim değerli danışman hocam Prof. Dr. Firdevs TULGA ÖZ' e

Tez çalışmam süresince, önerileri ve yardımları ile bana destek olan tez izleme komitesindeki değerli hocalarım Prof. Dr. Ayşegül ÖLMEZ ve Prof. Dr. Nurhan ÖZALP' a

Doktora eğitimim süresince değerli bilimsel ve mesleki tecrübelerinden yararlandığım ve yanlarında eğitim almaktan gurur duyduğum Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne,

Tez çalışmam sırasında gerek bilgisi gerekse desteğiyle bana yardımcı olan Uzm. Biyolog Ayça YILMAZ' a,

Her türlü yardım ve destekleriyle her zaman yanımda olan Dr. Dt. Hande Erkli ŞEBEROL, Dr. Dt. Erçin ŞEBEROL ve Dt. Ceren KOSER başta olmak üzere, fiilen yanımda olamasalar da varlıklarını her zaman hissettiğim ve bana her seferinde çok şanslı bir insan olduğumu hatırlatan canım dostlarım Dr. Dt. Esra YEŞİLÖZ GÖKÇEN, Dr. Dt. Emine SÜTLAŞ ŞAHİN, Dr. Dt. Semiha ESİRGİN BAHAROĞLU, Dr. Dt. Murat ÇETİNKAYA ve Dr. Dt. Zerhan KIZILELMA' ya ve diğer tüm asistan arkadaşlarım ile kürsü personeline,

Hayatımın her anında yanımda olan, sevgilerini ve desteklerini hep hissettiğim, bugünlere gelmemde en büyük emeğe sahip ve en önemlisi teşekkürlerin yetersiz kaldığı çok sevdiğim canım annem Havva KOÇ ve canım babam Ahmet Nabi KOÇ'a,

Hayatıma girdiği ilk günden beri beni her konuda destekleyen, en kötü anımda bile sabırla ve özveriyle yanımda olup tüm sıkıntılarımla paylaşan kocaman yüreğiyle beni her şeyin güzel olacağına inandıran biricik eşim Serkan NAMAZOĞLU' na ve o kocaman gözleri ve minicik yüreğiyle bana her an her saniye çok şanslı bir insan olduğumu hatırlatan, her şeyden çok sevdiğim minik kuzum POYRAZ'a tüm kalbimle teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

%	Yüzde
~	Yaklaşık
<	Küçüktür
=	Eşittir
>	Büyüktür
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
A. actinomycetemcomitans	Aggregatibacter actinomycetemcomitans
A. naeslundii	Actinomyces naeslundii
AHL	Açıl Homoserin Lakton
AI-2	Autoinducer- 2
AIP	Autoinducer Peptitler
AmF	Amine floridin
C. albicans	Candida albicans
Ca	Kalsiyum
Caf 2	Kalsiyum florid
CHX	Klorheksidin
CPC	Cetylpyridinium chloride
dk	Dakika
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. faecalis	Enterococcus faecalis
EB	Ethidum bromide
EPS	Ekstraselüler polisakkarit
F	Fluor
FDA	Fluoresan diacetate
H+	Hidrojen atomu
H2O2	Hidrojen peroksit
HF	Hidrofluorik asit
KLTM	Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu
L	Litre
L. casei	Laktobacillus casei
Maks.	Maksimum
mg	Miligram
Min.	Minimum
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mm ²	Milimetre kare
NAF	Sodyum florid
nm	Nanometre
O	Oksijen atomu
O ₂	Oksijen molekülü
O ₃	Ozon molekülü
P. micra	Poliana mikra

P.gingivalis	Porphyromonas gingivalis
pH	Power of hydrogen
ppm	Parts Per Million
QS	Quorum sensing (Çoğunluğu algılama)
RNA	Ribonükleik asit
rpoS	RNA polymerase, sigma S
s	Saniye
s. sobrinus	Streptokokus sobrinus
S.mutans	Streptokokus Mutans
S.S	Standart Sapma
S.sangius	Streptokokus Sangius
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscope)
T. forsythia	Tannerella forsythia
TEM	Geçirmeli Elektron Mikroskobu (Transmission Electron Microscope)
TÜV	Industrie Service GmbH kuruluşu /Technischer Überwachungs-Verein
USPHS	US Public Health Service
UV	Ultraviyole
V.parvula	Veionella parvula

ŞEKİLLER

Şekil 1.1	Kule veya mantar benzeri kümelenme gösteren mikrokolonilerin şematik görünümü	7
Şekil 1.2	Biyofilm oluşum evrelerinin şematik görünümü	17
Şekil 1.3.	OzonyTronX cihazının prob uçları	37
Şekil 2.1.a)	Köklerinden ayrılmış sığır dişlerinin kalıba gömülmüş hali	57
Şekil 2.1.b)	Sığır dişlerinden elde edilen örnekler	57
Şekil 2.1.c)	Hassas Kesit Alma Cihazı	57
Şekil 2.2.a)	Üst çeneye uygulanan plağın görüntüsü	58
Şekil 2.2.b)	Plağın alçı model üzerindeki görünümü	58
Şekil 2.3.	Plak üzerindeki bukkal uzantının alçı modelde görünümü	58
Şekil 2.4.a)	Örneklerin plak üzerine yerleştirilmiş halinin alçı model üzerindeki görünümü	59
Şekil 2.4.b)	Örneklerin plak üzerine yerleştirilmiş halinin hasta ağzındaki görünümü	59
Şekil 2.4.c)	Örneklerin bukkal oluk içine yerleştirilmiş hali	59
Şekil 2.4.d)	Bukkal oluğa yerleştirilmiş örneklerin ağız içi görüntüsü	60
Şekil 2.4.e)	Bukkal oluğa yerleştirilmiş örneklerin şematik görüntüsü	60
Şekil 2.5.	Örneklerin fizyolojik salin ile yıkanması	63
Şekil 2.6.a)	OzonyTronX cihazı	63
Şekil 2.6.b)	Örneklere ozon gazı uygulaması	63
Şekil 2.7.a)	Cervitec® Plus cila	63
Şekil 2.7.b)	Örneklere Cervitec® Plus cila uygulaması	63
Şekil 2.8.a)	Duraphat® cila	64
Şekil 2.8.b)	Örneklere Duraphat® cila uygulaması	64
Şekil 2.10.a)	Ethidium Bromide cansız hücre boyası	65
Şekil 2.10.b)	Fluoresan diasetate canlı hücre boyası	65
Şekil 2.11	Örneklerin mikropipet yardımı ile boyanma işlemi	66
Şekil 2.12	Fazla boyanın serum fizyolojik ile uzaklaştırılması	67
Şekil 2.13	Örneklerin lamele yapıştırılmış hali	67
Şekil 2.14	Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu görüntüsü	68
Şekil 3.1	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm kalınlık değerlerinin dağılımı	70
Şekil 3.2.	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm cansızlık değerlerinin dağılımı	76
Şekil 3.3.a)	6. Saatte oluşmuş biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	78
Şekil 3.3.b)	6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü.	78
Şekil 3.4.a)	6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	78

Şekil 3.4.b)	6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü	79
Şekil 3.5.a)	6 saatlik biyofilm örneğine ozon-Chx uygulanması sonrası KLTM görüntüsü. 1. görüntüdeki kırmızı alanlar cansız hücreleri, 2. görüntüdeki yeşil alanlar canlı hücreleri 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	79
Şekil 3.5.b)	6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü	79
Şekil 3.6.a)	6 saatlik biyofilm örneği üzerine Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	80
Şekil 3.6.b)	6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü	80
Şekil 3.7.a)	6 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	81
Şekil 3.7.b)	6 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü	81
Şekil 3.8.a)	6 saatlik bioflm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	81
Şekil 3.8.b)	6 saatlik bioflm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü	82
Şekil 3.9.a)	24 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulaması sonrası KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	84
Şekil 3.9.b)	24 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü	84
Şekil 3.10.a)	24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	85
Şekil 3.10.b)	24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü	85
Şekil 3.11.a)	24 saatlik biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	85
Şekil 3.11.b)	24 saatlik biyofilm üzerine ozon-chx uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü	86
Şekil 3.12.a)	24 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık	86

	halini göstermektedir.	
Şekil 3.12.b)	24 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü	86
Şekil 3.13	24 saatlik biyofilm örneği üzerine fluor uygulanması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	87
Şekil 3.14	24 saatlik biyofilm üzerine ozon- fluor uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	87
Şekil 3.15.a)	48 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir	90
Şekil 3.15.b)	48 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü	90
Şekil 3.16	48 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	90
Şekil 3.17	48 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	91
Şekil 3.18.a)	48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon- Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	91
Şekil 3.18.b)	48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon- chx uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü	92
Şekil 3.19	48 saatlik biyofilm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	92
Şekil 3.20.a)	48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.	93
Şekil 3.20.b)	48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü	93

ÇİZELGELER

Çizelge 1.1	OzonyTronX prop uçları ve kullanım alanları	38
Çizelge 1.2	OzonyTronX cihazının kademeleri, konsantrasyonu, uygulama süresi ve uygulama alanları	38
Çizelge 2.1	Tez çalışmamızda kullanılan materyallerin, marka, içerik ve üretici firmaları	55
Çizelge 2.2	Gruplara uygulanan tedavi prosedürleri	62
Çizelge 3.1	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm kalınlık değerleri	70
Çizelge 3.2	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri	71
Çizelge 3.3	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 24. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri	72
Çizelge 3.4	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 48. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri	73
Çizelge 3.5	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm cansız bakteri yüzdesi	74
Çizelge 3.6	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdesi	76
Çizelge 3.7	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 24. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdeleri	82
Çizelge 3.8	Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 48. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdeleri	88

1.GİRİŞ

Ağız ve diş hastalıkları ülkemizde görülen halk sağlığı sorunları listesinin ön sıralarında yer almaktadır. Toplumda ağız diş sağlığı sorununun azaltılabilmesi, sağlık hizmetlerinin nitelik ve niceliğinin koruma esaslı diş hekimliği hizmetine dönüştürülmesi ile mümkündür. Bu da ancak koruyucu diş hekimliği uygulamaları ile tedavi edici uygulamaların bir arada kullanılması kimi zaman da koruyucu hizmetlere öncelik ve ağırlık verilmesi ile mümkündür (Yazıcıoğlu, 1987; Yılmaz, 1993).

Diş çürüğü, ağız sağlığını en çok etkileyen hastalıklardan biri olup %60-90 oranında okul çağındaki çocuklarda görülmektedir (Borsatto ve ark., 2001). Bilindiği gibi çürük oluşumu ve ilerlemesinde etkili olan en önemli risk faktörlerinden biri diş yüzeyine kolonize olan karyojenik mikroorganizmalardır (Caufield ve ark., 2005). Yirminci yüzyılın ikinci yarısından sonra, elektron mikroskobu kullanımının yaygınlaşmasıyla birlikte, mikrobiyoloji alanında da büyük aşamalar kaydedilmiştir (Brock, 2003). Bu döneme kadar, bakterilerin sıvıların içerisinde, serbest biçimde tek başlarına yani planktonik yapı sergiledikleri düşünülürken, yapılan çalışmalarla bu fikrin tam aksi ortaya konmuş ve mikroorganizmaların canlılıklarını sürdürebilmek için katı bir yüzeye ihtiyaç duyduğu kanıtlanmıştır (Rijnaarts ve ark,1993; Zhang ve Taylor,1994). Islak yüzeylerde oluşan mukoid yapıdaki bakteriler fenotipik olarak planktonik hallerinden farklılık göstermektedir. Bu farklıktan yola çıkarak, mukoid yapılara, İngilizce canlı tabaka anlamına gelen “BİYOFİLM” isminin verilmesi uygun görülmüştür (Brock, 2003).

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 (Costerton ve ark., 1999; Fejerskov, 2004; Post ve ark., 2004; Marsh, 2012). Bu yeni görüşle birlikte diş çürüğü, diş minerali ve biyofilm sıvısı arasındaki fizyolojik dengede bozulmayla ortaya çıkan kompleks bir hastalık

olarak da tanımlanmaktadır (Fejerskov ve Nyvad, 2003; Marsh, 2012). Biyofilm, enfeksiyonların %80' inden fazlasından sorumludur (Fejerskov, 2004).

Çürük oluşumunun önlenmesi ve hastalığın kontrol altında tutulması, biyofilm yapısının mekanik ya da kimyasal olarak önlenmesiyle mümkündür (Axelsson ve Lindhe, 1987). Aktif ajanlar ağız içerisindeki biyolojik dengeyi bozmadan biyofilm oluşumunu önleyebilmektedirler. Bakteriosidal ve bakteristatik özelliklere sahip antimirobiyal ajanlar öncelikle koruma amaçlı kullanılırlar. Hedef, bireyin sağlığının devamı ve yeniden oluşabilecek hastalıklara karşı korunmasını sağlamaktır. Mantık, patojenik mikroorganizmaların tekrardan diş eti oluşu sıvısı içerisine kolonizasyonunu engellemek ya da ertelemektir (Baehni ve Takeuchi, 2003). Ekolojiyle ilgili genel kavramlar göz önüne alındığında, plak ve ağız dokuları arasındaki normal dengenin sağlanabilmesi değerli bir yaklaşım olarak öne sürülebilir. Ağız hijyen motivasyonu, diyet düzenlenmesi, odontopatojenik bakterilerin eliminasyonu, fissür örtücü ve antibakteriyel ajanlar gibi koruyucu uygulamaların yapılması bu dengenin korunmasına yarar sağlayan yaklaşımlardır (Bowden ve Edwardsson, 1994).

1.1.Biyofilm Tanımı ve Tarihçesi

Uzun yıllar boyunca yapılan birçok araştırma biyofilm çalışmaları için temel oluşturmaktadır. Yeni teknolojiler ve geliştirilen yeni mikroskoplarla birlikte plak mikrobiyolojisinin gerçek doğası, gün geçtikçe daha da fazla açıklık kazanmaya başlamıştır (Marsh, 2004). Overman, 2000; araştırmacıların, 120 yıldan bu yana ağızdaki hastalıklara sebep olan mikroorganizmaların doğasını anlamaya çalıştıklarını bildirmiştir. Zamanla diş plağı ve içerisinde barındırdığı mikroorganizmalar hakkındaki görüşler değişmiştir.

Günümüze kadar biyofilm birçok bilim adamı tarafından farklı şekillerde tanımlanmıştır. Costerton ve ark. (1978), biyofilmlerin ilk olarak 17. yüzyılda Anton van Leeuwenhoek tarafından tanımlandığını söylemiş, o dönemde dişinin üzerindeki plaktan aldığı örneği inceleyen ve mikroskop altında mikrobiyal

kümelerin varlığını izleyen Leeuwenhoek' un, baktığı şeyin biyofilm olduğunun farkında olmadığını bildirmiştir.

Socransky ve Haffajee, (1994), 1880' den 1930' a kadar olan yılların mikrobiyolojinin altın yılı olarak kabul edildiğini, sağlık açısından önem taşıyan ve birçok sistemik enfeksiyona sebep olan patojenlerin o dönemde tanımlandığını ve diş çürüklerine plak içerisindeki belirli mikroorganizmaların sebep olduğunu bildirmiştir. 1930' lu yıllarla birlikte plak hakkındaki görüşler de değişmeye başlamıştır. Overman, (2000), araştırmacıların 1930' lu yıllarda spesifik olmayan plak hipotezine inandığını, ağız içerisindeki hastalıklara belirli tür bakterilerden çok, bakteri florasının tümünün sebep olduğu ve plak oluşumuna neden olan mikroorganizma türlerinin, tek başına bir öneminin olmadığını bildirmiştir.

Ağız içerisindeki bu mikrobiyolojik olaylar doğadaki çalışmalarla da desteklenmiştir. İlk olarak Heukelekian ve Heller (1940), suda yaşayan mikroorganizmaların tutunabilecek bir yüzey bulmaları halinde, artmış aktivite ve büyüme hızları sergilediklerini bildirmişlerdir. Bir atık su işleme ünitesindeki filtreleri inceleyen Jones ve ark. (1969), filtreler üzerinde tutunmuş halde bulunan hücrelerin morfolojilerine bakarak, farklı mikroorganizmaların bir arada bulunduklarını tespit etmişlerdir.

Biyofilm hakkındaki genel teori asıl olarak 1970' li yıllardan sonra netlik kazanmış bunun da ötesine geçerek bakterilerin multisellüler davranış sergilemeye başlaması ile mikrobiyolojiye bakış açısı da değişmiştir (Biedlingmaier ve ark., 1998; Bothwell ve ark., 2003). Costerton ve ark. (1978), akarsuların içerisinde yaşayan bakterileri incelerken bakterilerin %99.99'unun bir yüzeye yapışarak, balçık benzeri bir yapı içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuş bu toplulukları tanımlamak amacıyla da ilk defa 'biyofilm' terimini kullanmıştır.

Davey ve O'toole (2000), biyofilm tabakasının 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.

Biyofilm tanımı son 30 yıl içerisinde elde edilen bilgiler ışığında geliştirilmiştir. Costerton ve ark. (1978), bakterilerin polisakkarit yapıda bir glikokaliks matriks içerisinde bulunduğunu ve bu yapının adezyonu kolaylaştırdığını gözlemlemişlerdir. Yine Costerton ve ark. (1987)'de biyofilmlerin yüksek oranda sulu (hidrate) anyonik ekzopolimer matriks içinde bulunan mikrokoloniler olduğunu belirtmiştir. Watnick ve Kolter (2000), biyofilmi, cansız ya da canlı bir yüzeye tutunmuş birçok bakterinin salgıladıkları muköz yapı içerisinde bir araya gelmesiyle oluşan mikroplar şehri olarak tanımlamışlardır. Bir grup araştırmacı ise; biyofilmi, mikrobiyal olarak değişime uğramış, yüzeye ya da birbirine tutunarak matriks ya da hücre dışı polimerik madde içine gömülmüş olan planktonik hücrelerden çoğalma, genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan biyolojik bir oluşum olarak tanımlamaktadırlar (Rijnaarts ve ark, 1993; Hood ve Zottola, 1997; Watnick ve Kolter, 2000; Jenkinson ve Lappin- Scott, 2000; Sutherland, 2001; Donlan, 2002).

Biyofilmin en yeni tanımı ise, canlı ya da cansız bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri organik bir ekzopolisakkarit matriks içine gömülü ve hareketsiz olarak birbirine, bir katı yüzeye ya da bir ara yüzeye tutunmuş genetik yapı ve protein sentezi açısından tamamen değişik yapıda olan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk olarak belirtilmektedir (Davey ve O'toole, 2000; Rudney, 2000; Rolland ve ark., 2006; Ten Cate, 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006; Thurnheer ve ark., 2006; Altun ve Şener, 2008; Jayaraman ve Wood, 2008). 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 dış ünitlerinde rastlanabilmektedir (Thomas ve Nakaishi, 2006; Altun ve Şener, 2008). 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 ve çeşitli dokularda oluşabilmektedir.

Biyofilmlerin bir kısmı organizma açısından koruyucu bir rol üstlenirken, belirli bir kısmı da 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, böbrek taşı, akciğer dokusu gibi canlı cansız birçok yüzeyde bulunabilmektedir (Altun ve Şener, 2008; Nadell ve ark., 2009).

Donlan ve Costerton (2002), biyofilm tanımını biraz daha geliştirmiş ve biyofilmleri aşağıdaki özelliklere sahip mikrobiyal hücrelerden oluşan hareketsiz bir topluluk olarak tanımlamışlardır:

1) Hücreler geri dönüşümsüz olarak bir substrata, ara yüze veya birbirlerine tutunmuşlardır.

2) Hücreler kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içerisinde gömülüdürler.

3) Büyüme hızları ve genlerinin kopyalanması açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar vardır (Donlan ve Costerton, 2002).

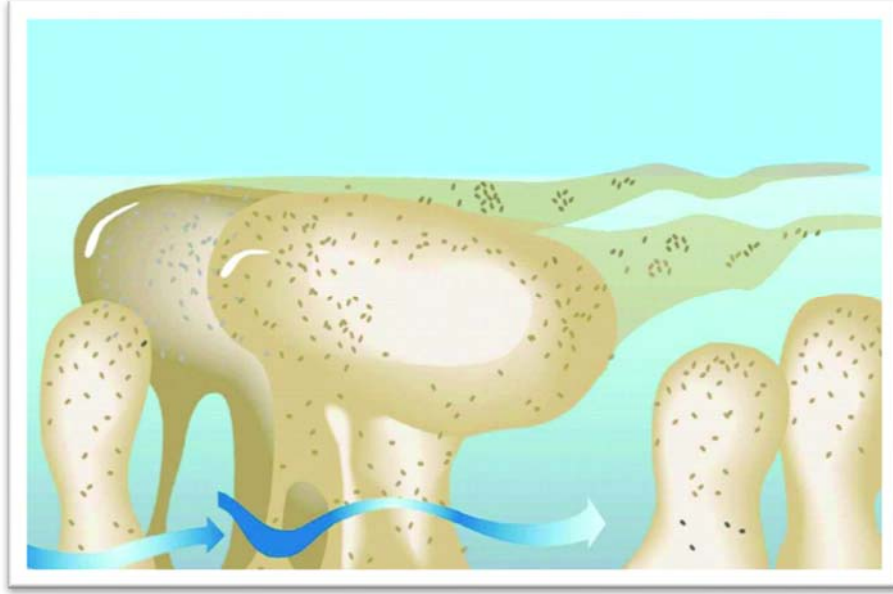
Bu tanım çok önemlidir. Çünkü bir yüzeyde koloniler halinde tutunarak yaşayan bazı mikroorganizmaların oluşturdukları her tabakaya ‘biyofilm’ denilmemelidir. Gerçekte biyofilm olmayan bu topluluklar, bulundukları yüzeylerde serbest hücre davranışı sergilemeye devam ederler. Hiçbirinde biyofilm içerisindeki bakterilerde izlenen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özellikler izlenmez. Bununla birlikte, biyofilm içerisindeki hücrelerin zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve dolaşıma geçtikleri unutulmamalıdır. Dolaşıma geçen bu hücreler, serbest formda olmalarına rağmen, ayrıldıkları topluluğun tüm güçlü karakterlerini taşımaktadırlar (Donlan, 2002).

1.2.Biyofilm Yapısı ve Genel Özellikleri

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 (Costerton ve ark., 1999; Fejerskov, 2004; Post ve ark., 2004; Marsh, 2012). Biyofilm, bakterinin yüzeyinde düzensiz bir şekilde dağılmış polisakkarit tabiatındaki bir matrikstir. Matriksin yoğunluğu ve genişliği sadece hücresel ve hücresel olmayan yapılar arasında değil, zamanla mikroorganizmaların türleri arasında da değişmektedir (Davey ve O'toole, 2000; Fraud ve ark., 2007).

Araştırmacılar, biyofilm yapısının 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 vurgulamışlardır (Davey ve O'toole, 2000; Marsh, 2012). Üç boyutlu açıdan bakıldığında biyofilmler, matriksleri içerisinde yaşamlarını sürdüren, hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasına imkan tanıyan 'su kanallarına' ve çok tabakalı heterojen bir yapıya sahiptirler (Davey ve O'toole, 2000; Teughels ve ark., 2006). Biyofilm yapısının büyük bölümü (%73-98) sulu (hidrate) şekildedir (Davey ve O'toole, 2000, Fraud ve ark., 2007).

Tam hidrate ve canlı biyofilm hacmi; %15 hücre ve %85 matriks materyali tarafından oluşturulmaktadır. Hücreler ise, bu matrikslerin çevrelendiği, farklı yüksekliklerdeki 'kuleler' ya da 'mantarlar' içerisinde yer almaktadır (Çiftçi, 2005; Donlan ve Costerton, 2002) (Şekil 1.1).



Şekil 1-1: Kule veya mantar benzeri kümelenme gösteren mikrokolonilerin şematik görünümü (Donlan ve Costerton, 2002)

Bir biyofilmin oluşması için gerekli olan ortak bileşenler mikroorganizma, glikokaliks ve yüzeydir. Bu bileşenlerden biri olmadığı takdirde biyofilm oluşamamaktadır. Biyofilmler tek bir mikroorganizma türü tarafından oluşturulabildiği gibi birden fazla türü de yapısında barındırabilmektedir (Davey ve O'toole, 2000; Altun ve Şener, 2008). Farklı türlerde oluşan biyofilmlerde, her tür kendi mikrokolonisini oluşturur. Bu mikrokoloniler birbirlerinden su kanalları aracılığı ile ayrılmışlardır. 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 (Davey ve O'toole, 2000; Altun ve Şener, 2008).

Tolker-Nielsen ve Molin'e (2000) göre, çoğu yapısı benzer olsa da her biyofilm yapısı kendine özgüdür. Bazı araştırmacılar biyofilmin devamlılık gösteren tek bir tabakadan oluşmadığını düşünerek, isminin yanlış verildiğini savunmuşlar ve biyofilmin daha çok mikro kolonilerden oluşan bir yapı olduğunu bildirmişlerdir (Davison, 1999; Lagido ve ark.,2003). Ayrıca biyofilimde ekstraselüler polisakkarit dağılımının homojen olmadığı da ortaya konmuş, sıvı akışı sonucu oluşan su kanallarının heterojen besin maddesi, oksijen hatta antimikrobiyal madde dağılımına neden olduğu bildirilmiştir (James ve ark., 1995).

Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler, biyofilmin ana ekstraselüler komponentini oluşturmaktadırlar (Nadell ve ark., 2009). Mikroorganizmaların birçoğu değişen kompozisyonlarda ekstraselüler polisakkarit üretmektedirler (Yılmaz ve Çelik, 2007). Biyofilm içerisinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler; intraselüler polisakkarit (depo), ekstraselüler polisakkarit (EPS), ve yapısal formdaki polisakkarit olmak üzere 3 ayrı formdadır. Bunlar biyofilm yapısının ana ekstraselüler komponentini oluştururlar. EPS formları hücre duvarı ile birleşmiş olabilen kapsüler veya büyük miktarlarda hücre duvarı dışında biriken ve kültür ortamına yayılan bağımsız salgılar olarak üretilen yapılardır ve genellikle immünojeniktirler (Yılmaz ve Çelik, 2007). Kapsüler EPS bakteri hücre yüzeyindeki fosfolipid veya lipid-A moleküllerine kovalent bağ ile bağlanmaktadır (Costerton ve ark., 1994). EPS' ler suda çözünen polimerlerdir ve doğada iyonik ya da iyonik olmayan yapılarda bulunabilirler. Pek çok mikroorganizma, ekstraselüler polimerik araçların biyosentezi ile fonksiyonel bir topluluk oluştururlar (Yılmaz ve Çelik, 2007).

EPS' ler, bakteriyi koruyucu bir örtü şeklinde sararak bakterinin olumsuz çevre şartlarından korunmasını ve çeşitli yüzeylere tutunmasını sağlamaktadırlar. EPS' nin bakteriyi koruma özelliği ayrıca antibiyotiklere ve deterjanlara karşı da fiziksel bir koruyuculuk şeklinde ortaya çıkmaktadır. Sonuç olarak yüksek moleküler yapıya sahip EPS şekli koloninin direncini ve kararlılığını ortaya koymaktadır (Costerton ve ark., 1994; Yılmaz ve Çelik, 2007). Bu ürün bakterilerin koloniler olarak büyümelerine yardım eden, besinlerin bulunduğu sert yüzeylere tutunmalarını sağlayan yapılardır (Costerton ve ark., 1987). Jel formasyonu, flokülasyon, emülsiyon, absorpsiyon, film formasyonu ve koruma gibi pekçok role sahip olan EPS' ler aynı zamanda biyofilm bakterilerinin varlığını sürdürülebilmesinden başka genetik özelliklerinin korunmasında ve genetik bilgi değişimi için gerekli ortamın hazırlamasında da çok büyük öneme sahiptirler (Moller ve ark., 1998).

1.2.1.Mikroorganizmalar Neden Biyofilm Oluşturmaktadırlar?

Doğal bir ortamda, tek bir tür bakteri izole bir kültür içerisinde yaşayamaz. Bakteriler her zaman diğer bakteri türleri ile bir alış veriş arayışı içerisinde. Bu alışveriş esnasında birbirlerinin atıklarını kullanırlar ve hatta birbirlerine genetik paketler gönderirler. Bakterilerde bir hayat ağacından çok türler arası bir ağdan bahsedilebilir. Bu da bakterilerin mevcut genetik özelliklerini sadece kendisinden önceki türlerden, yani atalarından değil, kendisiyle herhangi bir ilişkisi olmayan fakat bulunduğu ortamda komşusu durumunda bulunan başka tür bir bakteriden genetik materyal alarak elde edebileceği anlamını taşır (Biedlingmaier ve ark., 1998; Bothwell ve ark., 2003).

Tek başlarına biyofilm oluşturabilen veya diğer mikroorganizmalarla ortak biyofilm oluşturmak için iletişime geçebilen sayısız bakteri ve üretilebilecek sayısız polisakkarid türünün var olduğu düşünüldüğünde, elde edilebilecek farklı türdeki biyofilm sayısı sonsuza yaklaşmaktadır. Bu nedenle, doğada tek bir türün oluşturduğu biyofilmler çok nadir olup, daha çok birden fazla organizmanın oluşturduğu biyofilmler izlenir (Sutherland, 2001).

Bakteriler gerek in-vitro gerekse in-vivo ortamda biyofilm oluşturmak suretiyle bir dizi avantaja sahip olurlar (Hall-Stoodley ve ark., 2004). Biyofilm yapısı; bakterileri nem, ısı ve pH değişiklikleri gibi çevresel faktörlerden ve ultraviyole ışığa maruz kalmanın doğuracağı zararlardan korur. Besinlerin depolanmasının ve atıkların uzaklaştırılmasının kolaylaştırılması da biyofilm oluşumunun getirdiği avantajlardandır. Bakterilerin kümeler halinde ve EPS matriks içerisinde bulunmaları, fagosite edilmelerini güçleştirir ve hümmoral immün sistem bileşenlerinin bakterilere ulaşmalarını engeller (Costerton ve ark., 1994; Post ve ark., 2004).

Bakterilerin biyofilm oluşturan formları ile serbest yaşayan formu arasında ciddi farklılık görülmesine ve bakterinin biyofilm oluşturmalarını gerektiren durumlar ile ilgili farklı görüşler olmasına karşın yapılan çalışmalar değerlendirildiğinde biyofilm oluşum nedenleri şu başlıklar altında açıklanmıştır (Öztürk ve ark. 2008).

- ❖ **Savunma:** EPS' lerin farklı biyofilm topluluklarında ve çevre koşullarında çeşitli roller oynadıkları ve EPS matriksinin aynı zamanda bir iyon değiştiricisi gibi davranarak çeşitli ajanların biyofilm içerisine girişlerini engellediği bilinmektedir (Gilbert ve ark., 1997). Biyofilme sahip organizmalar; besin yoksunluğu, pH değişiklikleri, oksijen radikalleri, dezenfektanlar, fagositoz ve antibiyotikler gibi etkenlere karşı planktonik hücrelerden çok daha dirençlidirler. Çevreden almış olduğu sinyaller sonucunda tehlikede olduğunu algılayan bakteri mevcut genler ile biyofilm oluşturarak kendini koruma altına almaktadır (Davey ve O'toole, 2000; Marsh, 2003; Nadell ve ark., 2009).
- ❖ **Adezyon ve Kolonizasyon:** Mikroorganizmanın yaşaması ve ortamda kalabilmesi için en bilinen yol biyofilm oluşturmaktır (Patti ve ark., 1994) Bakterinin vücudun herhangi bir bölgesinde sabit kalabilmesi 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 popülasyona ulaşmak için çoğalırken diğer yandan da biyofilm oluşturma özelliğine göre biyofilm yapımına başlamaktadırlar. Biyofilm, bakterinin yapışmasını (tutunmasını) arttırırken, biyofilm oluşumunun başlaması ile birlikte hareket (motilite) faktörlerinin salgılanmasında da bir baskılama olmaktadır (Whitley ve ark., 2001; Wolz ve ark., 2002)
- ❖ **Yaşanabilir Çevre Geliştirmek:** Pseudomonas, Vibrio cholerae, Escherichia coli ve Staphylococcus gibi bakteriler, ortamda bulunan glukozu kullanarak EPS salgılanması ve biyofilm oluşumunu belirgin bir şekilde arttırmaktadırlar. Karbon katabolitleri, konakta yapışmış bakterinin gen regülasyonunu indüklemeye özelliği sayesinde biyofilm oluşumunda kritik rol oynamaktadır. Bakterinin konakta uygun bir ortam oluşturarak kalabilmesi için biyofilm yapısı gerekmektedir (Davey ve O' toole ve ark., 2000),

- ❖ **Topluluk oluşturmak:** Kazançların ortak paylaşımıdır. Bakterilerin ortama adaptasyonu sırasında toplu halde hareket etmeleri biyofilm oluşumunda sıklıkla görülmektedir. Tüm bakterilerin çevre faktörlerine aynı yanıtı vermiş olmaları ve fenotipik değişiklikler sergilemeleri toplu halde yaşamlarının en önemli göstergesidir (Öztürk ve ark., 2008).
- ❖ **Yeni genetik özelliklerin kazanılması:** Horizontal gen transferi doğal mikrobiyal toplulukların evrimi ve genetik çeşitliliği için çok önemlidir. Bu durum özellikle antibiyotiklere dirençli bakterilerin ortaya çıkmasında büyük rol oynar (Davies ve ark., 1998). Yapılan genom ve proteom çalışmaları biyofilm gelişimi ile ilgili birçok genin bulunmasına neden olmuştur. Bu genlerin hücre fizyolojisindeki rolleri araştırıldığında; adezyon, quorum sensing (Çoğunluğu algılama), hücre duvar yapımı, metabolizma, stres cevabı ve plazmide bağlanmada etkili oldukları görülmüştür. Biyofilm oluştukça mikro çevredeki değişiklikler, gen ekspresyonlarında da değişiklikler oluşturarak biyofilm oluşumunu hızlandırmaktadır (Öztürk ve ark., 2008). Özellikle biyofilm içerisindeki kapalı ortam bakteri birleşmesinin kolaylıkla yapılabilmesine imkan tanır (Davey ve O'toole, 2000).

Costerton ve ark. (1999), biyofilm oluşumunun tesadüfî bir olay olmadığını, bir araya gelen farklı türlerin belirli bir ortak amaç taşıdıklarını belirtmiştir. Bu görüşünü desteklemek için sığır bağırsaklarındaki biyofilmi örnek göstermiştir. Bağırsaktaki selülozu sindirebilmek için en az 5 farklı türde bakterinin var olması gerektiğini, bakterilerin selülozu ancak oluşturdukları mikrobiyal şehirler içerisinde bir arada çalışarak yıkabileceğini bildirmiştir.

1.2.2.Biyofilm İçindeki Bakterilerin Özellikleri ve Serbest Halde Bulunan Bakterilerle Karşılaştırılması:

Biyofilm bakterilerinin sahip oldukları avantaj, antibiyotiklere karşı, serbest halde dolaşan bakterilerden daha dirençli olmalarını sağlamaktadır. İlk başlarda EPS'lerin antimikrobiyal maddenin diffüzyonunu kısıtladığı düşünülmüş olsa da, artık

birçok antibiyotiğin biyofilm tabakasına kolayca penetre olduğu bilinmektedir (Walters ve ark., 2003). Ancak birçok antibiyotik hızla bölünen bakterileri hedeflediği için, özellikle biyofilmin derin tabakalarında bulunan ve azalmış metabolik ve bölünme hızları sergileyen bakterilere etkili olamamaktadır. Antibiyotiklerle tedavi edilmiş olan biyofilmlerin perifer kısımlarında bakterisidal etki izlenirken, daha derin kısımlarda yaşayan bakteriler hayatta kalmakta ve yeniden enfeksiyon gelişimine neden olmaktadır (Brown ve ark., 1988; Anwar ve ark., 1992).

1.2.3.Bakteriyel Biyofilmler Neden Antimikrobiyal İlaçlara Dirençlidir?

Biyofilm enfeksiyonlarının artmasıyla birlikte biyofilm direncini aydınlatmaya yönelik olarak yapılan çalışmalar da hız kazanmıştır. Bilindiği gibi biyofilm, içinde mikroorganizmaları barındıran korunaklı bir yapıdır. (Altun ve Şener, 2008). Ceri ve ark., (1999), bakterilerin biyofilm oluşturarak yüzeye yapışmış formu (sesil) ile süspansiyon formu (planktonik) arasında, antibiyotik ilaçlara karşı direnç açısından belirgin bir farkın olduğunu yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir.

Biyofilimde yer alan mikroorganizmalar antimikrobiyal ajanlara, planktonik şekillerine göre 200- 500 kat daha dirençlidir (Davey ve O'toole, 2000; Rudney, 2000; Marsh, 2004; Nagayoshi ve ark., 2004; Fraud ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008). Herhangi bir şekilde antimikrobiyal ajanlara dirençli olmayan mikroorganizma biyofilm oluşturunca dirençli hale, biyofilmden ayrıldığında ise tekrar duyarlı hale dönüşebilmektedir (Marsh, 2004; Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm tabakası, bakterileri sadece antibiyotiklere karşı değil, dezenfektanlara karşı da dirençli hale getirmektedir. Biyofilm tabakası içindeki bakteriler sıvı ortamda serbest üreyen bakterilere göre dezenfektanlara 10-100 kat daha dirençlidirler. Bu yolla oluşan direncin mekanizması tam olarak açıklığa kavuşmamakla birlikte; glikokaliks bileşimi, hücre dışı enzimler, besin sınırlaması, dezenfektanın hücrelere ulaşmasında zorluk gibi çeşitli faktörlerin

etkili olduğu düşünülmektedir (Müller ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008; Koluman, 2009).

Biyofilm direnci multifaktöriyel bir olaydır ve aşağıdaki başlıklar altında değerlendirilebilir:

- a- Antimikrobiyal ajanların biyofilm içine düşük penetrasyonları,
- b- Biyofilmi oluşturan mikroçevrede değişiklik
- c- Biyofilm içinde fenotipik değişikliklerin oluşumu (Ten Cate, 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006; Altun ve Şener, 2008).

1.2.3.a.Biyofilm içine düşük penetrasyon :

Biyofilm fiziksel bir bariyer görevi görerek antibiyotiklerin ve dezenfektanların mikroorganizma hücrelerine ulaşmasını engelleyebilmektedir. Bu engelleme sıklıkla antibiyotiğin biyofilm komponentlerine bağlanması sonucu ortaya çıkmaktadır (Thomas ve Nakaishi, 2006; Fraud ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008). Biyofilm içindeki ozmotik çevre değişiklikleri ozmotik bir strese yol açıp bakterilerin por yapısında ya da miktarında değişikliklere neden olabilir. Bu durum özellikle beta-laktam antibiyotiklerin hücre içine girişini kısıtlayabilir. Genel stres yanıtı bakteride “Q faktör” olarak bilinen RpoS geninin salgılanmasına yol açıp bir ozmotik koruyucu olarak fonksiyon gören trehalozun aşırı sentezlenmesine ve biyofilmin kalınlaşmasına neden olur (Foley ve ark., 1999).

1.2.3.b.Biyofilmi oluşturan mikroçevrede değişiklik:

Biyofilmi oluşturan bakterilerin biyofilm içindeki yoğunluğu, besin maddeleri ve oksijen konsantrasyonuna göre değişiklik göstermektedir. Biyofilmin en dış kısımlarında lokalize olan bakteriler besin maddelerine ve oksijene derinlerde olanlara göre daha rahat ulaşabilmektedir. Bu durum da bakteri popülasyonu içinde heterojenliğe yol açmaktadır. Antimikrobiyal ajanların metabolik olarak aktif hücreleri primer olarak hedefledikleri düşünülürse, biyofilm içindeki bu

heterojenliğin antibiyotik duyarlılığında farklılıklara yol açabileceği ortadadır. Düşük üreme hızı özellikle olgun biyofilmden görülmektedir. Sınırlı besin miktarları nedeniyle biyofilmlerin yavaş üreme hızına sahip olmaları direncin bir diğer nedeni olarak sayılabilmektedir (Davey ve O'toole, 2000; Marsh, 2004; Thomas ve Nakaishi, 2006; Fraud ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm içindeki oksijen yoğunluğu biyofilmi oluşturan mikro çevrede değişikliğe neden olan ve direnci etkileyen bir diğer faktördür. Oksijenin biyofilmin yüzey katmanlarında tüketildiği ve derin kısımlarda anaerobik ortamın olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bazı antibiyotiklerin, örneğin; aminoglikozidlerin etkinliği azalmakta ve direnç gelişebilmektedir (Altun ve Şener, 2008).

Direnci etkileyen diğer bir faktör ise, asidik atık maddelerden dolayı pH'nın değişmesi ve bu değişimin bazı antibiyotikler üzerine antagonistik etki yapmasıdır (Altun ve Şener, 2008).

1.2.3.c.Biyofilm içinde fenotipik değişikliklerin oluşumu:

Bakteriler bir yüzeye tutunmalarını takiben çeşitli fizyolojik, metabolik ve fenotipik değişikliklere uğramaktadırlar (Altun ve Şener, 2008). Biyofilm hücrelerinin kendi aralarındaki etkileşimleri sonucunda genetik yapılarında değişiklikler görülmekte ve ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluşturmaktadırlar. Genetik yapısı değişen hücreler, bu sayede antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç geliştirmiş olmaktadır (Thomas ve Nakaishi, 2006; Fraud ve ark., 2007; Altun ve Şener, 2008).

Biyofilm direncini etkileyen tüm bu faktörler göz önüne alındığında, biyofilmi oluşturan bakteri türü ve kullanılan antimikrobiyal ajana bağlı olarak farklı direnç mekanizmalarının etkili olabileceği ve bu direncin multifaktöriyel olduğu görülmektedir. Biyofilm fenotipinin özellikle antibiyotik direnci açısından planktonik fenotipten çok farklı olması hem mikrobiyologlar hem de tedaviyi uygulayan klinisyenler açısından ciddi bir problem oluşturmaktadır. Son yıllarda

biyofilm yapısı ve biyofilm fenotipi ile ilgili çalışmalar giderek hız kazanmış, biyofilm oluşumunun önlenmesi ve biyofilm enfeksiyonlarının tedavisinde yakın zamanda yeni ve etkin stratejilerin geliştirilmesine kesin gözüyle bakılmaktadır (Altun ve Şener, 2008).

1.3.Biyofilmin Gelişim Evreleri

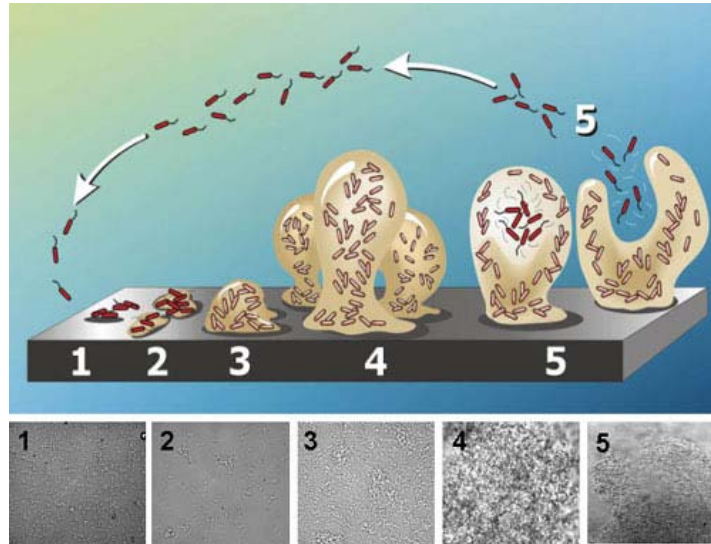
Bakterilerin bir araya gelmeleri ve o yüzeydeki diğer türlerle birlikte yaşamaya devam etmeleri ile meydana gelen biyofilm oluşumu rastgele gerçekleşen bir olay değildir. Biyofilm oluşumu 4 evrede gerçekleşmektedir.

1. **Tutunma ve yapışma:** Biyofilm oluşumu bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir süreçtir (Hall-Stoodley ve Stoodly, 2002; Hall-Stoodley ve ark., 2004). Tutunma işlemi; hücre yüzeyinin hidrofobik özelliği, bakterilerin EPS üretimi, bakterilerde fimbria ve flagella gibi yapıların varlığına göre değişmektedir. Bakterinin bir yüzeye tutunabilmesi için tutunduğu yüzeyin belirli özellikler taşıması gerekmektedir. Rosenberg ve ark. (1983), çoğu hücrenin negatif yük taşımakta olduğunu, bunun da sıvı akışı ile şarj olan yüzeye yapışmayı kolaylaştırdığını bildirmişlerdir. Bakteriler biyofilm oluşturmak için çeşitli kimyasal işaret mekanizmaları kullanırlar. Kimyasal sinyalin, lokal ekstraselüler konsantrasyonunun belirli bir seviyeye ulaşması, çevrede bulunan bakteriler için o bölgede belirli yoğunlukta bir hücresel kümelenmenin başladığı anlamına gelir. Kimyasal olarak popülasyon yoğunluğunun hissedilmesi işlemine 'quorum – sensing (çoğunluğu algılama)' adı verilir. (Ten Cate, 2006). 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 artış ile birlikte, biyofilm oluşumuna yönelik bir dizi işlem başlatılmış olur (Davies ve ark., 1998). Yüzeye organik ve/veya inorganik maddelerin yapışmasını takiben mikroorganizmalar bu yüzeye

geri dönüşür özellikte tutunur (Altun ve Şener, 2008; Nadell ve ark., 2009) Ortaya çıkan ilk mikrobiyal bağlantı zayıf ve geri dönüşebilen karakterdedir. Başlangıç bağlantısını takiben organizmalar sessiz bir faza girerler. Sessiz faz sürecinde organizmalar genetik yapılarını değiştirebilirler. Genetik materyaldeki bu değişikliğin bağlanmadan hemen sonra şekillendiği bilinmektedir. Biyofilm, ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluştururlar. Hücreler arasında DNA transferi gerçekleşir. Böylece genetik yapısı değişen hücreler çevreden gelebilecek olumsuz etkilere karşı daha direnç kazanmış olur (Post ve ark., 2004).

2. **Kolonizasyon:** Büyüme hızı ve gen kopyalanması açısından değişime uğramış fenotiplerin ortaya çıkışıyla birlikte hızlı büyüme evresi başlamaktadır. Bu dönemde mikroorganizmalar hücre dışı polimerik maddenin ana bileşenini oluşturan EPS salgılarlar. EPS genel olarak doğal şeker, amino şeker ve bazı üronik asitlerin oluşturduğu heterojen bir yapı sergiler. Nemli ve yapışkan yapıdaki EPS organizmaların yüzeye bağlanmalarını ve dış etkenler sonucu oluşabilecek koparma kuvvetlerine karşı direnç kazanmalarını sağlar. Serbest haldeki diğer organizmalar moleküller arası etkileşim ile yüzeye tutunabildikleri gibi bu karmaşık matrikse de takılarak yüzeye tutunabilirler. Bu tutunmalar sonucu bakteriler bölünüp çoğalarak biyofilmin en küçük birimi olan mikrokolonileri oluştururlar (Overman, 2000; Post ve ark., 2004).
3. **Olgunlaşma:** Bu evrede mikrokoloniler büyürler ve kompleks, mantar şeklindeki yapılara veya kulelere dönüşürler. Konfokal lazer mikroskopisi ile yapılan çalışmalar bakterilerin, kompleks EPS ile çevrilmiş mikrokoloniler içerisinde yaşadıklarını ortaya koymuşlardır (Zaura- Arite ve ark., 2001). Çeşitli yüksekliklerde kuleler oluşturan mikrokolonilerin aralarında, besinlerin ulaştırılması ve metabolik atık ürünlerin uzaklaştırılması için primitif bir dolaşım sistemi olarak görev yapan su kanalları bulunmaktadır (Bothwell ve ark., 2003; Post ve ark., 2004).

4. **Kopma:** Biyofilm gelişiminin en son evresi kopma veya ayrılma evresidir. Biyofilmde; kopma türlerine özgü bir özelliktir ve biyofilmin olgun hale geçtiğinin bir göstergesidir. Olgun biyofilm oluşuktan sonra koruyucu zırhın çeşitli yollarla kısmen veya tamamen parçalanması sonucu biyofilm içindeki tek bir bakteri veya bakteri kümeleri serbest hale geçerler. Bu ayrılma işlemi dış kuvvetlerin etkisiyle olabileceği gibi, biyofilm oluşum sürecinin bir parçası olarak tek bir hücrenin veya multipl hücrelerin emboli şeklinde kopması sonucu da oluşabilmektedir. Bu kopma sonunda, oluşan serbest hücrelerin her biri yeni bir biyofilm oluşturmak üzere farklı alanlara dağılır ve aynı süreç tekrar eder (Stoodley ve ark., 1999). Biyofilm oluşum evrelerinin şematik hali Şekil 1.2 de gösterilmektedir.



Şekil 1.2. Biyofilm oluşum evrelerinin şematik görünümü (Davies, 2014)

1.4. Biyofilm Oluşumunda Quorum Sensing: Çoğunluğu algılama (QS) Mekanizmaları

Bakterilerin birbirleri ile iletişim kurduklarının kanıtlanması, mikroorganizmaların oluşturduğu dünya hakkındaki düşüncelerimizi değiştirmiştir (Saraçlı, 2006). Uzun yıllar boyunca, iletişim yeteneğinin çok hücreli “yüksek yapı” organizmalara özgü bir özellik olduğu, bakteriler gibi tek hücreli canlıların ise sadece büyümek ve bölünmekten ibaret olan son derece basit bir yaşam tarzına sahip varlıklar oldukları düşünülüyordu. Ancak günümüzde, bakterilerin “asosyal”, “yalnız yaşayan”, “yalnız ölen” izole varlıklar olmadıkları

aksine değişen ortam koşullarına uyumlarını kolaylaştırmak için karmaşık hücreler arası iletişim sistemleri kullanan topluluklar halinde bulundukları kabul edilmektedir (Swift ve ark., 1994). Birçok gram pozitif ve negatif bakteri ve mantarlar birbirleri ile farklı sinyal molekülleri aracılığıyla iletişim kurmaktadır. Bu sinyal moleküllerini üretmekle birlikte mikroorganizmalar bu moleküllerin konsantrasyonunu ölçerek çevrelerindeki mikrobiyal topluluğun miktarı hakkında bilgi sahibi olmaktadır (Saraçlı, 2006). Sinyal moleküllerinin algılanması, bakterinin bulunduğu ortamda düşük veya yüksek miktardaki populasyon yoğunluğunu ayırt edebilmesini mümkün kılmakta ve bu sayede ortamda hücre sayısındaki değişikliğe cevap olarak gen ekspresyonunun populasyon düzeyinde kontrolü sağlanmaktadır. Bu olay “Quorum Sensing: Çoğunluğu algılama” olarak ifade edilmektedir. Başka bir deyimle Quorum Sensing (QS), bir bakteri populasyonunda gen ekspresyonunun, bütün bir popülasyonun gen ekspresyonu dikkate alınarak koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır (Schauder ve Bassler, 2001).

QS sisteminin bakteriye getirdiğı pek çok avantaj vardır. Bu sistem sayesinde bakteri davranışlarını koordine ederek, besin kaynaklarına adaptasyon geliştirir. Besin için yarışan diğerk bakterilere karşı savaşıabilir. En önemlisi, enfeksiyon sırasında virölans faktörlerin düzenlenmesi sonucu konakta immün yanıtıttan kaçabilmektedir (Saraçlı, 2006).

Birçok bakteriyel davranış, QS mekanizmasıyla kontrol edilmektedir. Antibiyotik biyosentezi, konjugasyon, önemli virölans faktörlerinin üretimi ve biyofilm oluşumu bu davranışlardan bazılarıdır. Bakteriler, biyofilm oluşumunu hücreden hücreye yollanan iletişim sinyalleri aracılığı ile kontrol etmektedirler (Davey ve O'toole, 2000; Foster ve Kolenbrander, 2004; Ten Cate, 2006; Thomas ve Nakaishi, 2006; Altun ve Şener, 2008; Jayaraman ve Wood, 2008). Bu sinyaller sayesinde bir odakta toplanan organizmalar biyofilm temelini oluşturmaktadır (Saraçlı, 2006; Ten Cate, 2006; Jayaraman ve Wood, 2008; Nadell ve ark., 2009) Biyofilm gelişimi ile QS sistemleri arasındaki ilişki birçok bakteri arasında gösterilmiştir (Davies ve ark.,1998; Riedel,ve ark., 2001). Biyofilm oluşum sürecinde QS molekülleri adezyonda, mikrokolonilerin oluşumunda ve sonrasında

biyofilm içinde kanalcıklar açmak suretiyle biyofilmden kopan mikroorganizmaların bir başka yere gidip tutunmasında görev almaktadırlar (Shih ve Huang, 2002). QS sistemi defektli, mutant suşlarda oluşan biyofilmlerde gevşek olmakta, hidrojen peroksit ve nütrofillere daha duyarlı hale gelmektedirler (Sticklers ve ark.,1998).

Bakteriler iletişim sinyali olarak çeşitli kimyasal mekanizmaları kullanmaktadırlar (Rudney, 2000; Saraçlı, 2006; Jayaraman ve Wood, 2008,). Farklı insan topluluklarının farklı diller kullanmaları gibi, farklı mikroorganizma türleri de genellikle farklı QS moleküllerini kullanmaktadırlar. Bu özellikleri nedeniyle farklı QS moleküllerini kullanan mikroorganizmalar birbirleri ile anlaşamamaktadır. Bazı mikroorganizmalar ise birden fazla farklı QS molekülü kullanmaktadır, dolayısıyla farklı QS moleküllerinin doğurduğu yanıtlar da farklı olmaktadır. Bununla birlikte, farklı türler arasında QS molekülleri aracılığı ile iletişim kurulabildiği de bilinmektedir. Bu tarz çapraz iletişim özellikle birden çok türden oluşan mikroorganizma topluluklarının bir arada olduğu biyofilmlerde önemlidir (Saraçlı, 2006; Jayaraman ve Wood, 2008).

Bakteriler birbirleriyle haberleşmek amacıyla 3 tip sinyal molekülü kullanmaktadır.

- 1- **Açıl Homoserin Lakton (AHL)** : Bu tip QS iletişimi daha çok gram negatif bakterilerde görülmektedir. Bakteriler tarafından sentezlenen bu küçük sinyal molekülleri, bakteri hücrelerinden difüze olur ve bakteri sayısındaki artışa paralel olarak ortamda birikmeye başlar. Hücre yoğunluğu eşik değere ulaştığında, ortamda birikmiş olan moleküller reseptör proteine bağlanarak hedef genlerin ekspresyonları tetiklenir (Ten Cate, 2006).
- 2- **Autoinducer- 2 (AI-2)** : Bu sinyal molekülü gram pozitif ve gram negatif bakterilerce üretilmektedir. Çoklu tür biyofilmler arasındaki iletişimin AI-2 sinyalleri aracılığı ile düzenlendiği bilinmektedir (Jayaraman ve Wood, 2008). McNab ve ark. (2003) ile Rickard ve ark.(2006) farklı bakteriler arasındaki iletişimin ve biyofilm oluşumunun AI-2 sinyalleri tarafından yönetildiğini göstermiştir.

- 3- **Autoinducer Peptitler (AIP)** : Özellikle gram pozitif bakteriler tarafından üretilen ve AIP olarak ifade edilen QS moleküllerinin birçoğu translasyon sonrası değişikliğe uğrayan büyük peptidlerden üretilir. Gram pozitif bakteriler bu sinyal molekülleri ile haberleşmektedirler. Bakteriler arası iletişim AIP' nin eşik değere ulaşması ile sağlanmaktadır (Havarstein ve ark., 1996; Cvitkovitch, 2001). Bakteri kendinden güçlü ve daha yetenekli bakterinin DNA' sını alarak kendi DNA' sını değiştirir. Bu durum bakterinin evrimsel gelişimi için gerekli bir durumdur (Thomas ve Nielsen, 2005). Bu özelliklerin dışında AIP biyofilm oluşumunu da kontrol etmektedir. AIP miktarı yeterli düzeyde olmayan bakterilerde biyofilm oluşum özelliklerinin azaldığı görülmüştür. Yapılan çalışmalarda ilave sentetik AIP verilmesinin de farklı streptokok türlerinin kütlelerinde artışa neden olduğu kanıtlanmıştır (Li ve ark., 2002).

Mikroorganizmalar birbirleri ile koordineli davranmaları, çevresel şartlardaki değişimlere çabuk cevap vermeleri ve uyum gösterebilmeleri sayesinde hayatta kalabilmeleri, mevcut besin maddelerinin kullanılmasında yarıştıkları diğer mikroorganizmalara karşı avantaj sağlamaları, toksik bileşiklerden korunmak amacıyla biyofilm oluşturmaları ve antibiyotik ile spor üretmeleri gibi birçok yanıtı QS molekülleri aracılığıyla kontrol eder. Başarılı bir enfeksiyon süreci, mikroorganizmaların QS moleküllerince kontrol edilen bu virülans faktörleri sayesinde konağın immün cevabından kurtulabilmelerine bağlıdır. Bu noktadan hareketle QS araştırmalarının en muhtemel yararı, mikroorganizmalar arası sinyal iletişimini bozarak mikroorganizma topluluklarının kontrol altında tutulmasıdır (Saraçlı, 2006).

1.5.Oral Biyofilm

Diş plağı, diş yüzeyine tutunmuş karmaşık mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanmaktadır ve bu özelliğiyle biyofilm yapısı ile benzerlik göstermektedir. Bu nedenden dolayı son yıllarda yapılan birçok çalışmayla birlikte plak artık biyofilm olarak değerlendirilmektedir (Marsh, 2004; Ten Cate, 2006; Marsh, 2012). Biyofilm bütün olarak bakıldığında içerisinde yaklaşık 1000 civarlarında

bakteri türü barındırmaktadır. Yeni türler de hala izole edilmektedir (Kolenbrander ve London, 1993; Ten Cate, 2006). Bu türlerin neredeyse yarısından fazlası toplu halde diş yüzeylerinde bulunurken, diğer bir kısmı da ağız ortamında serbest halde bulunmaktadır. Bir şekilde yüzeye tutunmamış halde bulunan bakteriler ağız ortamındaki tükürük ve besin ile temizlenerek ortamdan uzaklaştırılırlar (Ten Cate, 2006).

Diş yüzeyinde biyofilm oluşması için 3 basamak gerekmektedir.

- 1- Diş minesi üzerinde kazanılmış pelikül ya da hazırlayıcı film oluşması
- 2- Primer kolonizasyon yapan hücrelerin yüzeye yapışması
- 3- İkincil ve üçüncül kolonizasyon yapan hücrelerin birbirlerine ve primer kolonizasyon yapan hücrelere tutunmaları.

Diş yüzeylerinin diş fırçası ya da profesyonel yöntemlerle temizlenmesinin hemen ardından, yüzeyler tükürük pelikülü tarafından kaplanır (Ten Cate, 2006). Pelikül diş sürdükten sonra oluşan, homojen, membranöz, hücre içermeyen, salya glikoproteinlerinden oluşmuş bir film tabakasıdır. Yapısında kollejen, keratin ve melanin bulunmaktadır. Alttaki diş yüzeyine sıkıca bağlanmaktadır. Polisajla düzgün yüzeylerden kolaylıkla uzaklaştırılır ancak çok kısa bir sürede yeniden oluşur (Ataoğlu ve Gürsel, 1997). Kazanılmış pelikül primer kolonizasyon için bir substrat görevi görmektedir (Davey ve O'toole, 2000; Çiftçi, 2005; Ten Cate, 2006). Aynı zamanda diş yüzeyinin kayganlaşmasını sağlayarak etkili bir çiğneme sağlamakta ve diş demineralizasyondan korumaktadır (Godoy ve Hicks, 2008). Pelikül oluşumunun hemen ardından bakteriler yüzeye tutunmaya başlar. Dişlerdeki başlangıç kolonizasyonu *S. mutans* dışında mikroorganizmalarla başlamaktadır. *S. mutans* tek başına diş yüzeyine tutunma yeteneğine sahip değildir. Diş yüzeyindeki peliküle ilk tutunan bakteriler gr(+) kok formundaki bakterilerdir ayrıca az sayıda epitel hücresi ve nötrofillerde ilk tutunan hücresel elemanlardandır. Sonrasında ise, gr(+) çomak, gr(-) anaerobik kok ve fusiformlar diş yüzeyine yerleşmeye başlamaktadır (Bernimoulin, 2003; Rickard ve ark., 2003; Thomas ve Nakaishi, 2006).

Birkaç bakterinin biyofilm tabakası üzerine tutunmasını takiben (erken kolonizasyon), yüzey özellikleri ortamda bulunan diğer bakterilerin yüzeye tutunabilmeleri ve hayatta kalabilmeleri için elverişli hale gelir (Ten Cate, 2006). Mevcut mikroorganizmalar üzerine ortamda bulunan yeni mikroorganizmaların koadezyonu gerçekleşir. Koadezyon dış plağının işlevsel organizasyonunun da değişimine neden olur. Biyofilm içerisindeki bakteriler hem zıt hem de aynı biyokimyasal etkilerin görüldüğü ortamlarda yer almaktadırlar. Bu sayede anaerobik bakterilerin oksijen tüketim alanlarına koadezyonu, bakterilerin aerobik ortamlarda da hayatta kalabilmelerine neden olmaktadır (Çiftçi, 2005; Teughels ve ark., 2006).

Bakteri tutulumu sonrasında var olan bakterilerin hücre bölünmeleri ile büyüme gerçekleşmektedir. Sonunda üç boyutlu, işlevsel olarak organize olmuş ve karışık mikroorganizma topluluklarına sahip biyofilm başka bir değişle plak formasyonu oluşmuş olur (Çiftçi, 2005; Teughels ve ark., 2006).

1.6.Biyofilm Tabakasının Görüntülenmesi

Bugüne kadar biyofilmin mikro yapısının ortaya çıkarılması, bakterilerin fizyolojik özelliklerinin, birbiriyle olan iletişimlerinin anlaşılabilmesi için farklı teknikler kullanılmıştır (Lawrence ve ark., 1991). Tarama elektron mikroskobu (SEM), geçirmeli elektron mikroskobu (TEM), konfokal lazer tarama mikroskobu (KLTM), floresan mikroskobu, çeşitli mikro sensörler, optik uyumlu tomografiler kullanılarak biyofilmin doğası anlaşılmaya çalışılmıştır (Sutton ve ark., 1994; Davey ve O' Toole, 2000; Perilli ve ark., 2000; Keevil, 2003).

Optik kesitlerin birbirini etkilemeksizin kaydedilebilmesi ve bir araya getirilmesiyle meydana gelen görüntü elde etme teknolojisi olarak bilinen konfokal lazer tarama mikroskobu biyofilmlerin görüntülenmesinde kullanılan en yeni tekniklerden biridir. Konfokal lazer tarama mikroskobu ilk olarak 1950'lerde icat edilmiştir fakat 1980'li yıllara kadar bakterilerin incelenmesinde hiç kullanılmamıştır. KLTM, biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların karakteristik özelliklerinin kendi doğal ortamlarında incelenmesine olanak sağlamaktadır

(Dige, 2007). Öncelerde kullanılan elektron mikroskopunda biyofilm preparatı hazırlanması esnasında dehidrasyon veya deformasyon gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır ve fiksasyon esnasında %50' ye varan küçülmeler de izlenmektedir. Oysa KLTM tekniğinde transmisyon veya tarama elektron mikroskopisinde karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerle karşılaşmaz (Lawrence ve ark., 1991). KLTM 'ye ilave olarak floresan mikroskopisi de kullanıldığında çok daha başarılı sonuçlar elde edilmektedir. Biyofilm bakterilerinin farklı hücresel fonksiyonlarını hedef alan floresanlar geliştirilmiştir (Joux ve Lebaron, 2000).

Netuschil ve ark. (1998), daha önceleri kullanılan tekniklere ek olarak biyofilm araştırmalarında, floresan boyama tekniğini de ortaya çıkarmıştır. KLTM ve floresan tekniğinin birlikte kullanılması, biyofilm yapısının daha net anlaşılmasına bunun dışında farklı biyofilm toplulukları içerisindeki cansız ya da canlı bakterilerin ortamdaki dağılımlarının ortaya çıkarılmasına olanak sağlamaktadır (Netuschil ve ark. 1998). Bu teknik; biyofilm içerisindeki farklı bakteri türlerince oluşturulan krater tarzındaki çok tabakalı mikro koloni görüntüleri hakkında geleneksel elektron mikroskobuna ilave olabilecek bilgiler sunmaktadır. Ayrıca bu teknik ile biyofilm yapısı in-vitro koşullarda da rahatlıkla incelenebilmektedir.

KLTM, floresan mikroskobu temelinde çalışan bir optik kesit mikroskobu olup aydınlatma kaynağı olarak görünür ışık kaynakları yerine lazer ışınlarını kullanır. Seçilecek lazer tipi kullanıcının gereksinimine göre belirlenir. En yaygın kullanılan lazer dalga boyları 488 nm argon ve 543 nm helyum-neon lazerlerdir. Kelime anlamı “**eş odaklı**” demek olan konfokal terimine uygun olarak lazer ışınları, galvanometrik aynalar yardımıyla cismin sadece bir düzleminde odaklanmakta (**optik kesit**) ve bu odaktan geri yansıyan floresan yayılım, video sinyalleri şeklinde çok küçük bir delikten geçirilerek foto çoklayıcı tipindeki dedektörler tarafından algılanmaktadır. Bu tür görüntü oluşturmaının en önemli avantajı, genellikle iğne başı büyüklüğünde filtreler yardımıyla odak dışı görüntülerin ortamdaki kaldırılmasıdır. Son derece keskin ve tutarlı ışınım gösteren farklı dalga boylarındaki lazer ışınlarının kullanılıyor olmasının yanı sıra

fluoresan sinyallerinin çok duyarlı foto tüplerle algılanıyor olması, bilgisayar desteği sayesinde bunların mikro saniyeler içinde ve tamamen otomatik olarak yapılabiliyor olması, KLTM' ye, günümüzde alışık olduğumuz mikroskoplardan çok daha önemli kullanım ve uygulama avantajları sağlamaktadır (Lawrence ve ark., 1991).

Dige ve ark. (2007), konfokal lazer tarama mikroskopunu ve fluoresan ile yaptıkları çalışmada streptokokkusları biyofilm içerisindeki diğer mikroorganizma topluluklarından kolaylıkla ayırabilmişlerdir. Ayrıca bu sayede streptokokusların zamanla nasıl organize olduklarını da tanımlayabilmişlerdir.

1.7.Diş Çürüğü

Diş çürüğü, plakta bulunan mikroorganizmaların karbonhidratları fermentasyonu sonucu organik asit oluşumu ile başlayan, diş dokusu ve plak sıvısı arasındaki dengenin bozulmasıyla sonuçlanan, ileri aşamalarında dişin inorganik komponentlerinin demineralizasyonunun ve organik yapının enzimatik olarak bozulmasının eşlik ettiği, çok faktörlü enfeksiyöz, bulaşıcı bir hastalıktır (Fejerskov ve Thylstrup, 1994; Borsatto ve ark., 2001).

Geleneksel olarak günümüzde diş çürüğü; konak faktörlerinin (diş yüzeyi ve tükürük), mikrofloranın ve diyetin karşılıklı etkileşimi sonucu ortaya çıkan, çok nedene bağlı bir hastalık olarak kabul edilmektedir. Bunlara ek olarak zaman da çürük etiolojisinde etkili bir faktördür. Diğer bir deyişle çürük oluşumu için yatkın bir konağa, kariyojenik floraya, uygun bir diyet ve yeterli zamana ihtiyaç vardır. Bu faktörlerden herhangi birinin yokluğunda çürük gelişmez (Newbrun, 1989; Zero, 1995).

Çürük oluşumuna neden olan etiyojik faktörlerden birisi kariyojenik bakterilerdir. Mikrobiyal ağız florası, ağız içerisindeki farklı ekolojik ortamlarda yaşayan çok sayıda mikroorganizmanın belirli bir denge içerisinde bulunduğu dinamik bir ortamı tanımlamaktadır. Bakteriyel büyüme için ideal bir bölge olan ağız boşluğunun; sıcaklığı 35-37°C'de nispeten sabittir, ortamı nemli ve

karanlıktır. Bakteriler için gerekli besinler, düzenli aralıklarla konağın beslenmesinden, tükürükten ve dişeti cebi sıvısından sağlanır. Ağızda bakterilerin yapışabileceği değişik yüzeyler mevcuttur ve büyük kısmını yanakların, dişetinin, damağın ve dilin epitel yüzeyleri oluşturur. Bakterilerin kolonize olduğu diğer bir yüzey olan dişler ise vücutta kendisini yenileyemeyen yapılardır. Sürekli olarak yenilenerek mikroorganizmaların yer değiştirmesine neden olan epitelyal bölgelerin aksine, diş yüzeyleri nispeten sabit bir ekosistemin büyümesine izin verir (Minah, 1981).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma ile plak artık biyofilm olarak değerlendirilmektedir (Marsh, 2004; Ten Cate, 2006; Marsh, 2012). Bu yeni görüşle birlikte, diş çürüğü, diş minerali ve biyofilm sıvısı arasındaki fizyolojik dengede bozulmayla ortaya çıkan kompleks bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (Fejerskov ve Nyvad, 2003; Marsh, 2012). Ağız içerisinde çevresel koşullara bağlı olarak diş ve biyofilm arasındaki fizyolojik denge bozulabilir ve bunun sonucu dişte mineral kaybı oluşur. Tükürük, diet alışkanlıkları ve pek çok biyolojik belirleyicinin kompleks etkileşimi biyofilm kompozisyonu ve metabolizmasını etkilemektedir. (Fejerskov, 2004). Bu yeni görüşler, lezyonun başlaması ve ilerlemesinin doğasını ve buna göre de diş çürüğünün gerçek anlamda “önlenemeyeceği”, bunun yerine çeşitli müdahalelerle “kontrol edilebileceği” ni açıklamaya yardım eder (Hand ve ark., 1988; Luan ve ark., 2000).

Ekolojiyle ilgili genel kavramlar göz önüne alındığında, plak ve diş dokusu arasındaki normal dengenin sağlanabilmesi değerli bir yaklaşım olarak öne sürülebilir. Ağız hijyen motivasyonu, diyet düzenlenmesi, odontopatojenik bakterilerin eliminasyonu, fissür örtücü kullanılarak ortamın korunması ve antimikrobiyal ajan uygulamaları da bu dengenin korunmasını sağlayan yararlı yaklaşımlardır (Bowden ve Edwardsson, 1994).

1.8. Antiplak Ajanlar

Diş çürüğünden korunmak amacıyla geliştirilen kimyasal ajanlar öncelikli olarak plaktaki mikroorganizmaları hedef almaktadır. Yaygın olan görüşe göre plağın azaltılması diş çürüğünün önlenmesini sağlayacaktır (Pratten ve ark., 1998; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003).

Günümüzde kullanılan antiplak ajanlarının çoğu geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakterisid ya da bakteriyostatik etkilere sahiptir. Bu ajanlar, spesifik olmayan plak teorisine göre, plak birikimini ve metabolizmasını önlemek ya da sınırlamak amacıyla kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların membranına bağlanmakta ve normal hücre zarı fonksiyonlarını engellemektedir. Bu durum mikrobiyal metabolizmaya zarar vermekte ve mikroorganizmaları öldürebilmektedir (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003).

Teorik olarak, plak mikroorganizmalarının metabolik aktivitesini azaltan ya da değiştiren kimyasal ajanlar diş çürüğünü önleyebilmektedir. Diğer bir yaklaşım potansiyel patojenik mikrobiyal neslin genetik olarak modifiye edilerek daha az virulan hale getirilmesidir (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003).

Antimikrobiyal etki, diş yüzeylerine mikrobiyal yapışmayı engelleyerek ortaya çıkarılabilir. Biyofilm ve/veya mikroorganizmaların yüzey özellikleri, çeşitli yöntemlerle modifiye edilerek diş yüzeylerindeki mikrobiyal yapışma engellenmeye çalışılmıştır. İn vitro çalışmalarda serbest yüzey enerjisinin düşürülmesinin mikrobiyal yapışmayı azalttığı gösterilmiştir. Antimikrobiyal ajanlardan klorheksidin, setilpiridinium klorid, aminflorid, ve sodyumdodesilsulfat, yüzey özelliklerini değiştirerek mikrobiyal kolonizasyonu engellemektedir. Birçok antimikrobiyal ajan minimal konsantrasyonda bile yüzey adezinlerini etkileyerek mikrobiyal yapışmayı önlemektedir. (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003).

Antimikrobiyal ajanların etkinliği ağız dokularına bağlanabilme ve salınım yapabilme özelliklerine bağlıdır. Dayanıklı ajanlar ağız içerisinde, mukozal

yüzeylere, diş yüzeylerine, pelikül ve supragingival plağa tutunarak salınım yapmaktadırlar. Bu durum plak mikroorganizmaları ve antimikrobiyal ajanların uzun süreli temasını sağlamaktadır. Uzun süreli salınım yapan ajanlar ağız dokularına sıklıkla van der Waal's bağları, iyonik, hidrofobik ya da kovalent bağlar gibi spesifik olmayan bağlarla bağlanmaktadır (Scheie, 2003).

Kimyasal ajanlar uygulandıktan sonra ağız içindeki tutunumları, ağız içerisindeki dokular üzerine bağlanma yeteneklerine, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı akış hızlarına, doz, konsantrasyon, kontakt zamanına ve uygulanma sıklığına bağlıdır. Ajanın salınması tükürükteki kalsiyum değerlerine, pH, tükürük akış hızı ve ayrılma oranına bağlı olarak değişiklik göstermektedir (Scheie, 2003).

Vernikler, uzun süreli salınım yapan ajanlar olup uzun süreli profilaksi sağlamaktadır. Ajanın etkinliği dozuna ve salınım hızına bağlı olarak değişiklik göstermektedir. Bu gün florlu ve klorheksidinli vernikler antimikrobiyal ajan olarak kullanılan en etkin materyallerdendir (Scheie, 2003).

1.8.1.Fluor

Halojen grubuna ait eser elementlerden biri olan F, yüzey enerjisinin diğer tüm elementlerden daha yüksek olması sebebiyle elektronegatif ve reaktif element olarak adlandırılır. Diğer atomlarla hızlı bir şekilde reaksiyona girdiği için doğada nadiren serbest element olarak bulunur (Louma ve ark., 1986). İçme sularında, deniz suyunda, balıkta, sebzelerde, süt ve organik bileşiklerde flor bulunmaktadır. Fiziksel olarak flor diğer halojenlere benzemez ve farklı davranır, kalsiyuma olan yüksek afinitesi nedeniyle insanlardaki kemik ve dişler gibi kalsifiye dokularla etkileşim içindedir ve iskelette birikir. Gastrointestinal sistemden kan içine absorbe olur ya kemikte depolanır ya da böbreklerden atılımı gerçekleşir.

Fluor, elli yıldan fazla bir süredir hem ekonomik hem de etkili bir ajan olması nedeniyle yaygın olarak diş çürüğünün önlenmesinde kullanılmaktadır. Diş çürüğünü önleme özelliği olan flor bir kaç yolla etkisini gösterir (Warren ve

Levy, 1999). Tükürük ve plakta konsantre olmuş fluor minenin demineralizasyonunu önler. Demineralize mine tarafından kalsiyum ve fosfatla birlikte alınan fluor mine kristal yapısının bakteriyel asit üretimine karşı daha dirençli olmasını sağlar (Featherstone, 1999). Ayrıca, fluorun bakteriyel metabolizmayı inhibe ederek asit üretimini ve bakteriyel polisakkarid yapımını engellediği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hamilton 1990; Ekenback ve ark., 2001; Bradshaw ve ark., 2002).

1.8.1.1. Diş Plagında Fluor Varlığı ve Dağılımı

Plaktaki fluor konsantrasyonu, tükürük, plak ve dişeti oluğu sıvısında bulunan fluor konsantrasyonuna kıyasla daha yüksektir. Plakta bulunan fluorun kaynağı diyet, tükürük ve dişeti oluğu sıvısı olup, konsantrasyonu sudaki ve diyetteki fluor miktarı, minenin fluor içeriği, plak pH'sı ve biriken plak miktarına bağlı olarak değişiklik gösterir (Külekçi, 2000).

Reaktif özelliği olan fluor, plakta bulunan bakteri hücrelerine ekstrasellüler ve intrasellüler olarak yapışır (Hamilton ve Bowden, 1988). Fluorun çoğunluğu bağlı fluor yapısında olup %90'ı sitoplazma içinde olmak üzere bakteri hücresine taşınır. İntrasellüler fluor, miktarca az olmasına rağmen asidik koşullarda hidrofluorik asit (HF) formasyonuna bağlı olarak artar (Hamilton 1990). Bakterinin hücre zarına girerek plak sıvısındaki fluor miktarını düşürür (Hamilton ve Bowden, 1988).

Yapılan çalışmalarda; florlu besiyerlerinde üretilen ağız bakterilerinin fluor depoladığı saptanmıştır. Bakterilerde biriken fluor, plaktaki fluorun yüksek konsantrasyonlu olmasını ve buna bağlı olarak da fluorun plak metabolizmasını inhibe ederek çürük önleyici etki göstermesini sağlamaktadır (Fejerskov ve ark., 1981).

Bakteriler tarafından fluor alımı, solüsyondaki fluor iyonunun formuna, çeşitli plak bakterilerinin içeriğine ve fizyolojik durumlarına, ortamda baskın olarak bulunan mikroflora yapısına bağlı olarak farklılık gösterir. Ayrıca, plak pH'sı

bakterilerin fluor alınımını etkileyen en önemli faktörlerden birisidir. Tükürük akış hızı ve tamponlama kapasitesi, diyetteki karbonhidrat içeriği, bireydeki çürük diş sayısı da fluor aktivitesi üzerine etkili olan diğer etkenlerdir (Hamilton ve Bowden, 1988).

Fluorun antimikrobiyal etki göstermesi için öncelikle hücre içerisine girmesi gerekir. Hücre içerisine girdikten sonra fluorun büyük bir bölümü hücre içerisindeki çeşitli yapılara bağlanır. Fluorun, enolaz ve proton çıkaran ATP-az enzimlerine bağlanması sonucunda, asidojenik ağız bakterilerinin karbonhidrat metabolizması ve şeker alımı etkin bir şekilde inhibe edilir (Hamilton ve Bowden, 1988; Hamilton 1990).

Plaktaki fluor, asidojenik ve asidürik bakterilerin karbonhidrat metabolizmasını azaltarak dış ortam pH'sının önemli derecede düşmesini engeller. Plak pH'sının yüksek seviyelerde kalması, mine demineralizasyon riskini azaltmaktadır (Hamilton ve Bowden, 1988). İn vitro ortamda yapılan bir çalışmada, diş yüzeylerine %1'lik fluor jel uygulanan grup ile uygulanmayan kontrol grubu kıyaslandığında uygulanan grupta *S.mutans* birikiminde azalma olduğu bildirilmiştir. Ancak fluorun etkisinin zamanla kaybolduğu ve 5 günün sonunda *S.mutans*'ın kontrol grubuyla benzer oranda birikim gösterdiği saptanmıştır (Streckfuss ve ark., 1980).

Biyofilm oluşumunda, hidroksiapatit yüzeylerine proteinlerin yapışması görüşü giderek ağırlık kazanmaktadır. Yüzeyde bulunan pozitif yüklü kalsiyumlar ve negatif yüklü fosfat grupları proteinlerle etkileşerek, proteinleri tutarlar. Proteinlerin karboksilik grupları kalsiyumla, amino grupları ise fosfatlarla elektrostatik bağlar yaparak hidroksiapatite yapışırlar. Fluor bu bağlanmayı kalsiyuma olan yüksek ilgisi ile engeller. Fluor bunun dışında diş yüzeyinin nemliliğini etkiler ve serbest yüzey enerjisini azaltır. Daha zor nemlenen bir yüzeye plak tabakalarının yapışması zorlaşır (Camosci ve Tinanoff, 1984).

Birçok ağız bakterisi fluor konsantrasyonundaki artışa uyum sağlayarak üremeye devam eder. Bu adaptasyon birçok çalışma ile de gösterilmiştir (Hamilton ve Bowden, 1988; Hamilton, 1990; Tatevossian, 1990). Bakterilerdeki doğal

bağışıklık ve fenotipik adaptasyon özelliği, plakta bulunan birçok mikroorganizmanın in-vivo olarak yüksek konsantrasyonlu fluor uygulamasına karsın üremeye devam etmesine olanak sağlar. Bununla birlikte fluorlu ortama adapte olan bakterilerin asit üretme yeteneği azalır. Bu durum pH artısına neden olarak minenin devamlılığının korunmasına ve asidürik bakterilerin karbonhidrat metabolizmasının etkilenmesine neden olur (Bowden, 1998).

Özetle; karbonhidrat metabolizması sırasında ortam pH'sı 7 ile 5 arasında sınırlı kalırsa, fluor diş plağı tarafından HF olarak alınır ve daha alkali olan sitoplazma içerisinde H^+ ve F^- iyonlarına ayrışır. Protonlar sitoplazmada asidik ortam oluşturarak pH'yı düşürürler ve fluorun hücre işleyişini engelleyebilmesi için gerekli ortamı yaratırlar (Hamilton ve Bowden, 1988).

Topikal olarak uygulanan fluorlu bileşiklerin mine yüzeyinde CaF_2 birikimi yaptığı bilinmektedir. Fluor içeren topikal solüsyon ve jellerin uygulanmasının ardından ilk 24 saat içerisinde uygulanan fluorun büyük bir kısmının yitilmesi araştırmacıları mine yüzeyi üzerinde daha uzun süre kontakt halinde kalabilecek yöntemlere yöneltmiştir. Bu amaçla geliştirilen fluorlu vernikler daha uzun süre diş yüzeyinde kalmakta ve ortama yavaş bir şekilde fluor salmaktadır. Bu sayede mine yüzeyine tutunan fluor miktarı da artmış olur. Artmış fluor varlığı sayesinde fluorlanmış hidrosiapaptit oluşumu da artmakta ve minenin asitlere karşı daha dirençli olması sağlanmaktadır (Beltran-Aguilar ve ark., 2000; Hazelrigg ve ark., 2003). Fluor vernikleri üretici firmanın önerileri doğrultusunda kullanıldığı takdirde yutulma ile oluşacak toksik etki çok düşük olacağından küçük çocuklarda da güvenle kullanılabilir. Erken çocukluk çağı çürüğü olan çocuklarda, engelli bireyler gibi yüksek çürük risk grubundaki bireylerde, fluor vernikleri sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalarda verniklerin, 2 yıl düzenli uygulandıklarında çürük sıklığını %38 oranında azalttığı belirtilmektedir. Yüksek çürük risk grubundaki bireylerde yılda 4, düşük çürük risk grubundaki bireylerde yılda 2 kez uygulanması önerilmektedir (Beltran-Aguilar ve ark., 2000; Vaikuntam, 2000).

Fluor verniği, doğal ya da sentetik bazlı, fluor tuzlarının etanol gibi bir solventin içinde çözündüğü bir lak ya da likit olarak tanımlanabilir. Doğal verniklerin

alkolik solüsyonu olup sarımsı visköz bir madde olan Duraphat® (Colgate, Rorer GmbH Köln, Germany) 1964 yılında Schmit tarafından diş hekimliğine tanıtılmıştır. 1ml'sinde 50 mg sodyum florid (%5 NaF) ya da %2.26 (22.600 pmm F-) fluor bulunmaktadır. Bu vernik diş üzerinde sıkı bir temas halinde 12 saat kadar kalabilmektedir. Fluorun uygulanmasından itibaren 48 saat süre ile etkisi sürmektedir. Tükürük varlığında, nemli ortamda diş yüzeylerine yapışma özelliğine sahiptir (Petersson, 1993; Beltran-Aguilar ve ark., 2000). Çürük önleyici etkisinin devam etmesi için belli zaman aralıklarıyla uygulanması gereklidir. En etkili uygulama yöntemi, 3'er aylık aralıklarla tekrarlanmasıdır (Vivaldi-Rodrigues ve ark., 2006).

1.8.2.Klorheksidin (Chx)

Klorheksidin santral heksametilen halkası tarafından birleştirilmiş iki 4-klorofenil halkası ve iki biguanid grubundan oluşan simetrik bir katyonik moleküldür (Fardal, 1986). Chx ticari olarak piyasada genellikle dihidroklorid, diasetat ve diglukonat şekillerinde bulunmaktadır ve 30 yılı aşkındır kullanılmaktadır (Killooy, 1988). Chx kuvvetli bazik özellikte bir ajandır. Bakteri hücre duvarı, bakteriyal EPS, hidroksiapatit, pelikül, plak, tükürük musini ve ağız mukozası gibi eksi yüklü alanlara karşı afinitesi vardır. Chx' in antibakteriyal aktivitesinde birkaç mekanizma rol oynar. Konsantrasyonla ilişkili olarak ya bakteriler için öldürücüdür (bakterisit), ya da bakterilerin fonksiyonlarını bozarak (bakteriostatik) etki gösterir. Her iki mekanizma da Chx' in çürük önleyici etkisinde rol oynamaktadır. Chx'in öncelikle uygulama anında bakterisit etkiyle plak oluşumunu önlediğine ve mine yüzeyindeki pelikula ve ağız içerisindeki dokulara absorpsiyonu sonucu devam eden bakteriostatik etki gösterdiğine inanılmaktadır (Kidd, 1991). Chx'in antimikrobiyal ve antiplak ajan olarak başarılı bulunmasındaki en önemli faktör etkisinin uzun sürmesidir. Örneğin %0,2' lik Chx gargara ile bir kez çalkalama sonucunda 24 saat süreyle diş plağında asit oluşumunun önlenildiği gösterilmiştir (Axelsson ve ark., 1987; Kidd, 1991). Chx gram (+), gram (-) bakteriler, mantarlar, fakültatif anaerob ve aeroblar gibi geniş spektrumlu organizmalar üzerinde etkilidir. Gram (+)

bakterilerden özellikle *S. mutans* üzerinde daha çok etkilidir (Marsh, 1993; Emilson, 1994; van Rijkom ve ark., 1996; Achong ve ark., 1999).

Bakteri hücre duvarının en karakteristik özelliği negatif yüklü olmasıdır. Artı yüklü Chx molekülleri, eksi yüklü bakteri hücre duvarının lipopolisakkaritlerinin fosfat grubu ve proteinlerinin karboksil grubu ile bağlanır. Bu durum bakteriyal hücre membranının bütünlüğünü bozar ve Chx hücre membranının iç kısmındaki fosfolipitlere bağlanır. Bunun sonucunda bakteri iç membranının geçirgenliği artar ve düşük molekül ağırlıklı potasyum ve fosfor gibi maddeler ayrışır (Fardal, 1986). Ayrıca Chx glikoziltransferaz gibi enzimlerle fosfoenolpiruvat fosfotransferaz sistemini baskılayarak bakteri metabolizmasını inhibe eder (Van Strijp, 1997). Bakteriostatik evrede Chx' in etkileri geri dönüşümlüdür ve ortamdan fazla Chx' in uzaklaştırılması bakteri hücresinin eski haline dönmesine imkan verir. Chx konsantrasyonu arttıkça bakterilerin sitoplazmik membranında oluşan hasar da artmaktadır. Yüksek konsantrasyonlarda Chx hücre içine penetre olur ve muhtemelen çapraz protein bağlanması sonucu sitoplazmanın presipitasyonu ve koagülasyonuna neden olarak bakteriyi öldürür. Chx' in bakteri hücre membranında bağlandığı özel alanların tanımlanması henüz başarılamamıştır. Ancak Chx' in iç ve dış membranlardaki etkisinin farklı olması Chx' in membranlara spesifitesinde farklılıklar olabileceğini akla getirmektedir (Fardal, 1986; Jones, 1997).

1.8.2.1.Klorheksidin Plak Oluşumunu Önleyici Etkisi

Chx' in plak oluşumunu önleyici etkisi sadece Chx uygulaması esnasında ağız florasının genel olarak baskı altına alınması ve bakteri ölümüne bağlanamaz. Nitekim daha güçlü antibakteriyal etkiye sahip birçok ajanın in-vitro olarak plak oluşumunu önlemediği görülmüştür. Bu durum Chx' in ağız içi dokulara emilimi ve yavaş salınımının uzun süre devam etmesi sonucu bakteriostatik etkisinin devamlı olmasıyla açıklanmıştır (Gjermo, 1989; Steinberg ve ark., 1999).

Chx, pelikül, tükürük gibi değişik yüzeylere tutunma özelliğine sahiptir. İn-vitro olarak Chx' in tükürük musinlerine yüksek afinitesi olduğu gösterilmiştir ve bu

durum, in-vivo etkinliğinin açıklanmasında önemli bir mekanizmadır. Tek bir seans Chx ile çalkalanma sonrasında bile tükürüğün antibakteriyal aktivitesi 5 saat devam etmektedir. Ağız içi yüzeylere tutulum sonrasında ise tükürük bakterilerinin 12 saat süreyle baskılandığı bildirilmiştir (Gjermo, 1989; Jones, 1997).

Chx ağız içi yüzeylere geri dönüşümlü, elektrostatik bağlanma ile tutunur ve tükürük Chx konsantrasyonları düştüğünde retansiyon sahalarından yavaşça salınır. Chx, ağız içerisinde özellikle yüzey yapılarının glikoproteinlerine tutunmaktadır (Gjermo, 1989; Klein ve ark., 1999). Bu bağlanma pH' a bağlı olarak değişir. Düşük pH da Chx' in ağız içi dokulara tutulumu azalmakta ve Chx ağız içine salınmaktadır (Gjermo,1989).

Cosyn ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada 2 farklı Chx cılanın antiplak etkisini karşılaştırmışlardır. Çalışmada bir gruba EC40[®], diğer gruba ise Cervitec[®] plus uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre, cila uygulanan gruplarda kısa dönem plak miktarında olumlu derecede azalma görülmüştür. EC40[®] ve Cervitec[®]plus uygulanan gruplarda plak miktarı açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Waalder ve Röllä (1985), Chx' in pelikılla örtülü olan diş yüzeylerine tutulumunun diğer yüzeylerde oluşan Chx-protein etkileşimlerine göre daha az olduğunu belirterek, ne dil ne de diş yüzeylerinin Chx için plak oluşumunu önleyici reseptör alanları olmayacağını bildirmişlerdir.

Araştırmacılar ağız içi dokuların Chx için rezervuar görevi gördüğünü ve ağız içerisinde Chx konsantrasyonu düştükçe bu bölgelerden molekül salınımı meydana geldiğini ileri sürmüşlerdir (Jenkins ve ark., 1988; Gjermo, 1989).

Oysa Jenkins ve ark. (1988), Chx' in plak oluşumunu önleyici etkisinde ağız içerisindeki depolardan antiseptik düzeyde salınımının bir rolü olmayacağını bildirmişlerdir. Chx' in antiplak etkisini, Chx' in pelikılla kaplı mine yüzeyine absorpsiyonu sonucu bakteriostatik etkisinin devamlı olmasına bağlamışlardır.

Chx uygulaması sonrasında diş yüzeyine bakteri adezyonunun tamamen önlenemediği ancak; yüzeye absorpsiyonu sonucu devam eden bakteristatik etki ile bakteri üremesinin durdurulduğunu bildirmişlerdir.

Chx' in bir diğer etkisi bakterilerin hem diş yüzeyine hem de birbirine yapışmasını engellemesidir. Chx bakterilerin ilgili bölgeleri için kalsiyum (Ca) ile yarışa girer ve Ca yerine bakterilere bağlanarak bakteriler arası ve bakteriyel dokular arası Ca köprüleri ile oluşan bağlanmayı engeller. Yüksek konsantrasyonlarda Ca' un Chx' in etkisini önlediğine dair görüşler mevcuttur. Ayrıca Chx bakteriyel adezyonda önemli rol oynayan glikoziltransferaz ve dolaylı olarak EPS oluşumunu engelleyerek bakterilerin diş yüzeyine tutulumunu önler (Gjermo, 1989).

1.8.2.2.Klorheksidin Oluşmuş Plağa Etkisi,

Chx' in olgun plağa penetrasyonu ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. İn vitro olarak Chx iyonlarının olgun plağa 2 mm penetre olabildiği gösterilmiştir (Melsen ve ark., 1983). Plağa bağlanan Chx muhtemelen bakteri yüzeylerindeki fosfat gruplarına ve yüzeye bağlı bakteriyel enzimlerin tiol gruplarındaki sulfatlara bağlanmaktadır (Gjermo, 1989).

İnsanlarda yapılan deneysel çalışmalarda Chx' in olgun plakta asit oluşumunu önlediği gösterilmiştir. Bu durum ağız içerisinde Chx tutulumu ve yavaş salınımına bağlanmıştır. Asit üretiminin az olmasının bir diğer nedeni de asidofilik ve karyojenik mikroorganizmaların kolonizasyonları için daha az elverişli bir ortam yaratmasıdır (Gjermo, 1989).

Araştırmacılar, mikroorganizmaların uzun süre baskılanmasının klorheksidin gibi ajanların uzun süre diş üzerinde teması ile mümkün olabileceğini düşünmektedirler (Emilson, 1994; Madlena ve ark., 2000; Araujo ve ark., 2002). Bu nedenle son yıllarda uzun dönem salınım yapan ve bakteriler üzerine etkili vernikler geliştirilmiştir. Chx verniklerden biri olan Cervitec®plus, %88 etanol/ethyl asetat, %10 polimer sistem ve antimikrobial ajan olarak %1 chx ve

%1 timol içermektedir. Esas olarak bu vernikler yüksek çürük riski taşıyan bireylerde çürük önleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Chx vernik uygulaması ile biyofilmdeki streptokokus mutans sayısı baskılamakta böylece karyojenik potansiyel düşmektedir (Schaeken ve ark., 1991; Ie ve Schaeken 1993; Schaeken ve ark., 1994; Twetman ve ark., 1995; Twetman ve Petersson 1997; Madlena ve ark., 2000; Araujo ve ark., 2002).

Klorheksidin vernik, düşük miktarda kullanımı, belirli bir bölgeye uygulanabilmesi ve yüksek retansiyon oranı göstermesi, dişi boyamaması ve ağızda kötü tat bırakmaması gibi özellikleri ile gargaralara alternatif olarak sunulmuştur. Sık uygulama gerektirmemesi ve cila ile diş arasında uzamış kontak zamanı nedeniyle streptokokları uzun süre baskılaması ise diğer avantajlarıdır (Attin ve ark., 2003). Ancak klorheksidin preparatlarının hiçbirinin çürükle mücadelede tek başına etkili olamayacağı unutulmamalıdır (Twetman, 2004).

1.8.3.Ozon

Oksijen atmosferde; oksijen atomu (O), oksijen molekülü (O₂) ve ozon (O₃) olarak üç değişik biçimde bulunmaktadır. Ozon (O₃) üç oksijen atomundan oluşan, doğada gaz halinde bulunan bir moleküldür (Azarpazhooh ve Limeback, 2008). Atmosferik oksijenden (O₂) daha yüksek bir enerjiye sahiptir ve daha kararsız yapıdadır (Nogales ve ark, 2008).

Ozon, ilk olarak 1840'da Alman kimyager Christian Friedrich Schönbein tarafından keşfedilmiş ve adlandırılmıştır. Renksiz ve keskin kokulu bir gaz olan ozon Yunanca 'koklamak' anlamına gelen 'ozoin' kelimesinden gelmektedir (Nogales ve ark., 2008). Ozon yüksek frekanstaki güneşin ultraviole ışınları ile ya da yapay olarak ozon jeneratörüyle üretilmektedir. İlk ozon jeneratörü, Werner von Siemens tarafından 1857'de Almanya'da geliştirilmiş ilk defa C.Lender tarafından 1870'de kanın saflaştırılması için kullanılmıştır. 1881'de ozonun Dr. Kellok tarafından dezenfektan olarak difteride kullanıldığı belirtilmiştir. Ozon mikroorganizmaları inaktive edici güçlü etkisinden dolayı 19. yüzyılda su dezenfektanı olarak önerilmiştir. Günümüzde ise ozon; su arıtma, gıda endüstrisi,

kağıt endüstrisi, tekstil sektörü, tıp ve diş hekimliği gibi birçok farklı alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Azarpazhooh ve Limeback, 2008).

Sıvı ya da gaz formundaki ozonun bakteri, mantar, protozoa ve virüslere karşı güçlü antimikrobiyal etki gösterdiği saptanmıştır. Ozonun oksidasyon potansiyeli bakteri ve mantarların sitoplazmik membranlarını ve hücre duvarlarını yıkıma uğratmaktadır. Bu süreç boyunca; ozon glikoproteinler, glikolipidler ve diğer amino asitleri inhibe ederek hücrelerin enzimatik kontrol sistemlerini bloke etmektedir. Bunun sonucu olarak; membran geçirgenliği artmakta, ozon molekülleri hızlıca hücreye girebilmekte ve mikroorganizmaların ölümüne neden olmaktadır (Nagayoshi ve ark., 2004; Arita ve ark., 2005).

Ozon patojenik mikroorganizmaların üremesini engelleyerek, nötralize ederek ya da hücre duvarını yıkıma uğratarak dezenfeksiyon sağlamaktadır (Müller ve ark., 2007; Azarpazhooh ve Limeback, 2008).

Diş hekimliğinde ozon ilk olarak 1933 yılında Zürih’li diş hekimi E. Fisch tarafından, enfekte yara yüzeylerini ve kronik periodontal enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla sıvı formunda kullanılmıştır (Azarpazhooh ve Limeback, 2008).

Ozonun günümüzde diş hekimliğinde kullanıldığı alanlar aşağıda sıralanmaktadır;

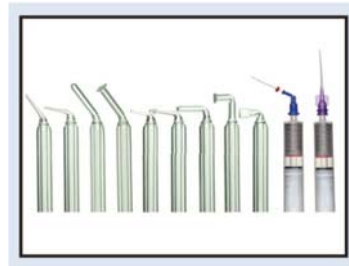
- Pit ve fissür çürükleri
- Başlangıç mine çürükleri
- Dentin çürükleri
- Kök çürükleri
- Dentin hassasiyetinin tedavisi
- Dişlerin beyazlatılması
- Kök kanal tedavisi
- Ortodontik braketler etrafındaki demineralizasyonun önlenmesi
- Aft ve herpes tedavileri
- Postoperatif ağrı
- Aletlerin sterilizasyonu
- Dental ünit sularının temizliği (Lynch, 1996; Thaman ve Sood, 2012).

Diş hekimliği ve tıp alanında ozon tedavisini uygularken ozon jeneratörlerinden yararlanılmaktadır. Geçmişten günümüze ozon üreten jeneratörlerin listesi şu şekildedir:

1. Corona Jeneratörü (Bilim adamı, Nicolar Teslar, 1859).
2. Ozonosan (1. tıbbi Ozon jeneratörü, Fa. Hänslar, 1958).
3. OzonyTron (Mymed, Almanya, 1999).
4. HealOzon (KAVO Dental, Almanya, 2001).
5. UltraOzon (Mymed, Almanya, 2004).
6. OzonyTronX (Mymed, Almanya, 2005).
7. Biozonix® GmbH (Mymed, ALMANYA, 2009).

1.8.3.1.OzonyTronX

Cihaz 1999’da OzonyTron, 2005 yılında ise geliştirilerek OzonyTronX olarak Almanya’da Mymed tarafından üretilmiştir. OzonyTronX, ana ünite, plazma probu ve aplikatörden oluşmaktadır. OzonyTronX cihazı ozon gazı üreten bir jeneratör değildir. Cihazın probu hastaya temas ettiği anda ortamda bulunan oksijen molekülü (O_2) atomlarına ayrılmaktadır. Bu atomik oksijen, bakteri jermelerinin ölümüne neden olmakta ve geçici olarak ortamdaki oksijen (O_2) ile birleşerek yüksek derecede dezenfeksiyon etkisi yapan ozon (O_3) gazını oluşturmaktadır. OzonyTronX cihazı, uygulama alanına göre farklı prob uçlarına sahiptir (Şekil 1.3) (Anonymus, 2011a; 2011b; 2011d).



Şekil 1.3. OzonyTronX cihazının prob uçları

Cam prob uçlarının içerisinde, elektromanyetik enerjiyi yönlendiren ve uygulama alanına veren soy gaz karışımı bulunmaktadır. OzonyTronX cihazının yedi ana prob ucu ve kullanım alanları Çizelge 1.1’ de gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. OzonyTronX prob uçları ve kullanım alanları

Prob uçları	Kullanım alanları
CR prop ucu	Çürük, pulpa dezenfeksiyonu, hiperemi, pulpitis, kök kanal tedavisi, abse, granüloma, hipersensitivite tedavisi ve kavite dezenfeksiyonu
PA prop ucu	İmplatoloji, re-implantasyon, kanama kontrolü, gingivitis, periodontitis, cerrahi işlemlerde dezenfeksiyon, fistül tedavisi, kuron dezenfeksiyonu
PA/8 prop ucu	Derin periodontal cepler, gingivitis, periodontitis, cerrahi işlemlerde dezenfeksiyon, periapikal enfeksiyonlar, fistül tedavisinde
AV prop ucu	İmplant öncesi kemik dokunun hazırlanması, cerrahi işlemler, yaraların dezenfeksiyonu, hemorajik kanamalar
GI prop ucu	Gingivitis, periodontitis, stomatitler, yumuşak doku lezyonları, implantoloji, fistül tedavisi, periapikal enfeksiyonlar, kök kanal tedavisi
CA prop ucu	Çürük tedavisi, özellikle çocuk diş hekimliğinde ağrıya ya da hassasiyete neden olabilecek dişlerin tedavisi, kavite dezenfeksiyonu
KP prop ucu	Ulaşılmaz güç alanlar (Kanal tedavilerinde kanal dezenfeksiyonu ve apikal lezyonların dezenfeksiyonu, fissürler ve derin periodontal cepler)

Çürük tedavisinde ve çocuk diş hekimliğinde diş ile prob ucu arasında yalıtımı sağlayan ve elektromanyetik akımın ağrı oluşturmalarını engelleyen, silikon başlıklı CA prob ucu kullanılmaktadır (Anonymus, 2011a; 2011b; 2011d).

OzonyTronX cihazı üzerinde, beş kademeli olarak ozon gazının yoğunluğunun ayarlanabildiği kontrol düğmesi bulunmaktadır. Kademelerin konsantrasyonu, uygulama süresi ve bu konsantrasyona göre uygulanan tedavi seçenekleri Çizelge 1.2’ de gösterilmektedir.

Çizelge 1.2. OzonyTronX cihazının kademeleri, konsantrasyonu, uygulama süresi ve uygulama alanları

KADEME	OZON KONSANTRASYONU	UYGULAMA SÜRESİ	UYGULAMA ALANLARI
1. KADEME	0-5 000 ppm	120 s.	Hassasiyet Testleri
2. KADEME	10 000-25 000 ppm	90 s.	Yumuşak dokuların viral ve mantar enfeksiyonları, Hassas dokuların dezenfeksiyonu (dil, dudak)
3. KADEME	25 000-45 000 ppm	40-60 s.	Gingivitis,periodontitis,hiperemi
4. KADEME	45 000-100 000 ppm	30-40 s.	Reimplantasyon, çekim sonrası alveolar soket dezenfeksiyonu, trismus, mine ve dentin yüzeylerinin restorasyona hazırlanması
5. KADEME	100 000-300 000 ppm	40-50 s.	Prob ucunun dezenfeksiyonu, Kanama kontrolü, kök kanal dezenfeksiyonu

Maksimum ozon konsantrasyonu OzonyTronX’de 300.000 ppm iken, Ozonasan’da 50.000, HealOzon’da ise 2100 ppm’dir (Anonymus, 2010b). Almanya’da “TÜV SÜD (Teknik denetim kurumu) Industrie Service GmbH” kuruluşu tarafından OzonyTronX cihazının ürettiği ozon miktarı ve konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Ozonun diş hekimliğinde kısa sürelerde (20–120 saniye) uygulanması sonucu oluşabilecek maksimum ozon konsantrasyonunun, insanlar için zararlı ozon konsantrasyonu eşik değerinin (TLV) %37’inde kalması nedeniyle, güvenli uygulanabilirliğine izin verilmiş ve herhangi bir toksik etki yaratmadığı “TÜV” belgesi ile kanıtlanmıştır (Anonymus, 2010b; 2011c).

1.9. İn-Situ Çalışmalar

İn vitro laboratuvar çalışmaları ya da hayvan çalışmalarının aksine deney ortamının bireylerin doğal ağız ortamı olması, farklı temel bilim dallarında kullanılan analitik tekniklerin de kullanımına imkan tanıyarak metodolojinin bilimselliğinin ve hassasiyetinin artmasına imkan vermesi, kısa deney süresi nedeniyle insanlarda yapılan pek çok çalışmada karşılaşılabilen etik ve motivasyon sorunlarının minimize edilebilmesine olanak tanınması ve uzun süreli çalışmalarla kıyaslandığında daha ekonomik olması, in-situ çürük modellerinin kullanımlarının başlıca avantajları olarak sayılmaktadır (Zero, 1995).

Katılımcıların seçiminin büyük önem taşıdığı in-situ çürük modellerinin kullanıldığı araştırmalarda; en önemli temel şartlardan biri hazırlanan ağız içi modellerinin, genel sağlık durumu iyi ve sistemik ya da lokal etkili ilaç kullanmayan katılımcılarda uygulanmasıdır. İn-situ çalışmalarda etik işlemlere de önem verilmesi ve çalışmaya başlamadan önce mutlaka katılımcıların klinik protokol ile işbirliği içinde olmaya gönüllü olduklarını belirttikleri bilgi onam formlarının imzalatılarak toplanması ve Etik Kurul onayının alınmış olması gerekir. İn-situ araştırmalarda kullanılan ağız içi apareylerin büyüklüğü ve şekli, sabit ya da hareketli olup olmamaları da önemli unsurlar arasındadır. Bu tip planlanan çalışmaların içeriğine göre kullanılacak ağız içi apareylerde gerekli

durumlarda çeşitli modifikasyonlar yapılabilir (Netuschill ve ark., 1998). Örneklerin apareyler üzerinde bulundukları bölgelerin lokalizasyonu da in-situ model ile elde edilen sonuçları etkileyen bir diğer parametredir. Özellikle besinlerin ve fluor gibi çürük engelleyici maddelerin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda örneklerin apareylerde bulundukları bölgelerin, büyük tükürük bezlerinin ağızlarına olan uzaklıkları, çevredeki yapıların anatomik özellikleri de çalışma sonuçlarını etkileyecek ve dikkat edilmesi gerekli özelliklerdir (Edgar ve Higham, 1995).

İn-situ çalışmalarda kullanılan apareylere insan ve sığır dişlerinden elde edilmiş blok ya da tek bir kesit halindeki doku örnekleri yerleştirilir. Klinik eşdeğerliliği açısından apareylerde insan dişlerinden elde edilen doku örneklerinin kullanılması tercih edilirken, sığır dişi minesine de insan dişi minesine nazaran daha kolay temin edilebilmesi, hem çürük oluşumuna hem de çürük önleyici uygulamalara, sahip olduğu uniform formdaki kompozisyonu nedeniyle daha az oranda farklı cevap verebilmesi gibi avantajlara da sahiptir. Bu gibi nedenlerden ötürü sığır dişlerinin in-situ çalışmalarda kullanımı uygundur (Duggal ve ark., 2001).

İn-situ çürük modellerinin kullanıldığı çalışmalarda deney süreci; kullanılan modelin tipine, araştırılan konuya, kullanılan analitik metodların hassasiyetine bağlı olarak 45 dakika kadar kısa ve 6 ay kadar uzun olabilir. Aynı zamanda in-situ çalışmalarda kullanılan apareylerdeki doku örneklerinin değerlendirilmek üzere toplanması için katılımcılardan alınıp ağız içi apareylerinin tekrar katılımcılara geri verilmelerine kadar geçecek sürenin de mümkün olduğunca kısa olmasının deney süresinin uzamaması ve katılımcıların klinik protokolden uzaklaşmamaları açısından önemli olduğu bildirilmektedir (Dijkman ve ark., 1990, Ogaard, 1990).

1.10.Yapılan Çalışmalar

1.10.1.Fluorun Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Araştıran Çalışmalar:

Fluorların antibakteriyel etkisini inceleyen az sayıda çalışma vardır.

Zickert ve Emilson (1982), yaptıkları çalışmada, Duraphat cila uygulanmış çocuklardan 4, 10 ve 21. günün sonunda plak ve tükürük örnekleri almışlardır. Örneklerin incelenmesi sonucu, fluor uygulanmış ve uygulanmamış gruplarda plaktaki ve tükürükteki *S.mutans* seviyelerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Fluorun çürük önleyici etkisinin plak ya da tükürükteki *S.mutans* seviyeleri üzerine etkisi ile ilgili olmadığı; fluorun daha çok remineralizasyon özelliği ile çürük oluşumunu engelleyebildiği sonucuna varmışlardır.

Ekenback ve ark. (2001), yüksek fluor konsantrasyonunun *S.mutans* bakteri metabolizması ve laktik asit formasyonu üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında; fluorun, *S.mutans* bakterilerince oluşturulan biyofilmde, bakteri metabolizmasını anlamlı derecede inhibe ettiğini ve laktik asit oluşumunu engellediğini bildirmişlerdir.

Bradshaw ve ark. (2002), düşük konsantrasyondaki fluoru biyofilm bakterileri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında fluorun antimikrobiyal etkiye sahip olduğu, bunu da *S.mutans* gibi bakterilerin metabolizmasını engelleyerek ve çürük yapıcı bakteriler için gerekli pH' ın düşmesini sağlayarak gerçekleştirdiği sonucuna varmışlardır.

Jeevarathan ve ark. (2007), fluor cılanın plak içindeki streptokokus mutans miktarları üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, 24 saat sonunda fluor cila uygulanmış plakta *S.mutans* sayılarının anlamlı derecede azaldığını bildirilmişlerdir. Cila uygulanmamış grupta mutans sayısı 10^{-4} - 10^{-5} bulunurken, cila uygulanan grupta bu değerler $< 10^{-4}$ olarak bulunmuştur.

1.10.2.Klorheksidin Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Değerlendiren Çalışmalar:

Gusberti ve ark. (1988), in-vivo koşullarda yaptıkları çalışmada deneysel gingivitisli hastalarda %0.12' lik Chx ve H₂O₂' nin klinik ve mikrobiyolojik etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışma için seçilen 32 kişi 3 gruba ayrılmıştır. Denekler 21 gün boyunca ağız hijyeni uygulamasından kaçınacak şekilde günde 2

defa bir grup %0.12' lik Chx, diğer grup %1' lik H₂O₂ ve 3. Grup ise antimikrobiyal etkisi olmayan bir ajanla gargara yaptırılmıştır. Çalışma sonucunda %0.12' lik Chx ile ağzını çalkalayan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gingivitis oluşumunda %95, plak skorlarında ise %80 oranında azalma olduğu bildirilmiştir. Mikrobiyolojik çalışmalar sonucunda ise, %0.12' lik Chx uygulanan grupta, plakta yer alan fakültatif anaerob bakterilerin sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede düşüş olduğu bildirilmiştir.

Twetman ve ark. (1995), ortodontik tedavi gören çocuklarda Cervitec cilanın plak S. mutans değerleri üzerine etkisini araştırmışlar, 1. ayın sonunda test grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir baskılama olduğunu bildirmişlerdir.

Pratten ve ark. (1998), %0.2'lik klorheksidinin beş farklı bakteri türü ile oluşturulan biyofilm üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, Chx' i 1, 5 ve 60 dk süreyle uygulamışlardır. Tüm bakteriler için 1 ve 5 dk' lık Chx uygulamasının bakteri canlılığında azalmaya neden olduğu ancak bu değerlerin istatistiksel olarak anlamlı olmadığı, 60 dk' lık temasta ise bakteri canlılığının anlamlı derecede azaldığı sonucuna varmışlardır.

Zaura-Arite ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak Chx' in 6, 24 ve 48. saatte in-situ koşullarda oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak Chx' in biyofilm canlılığı üzerine etkisinin 6 saatte oluşmuş biyofilimde daha fazla olduğu zaman geçtikçe canlılık değerlerinin arttığı, 48 saatlik biyofilm yapısında sadece biyofilmin dış katmanlarında canlılık değerlerinin de anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir. Bu veriler sonucunda biyofilm yapısının zaman geçtikçe antimikrobiyallere karşı direnç kazandığı gösterilmiştir.

Jenkins ve ark. (1994), yaptıkları çalışmada aynı konsantrasyondaki 3 farklı antimikrobiyal ajanın plak oluşumu üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada %0.05' lik cetylpyridinium chloride (CPC), Chx ve triklosan kullanılmıştır. Çalışma sonucunda bütün gargaraların kontrol grubuna göre plak oluşumunda anlamlı derecede azalmaya neden olduğu rapor edilmiştir. CPC ve Chx' in plak

oluşumunun engellenmesi üzerine etkisi tiriklosandan çok daha iyi bulunmuştur. CPC ve Chx uygulanan gruplar arasında ise anlamlı derecede farklılık olmadığı rapor edilmiştir.

Decker ve ark. (2003), Chx' in biyofilm modelleri üzerindeki *S. sangius*' un serbest ve tutunmuş hücreleri üzerine olan etkilerinin incelendiği çalışmada, Chx uygulanan gruptaki bakteri canlılığının %2-5 arasında azaldığını, tedavi edilmemiş grupta ise canlılığın %65-66 oranında olduğu rapor edilmiştir.

Foster ve ark. (2004), 12 saatlik biyofilme 30 ve 60 s süreyle antimikrobiyal ajanlar uygulamışlar ve klorheksidinin 60 s' de hücre zarına büyük harabiyet verdiğini gözlemlemişlerdir. Aynı zamanda biyofilm yapısının olgunlaştıkça antimikrobiyallere karşı daha fazla direnç gösterdiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda, antimikrobiyal ajanların olgun plaktaki etkilerini incelemek için daha uzun süreli çalışmaların planlanması gerektiği vurgulanmıştır.

Cosyn ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada 2 farklı Chx cilanın antimikrobiyal etkisini karşılaştırmışlardır. Çalışmada, bir gruba EC40[®], diğer gruba Cervitec[®] uygulanmış üçüncü gruba ise hiçbir tedavi uygulanmamıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre, cila uygulanan gruplarda kısa dönem plak miktarında olumlu derecede azalma görülmüştür. EC40[®]ve Cervitec[®] uygulanan gruplarda plak miktarı açısından anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Vitkov ve ark. (2005), 24 saatlik biyofilm üzerine 1 ve 5 dk süreyle %0.1'lik Chx uyguladıkları çalışmalarında; SEM'le yaptıkları incelemeler sonunda biyofilm matriksinde değişiklik gözlenmediğini, TEM'le yaptıkları incelemeler sonunda ise az sayıdaki bakterilerin hücre zarında ve fimbrialarında değişiklik gözlendiğini bildirmişlerdir. Çalışma sonunda, Chx' in birkaç bakterinin matriks ve fimbriasında değişikliğe neden olabildiği ancak biyofilm oluşumunu parçalayamadığı için Chx' in biyofilm üzerinde yetersiz etkiye sahip olduğu sonucuna varmışlardır.

Kara ve ark. (2006), *S.mutans* ve *V.parvula*'nın tek başına ya da beraber oluşturdukları biyofilm yapısı ve bakterilerin laktik asit üretimi üzerine klorheksidinin etkisini inceledikleri çalışmalarında, 72 saat sonunda her iki biyofilm tipinde de bakteri canlılığının benzer olduğunu; 48 ve 72 saat sonunda bakterilerin birlikte oluşturduğu biyofilmdeki laktik asit üretiminin *S.mutans*'la oluşturulan biyofilmden daha az olduğunu bildirmişlerdir. İki bakteri tarafından oluşturulmuş biyofilmin Chx' e bir bakteri tarafından oluşturulmuş biyofilme göre daha az duyarlı olduğu ve iki bakterinin birlikte oluşturduğu biyofilmin tek bakteri cinsiyle oluşturulan biyofilmden farklı özellikler sergilediği sonucuna varmışlardır.

Ribeiro ve ark. (2008), farklı %1' lik Chx cila uygulamalarının tükürük ve biyofilm üzerindeki bakteri sayılarına olan etkilerini incelemişlerdir. Grup A' ya sadece 1 kere %1' lik Chx cila uygulanmıştır, Grup B' ye birbirini takip eden 3 gün boyunca günde sadece 1 kere Chx cila uygulanmıştır, Grup C' ye her bir uygulamadan sonra 4 gün ara bırakılacak şekilde 3 defa Chx cila uygulanmıştır. Grup D' ye ise, tesirsiz bir cila günde 3 defa uygulanmıştır. Tükürük ve biyofilm son cilalamadan 1, 4 ve 8 hafta sonra toplanmıştır. Çalışmanın sonunda tükürük streptokokus mutans sayısı bakımından farklı periyotlar da uygulanan deney gruplarında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. 1 hafta sonrası biyofilm içerisindeki bakteri sayısında her grupta anlamlı olarak artış gösterilmiştir. Sadece Grup A' da bakteri sayısında anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir.

1.10.3. Fluor Ve Chx' in Antimikrobiyal Ajan Olarak Birbirleriyle Karşılaştırıldıkları Çalışmalar:

Ekenback ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada 4 farklı cilanın kök yüzeylerinde bakteri birikimi ve bakteri miktarı üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada cila olarak Cervitec cila, Fluor Protector, Duraphat ve Timol cila kullanılmıştır. Başlangıçta, 1. hafta, 1. ve 6. ayın sonunda hastalardan plak örnekleri alınmıştır. Çalışma sonunda her bir zaman diliminde Cervitec cilanın anlamlı şekilde bakteri miktarını düşürdüğü bu değerlerin 1. hafta ve 1. ayın

sonunda istatistiksel olarak daha anlamlı olduğu Duraphat cılanın ise bakteri miktarında anlamlı bir değişime neden olmadığı bildirilmiştir.

Giertsen ve ark. (2000), in-situ koşullarda biyofilm modelleri oluşturarak plak bakterilerine etkili olan farklı antimikrobiyal ajanların etkilerini inceledikleri çalışmalarında, fluor, inko, Chx, inko-fluor kombinasyonu ve fluor-Chx kombinasyonunun 1 haftalık periyotta in-situ koşullarda oluşturulmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda fluor, çinko asetat ve çinko asetat ile kombine fluor uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bakteri oranının azaldığı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığın bulunmadığı oysa Chx uygulanan grupta bakteri canlılığı ve toplam hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir.

Shani ve ark. (2000), yaptıkları çalışmada amine floridin (AmF) deneysel biyofilm üzerine olan tutulumunu ve S. sobrinus üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada kullanılan biyofilm modelleri hidroksiapatitten elde edilmiştir. Sonuç olarak AmF ve Chx solüsyonlarının konsantrasyonu arttıça S. Sobrinus' un canlılığında da anlamlı olarak azalma olduğu rapor edilmiştir. AmF' in deneysel biyofilm modellerine %90 oranında tutunduğu bulunmuştur.

Shapiro ve ark. (2002), çalışmalarında 12 farklı antimikrobiyal ağız gargarasının biyofilm oluşumu üzerine olan etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmada kullanılan gargaralar chlorhexidine, hexetidine, octenidine, triclosan, bitki zleri ya da aminefluoride/stannous fluoride içermektedir. Distile su ile karşılaştırıldığında tüm gargaraların mikroorganizma sayılarında anlamlı derecede azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Bitkisel ve fenolik bileşenleri içeren gargaralar Chx, hexetidine ve octenidine içeren gargarlara oranla çok daha az etkili olduğu bulunmuştur.

Auschill ve ark. (2005), çalışmalarında amine fluoride/stannous fluoride ve Chx gargaranın in-situ koşullarda oluşturulmuş biyofilm üzerine etkilerini karşılaştırmışlardır. Çalışmaya seçilen 7 kişinin st çenelerine biyofilm elde

etmek amacıyla 6 örneğin yerleştirildiği özel plaklar yapılmıştır. Hastalar günde 2 defa 10 ml ağız gargarası ile 1dk boyunca gargara yapmıştır. Plak kullanımının 48 saat sonrası örnekler plaklardan çıkarılmış ve konfokal lazer tarama mikroskopunda floresan boyama yapılarak değerlendirilmiştir. Su ile karşılaştırıldığı zaman her iki solüsyon da biyofilm kalınlığı ve bakteri canlılığında anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur. İki solüsyon karşılaştırıldığında ise, solüsyonlar arasında istatistiksel olarak anlamlılığın bulunmadığı rapor edilmiştir.

Takeuchi ve ark. (2007), in-vitro koşullarda oluşmuş karmaşık yapıdaki biyofilm modelleri üzerine uygulanan Chx/timol ve fluor içeren 2 farklı cılanın etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada, cilaların plak formasyonu ve bakteri kültürleri üzerine etkilerini, vital boyama ve SEM kullanarak tayin etmişlerdir. Çalışma sonunda Chx/timol cila ile tedavi edilen grup bakteri canlılığı açısından kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Fluor cila ile tedavi edilen grupta ise canlılık sayısı kontrol grubundan anlamlı olarak farklı bulunmamıştır. Chx/timol cila ile tedavi edilen grupta biyofilm gelişiminin engellendiği oysa fluor cila ile tedavi edilmiş grupta biyofilm gelişiminin durdurulamadığı bildirilmiştir

Pizzo ve ark. (2008), amine fluoride/stannous fluoride ve esansiyel yağların antiplak etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada Chx pozitif kontrol grubu fizyolojik salin ile tedavi edilen grup ise negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. Çalışma sonucunda amine fluoride/stannous fluoride ve esansiyel yağlar ile tedavi edilen grup su ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede plak oluşumunu engellediği bildirilmiştir. Fakat plak oluşumunun engellenmesinde Chx' in çok daha fazla etkili olduğu çalışma sonucunda rapor edilmiştir. Amine fluoride/stannous fluoride ve esansiyel yağlar karşılaştırıldığında ise iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

Erdem ve ark. (2012), çalışmalarında 2 farklı fluor cila ve fluor cila ile Chx cılanın kombine kullanımının biyofilm oluşumu üzerine etkilerini

değerlendirmişlerdir. 24 saat, 48 saat ve 5 günde oluşturulmuş biyofilm yapısı incelenmiş ve uygulanan tüm cila gruplarında *S. mutans* sayılarında azalma olduğu bildirilmiştir. 24 saat ve 48. saatteki biyofilm yapısı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında fluor cila ve Chx cilanın kombine kullanıldığı grupta canlı mikroorganizma sayısının diğer gruplara göre daha az olduğu bulgulanmıştır.

Sajjan ve ark. (2013), Cervitec ve Duraphat cilanın plak streptokokus miktarları üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, Cervitec cilanın 1. ve 3. ayın sonunda *S. mutans* sayısını anlamlı derecede düşürdüğünü Duraphat cila uygulanan grubun ise *S. mutans* sayılarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir.

1.10.4.Ozonun Biyofilm Bakterileri Üzerine Etkisini Değerlendiren Çalışmalar:

Son dönemde tıp ve diş hekimliğinde kullanımı gündeme gelen ve kuvvetli antimikrobiyal potansiyele sahip olan ozonun, ağız boşluğunda yer alan mikroorganizmalar üzerindeki etkinliği daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmekte ve biyofilm tabakasında yer alan enfeksiyöz mikroorganizmaları kontrol altına almada faydalı olabileceği bildirilmektedir (Nagayoshi ve ark., 2004; Muller ve ark., 2007).

Şu ana kadar yaptığımız literatür taramasında, ozonun çocuklardan elde edilmiş biyofilm üzerine antimikrobiyal ajan olarak kullanımıyla ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamakla birlikte yetişkinlerde ozonun in-vitro ve in-vivo koşullarda biyofilm bakterileri üzerine etkinliğini değerlendiren çalışmalar mevcuttur.

Walker ve ark. (2003), içinde ozonun da bulunduğu 23 farklı antimikrobiyal ajanın dental ünit su sistemlerindeki biyofilm üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, 10 dk ozon uygulanmasının, biyofilm yapısını kaldıramadığını, ancak biyofilm içindeki canlı mikroorganizma sayısını %65 oranında azalttığını bildirmişlerdir.

Nagayoshi ve ark. (2004), ozon içerikli sıvının ağız içi mikroorganizmaları ve plak üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmalarında, plak üzerine 10 s. ozon içerikli sıvı uygulamasının canlı *S. mutans* sayısında azalmaya neden olduğunu ve ozon içerikli sıvının in-vitro ortamda deneysel olarak plak birikimini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Söz konusu sonuçlar ozonun ağız içi mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonları önlediği görüşünü desteklemiştir.

Huth ve ark. (2006), tarafından yapılan *in-vitro* çalışmada, planktonik ve biyofilm olmak üzere 2 ayrı kültür ortamında, periodontopatojen olan *P.gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythia* ve *Parvimonas micra* üzerine farklı dozlarda ozonun sıvı, gaz formları ve Chx' in antibakteriyel etkinlikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Bu amaçla ozonize su 1.25, 2.5, 5, 10, 20 µg/ml konsantrasyonlarında, ozonize gazı 1, 2, 4, 8, 16, 32, 53 g/m³ miktarlarında ve Chx ise %0.2, %1, %2 oranlarında uygulanarak test grupları oluşturulurken, kontrol grubuna ise sadece serum fizyolojik uygulaması yapılmıştır. Tüm çalışma gruplarında uygulama süresi 1 dakika olarak belirtilmiştir. Biyofilm ortamında test gruplarından hiçbiri *A. actinomycetemcomitans*'ın ortadan kaldırılmasını tam olarak sağlayamazken; %2' lik Chx ve 53 g/m³ oranında ozon gazı uygulanan örneklerde *P.gingivalis*, *T. forsythia* ve *P. micra*'nın tamamen yok edildiği bildirilmiştir. Antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalara olan etkisi biyofilm kültürüne göre planktonik kültürde daha başarılı bulunmuştur. Araştırmada, hem biyofilm hem de planktonik kültür ortamında ozonize su ve ozonize gazı, %2' lik Chx uygulaması ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı belirtilmiş, ancak %0.2 Chx uygulamasına göre daha başarılı olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmanın sonucunda ozonun gaz ya da sıvı formunun antimikrobiyal etkisinin süreye, doza ve mikroorganizma türüne bağlı olarak değiştiğini bildirmişlerdir.

Müller ve ark. (2007), ozon ve fotodinamik terapinin antimikrobiyal etkisini in-vitro olarak değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, 64.5 saat'lik çoklu tür biyofilm modeli üzerine 60 s. ozon ve fotodinamik tedavi uygulamışlardır. Sonuç olarak fotodinamik tedavi ve ozonun biyofilm içindeki çürük yapıcı mikroorganizmaların canlılığı üzerine çok düşük etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Bezirtzoglou ve ark. (2008), ozon gazının diş fırçası üzerindeki mikroorganizmalara etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, çeşitli bakteriler ile kontamine olan diş fırçalarını ozonla doyurulmuş fosfatla tamponlanmış salin çözeltisi içerisinde 5 dk, 10dk, 15dk, 20 dk ve 30 dk bekletmişler ve 30 dk' nın bakteri florası üzerinde en etkin süre olduğu saptamışlardır. Çalışma sonunda ozonun güçlü bir antibakteriyel ajan olduğunu belirtmişlerdir.

Johansson ve ark. (2009), çalışmalarında çürük yapıcı etkisi olan bakteriler üzerinde ozon uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. *A. naeslundii*, *L. casei* ve *S. mutans* bakterileri üzerine 10 s, 30 s ve 60 s ozon uygulamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre *A. naeslundii*, *S. mutans* ve *L. casei* bakterilerinin sırasıyla %92, %73 ve %64'ünün öldüğünü bildirmişlerdir. 60 s sonunda ise total bakterilerin %99,9'unun canlılığını yitirdiğini saptamışlardır. *S. mutans* ve *L. casei* bakterilerinde 10 s, 20 s ve 30 s ozon uygulanmasının *A. naeslundii*' ye göre daha az etkili olduğunu tespit etmişlerdir. Sonuç olarak 60 s'lik ozon uygulaması sonrasında çürük yapıcı etkisi olan *S.mutans* bakterilerinin tamamının elimine edildiğini bildirmişlerdir.

Kshitish ve ark. (2010), periodontitisli hastalarda ozonize su ile Chx' i kıyasladıkları çalışmalarında, gingival indeks fark değerlerini ozonize su uygulanan grupta 0.34 ± 0.38 , Chx grubunda ise 0.23 ± 0.52 olarak tespit etmişlerdir. Ozonize su uygulanan grupta gingival indekste meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunurken, Chx grubunda anlamlı bulunmamıştır. Araştırmacılar ozonize su uygulanan gruptaki azalmanın nedenini, ozonun mikroorganizmalar üzerinde sahip olduğu inaktivasyon özelliğiyle açıklamışlardır.

Huth ve ark. (2011), periodontal hastalığa neden olan mikroorganizmalar üzerine ozon gazı ve Chx' in antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmalarında, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. micra* bakterilerinin planktonik formu ve biyofilm formları üzerine 1dk boyunca gaz formundaki ozon, Chx ve kontrol grubu olarak fosfatla tamponlanmış salin uygulanmıştır. Çalışma sonunda hiçbir ajanın biyofilm kültüründeki *A.actinomycetemcomitans*

bakterilerinin miktarını azaltmadığı, *P.gingivalis*, *T. forsythia*, and *P. micra* bakterilerinin Chx ve ozon uygulaması ile elimine edildiği bildirilmiştir. Chx, ozon gazı ile karşılaştırıldığında antimikrobiyal etki bakımından aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı ancak biyofilm kültür ortamından ziyade planktonik ortamda daha fazla antimikrobiyal etki gözlemlendiği bildirilmiştir. Çalışma sonunda bakterileri elimine etmek için gerekli antimikrobiyal etkinin, bakteri türüne ve ajanın içeriğine, konsantrasyonuna bağlı olarak değişebileceğine dikkat çekilmiştir.

Sadatullah ve ark. (2012), 0.1 ppm' lik ozonize suyun 24 saatte oluşturulmuş biyofilm bakterileri üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, 24 saat sonunda hasta ağızından topladıkları biyofilm örnekleri üzerine ozon gazı ve kontrol grubu olarakta salin uygulamışlardır. Çalışma sonunda 0.1' ppm lik ozonun biyofilm bakterilerinin sayısını azalttığı ancak tamamen elimine edemediği sonucuna varmışlardır.

1.11.Amaç

Diş çürüğü, hayati tehlike yaratacak bir hastalık olarak kabul edilmese de aslında insan sağlığı için oldukça önemli bir sorundur. Özellikle çocuklarda erken yaşlarda oluşan çürük lezyonları ağrı, fonksiyon bozukluğu ve estetik problemler gibi olumsuz etkilere neden olmakta, çocuğun büyüme ve gelişim sürecinde çürük ya da travmatik yaralanmalar sonucu pulpa harabiyetine bağlı olarak süt dişinin fizyolojik düşme zamanından önce kaybı; çocuğun beslenmesi, konuşması, sürekli dişlenme ve çene gelişimi yönünden risk taşımaktadır (Alaçam, 2000; Camp ve Fuks, 2006).

Dişler, tükürük ve yüzlerce bakteriyle karşılaşmadan önce vücut içerisinde mükemmel bir yapıya sahiptirler. Ancak dişlerin ağız ortamına sürmelerini takiben bakteriler kolonize olmaya başlarlar ve bu kolonizasyon dişlerin çekimine kadar devam eder. Bu yüzden çocukluk dönemindeki bakteri kolonizasyonu büyük önem taşımaktadır (Ten Cate, 2006). Çocukların diş sağlığı ile ilgili koruyucu ve tedavi edici yöntemlerin planlanmasında dişlerin sürmeye başladığı

dönem oldukça önemlidir. Carvalho ve ark. (1989), daimi birinci büyük azı dişlerinin sürmesi esnasında oklüzal yüzeylerdeki plak birikimi ve çürük oluşumunun en yüksek düzeyde olduğunu kanıtlamışlardır. Bu nedenle çocukların diş sağlığı açısından bu sürecin hayati bir öneme sahip olduğu belirtilmektedir.

Caufield ve ark. (1993), ağız florasında *S. mutans* kolonizasyonları için uygun zaman dilimleri olduğunu saptamışlar, enfeksiyon penceresi olarak adlandırılan bu dönemlerin büyük öneme sahip olduğunu vurgulamışlardır. Çürük açısından büyük risk taşıyan bu dönemler eğer *S. mutans* enfeksiyonu çok yüksek değerlere ulaşmadan atlatılabilirse, dişler üzerinde karyojenik olmayan mikroorganizmaların oluşturduğu olgun bir plak meydana gelmektedir. Oluşan bu flora içerisine daha sonra *S. mutans*' ların girmesi çok zor olduğundan çürük riski de ortadan kalkmaktadır (Caufield ve ark., 1993). Ayrıca biyofilm bakterilerin farklı bölgelerindeki canlılık durumları, bakterilerin çevreye karşı oluşturdukları uyum ve yapısını üç boyutlu inceleme olanağı bakterinin metabolik özelliklerini daha iyi anlamamıza olanak sağlayacak ve bu sayede çürükle savaş konusunda en etkin tedavi stratejilerini geliştirmemize yardımcı olacaktır (Netuschil ve ark., 1998; Auschill ve ark., 2001; Zaura-Arite ve ark., 2001; Auschill ve ark., 2002).

Ağız sağlığının kazanılması için yapılan birçok çabaya rağmen çürük ve periodontal hastalığın görülme sıklığı oldukça yüksektir. Çalışmalar, periodontal hastalıkların ve çürük oluşumunun biyofilm kontrol programlarıyla engellenebileceğini göstermiştir (Axelsson ve Lindhe, 1987; Twetman, 2010). Günlük uygulanan mekanik metodlar biyofilm eliminasyonunda uygulanan en iyi yöntemdir (Collins ve Dawes, 1987; Mager ve ark., 2003). Ancak fırçalama tekniklerinin yanlış uygulanması, zaman yetersizliği, motivasyon düşüklüğü ve sistemik hastalıklar gibi sebepler günlük ağız hijyeninin düzgün şekilde yerine getirilememesine buna bağlı olarak ta çürük gelişimine neden olmaktadır. Böyle durumlarda, çürük ve periodontal hastalıkların önlenmesi için antimikrobiyal ajanların uygulanması fikri gündeme gelmiştir (Depaola ve ark., 1989). Mikrobiyal patojenler tarafından oluşturulan klasik enfeksiyon hastalıklarının aksine, diş çürüğü var olan ağız içi mikroflora tarafından oluşturulmaktadır. Antimikrobiyal ajan uygulamasındaki amaç, ağız florasını yok etmek değil, ağız

sağlığını tehdit etmeyecek düzeyde tutmaktır çünkü ağız florası belirli bir dengede tutulduğu takdirde konak için yararlı etkilere sahiptir (Scheie, 2003).

Günümüzde kullanılan antiplak ajanlarının çoğu geniş spektrumlu antimikrobiyal ajanlar olup bakterisid ya da bakteriyostatik etkilere sahiptir. Bu ajanlar, plak birikimini ve metabolizmasını önlemek ya da sınırlamak amacıyla kullanılmaktadır (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003). Mikroorganizmaların membranına bağlanmakta ve normal hücre zarı fonksiyonlarını engellemektedir. Bu durum mikrobiyal metabolizmaya zarar vermekte ve mikroorganizmaları öldürebilmektedir (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003). Diğer bir yaklaşım ise, potansiyel patojenik mikrobiyal neslin genetik olarak modifiye edilerek daha az virulan hale getirilmesidir (Scheie, 1989; Sreenivasan ve Gaffar, 2002; Scheie, 2003).

Bilinen en iyi antimikrobiyal ajan olan Chx, plak ve gingivitis oluşumuna karşı en etkili ajan olarak nitelendirilmektedir (Emilson, 1994). Ancak Chx' in biyofilm bakterilerini etkin bir şekilde elimine etmesinin uzun süreli ve yüksek konsantrasyonlarda kullanımı ile mümkün olabileceği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir. Klorheksidin uzun süre kullanımı sonucu ağız içinde renkleşmeye neden olması gibi dezavantajları araştırmacıları biyofilm bakterileri üzerine daha etkili yeni bir antimikrobiyal ajan aramaya yöneltmiştir. Günümüzde hala antiplak ajanlar hakkında çalışmalar devam etmektedir (Baehni ve Takeuchi, 2003; Sadatullah ve ark., 2012). Antimikrobiyal etkinliği bilinen klasik solüsyonların kimyasal ajan olarak kullanılmasının ötesinde ozon gibi yeni, modern ve etkili ajanların da kimyasal ajan olarak kullanılması diş hekimliği pratiği içerisine girmiştir (Müller ve ark., 2007; Sadatullah ve ark., 2012).

Günümüze kadar antiplak ajan olarak klorheksidin ve florun kullanımıyla ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına rağmen yeni ve etkin antimikrobiyal tedavi stratejilerinden biri olan ozon uygulamalarının kompleks biyofilm bakterileri üzerine etkinliğini değerlendiren çalışma sayısı oldukça azdır. Ayrıca bu çalışmaların hepsi erişkin hasta üzerinde, in-vitro ve in-vivo koşullarda gerçekleştirilmiştir. Yaptığımız literatür taramasında, ozonun antimikrobiyal ajan olarak çocuk hasta üzerinde ve in-situ koşullarda, farklı zamanlarda oluşturulmuş

biyofilm bakterileri üzerine etkinliğini değerlendiren çalışmaya rastlanılmamıştır. Bu sebepten yola çıkarak biz de tez çalışmamızda; ilk kez olarak ocuk hasta üzerinde ve in-situ koşullarda ozonun antimikrobiyal ajan olarak kompleks biyofilm üzerine etkilerini konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak değerlendirmeyi amaçladık ve ozonun tek başına ve kombine kullanımının farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm kalınlık ve canlılık değerleri üzerine etkisini inceledik.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Tez çalışmamızda, antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış klorheksidin cila (Cervitec®Plus İvoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein), fluor cila (Duraphat® Colgate & Cie, GmbH, Köln, ALMANYA) ve diş hekimliğinde kullanımı son dönemde gündeme gelen ozon gazının (OzonyTronX®, Mymed, GERMANY) tek başına ve kombine kullanımlarının farklı zamanlarda, in-situ koşullarda oluşmuş biyofilm içerisindeki bakteriler üzerine olan etkinliği karşılaştırmalı olarak konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak değerlendirilmiştir.

2.1. Etik Kurul Onayı

Araştırmanın in-situ bölümü için gerekli olan etik kurul onayı, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu Başkanlığı'ndan alınmıştır (8-14-1137 Sayılı; 29.06.09) (Ek. 1-4). Araştırmaya dahil edilen tüm çocukların ebeveynlerine, araştırma hakkında bilgi verilip, gerekli izin alındıktan ve aydınlatılmış onam formları imzalatıldıktan sonra klinik işlemlere geçilmiştir (Ek. 5-7).

2.2.Çalışmada Kullanılan Materyaller

Çalışmamızda kullanılan materyallerin markaları, içerikleri ve üretici firmaları Çizelge 2.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.1 Tez çalışmamızda kullanılan materyallerin marka, içerik ve üretici firmaları

Materyal	İçerik	Firma
Serum fizyolojik	%0.9 izotonik sodyum klorür, 100 ml'sinde 0.9gr sodyum klorür (154mEq/L sodyum ve 154 mEq/L klorür), 100 ml enjeksiyonluk su	İ.E Ulagay ilaç sanayi, İstanbul, TÜRKİYE
Klorheksidin cila	%10 polimer sistem % 88 etanol/ethyl asetat %1 chx %1 timol	Cervitec®Plus İvoclar Vivadent, Schaan, Liechtenstein
Fluor cila	50mg sodyum fuorür etanol %96, beyaz balmumu (E901), şellak DAB (E904), kolofon mastik, sakarin (E954), ahududu esansı	Duraphat® Colgate & Cie, GmbH, Köln, ALMANYA
Ozon gazı		OzonyTronX®, Mymed, ALMANYA
Fluoresan boya (kırmızı)		Ethidum Bromid, EB, E-875 1; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, ALMANYA
Fluoresan boya (yeşil)		Floresan Diacetate, FDA, F-7378; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, ALMANYA
Fiksasyon ajanı		Histomount İnvitrogen Frederick, MD 21704 USA

2.3. Araştırmaya Dahil Edilen Katılımcıların Seçim Kriterleri

Araştırmamıza başlamadan önce çalışma gruplarımızın sayılarını belirlemek amacıyla ‘Power Analiz’ testi yapılmıştır. Bu analizin sonuçları doğrultusunda araştırma, Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalına başvuran 11- 14 yaşları arasındaki, tamamen sağlıklı, üst çenesinde diş eksikliği bulunmayan, daimi dentisyona geçmiş 6’ sını erkek 4’ ü kız olmak üzere toplam 10 çocuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. Çocuklar DMFS indeksi kullanılarak yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz olarak iki gruba ayrılmıştır. Çürük yüzey sayısı hesaplanırken küçük ve büyük azı dişler için 5 yüzey, kesici ve kanin dişler için ise 4 yüzey olarak değerlendirme yapılmıştır. 10 çocuktan 5 tanesi çürüksüz (DMFS 0), diğer 5 tanesi ise, yüksek çürük aktivitesi (DMFS 11.5 ± 4.8) gösterecek şekilde seçilmiştir. Deneysel işlemleri etkilememesi için çocukların mevcut olan tüm koruyucu ve restoratif tedavileri deney süresinin bitiminden hemen sonra yapılmıştır.

Ayrıca seçilecek çocuklardan alınan anamnezde, çocuklarda hiçbir sistemik hastalık bulunmamış olmasına, yakın dönemde akut bir hastalık geçirmemiş olmasına, periodontitis bulgusu ve yumuşak dokuda herhangi bir enfeksiyon bulunmamış olmasına ve son 6 ay içerisinde antibiyotik ve ağız antiseptiği kullanmamış olmasına dikkat edilmiştir.

2.4.Dişlerin Hazırlanması

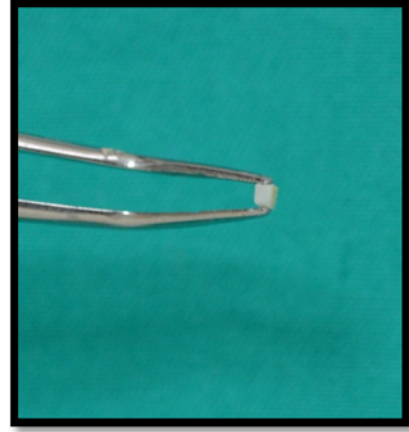
Araştırmamızda, biyofilm oluşumunu sağlamak için transilüminasyon yoluyla bakıldığında hiçbir defekt, kırık bulunmayan yeni çekilmiş 30 adet daimi kesici sığır dişleri kullanılmıştır. Çalışmada kullanılan dişlerin üzerinde bulunan yumuşak doku artıkları, bir kretuar yardımı ile temizlenmiş ve ardından diş fırçası ve diş macunu kullanılarak 30 dakika boyunca fırçalanmıştır. Deneyler başlayıncaya kadar (en fazla 30 gün) dişler steril serum fizyolojik solüsyonu içerisinde saklanmıştır.

2.5.Dişlerden Elde Edilen Örneklerin Hazırlanması

Sığır dişlerinin her biri elmas separe yardımı ile köklerinden ayrılmıştır. Köklerinde ayrılmış sığır dişleri labial yüzeyleri açıkta kalacak şekilde akril kalıplara gömülmüş ve Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Protetik Diş Tedavisi Anabilim Dalı'nda bulunan hassas kesit alma cihazı (Microcut Precision Cutter, Metkon Instruments Ltd, Bursa, Turkey) yardımı ile ~2 mm genişliğinde ~3 mm yüksekliğinde olan ~6 mm² kesitlere ayrılmıştır (Şekil 2.1.a,b,c). Bu sayede 1 diş üzerinden aynı hastada kullanmak üzere 18 adet örnek elde edilmiştir. Sığır dişlerinden elde edilen örnekler doğal mine yapısını koruyacak ve hazırladığımız akrilik plak üzerindeki oluklara rahat yerleştirebilmemize olanak sağlayacak şekilde inceltilmiş, sterilizasyon amacı ile 121°C de 20 dk boyunca otoklavda bekletilmiştir (Müller ve ark., 2007; Takeuchi ve ark., 2007).



Şekil 2.1.a Köklerinden ayrılmış sığır dişlerinin kalıba gömülmüş hali



Şekil 2.1.b Sığır dişlerinden elde edilen örnekler



Şekil 2.1.c. Hassas Kesit Alma Cihazı

2.6.Örneklerin Plaklara Yerleştirilmesi ve Katılımcılar Tarafından Kullanılması

İn-situ koşullarda biyofilm elde etmek için çocukların üst çenelerine, üzerinde sığır dişlerinden elde edilmiş örneklerin yer aldığı, özel akrilik plaklar yapılmıştır. Katılımcıların üst çenelerinden uygun kaşıklar yardımı ile ölçü alınmış, laboratuvar ortamında akrilik plaklar hazırlanmıştır (Şekil 2.2.a,b)



Şekil 2.2.a) Üst çeneye uygulanan plağın görüntüsü



Şekil 2.2.b) Plağın alçı model üzerindeki görünümü

Plak üzerinde sıgır dişinden elde edilmiş örneklerin yerleştirilmesine olanak sağlayacak şekilde bukkal bölgeye doğru bir uzantı oluşturulmuştur (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Plak üzerindeki bukkal uzantının alçı modelde görünümü

Örnekler; bu bukkal çıkıntı üzerinde oluşturulan oyuklara, yapışkan mumlar vasıtasıyla, mine yüzeyleri doğal dişlerin aproksimal bölgelerine bakacak şekilde yerleştirilmiş ve örnekler ile dişler arasındaki mesafe ~2 mm olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 2.4.a,b,c,d,e)



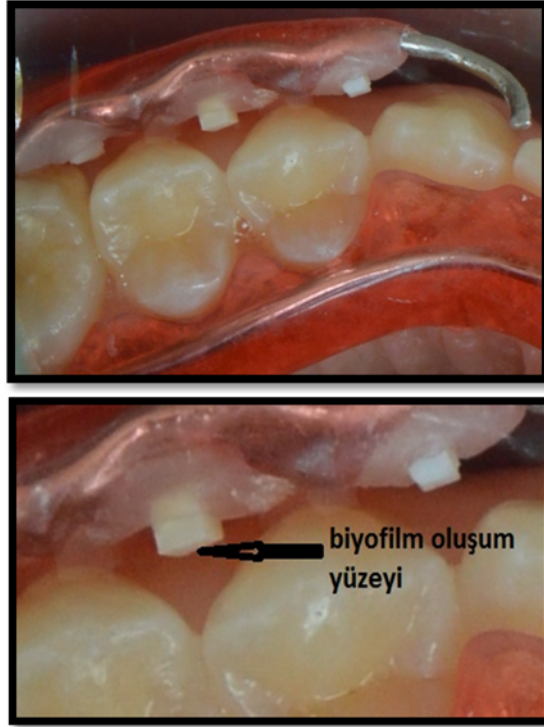
Şekil 2.4.a) Örneklerin plak üzerine yerleştirilmiş halinin alçı model üzerindeki görünümü



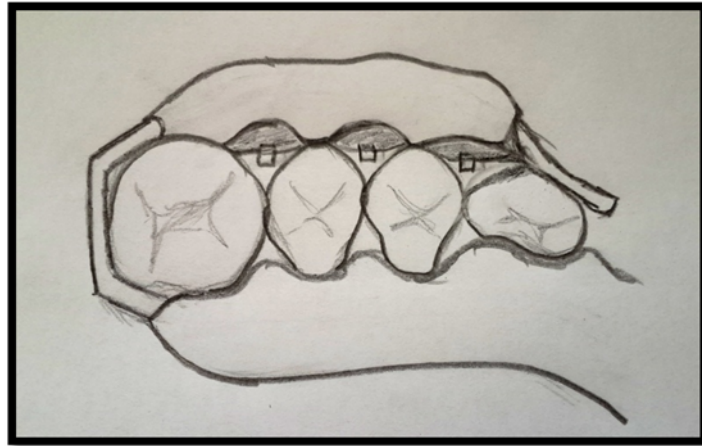
Şekil 2.4.b) Örneklerin plak üzerine yerleştirilmiş halinin hasta ağızındaki görünümü



Şekil 2.4.c) Örneklerin bukkal oluk içine yerleştirilmiş hali



şekil 2.4.d) Bukkal oluğa yerleştirilmiş rneklerin ağız içi grrntüsü



şekil 2.4.e) Bukkal oluğa yerleştirilmiş rneklerin şematik grrntüsü

Katılımcılardan plakları 6, 24 ve 48 saat boyunca, yemek yeme ve dişlerin fırçalanması hariç ağızlarında taşımaları istenmiştir. Katılımcılar kendilerine ait diet alışkanlıklarına devam etmeleri ve dişlerini herhangi bir diş macunu kullanmadan sadece su ile fırçalamaları konusunda uyarılmış, plakları kullanmadıkları süre zarfında, fizyolojik salin içeren kaplar içinde saklamaları söylenmiştir.

2.7.Biyofilm Örneklerine Uygulanan Tedavi Prosedürleri

Çalışmamız 10 katılımcı üzerinde yapılmıştır. Yüksek çürük aktivitesine sahip 5 kişinin yer aldığı grup Grup-1, çürüksüz 5 kişinin bulunduğu grup ise Grup-2 olacak şekilde ayrılmıştır. Gruplara uygulanan tedavi prosedürleri Çizelge 2.2’ de gösterilmektedir.

Gruplara ait katılımcıların her biri, hazırlanan plakları sırası ile 6, 24 ve 48 saat süre ile taşımışlardır. Katılımcılar 6 saat süreyle plak taşıdıktan sonra çağırılmış ve plak içerisinde bulunan 6 adet örnek dikkatli bir şekilde plaktan çıkarılmıştır. 24. saat için aynı sığır dışından elde edilmiş 6 adet yeni örnek plaklara yerleştirilmiş ve katılımcılara 24 saat süre ile plağı taşımaları söylenmiştir. Katılımcılar 24 saat süreyle plak taşıdıktan sonra tekrar çağırılmış ve plak içerisinde bulunan 6 adet örnek dikkatli bir şekilde plaktan çıkarılmıştır. 48. saat için aynı sığır dışından elde edilmiş 6 adet yeni örnek plaklara yerleştirilmiş ve katılımcılara 48 saat süre ile plağı taşımaları söylenmiştir. Katılımcılar 48 saat süreyle plak taşıdıktan sonra çağırılmış ve plak içerisinde bulunan 6 adet örnek dikkatli bir şekilde plaktan çıkarılmıştır. Böylece hastalar toplamda 18 adet örneği plak yardımı ile ağızlarında taşımışlardır. İstenilen süre sonunda biyofilm oluşumunu sağlamak için plaklara yerleştirilen örnekler presel yardımı ile dikkatli bir şekilde çıkarılmış, laboratuarda tedavi prosedürlerinin uygulanacağı süreye kadar fizyolojik salin bulunan petri kaplarında muhafaza edilmiş ve vakit kaybetmeden laboratuvar işlemlerine geçilmiştir. Çalışmamızın laboratuvar işlemleri Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Biyoteknoloji Enstitüsü Moleküler Biyoloji Laboratuvarı bölümünde gerçekleştirilmiştir.

Çizelge 2.2. Gruplara uygulanan tedavi prosedürleri

Biyofilm oluşum zamanları	Çalışma grupları	Tedavi prosedürleri
6 saat	Negatif kontrol grubu	1 dk fizyolojik salin uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-1	1 dk Cervitec®plus uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-2	1 dk Duraphat® cila uygulaması
	Deney grubu-1	1 dk ozon tedavisi
	Deney grubu-2	1 dk Cervitec®plus ardından 1dk. ozon tedavisi
	Deney grubu-3	1 dk Duraphat® cila ardından 1dk ozon tedavisi
24 saat	Negatif kontrol grubu	1 dk fizyolojik salin uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-1	1 dk Cervitec®plus uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-2	1 dk Duraphat® cila uygulaması
	Deney grubu-1	1 dk ozon tedavisi uygulaması
	Deney grubu-2	1 dk Cervitec®plus ardından 1dk ozon tedavisi
	Deney grubu-3	1 dk Duraphat® cila ve 1dk ozon tedavisi
48 saat	Negatif kontrol grubu	1 dk fizyolojik salin uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-1	1 dk Cervitec®plus uygulaması
	Pozitif kontrol grubu-2	1 dk Duraphat® cila uygulaması
	Deney grubu-1	1 dk ozon tedavisi uygulaması
	Deney grubu-2	1 dk Cervitec®plus ardından 1dk ozon tedavisi
	Deney grubu-3	1 dk Duraphat® cila ve 1dk ozon tedavisi

Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz her iki grupta da 6, 24 ve 48 saatlik plak kullanımının ardından plaklardan çıkarılan örneklerle uygulanan tedavi prosedürü ayrıntılı bir şekilde aşağıda anlatılmaktadır.

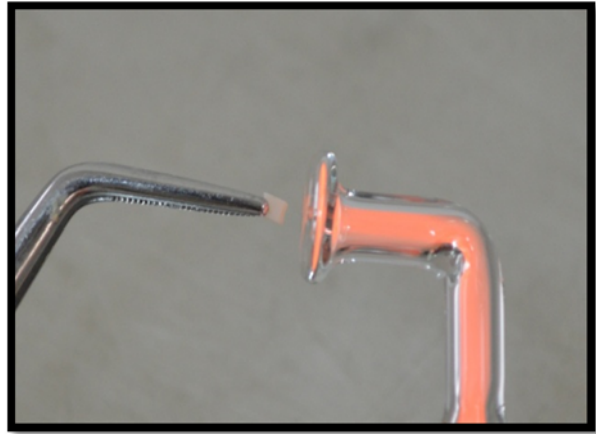
Deney Grubu-1: Plak üzerinden dikkatli bir şekilde çıkarılan örneklerden rastgele seçilmiş 1 örnek; 1 dk boyunca enjektöre çekilen fizyolojik salin ile biyofilm tabakasına zarar vermeyecek şekilde yavaşça yıkanmıştır (Şekil 2.5). Bu işlemi takiben örnek üzerine OzonyTronX® cihazı kullanılarak 60 s boyunca 3. seviyede ozon tedavisi uygulanmıştır (Şekil 2.6.a,b). Antimikrobiyal ajanların dikkatli bir şekilde ve aynı koşullarda uygulanmasına dikkat edilmiştir.



Şekil 2.5. Örneklerin fizyolojik salin ile yıkanması



Şekil 2.6.a) OzonyTronX® cihazı

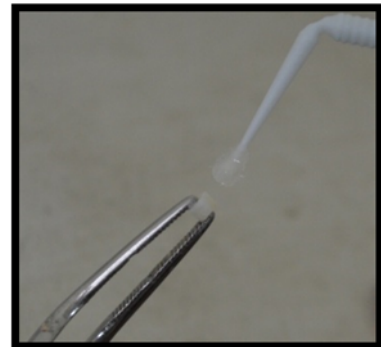


Şekil 2.6.b) Örneklere ozon gazı uygulaması

Deney Grubu-2: Rastgele seçilmiş 2. örneğin 1dk fizyolojik salin ile yıkanmasını takiben üretici firmanın talimatları doğrultusunda kendi aplikatörü ile 1 dk boyunca Cervitec®Plus cila (Şekil 2.7.a,b) uygulanmıştır. Uygulamanın ardından örnekler fizyolojik salin ile yıkandıktan sonra OzonyTronX® cihazı ile 60 s boyunca 3. seviyede ozon tedavisi uygulanmıştır.



Şekil 2.7.a) Cervitec®Plus cila



Şekil 2.7.b) Örneklere Cervitec®Plus cila uygulaması

Deney Grubu-3: Rastgele seçilmiş 3. örnek önce 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1dk boyunca Duraphat® cila uygulanmıştır (Şekil 2.8.a,b). Cila artıklarını uzaklaştırmak için fizyolojik salin ile yıkanan örnekler 60 s boyunca 3. seviyede ozon tedavisi uygulanmıştır.



Şekil 2.8.a) Duraphat® cila



Şekil 2.8.b) Örneklere Duraphat® cila uygulaması

Pozitif Kontrol Grubu-1: Rastgele seçilmiş 4. örnek önce 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1dk boyunca Cervitec®Plus cila uygulanmıştır.

Pozitif Kontrol Grubu-2: Rastgele seçilmiş 5. örnek önce 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1dk boyunca Duraphat® cila uygulanmıştır.

Negatif Kontrol Grubu: Son örneğe hiçbir tedavi prosedürü uygulanmamış örnekler sadece 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmıştır.

Örneklere antimikrobiyal ajanların uygulamasını takiben örnekler 5 dk boyunca basınçsız ve aynı miktarda olacak şekilde fizyolojik salin ile yıkanmış ve boyama işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.8.Boyalarmın Hazırlanması

6, 24 ve 48. saatin sonunda plaklardan çıkarılan örneklere tedavi prosedürlerinin uygulanmasından sonra floresan boyası ile boyama işlemi yapılmıştır. Floresan boyası olarak ethidium bromide (EB, E-875 1; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) ve floresan diacetate (FDA, F-7378; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) boyları kullanılmıştır (Şekil 2.10 a,b)



Şekil 2.10.a) Ethidium Bromide cansız hücre boyası



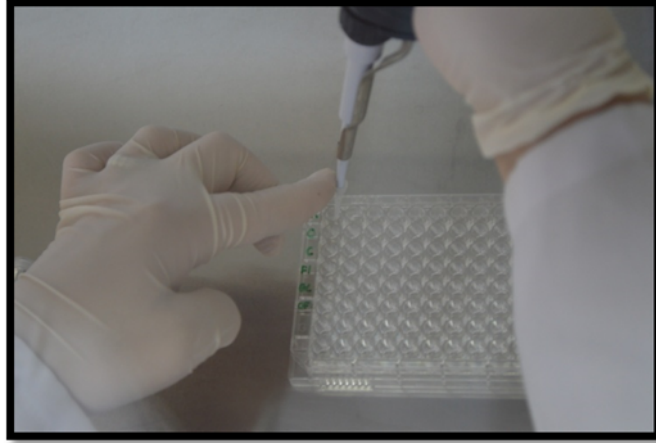
Şekil 2.10.b) Floresan diacetate canlı hücre boyası

Boyların kullanılmasından önce her bir boya için stok bir karışım oluşturulmuştur. FDA için hazırlanan stok boya 5mg/ml FDA' ın soğuk aseton (%50) ile karıştırılması sonucu elde edilmiş ve boya kullanacağımız zamana kadar -20°C' de muhafaza edilmiştir. EB için hazırlanan karışım ise, 1.25 mg/ ml EB ile fizyolojik salinin karıştırılması ile elde edilmiştir ve kullanılacak zamana kadar ki sürede 5°C de saklanmıştır. Boyama işlemi esnasında kullanılacak asıl boya karışımı mikropipetler yardımı ile, 6µl FDA stok solüsyonu ve 3µl EB stok solüsyonunun 1ml soğuk fizyolojik salin ile karıştırılmasıyla elde edilmiştir (Netuschil ve ark., 1989). Bu boya karışımı, örneklerin boyanma işlemlerinden

hemen önce ve taze bir şekilde hazırlanmıştır. Diğer gruplardaki örnekleri boyamak için her seferinde yeni bir boya karışımı kullanılmıştır.

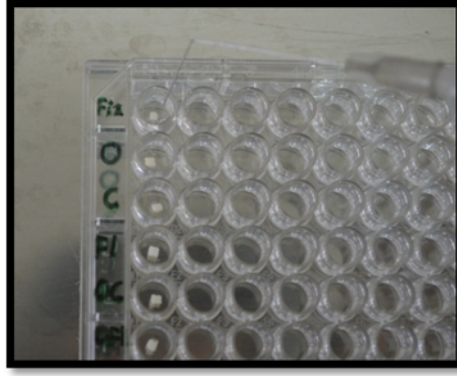
2.9.Örneklerin Boyama ve Sabitleme İşlemi

Plaklardan çıkarılan 6 adet örnek boyama işlemi için 96 gözlü steril kaplara konulmuş ve 2 farklı fluoresan boyasının karıştırılmasıyla elde edilen bir boya ile boyanmıştır. Hazırlanan karışımdan mikropipet ile 3,5 µl boya alınarak dikkatli bir şekilde biyofilm yapısına zarar vermeden örneklerin üzerine damlatılmıştır (Şekil 2.11).



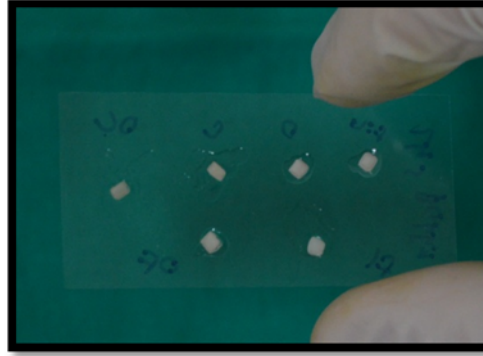
Şekil 2.11. Örneklerin mikropipet yardımı ile boyanma işlemi

Boyanma işlemi 2-15 dk içerisinde gerçekleşeceğinden boyanmış örnekler 15 dk boyunca boyaların güneş ışığından zarar görmelerini engellemek adına karanlık bir ortamda bekletilmiştir. 15 dk sonunda fazla boyayı uzaklaştırmak için örnekler fizyolojik salin ile yıkanmıştır (Netuschil ve ark., 1989)(Şekil 2. 12).



Şekil 2.12. Fazla boyanın serum fizyolojik ile uzaklaştırılması

Biyofilm içindeki bakterilerin konfokal lazer tarama mikroskopunda değerlendirilmesine kadar geçen süre içinde zarar görmesini engellemek için örnekler lamellere yapıştırılarak fikse edilmiştir. Biyofilm yapısını incelediğimiz mine yüzeyi biyofilm yapısına zarar vermeden konfokal lazer tarama mikroskopunun görüntüleme şekline uygun olacak şekilde lamellere yapıştırılmıştır (Şekil 2.13). Daha sonrasında tüm örnekler konfokal lazer tarama mikroskopunda değerlendirilmiştir.



Şekil 2.13. Örneklerin lamele yapıştırılmış hali

2.10. Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu İle Değerlendirme

Örnekler üzerindeki canlı ve cansız bakteri hücrelerini görüntülemek ve analizini yapmak için Bilkent Üniversitesi, UNAM laboratuvarında bulunan KLTM (ZEISS LSM 510 META, ZEISS GmbH, Jena, Germany) kullanılmıştır (Şekil 2.14). Her bir örnek üzerinde 2 farklı bölgeden görüntü alınmış ve analiz edilmiştir. EB ve FDA boyaları için kullanılan maximum eksitasyon 488 nm iken, maximum

emisyona EB için 510 nm, FDA için 635 nm'dir. Yeşil ve kırmızı floresanları görebilmek için eş zamanlı iki kanallı görüntüleme kullanılmıştır. Görüntüler 20X büyütmede alınmıştır. Biyofilm kalınlık değerleri, biyofilm oluşumunun sağlandığı örnek ile biyofilm yapısı içindeki yüksek hücre kültürünün tepe noktası arasındaki mesafenin ölçülmesi ile belirlenmiş μm cinsinden hesaplanmıştır. Biyofilm canlılığı ise mikroskop ile elde edilen görüntüler üzerindeki kırmızı ve yeşil rengin toplam renge oranlanması ile % cinsinden hesaplanmıştır.



Şekil 2.14. Konfokal Lazer Tarama Mikroskobu görüntüsü

2.11.İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programında yapılmıştır. Verilerin frekans ve yüzdesel dağılımları verilmiş, normallik testi sonucunda, gruplar arasında farklılık incelenirken ikili gruplarda normal dağılmayan değişkenlerde Mann Whitney U Testi kullanılmıştır. Araştırma grupları arasında canlı mikroorganizma sayısı ve cansız hücre oranları yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testiyle değerlendirilmiştir.

Gruplar arası farklılık incelenirken; anlamlılık seviyesi olarak 0,05 kullanılmış olup $p < 0,05$ olması durumunda gruplar arası anlamlı farklılığın olduğu, $p > 0,05$ olması durumunda ise gruplar arası anlamlı farklılığın olmadığı belirtilmiştir.

3. BULGULAR

Etkili bir antimikrobiyal ajan olan ozon gazının tek başına ve diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine kullanımının in-situ koşullarda farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı ve kalınlığı üzerine etkilerini değerlendirdiğimiz çalışmamızda,

- Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki hasta grubundan elde edilen biyofilm örnekleri ile biyofilm kalınlık ve canlılık değerleri
- 6. saatte elde edilen biyofilm örneklerine uygulanan ajanların biyofilm canlılık ve kalınlıkları üzerine etkileri
- 24. saatte elde edilen biyofilm örneklerine uygulanan ajanların biyofilm canlılık ve kalınlıkları üzerine etkileri
- 48. saatte elde edilen biyofilm örneklerine uygulanan ajanların biyofilm canlılık ve kalınlıkları üzerine etkileri konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak elde edilen görüntüler ile değerlendirilmiştir.

İn situ koşullarda 5 adet yüksek çürük aktiviteli ve 5 adet çürüksüz 10 katılımcıdan elde edilen biyofilm örneklerinin kalınlık değerleri konfokal lazer tarama mikroskobu kullanılarak μm cinsinden elde edilmiştir.

6, 24 ve 48. saatlerde yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz her iki grupta da biyofilm kalınlık değerleri hiçbir işlemin yapılmadığı sadece fizyolojik salin ile yıkanmış grup baz alınarak ölçülmüş ve istatistiksel analizi yapılmıştır. Sonuçlar çizelge 3.1’ de gösterilmektedir.

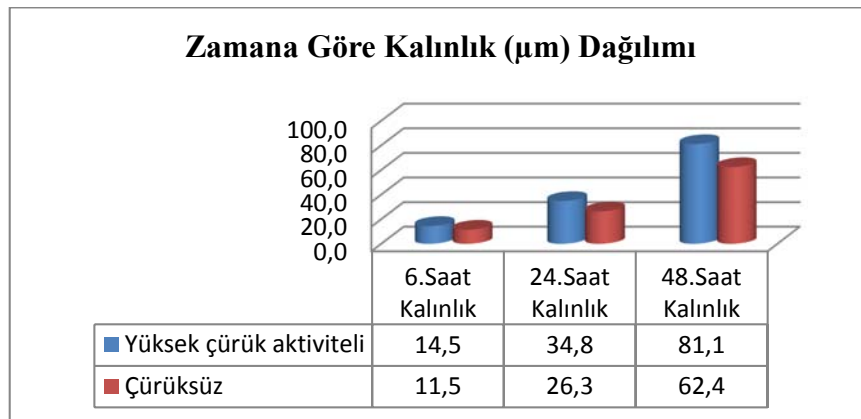
Çizelge 3.1. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm kalınlık değerleri

		Biyofilm Kalınlık (µm)						Mann-Whitney U Testi	
	Çürük Grupları	n	Mean	Median	Min.	Max.	sd	U	p
6.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	14,5	14	13,0	17,3	1,8	2	0,0028
	Çürüksüz	5	11,5	11,7	10,0	13,1	1,3		
24.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	34,8	35,2	32,7	37,2	1,7	0	0,009
	Çürüksüz	5	26,3	26,0	23,4	30,5	2,8		
48.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	81,1	80,1	74,9	89,7	5,8	0	0,009
	Çürüksüz	5	62,4	61,8	59,0	65,0	2,6		

* p<0.05

6, 24 ve 48. saatlerde oluşmuş biyofilm kalınlık değerlerinin istatistiksel analizi sonunda, her bir zaman diliminde gruplar arası fark oluşmuştur. Yüksek çürük aktiviteli grupta çürüksüz gruba göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha yüksek biyofilm kalınlık değerleri elde edilmiştir (p<0.05).

Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda; 6, 24 ve 48 saatlik zaman dilimleri karşılaştırıldığında ise, her iki grupta da zamanla birlikte biyofilm kalınlık değerlerinin arttığı ve bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olduğu saptanmıştır (p<0.05) (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm kalınlık değerlerinin dağılımı

6, 24 ve 48. saatlerde yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda antimikrobiyal ajan uygulaması sonrası biyofilm kalınlık değişimleri değerlendirilmiştir. Kruskal-Wallis H testi kullanılarak yapılan analiz sonrası 6. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri Çizelge 3.2’ de gösterilmektedir.

Çizelge 3.2. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri

			Biyofilm Kalınlık (µm)						Kruskal-Wallis H Testi	
			n	Mean	Median	Min	Max	sd	H	p
6.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	1-Salin	5	14,5	14,0	13,0	17,3	1,8	0,626	0,986
		2-Ozon	5	14,1	14,0	11,9	16,7	1,7		
		3-Fluor	5	14,4	13,3	12,0	17,1	2,3		
		4-Chx	5	14,2	13,8	12,3	16,8	2,3		
		5-Ozon fluor	5	13,9	13,0	11,1	17,0	2,3		
		6-Ozon Chx	5	13,8	13,3	12,0	16,7	1,8		
	Çürüksüz	1-Salin	5	11,5	11,7	10,0	13,1	1,3	10,612	0,059
		2-Ozon	5	9,9	10,0	9,0	10,5	0,6		
		3-Fluor	5	10,3	10,0	9,4	11,8	1,0		
		4-Chx	5	10,2	10,0	9,0	12,0	1,1		
		5-Ozon fluor	5	9,3	9,0	8,7	10,0	0,6		
		6-Ozon Chx	5	9,2	9,1	7,0	11,2	1,5		

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz her iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanlar biyofilm kalınlık değerlerini azaltmıştır. Ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır ($p>0.05$).

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz her iki grupta da en az biyofilm kalınlık değeri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Bunu sırası ile ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, ozonun tek başına uygulandığı grup, Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ancak antimikrobiyal ajanların grup içi karşılaştırmalarında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplardan elde edilmiş biyofilm örnekleri üzerine uygulanan ajanların biyofilm kalınlık değerleri üzerine etkilerinin değerlendirilmesi sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.3' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 24. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri

			Biyofilm Kalınlık (µm)						Kruskal-Wallis H Testi	
			n	Mean	Median	Min.	Max.	sd	H	p
24.Saat	Yüksek Çürük aktiviteli	1-Salin	5	34,8	35,2	32,7	37,2	1,7	2,66	0,751
		2-Ozon	5	33,3	34,0	31,0	36,1	2,2		
		3-Chx	5	33,3	33,4	31,0	36,7	2,4		
		4-Fluor	5	33,6	33,7	31,1	36,2	1,9		
		5-Ozon Chx	5	33,0	33,2	30,9	36,0	2,2		
		6-Ozon Fluor	5	33,0	33,2	30,9	35,7	2,0		
	Çürüksüz	1-Salin	5	26,3	26,0	23,4	30,5	2,8	1,37	0,926
		2-Ozon	5	25,0	25,2	21,6	30,0	3,4		
		3-Chx	5	25,1	25,3	21,6	30,0	3,4		
		4-Fluor	5	25,1	25,4	21,7	29,4	3,2		
		5-Ozon Chx	5	24,6	25,1	21,0	29,2	3,3		
		6-Ozon Fluor	5	24,9	25,2	21,2	30,2	3,6		

24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda antimikrobiyal etkinliği olan ajanlar salin grubu ile karşılaştırıldığında tüm ajanlar biyofilm kalınlık değerlerini azaltmış ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir değişime neden olmamıştır ($p>0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en az biyofilm kalınlık değeri ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Bunu aynı biyofilm kalınlık değeri ile ozon ve Chx grubu takip etmiş, fluor grubu ise biyofilm kalınlık değerlerinde en az azalmaya neden olmuştur. Ancak antimikrobiyal ajanların grup içi karşılaştırmalarında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

24. saatte çürüksüz grupta, en az biyofilm kalınlık değeri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Bunu sırası ile ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, ozonun tek başına uygulandığı grup ve aynı biyofilm kalınlık değeri ile Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ancak antimikrobiyal ajanların grup içi karşılaştırmalarında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

48. saatteki yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplardan elde edilen biyofilm örneklerinin kalınlık değerleri incelenmiştir. Ajan gruplarının biyofilm kalınlıkları üzerine olan etkisini karşılaştırmak için yapılan istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3. 4' te gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 48. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm kalınlık değerleri

			Biyofilm Kalınlık (µm)						Kruskal-Wallis H Testi	
			n	Mean	Median	Min.	Max.	sd	H	p
48.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	1-Salin	5	81,1	80,1	74,9	89,7	5,8	1,52	0,909
		2-Ozon	5	78,4	78,5	71,1	88,0	6,2		
		3-Chx	5	78,6	78,0	71,0	89,1	6,8		
		4-Fluor	5	79,0	79,1	71,8	88,9	6,4		
		5-Ozon Chx	5	77,9	78,7	70,4	88,1	6,8		
		6-Ozon Fluor	5	78,2	78,0	70,5	88,4	6,6		
	Çürüksüz	1-Salin	5	62,4	61,8	59,0	65,0	2,6	0,768	0,768
		2-Ozon	5	59,1	59,1	53,7	64,0	4,6		
		3-Chx	5	59,1	59,7	53,8	63,9	4,4		
		4-Fluor	5	59,2	60,0	53,0	64,1	4,8		
		5-Ozon Chx	5	58,9	59,2	53,1	63,9	4,7		
		6-Ozon Fluor	5	58,9	59,2	53,3	64,0	4,6		

$p>0.05$

Yapılan istatistiksel analiz sonunda, 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerlerinde azalmaya neden olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en az biyofilm kalınlık değerleri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Bunu sırası ile ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, ozonun tek başına uygulandığı grup, Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır ($p>0.05$).

48. saatte çürüksüz grupta, en az biyofilm kalınlık değerleri ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Bunu aynı biyofilm kalınlık değeri ile ozon ve Chx grubu takip etmiş, fluor grubu ise biyofilm kalınlık değerlerinde en az azalmaya neden olmuştur ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerlerindeki bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır ($p>0.05$).

6, 24 ve 48. saatlerde yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz katılımcılardan elde edilen biyofilm örneklerindeki bakteri canlılık değerleri, konfokal tarama mikroskopundaki yeşil ve kırmızı renklerin birbirine oranının % cinsinden hesaplanmasıyla elde edilmiştir. Saatler arasında, yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda biyofilm canlılık farklılıklarına ait istatistiksel sonuçlar Çizelge 3.5’ de gösterilmektedir.

Çizelge 3.5. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm cansız bakteri yüzdesi

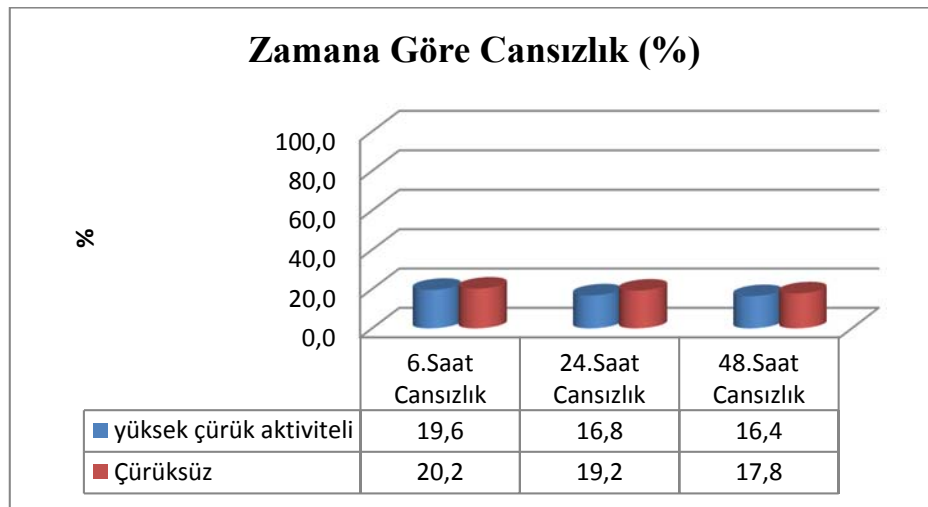
		cansız bakteri (%)						Mann-Whitney U Testi	
	Çürük Grupları	n	Mean	Median	Min.	Max.	sd	U	p
6.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	19,6	21,0	12,0	25,0	4,9	11,5	0,834

	Çürüksüz	5	20,2	20,0	12,0	27,0	5,5		
24.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	16,8	17,0	13,0	21,0	3,3	7	0,247
	Çürüksüz	5	19,2	21,0	11,0	23,0	4,8		
48.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	5	16,4	16,0	11,0	21,0	3,8	9	0,461
	Çürüksüz	5	17,8	18,0	12,0	22,0	4,0		

($p>0.05$)

6, 24 ve 48. saatlerde sadece fizyolojik salin grubundaki değerler baz alınarak yapılan istatistiksel analiz sonucunda 6. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm içindeki cansız bakteri yüzdesinin çürüksüz gruba göre daha az olduğu ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Aynı şekilde 24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm içindeki cansız bakteri yüzdesi 24. saatte çürüksüz gruba göre daha azdır. Ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz grup cansız bakteri yüzdesi açısından karşılaştırıldıklarında yüksek çürük aktiviteli gruptaki cansız bakteri sayısındaki azlık gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır ($p>0.05$).

Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup kendi içinde saat bazında karşılaştırılmıştır. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz grupta 6, 24 ve 48. saatlerdeki cansız bakteri yüzdeleri Şekil 3.2' de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen biyofilm cansızlık değerlerinin dağılımı

Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da,

- 6 ve 24. saatteki biyofilm cansız bakteri yüzdesi karşılaştırıldığında 6. saatteki cansız bakteri yüzdesi 24. saatteki değerlere göre daha fazladır. Bu iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).
- 6. ve 48. saatlerdeki biyofilm cansız bakteri değerleri karşılaştırıldığında, 48. saatte cansız bakteri yüzdesi 6. saate göre daha azdır ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).
- 24. ve 48. saatlerdeki biyofilm canlılığı karşılaştırıldığında 24. saatteki cansız bakteri yüzdesi 48. saattekine oranla daha azdır bu değerler istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz grupta, test edilen ajanların 6, 24 ve 48. saatte oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkilerini karşılaştırmak amacıyla elde ettiğimiz verilerin istatistiksel olarak analizi Kruskal-Wallis H testi kullanılarak yapılmıştır. 6. saatte ajan gruplarına göre cansız bakteri yüzdeleri Çizelge 3. 6. de gösterilmiştir.

Çizelge 3.6. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 6. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdesi

		Ajan grupları	cansız bakteri (%)						Kruskal-Wallis H Testi	
			n	Mean	Median	Min	Max	sd	H	p
6.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	1-Salin	5	19,6	21,0	12,0	25,0	4,9	27,2	0,0001
		2-Ozon	5	93,4	94,0	90,0	96,0	2,4		
		3-Chx	5	77,2	77,0	75,0	79,0	1,5		
		4-Fluor	5	72,0	72,0	70,0	75,0	2,1		
		5-Ozon Chx	5	96,6	97,0	95,0	98,0	1,5		
		6-Ozon Fluor	5	91,6	92,0	89,0	94,0	2,1		
	Çürüksüz	1-Salin	5	20,2	20,0	12,0	27,0	5,5	26	0,0001
		2-Ozon	5	93,0	92,0	92,0	95,0	1,4		
		3-Chx	5	79,2	80,0	75,0	83,0	2,9		
		4-Fluor	5	76,6	77,0	74,0	79,0	2,1		
		5-Ozon Chx	5	95,4	95,0	93,0	97,0	1,7		

		6-Ozon Fluor	5	92,4	93,0	89,0	95,0	2,2		
--	--	--------------	---	------	------	------	------	-----	--	--

$p<0.05$

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların tümü biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır ($p<0.05$).

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da en fazla biyofilm cansız bakteri değerleri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiş, bunu sırası ile ozonun tek başına uygulandığı grup, ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ozonun tek başına uygulandığı grup ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grup ile biyofilmdeki cansız bakteri yüzdesi açısından karşılaştırıldığında gruplar aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruplar biyofilm bakteri cansızlık değerleri açısından karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

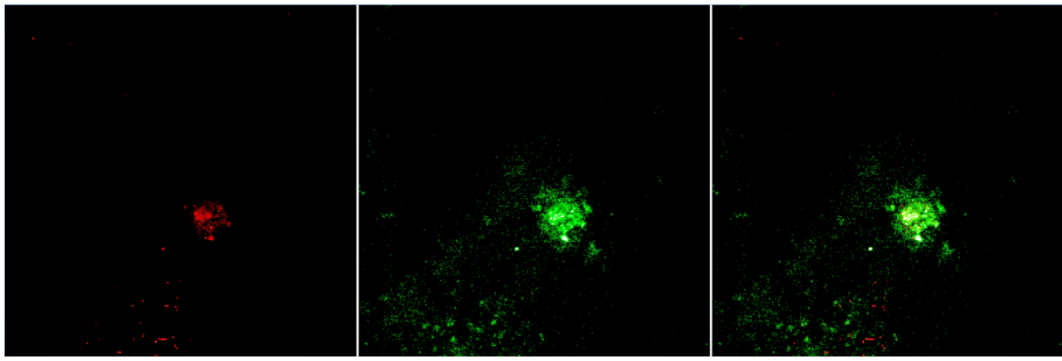
6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta, ozonun tek başına uygulandığı grup Chx ve fluorun tek başına uygulandığı grubuna göre bakteri canlılığını daha fazla düşürmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta, ozonun Chx ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruba göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla düşürmüştür ($p<0.05$).

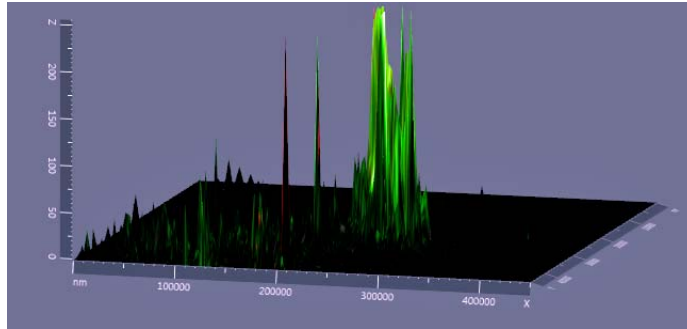
6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruba göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla düşürmüştür ($p<0.05$).

6. saatte elde edilen biyofilm örneklerine antimikrobiyal ajan uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

Kontrol grubuna ait görüntüde canlı bakterilerin (yeşil renk) fazla olduğu cansız bakterilerin (kırmızı renk) ise belirli bölgelerde bulunduğu gözlenmektedir (Şekil 3.3,a,b).

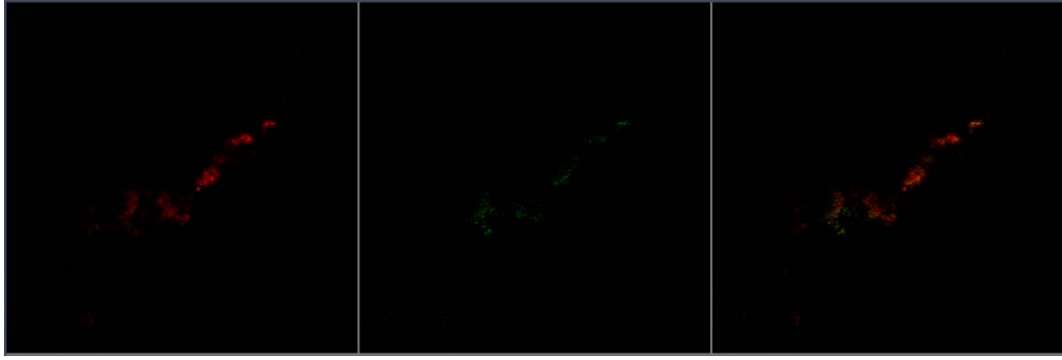


Şekil 3.3,a) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

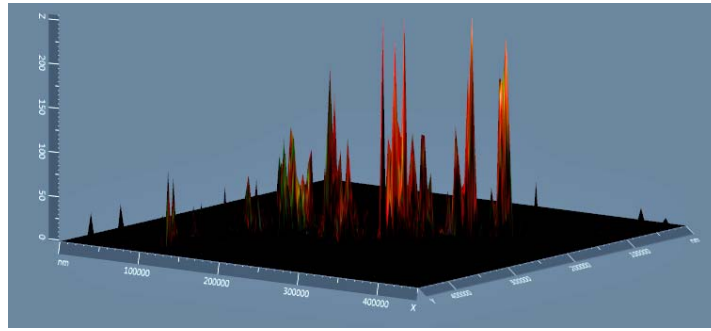


Şekil 3.3,b) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü

Ozon uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsünde, cansız bakterilerin (kırmızı renk) sayısı artmış canlı bakteri (yeşil renk) sayısı ise belirgin şekilde azalmıştır (Şekil 3.4.a,b)

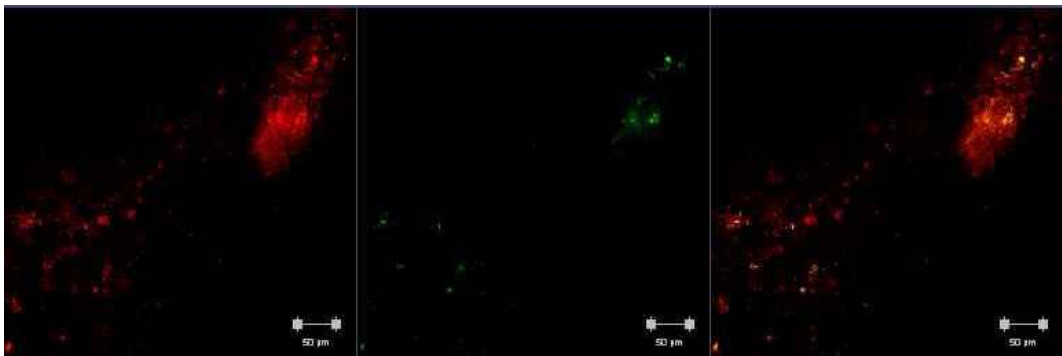


Şekil 3.4.a) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1.görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

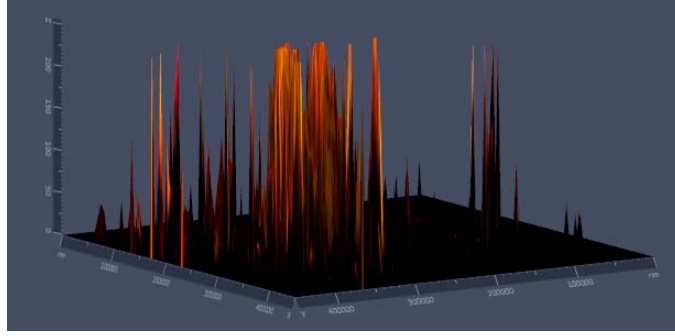


Şekil 3.4.b) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü

Ozon-Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde, canlı bakteri (yeşil) sayısı oldukça azalmıştır. Cansız bakterilerin (kırmızı) yoğunluğu ise belirgin şekilde artmıştır (Şekil 3.5.a.b)

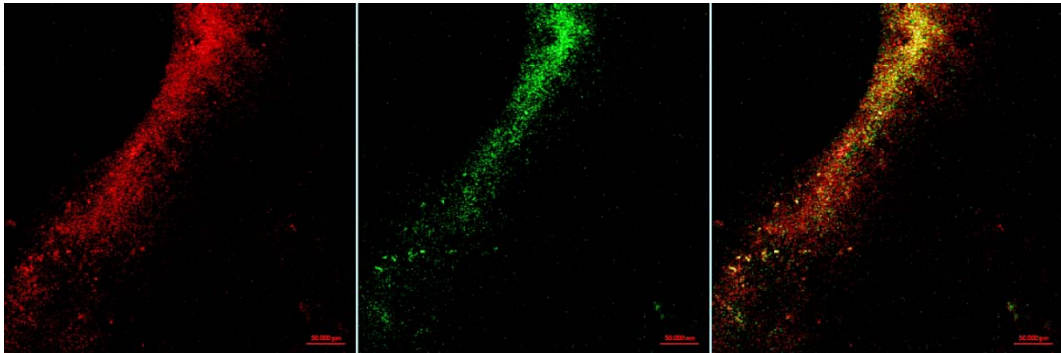


Şekil 3.5.a 6 saatlik biyofilm örneğine ozon-Chx uygulaması sonrası KLTm görüntüsü. 1. görüntüdeki kırmızı alanlar cansız hücreleri, 2. görüntüdeki yeşil alanlar canlı hücreleri 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

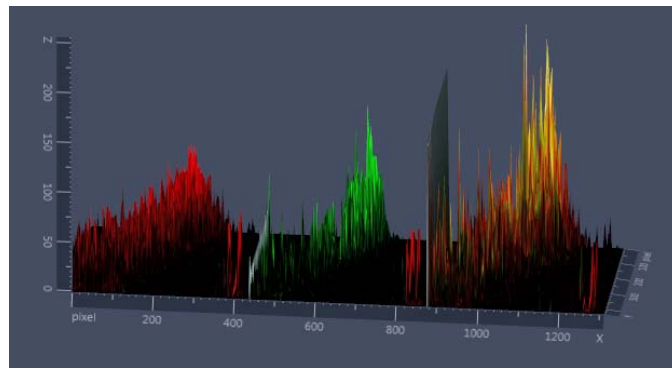


Şekil 3.5.b) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü

Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsünde, canlı bakteri (yeşil) sayısı oldukça azalmıştır. Cansız bakterilerin (kırmızı) yoğunluğu ise belirgin şekilde artmıştır (Şekil 3.6.a,b). Ozon-Chx grubuna ait görüntü ile karşılaştırıldığında cansız bakteriler (kırmızı renk) ozon-Chx uygulanan örneğin görüntüsünde daha fazladır.

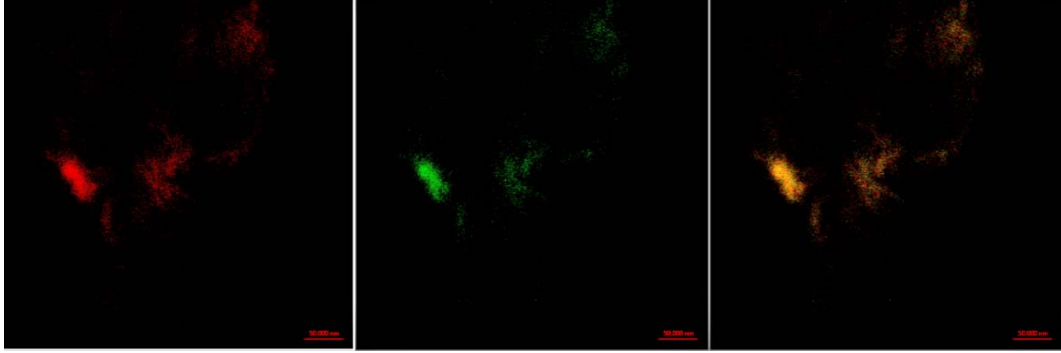


Şekil 3.6. 6 saatlik biyofilm örneği üzerine Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

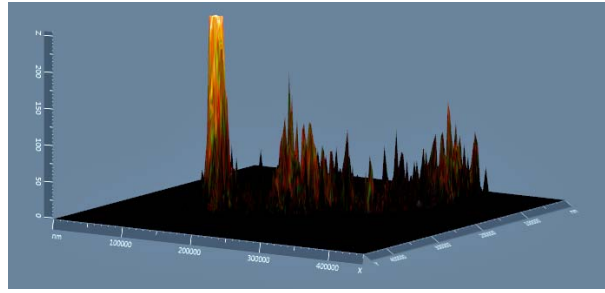


Şekil 3.6.b) 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin 3 boyutlu görüntüsü

6 saatlik biyofilm örneklerine fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde cansız bakterilerin (kırmızı renk) canlı bakterilerden (yeşil renk) fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.7.a,b)

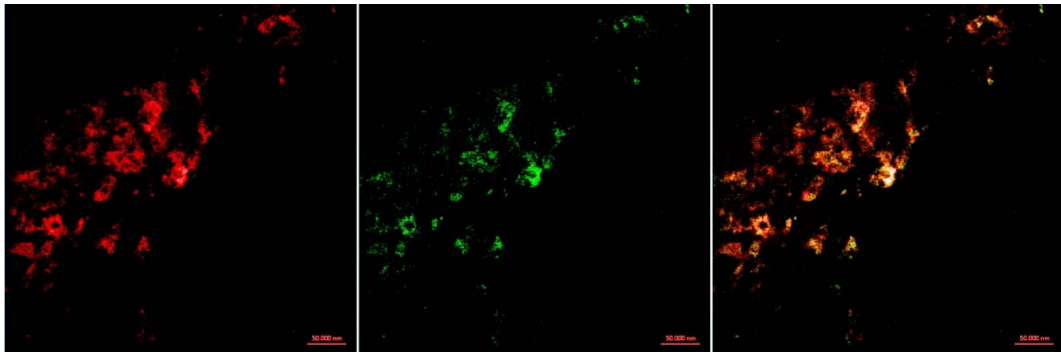


Şekil 3.7.a) 6 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



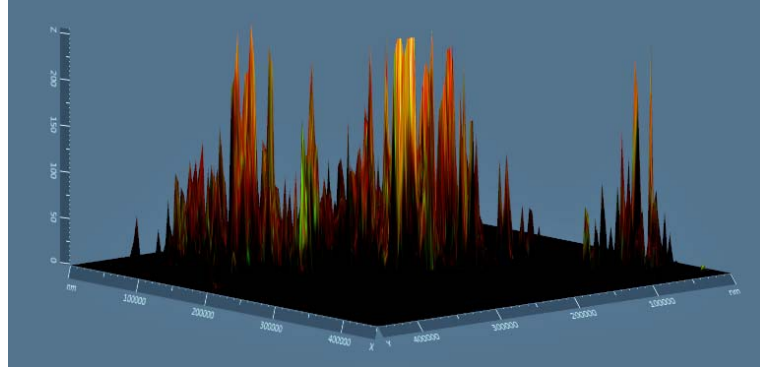
Şekil 3.7.b) 6 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü

6 saatlik biyofilm üzerine ozon ve fluorun kombine uygulandığı örneğin KLTm görüntüsünde cansız bakterilerin (kırmızı renk) canlı bakterilerden (yeşil renk) belirgin şekilde fazla olduğu gözlenmektedir. (Şekil 3.8.a,b).



Şekil 3.8.a) 6 saatlik bioflm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTm

görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



Şekil 3.8.b) 6 saatlik biofilm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü

24. saatteki yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplardan elde edilen biyofilm örneklerindeki cansız bakteri değerleri incelenmiştir. Ajan gruplarının biyofilm canlılıkları üzerine olan etkisini karşılaştırmak için yapılan istatistiksel analiz sonuçları çizelge 3. 7’ de gösterilmiştir.

Çizelge 3.7. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 24. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdeleri

		Ajan grupları	cansız bakteri (%)						Kruskall-Wallis H Testi	
			n	Mean	Medi an	Min	Max	sd	H	p
24.Saat	Yüksek çürük aktiviteli	1-Salin	5	16,8	17,0	13,0	21,0	3,3	25,4	0,0001
		2-Ozon	5	83,4	83,0	79,0	90,0	4,4		
		3-Chx	5	71,8	72,0	69,0	75,0	2,4		
		4-Fluor	5	63,8	64,0	58,0	70,0	4,9		
		5-Ozon Fluor	5	85,6	85,0	84,0	89,0	2,1		
		6-Ozon Chx	5	86,4	86,0	84,0	89,0	2,1		
	Çürüksüz	1-Salin	5	19,2	21,0	11,0	23,0	4,8	26,7	0,0001
		2-Ozon	5	85,2	85,0	83,0	88,0	1,9		
		3-Chx	5	72,8	73,0	71,0	75,0	1,5		
		4-Fluor	5	66,4	66,0	62,0	70,0	3,2		
		5-Ozon Chx	5	88,6	89,0	85,0	91,0	2,3		
		6-Ozon Fluor	5	88,6	89,0	87,0	90,0	1,1		

p<0.05

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonunda, 24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı görülmüştür ($p<0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en fazla biyofilm cansız bakteri yüzdesi ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiş, bunu sırası ile ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, ozonun tek başına uygulandığı grup, Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ozonun tek başına uygulandığı grup ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında gruplar aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

24. saatte çürüksüz grupta, en fazla biyofilm cansız bakteri değeri ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı iki grupta elde edilmiştir. Bunu sırası ile ozon, Chx ve fluor grupları takip etmiştir. Ozonun tek başına uygulandığı grup ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı gruplarla karşılaştırıldığında gruplar aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta, ozonun tek başına uygulandığı grup Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını daha fazla düşürmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta, ozonun Chx ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruba göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla düşürmüştür ($p<0.05$).

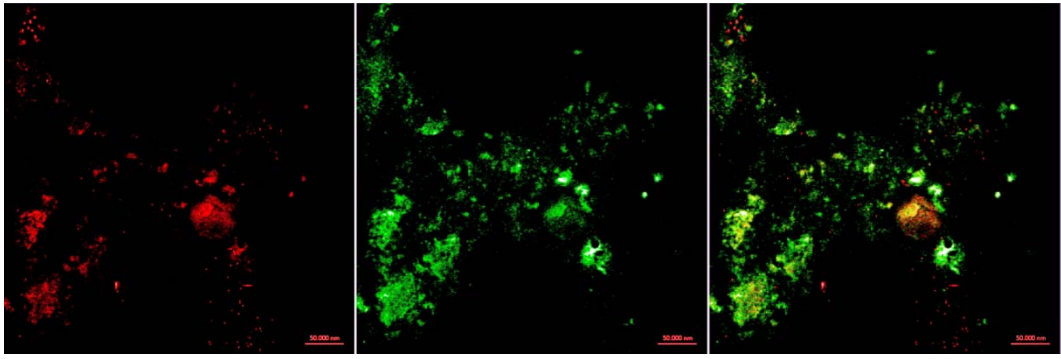
24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha fazla düşürmüştür ($p<0.05$).

24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruplar biyofilm cansız bakteri değerleri açısından

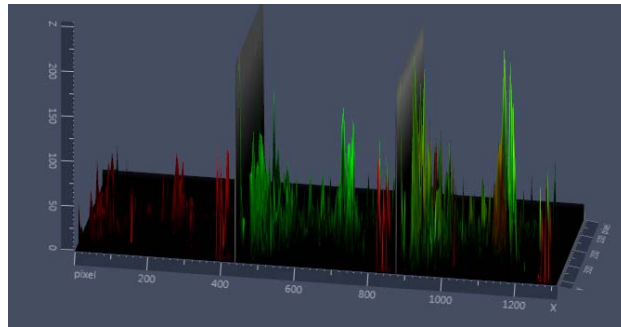
karşılaştırıldığında Chx' in fluora göre canlılık değerlerini daha fazla düşürdüğü ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

24. saatte elde edilen biyofilm örneklerine antimikrobiyal ajan uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

24 saatlik biyofilm örnekleri üzerine salin uygulaması sonrası alınan KLTm görüntüsünde canlı bakterilerin (yeşil renk) fazla olduğu cansız bakterilerin (kırmızı renk) ise az olduğu görülmektedir (Şekil 3.9.a,b).

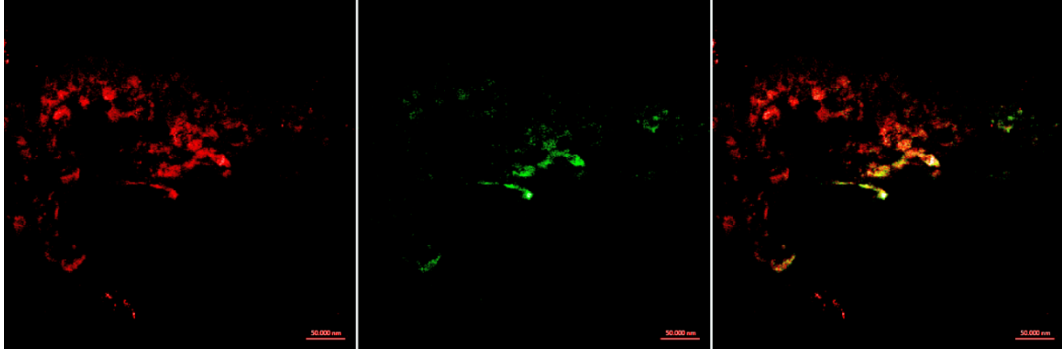


Şekil 3.9.a 24 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulaması sonrası KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

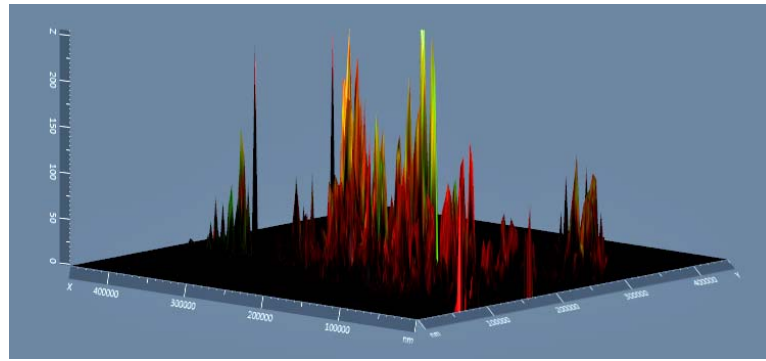


Şekil 3.9.b) 24 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü

24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin KLTm görüntüsünde cansız bakterilerin (kırmızı renk) fazla olduğu görülmektedir. Canlı bakteri (yeşil renk) sayısı ise oldukça azdır (Şekil 3.10.a,b).

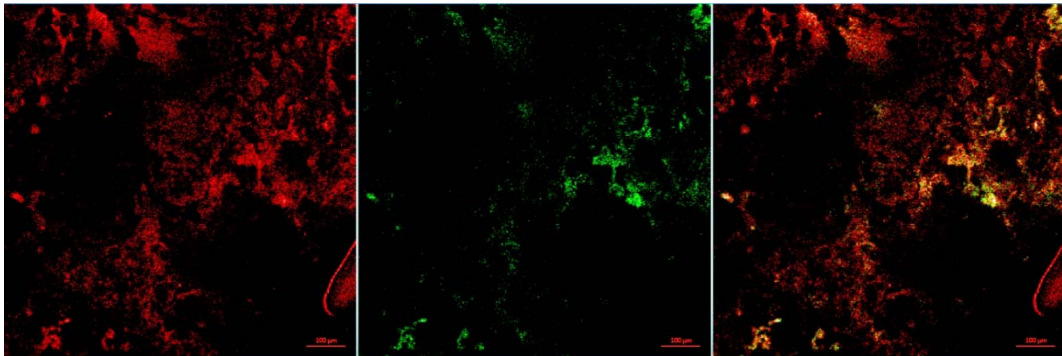


Şekil 3.10.a) 24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

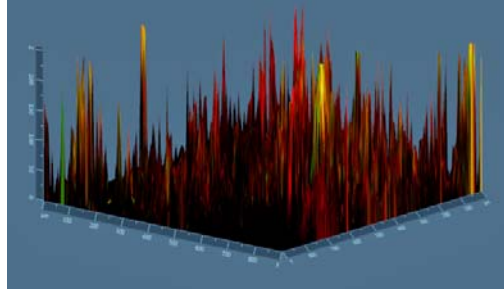


Şekil 3.10.b) 24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü

24 saatlik biyofilm üzerine ozon ve Chx' in kombine uygulanması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde cansız bakteriler (kırmızı renk) oldukça fazladır. Ozonun tek başına uygulandığı grupta da cansız bakteriler (kırmızı renk) fazladır. İki grupta da kırmızı renk yoğunluğu açısından benzer görüntüler elde edilmiştir. (Şekil 3.11.a,b).

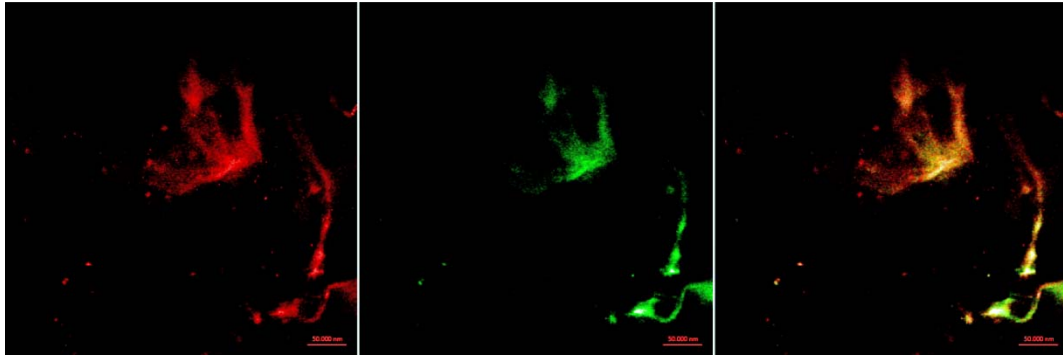


Şekil 3.11.a) 24 saatlik biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

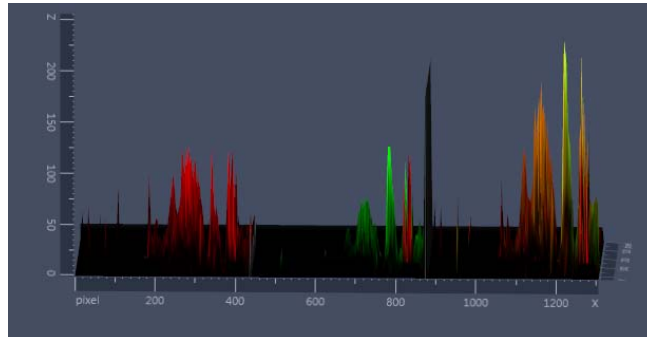


Şekil 3.11.b) 24 saatlik biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü

24 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde, cansız bakterilerin (kırmızı renk) canlı bakterilerden (yeşil renk) daha fazla olduğu, ozon-Chx grubuna ait görüntü ile bu görüntü karşılaştırıldığında ise cansız bakterilerin ozon-Chx grubuna ait görüntüde daha fazla olduğu gözlenmiştir (Şekil 3.12.a,b).

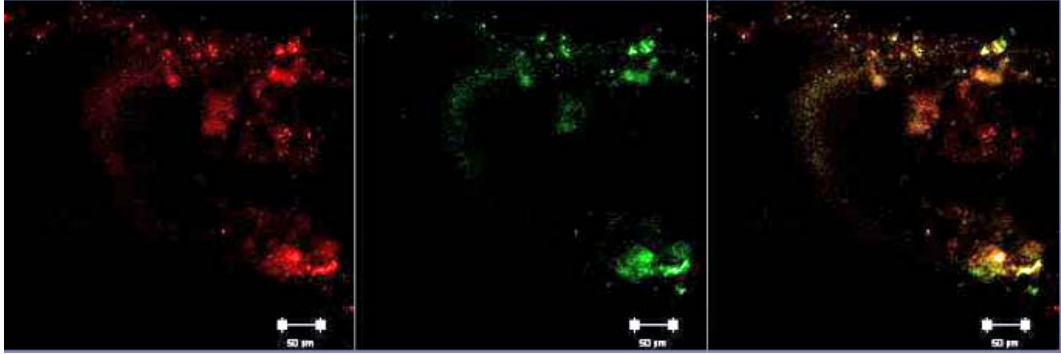


Şekil 3.12.a) 24 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



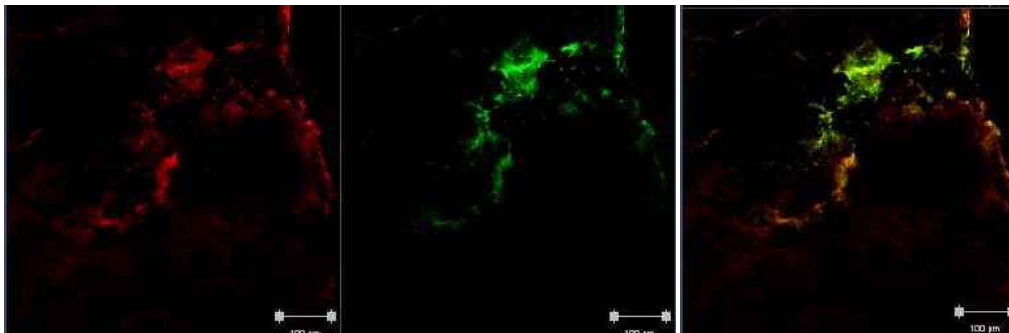
Şekil 3.12.b) 24 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin üç boyutlu görüntüsü

24 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulanmış örneğin KLTM görüntüsünde, cansız bakteri (kırmızı renk) yoğunluğunun canlı bakteri (yeşil renk) yoğunluğundan fazla olduğu ama bu iki farklı renk yoğunluklarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Diğer ajan gruplarına ait görüntü ile karşılaştırıldığında ise fluor uygulanmış örneğin görüntüsünde canlı bakteri(yeşil renk) yoğunluğu daha fazladır (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. 24 saatlik biyofilm örneği üzerine fluor uygulanması sonrası elde edilen KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

24 saatlik biyofilm üzerine ozon-fluor uygulanmış örneğin KLTM görüntüsünde cansız bakterilerin (kırmızı renk) canlı bakterilerden (yeşil renk) fazla olduğu gözlenmektedir. Fluor uygulanmış örneğin görüntüsüyle karşılaştırıldığında kırmızı renk yoğunluğu ozon-fluor uygulanmış örnekte daha fazladır. Aynı örnek ozon uygulanan grup (%87) ile karşılaştırıldığında kırmızı renk yoğunluğunun hemen hemen bir birine yakın olduğu gözlenmektedir. (Şekil 3.14).



Şekil 3.14. 24 saatlik biyofilm üzerine ozon- fluor uygulanmış örneğin KLTM görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

48. saatteki yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplardan elde edilen biyofilm örneklerinin cansızlık değerleri incelenmiştir. Ajan gruplarının biyofilm canlılıkları üzerine olan etkisini karşılaştırmak için yapılan istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.8’ de gösterilmiştir.

Şekil 3.8. Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz gruplarda 48. saatte antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonraki biyofilm cansız bakteri yüzdeleri

		Ajan grupları	cansız bakteri(%)						Kruskall-Wallis H Testi	
			n	Mean	Median	Min	Max	sd	H	p
48.Saat	Yüksek Çürük aktiviteli	1-Salin	5	16,4	16,0	11,0	21,0	3,8	26,9	0,0001
		2-Ozon	5	57,2	57,0	56,0	60,0	1,6		
		3-Chx	5	53,6	54,0	52,0	55,0	1,1		
		4-Fluor	5	52,4	52,0	51,0	54,0	1,1		
		5-Ozon Chx	5	58,2	58,0	55,0	61,0	2,4		
		6-Ozon Fluor	5	57,2	57,0	56,0	60,0	1,6		
	Çürüksüz	1-Salin	5	17,8	18,0	12,0	22,0	4,0	26,4	0,0001
		2-Ozon	5	65,0	64,0	63,0	69,0	2,5		
		3-Chx	5	53,4	53,0	51,0	56,0	2,1		
		4-Fluor	5	52,0	52,0	51,0	54,0	1,2		
		5-Ozon Chx	5	66,4	66,0	62,0	70,0	3,2		
		6-Ozon Fluor	5	66,2	66,0	63,0	70,0	2,6		

p<0.05

Yapılan istatistiksel değerlendirme sonunda, 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanlar biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azaltmıştır (p<0.05).

48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en fazla cansız bakteri değeri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiş, bunu sırası ile aynı cansız bakteri yüzdesi ile ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup ve ozonun tek başına uygulandığı grup takip etmiştir. Bu üç grup birbirleriyle karşılaştırıldığında ise aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (p>0.05).

48. saatte çürüksüz grupta, en fazla cansız bakteri değeri ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiş, bunu sırası ile ozonun fluor ile kombine

uygulandığı grup ve ozonun tek başına uygulandığı grup takip etmiştir. Bu üç grup birbirleriyle karşılaştırıldığında gruplar aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı bulunmuştur ($p>0.05$).

48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx, fluor grubuna göre biyofilm canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla düşürmüştür ($p<0.05$).

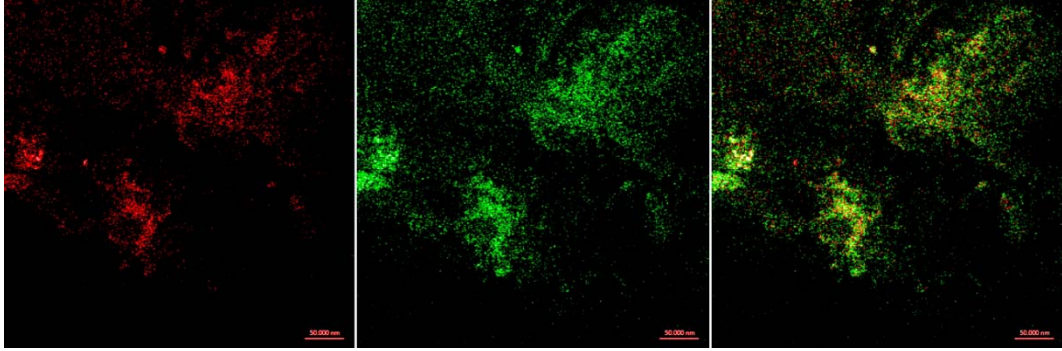
48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da, ozonun tek başına uygulandığı grup Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını daha fazla düşürmüştür. Gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$).

48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun Chx ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruba göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($p<0.05$).

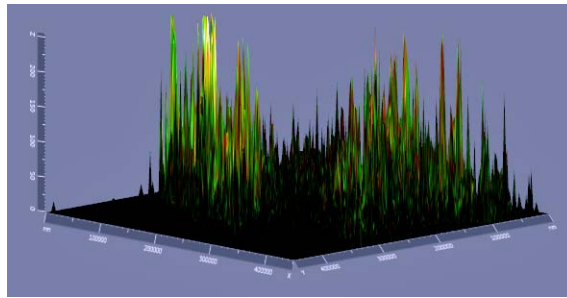
48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun fluor ile kombine uygulandığı grup, Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürmüştür ($p<0.05$).

48. saatte elde edilen biyofilm örneklerine antimikrobiyal ajan uygulaması sonrası elde edilen KLTM görüntüleri aşağıda gösterilmiştir.

48 saatlik biyofilm üzerine salın uygulanmış örneğin KLTM görüntüsünde canlı bakteriler (yeşil renk) oldukça fazladır. Belirli bölgelerdeki kırmızı renk yoğunluğunun varlığı o bölgede cansız hücre yapısının olduğunu göstermektedir (Şekil 3.15.a,b)

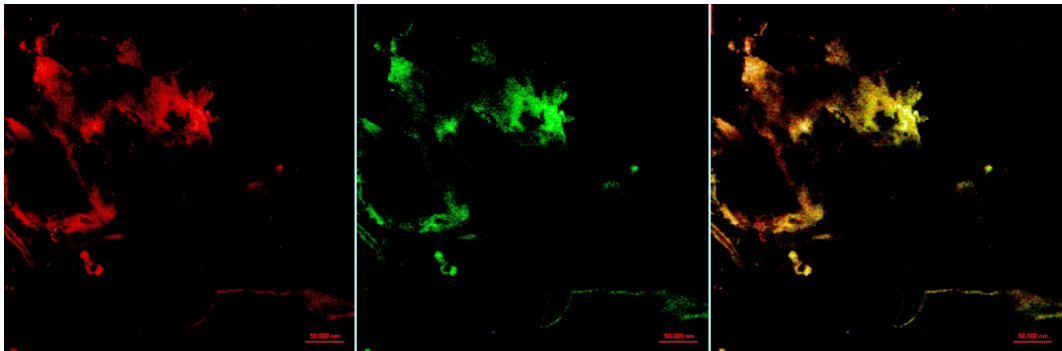


Şekil 3.15.a) 48 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



Şekil 3.15.b) 48 saatlik biyofilm üzerine fizyolojik salin uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü

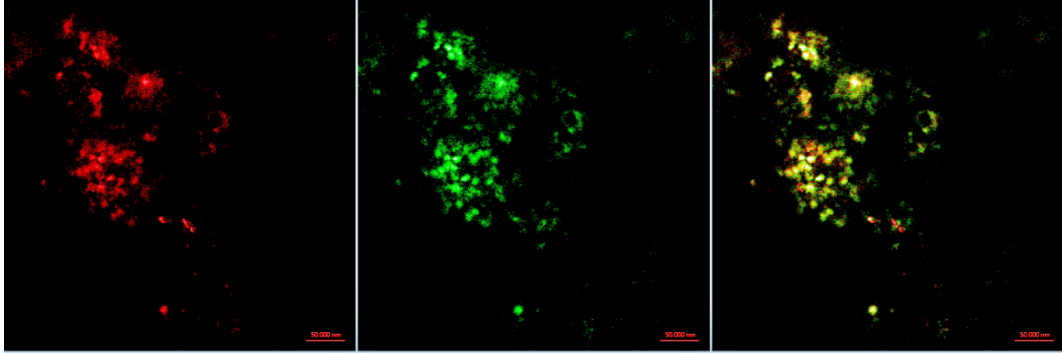
48 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin KLTm görüntüsünde canlı ve cansız bakterileri miktarının birbirine çok yakın olduğu görülmektedir. Görüntüde cansız bakteriler (kırmızı renk) canlı bakterilerden (yeşil renk) fazladır ama bu fazlalık aşırı düzeyde değildir (Şekil 3.16).



Şekil 3.16. 48 saatlik biyofilm üzerine Chx uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

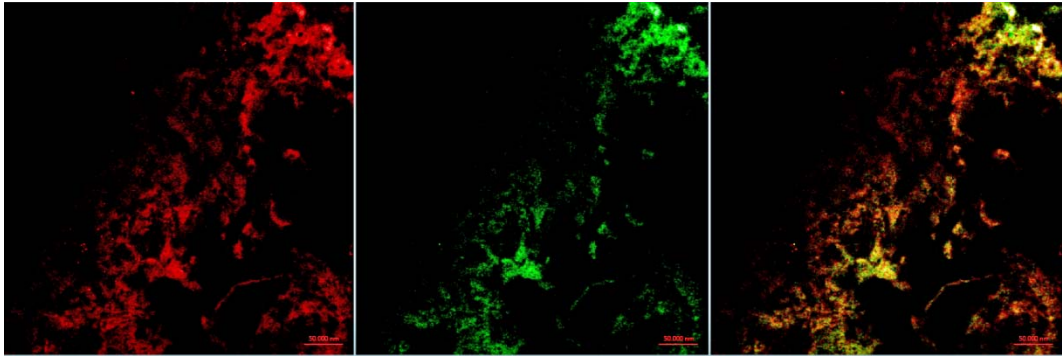
48 saatlik biyofilm örneği üzerine fluor uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde canlı ve cansız bakteri yoğunluklarının bir birlerine çok yakın

olduğu hatta canlı bakterilerin az oranda da olsa kırmızı renklere fazla olduğu gözlenmektedir (Şekil 3.17).

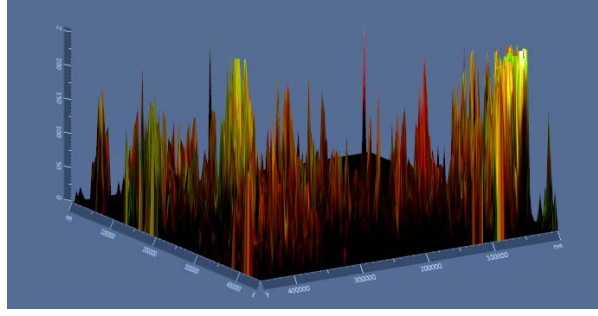


Şekil 3.17. 48 saatlik biyofilm üzerine fluor uygulanmış örneğin KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

48 saatlik biyofilm üzerine ozon-Chx uygulanmış örneğin KLTm görüntüsünde cansız bakterilerin (kırmızı renk) fazla olduğu ancak canlı bakteriler ile karşılaştırıldığında aralarında belirgin bir farkın olmadığı görülmektedir. 6 ve 24 saatlik biyofilm örnekleri ile karşılaştırıldığında cansız bakteri yoğunluğu giderek azalmaktadır (Şekil 3.18.a,b).

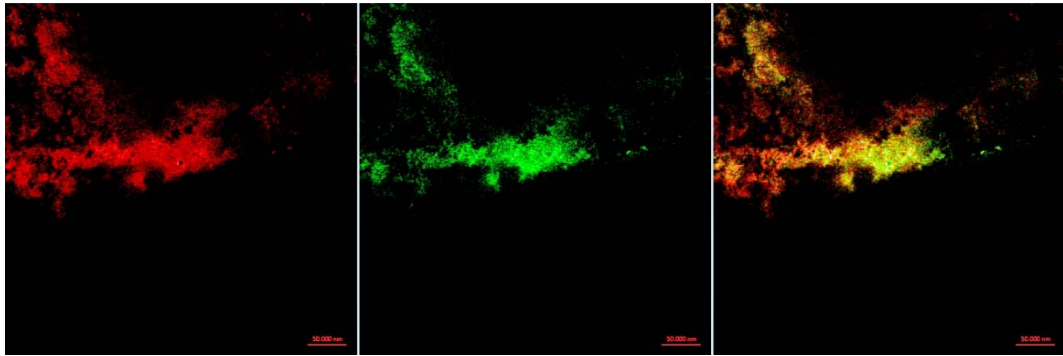


Şekil 3.18.a) 48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon- Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



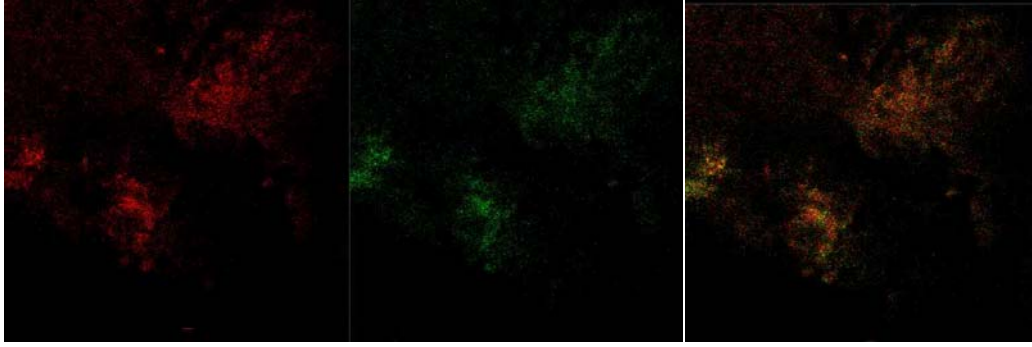
Şekil 3.18.b) 48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon- Chx uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsü

48 saatlik biyofilm üzerine ozon-fluor uygulanmış örneğin KLTm görüntüsünde cansız bakterilerin canlı bakterilerden fazla olduğu ancak hemen hemen birbirlerine benzer oranlarda olduğu görülmektedir. Ozon- fluorun 6 ve 24 saatlik biyofilm üzerine uygulanması sonrası elde edilen görüntülerde cansız bakteri oranı fazlayken biyofilm yaşı arttıkça canlı bakteri yoğunluğu artmaktadır (Şekil 3.19).

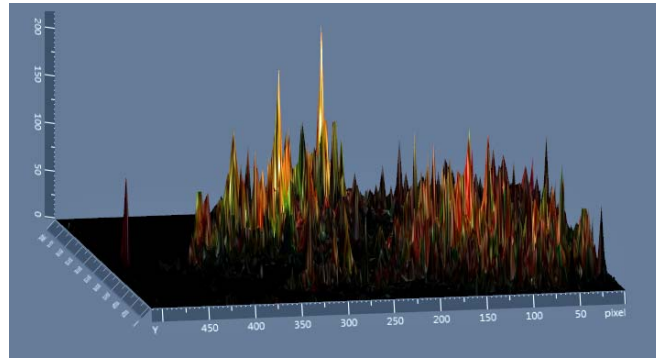


Şekil 3.19. 48 saatlik biyofilm üzerine ozon-fluor uygulaması sonrası KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.

48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsünde cansız bakteri (kırmızı renk) yoğunluğunun canlı bakteri (yeşil renk) yoğunluğundan fazla olduğu ancak aralarındaki farkın fazla olmadığı görülmektedir. 48 saatlik ozon uygulanan grup 6 ve 24 saatlik biyofilm üzerine ozon uygulanan örneklerin görüntüleri ile karşılaştırıldığında 3 grupta cansız bakteri miktarı canlı bakterilerden fazladır ancak biyofilm yaşı arttıkça canlı bakteri miktarı bir önceki örneğe göre daha da artmıştır (Şekil 3. 20.a,b).



Şekil 3.20.a) 48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon uygulaması sonrası elde edilen KLTm görüntüsü. 1. görüntü cansız bakterileri, 2. görüntü canlı bakterileri, 3. görüntü ise canlı ve cansız bakterilerin karışık halini göstermektedir.



Şekil 3.20.b) 48 saatlik biyofilm örneği üzerine ozon uygulaması sonrası elde edilen üç boyutlu görüntü

4. TARTIŞMA

Diş çürüğü, plakta bulunan mikroorganizmaların karbonhidratları fermentasyonu sonucu organik asit oluşumu ile başlayan, diş dokusu ve plak sıvısı arasındaki dengenin bozulmasıyla sonuçlanan, ileri aşamalarında dişin inorganik komponentlerinin demineralizasyonunun ve organik yapının enzimatik olarak bozulmasının eşlik ettiği, çok faktörlü enfeksiyöz, bulaşıcı bir hastalıktır (Fejerskov ve Thylstrup, 1994; Borsatto ve ark., 2001). Çürük oluşumuna neden olan etiyolojik faktörlerin en önemlisi bilindiği gibi karyojenik bakterilerdir (Sajjan ve ark. 2013). Mikrobiyal ağız florası, ağız içerisindeki farklı ekolojik ortamlarda yaşayan çok sayıda mikroorganizmanın belirli bir denge içerisinde bulunduğu dinamik bir ortamı tanımlamaktadır (Decker ve ark., 2003; Marsh, 2012).

Son yıllarda yapılan birçok çalışma, plağın artık biyofilm olarak değerlendirilmesi gerektiğini vurgulamaktadır (Marsh, 2004; Ten Cate, 2006; Rode Sde ve ark., 2012). Bu yeni görüşle birlikte, diş çürüğü, diş minerali ve biyofilm sıvısı arasındaki fizyolojik dengede bozulmayla ortaya çıkan kompleks bir hastalık olarak da tanımlanmaktadır (Fejerskov ve Nyvad, 2003). Ağız içinde çevresel koşullara bağlı olarak diş ve biyofilm arasındaki fizyolojik denge bozulabilir ve bunun sonucu dişte mineral kaybı oluşur. Çürük kavitesinin oluşmasıyla birlikte ise, biyofilm bakterileri bu bölgede oluşan pH değişikliklerine karşı adaptasyon geliştirir. Tükürük, diet alışkanlıkları ve pek çok biyolojik belirleyicinin kompleks etkileşimi biyofilm kompozisyonu ve metabolizmasını etkilemektedir (Fejerskov, 2004). Bu yeni görüşler, lezyonun başlaması ve ilerlemesinin doğasını ve buna göre de diş çürüğünün gerçek anlamda “önlenemeyeceği”, bunun yerine çeşitli müdahalelerle “kontrol edilebileceği” ni açıklamaya yardım eder (Hand ve ark., 1988; Luan ve ark., 2000).

Diş çürükleri, dünyanın birçok ülkesinde en önemli halk sağlığı problemlerinin başında gelmektedir. 2000 yılında yayınlanan “Amerika Birleşik Devletleri Kamu Sağlığı Hizmetleri” raporuna göre en yaygın kronik hastalığın çocukluk çağında

görülen diş çürükleri olduğu belirtilmiştir (US Department Of Health And Human Service, 2000).

Ağız ve diş sağlığının çocuğun büyüme ve gelişim sürecindeki önemi bilinmekte ağız içerisinde oluşabilecek her türlü problem, ciddi ekonomik ve sosyal sorunları da beraberinde getirmektedir. Çürük ya da travmatik yaralanmalar sonucu pulpa harabiyetine bağlı olarak süt dişinin fizyolojik düşme zamanından önce kaybı; çocuğun beslenmesi, konuşması, sürekli dişlenme ve çene gelişimi yönünden büyük risk taşımaktadır. Diş çürüğünün erken dönemde önlenmesi ve daha masraflı tedavi gereksinimlerinin azaltılması ile çocuklara daha sağlıklı bir diş dizisi kazandırılır ve bu sayede ülke ekonomisine katkı sağlanır. Bu nedenle, ağız ve diş sağlığının bozulmasından önce, koruyucu önlemlerin alınması ve tedavi hizmetlerinin konservatif yöntemlere doğru kaydırılması görüşü önem kazanmıştır (Drewnowski ve Popkin, 1997; Petersen, 2003). Günümüzde, çağdaş diş hekimliğinin amacı koruyucu uygulamaları yaygınlaştırarak diş sağlığının bozulmadan önce korunmasını sağlamaktır.

Özellikle Türkiye gibi gelişmekte olan ve koruyucu diş hekimliği uygulamalarının yeterli düzeyde yaygınlaşmadığı ülkelerde, restoratif tedavilerin çeşitliliğine rağmen çocuklarda gelişen çürüklerin önlenememesi, koruyucu diş tedavilerinin önemini daha çok vurgulamaktadır (Ulusoy, 2010).

Ağız sağlığının kazanılması için yapılan birçok çabaya rağmen çürük ve periodontal hastalığın görülme sıklığı oldukça yüksektir. Çalışmalar, periodontal hastalıkların ve çürük oluşumunun ancak biyofilm kontrol programlarıyla engellenebileceğini göstermiştir (Axelsson ve Lindhe, 1987; Twetman 2010). Ekolojiyle ilgili genel kavramlar göz önüne alındığında, plak ve diş dokuları arasındaki normal dengenin sağlanabilmesi değerli bir yaklaşım olarak öne sürülebilir. Ağız hijyeninin motivasyonu, diyetin düzenlenmesi, odontopatojenik bakterilerin eliminasyonu, fissür örtücü kullanılarak ortamın korunması veya değiştirilmesi de bu dengenin korunmasında yararlı yaklaşımlardır (Bowden ve Edwardsson, 1994).

Günlük uygulanan mekanik metodlar biyofilm eliminasyonu amacıyla uygulanan en iyi yöntemdir. Ancak bilindiği gibi dişler ağız içerisinde sadece %25' lik kısmı oluşturmaktadır geri kalan %75' lik kısım ise; çürük ve periodontal hastalıkların oluşumuna neden olan bakteriler için depo görevi görmektedir (Collins ve Dawes, 1987; Mager ve ark., 2003). Bu bölgelerden gelen bakteriler diş yüzeyine tutunarak ya da gingival sulkus içine girerek birçok ağız içi hastalığa neden olmaktadır (Mager ve ark., 2003). Ayrıca; fırçalama tekniklerinin yanlış uygulanması, zaman yetersizliği, motivasyon düşüklüğü ve sistemik hastalıklar gibi sebepler günlük ağız hijyeninin yeterince düzgün şekilde yerine getirilememesine neden olmaktadır. İşte bu durumda; günlük ağız hijyeninin sağlanmasının yanısıra çürük ve periodontal hastalıkların önlenmesi için farklı yöntemlerin de ilave olarak uygulanması gerektiğini vurgulanmaktadır (Depaola ve ark., 1989).

Çürük önlenmesi ve hastalığın kontrol altında tutulması ancak biyofilm yapısının mekanik ya da kimyasal olarak önlenmesiyle mümkündür (Axelsson ve Lindhe, 1978). Aktif ajanlar ağız içerisindeki biyolojik dengeyi bozmadan biyofilm oluşumunu önleyebilirler. Bakteriosidal ve bakteristatik özelliklere sahip antiplak ajanlar öncelikle koruma amaçlı kullanılırlar. Hedef, bireyin sağlığının devamı ve yeniden oluşabilecek hastalıklara karşı korumasını sağlamaktır. Mantık, patojenik mikroorganizmaların supgingival bölgeye yeniden kolonizasyonunu engellemek ya da ertelemektir (Baehni ve Takeuchi, 2003; Marsh, 2010). Biz de tez çalışmamızda, ilk defa çocuk hasta üzerinde, ileride oluşabilecek çürük gelişiminin durdurulması için kullanılan antimikrobiyal ajanların farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm yapısının kalınlık ve canlılığı üzerine etkisini değerlendirmeyi amaçladık.

Üzerinde en çok çalışma yapılan ve antiplak özellikleri en iyi bilinen ajan Chx' dir (Rölla ve Melsen, 1975; Pratten ve ark, 1998; Sajjan ve ark. 2013). Chx kuvvetli bazik özelliktedir. Bakteri hücre duvarı, bakteriyel ekstrasellüler polisakkarit, hidroksiapatit, pelikül, plak, tükürük musini ve ağız mukozası gibi eksi yüklü alanlara karşı afinitesi vardır (Kidd, 1991). Bu sayede bakterilerin bu bölgelere tutunmalarını engellerler (Rölla ve Melsen, 1975; Pratten ve ark., 1998).

Chx' in antibakteriyal aktivitesinde birkaç mekanizma rol oynar. Konsantrasyonla ilişkili olarak ya bakteriler için öldürücüdür (bakterisit), ya da bakterilerin fonksiyonlarını bozarak (bakteriostatik) etki gösterir. Her iki mekanizma da Chx' in çürük önleyici etkisinde rol oynamaktadır. Chx' in öncelikle uygulama anında bakterisit etkiyle plak oluşumunu önlediğine ve mine yüzeyindeki pelikula ve ağız içi dokulara absorpsiyonu sonucu devam eden bakteriostatik etki gösterdiğine inanılmaktadır (Kidd, 1991; Sajjan ve ark., 2013).

Yetişkinlerde yapılan deneysel çalışmalarda, Chx' in olgun plakta asit oluşumunu önlediği gösterilmiştir (Gerardu ve ark., 2003; Featherstone ve ark., 2006). Bu durum ağız içerisinde Chx tutulumu ve yavaş salınımına bağlanmıştır (Gerardu ve ark., 2003). Asit üretiminin az olmasının bir diğer nedeni de asidofilik ve karyojenik mikroorganizmaların kolonizasyonları için daha az elverişli bir ortam yaratmasıdır (Gjermo, 1989). Chx' in olgun plağa penetrasyonu ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Ancak, in-vitro koşullarda Chx iyonlarının olgun plağa 2 mm penetre olabildiği gösterilmiştir (Melsen, 1983). Plağa bağlanan Chx bakteri yüzeylerindeki fosfat gruplarına ve yüzeye bağlı bakteriyal enzimlerin thiol gruplarındaki sulfatlara bağlanmaktadır (Gjermo, 1989).

Çürük oluşumunu engellemek için planlanan çalışmalar, çoğunlukla ağız içerisindeki bakterilerin eliminasyonu amacına odaklanmaktadır (Marsh, 2010; Marsh, 2012; Sajjan ve ark., 2013). Antimikrobiyal ajanların diş üzerine uygulanması da bu stratejilerden biridir (Matthijs ve Adriaens, 2002; Marsh, 2012; Sajjan ve ark., 2013). Bilinen en iyi antimikrobiyal ajan olan Chx plak ve gingivitis oluşumuna karşı en etkili ajan olarak nitelendirilmektedir. Araştırmacılar, mikroorganizmaların uzun süre baskılanmasının klorheksidin gibi ajanların uzun süre diş üzerinde teması ile mümkün olabileceğini düşünmektedirler (Emilson, 1994; Madlena ve ark., 2000; Araujo ve ark., 2002; Sajjan ve ark., 2013). Bu nedenle uzun dönem salınım yapan ve bakteriler üzerine etkili vernikler geliştirilmiştir. Chx verniklerden biri olan Cervitec®plus %88 etanol/ethyl asetat, %10 polimer sistem ve antimikrobial ajan olarak ta %1 Chx ve %1 timol içermektedir. Esas olarak bu vernikler yüksek çürük riski taşıyan bireylerde çürük önleyici ajan olarak kullanılmaktadır. Chx vernik uygulaması ile

plaktaki *S. mutans* sayısı baskılanmakta böylece karyojenik potansiyel düşmektedir. (Schaeken ve ark., 1991; Ie ve Schaeken, 1993; Schaeken ve ark., 1994; Twetman ve ark., 1995; Twetman ve Petersson 1997, Madlena ve ark., 2000; Araujo ve ark., 2002; Gerardu ve ark., 2003). Peterson ve ark. (1991), yaptıkları in-vitro çalışmada, streptokokus mutansların Chx/timol verniğe karşı duyarlı olduklarından bu ajanların periodontal hastalıkların tedavisi ve önlenmesinde oldukça önemli rol oynadıklarını vurgulamışlardır. Ortodontik tedavi gören hastaların tedavisinde Cervitec®plus kullanımı diş eti cebi sıvısındaki inflamatuvar ajanların anlamlı derecede azalmasına neden olmaktadır. (Skold ve ark., 1998, Yucel-Lindberg ve ark., 1999). %1'lik klorheksidin ve %1 timol içeren vernik (Cervitec®plus) kullanımı *S. mutans* sayısını ve buna bağlı olarakta diş çürüğünü 2 yıl süreyle inhibe etmektedir (Zaura-Arite ve Ten Cate, 2000). Chx verniğin mevcut yararlarından dolayı bizde tez çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak Cervitec®plus kullanmayı tercih ettik.

Larsson ve ark. (2001), klorheksidin/timol içeren verniğin, antibakteriyel etkisini, ortodontik tedavi gören hastalardan topladıkları plak üzerinde inceledikleri çalışmalarında; klorheksidin verniğin total canlı bakteri miktarını etkilemediğini ancak 7.günde *S.mutans* oranını anlamlı derecede azalttığını bildirmişlerdir. Çalışma sonunda klorheksidin/timol içeren verniklerin erken supragingival plakta ağız bakterilerinin canlılığını ve metabolik aktivitesini belli oranda azalttığı sonucuna varmışlardır.

Yapılan birçok çalışmada, yeni geliştirilmiş antibakteriyal ajanlar altın standart olarak ta kabul edilen Chx ile karşılaştırılmaktadır (Emilson, 1994; Jones, 1997; Huth ve ark., 2006; Pizzo ve ark., 2008; Kshitish ve Laxman, 2010). Auschill ve ark. (2005), Chx ve amine fluoride/satannous fluoride içeren 2 gargaranın biyofilm üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında 1 dk' lık Chx uygulanmasının biyofilm bakterileri üzerine etkisinin anlamlı derecede fazla olduğunu bildirmişlerdir. Zaura-Arite ve ark. (2001), Chx' in biyofilm bakterileri üzerine olan antimikrobiyal etkisini inceledikleri çalışmalarında, Chx' i 1dk süre boyunca uygulamışlar ve etkili sonuçlar elde etmişlerdir. Foster ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada, 12 saatlik biyofilm üzerine 30 ve 60 saniye süreyle

antimikrobiyal ajan uygulamışlar. Çalışma sonunda, klorheksidinin 60 saniye uygulanmasının hücre zarına büyük harabiyet verdiğini gözlemlemişlerdir. Biz de bu sonuçlardan yola çıkarak, tez çalışmamızda pozitif kontrol grubu olarak kullandığımız Cervitec®plus' ı 1dk uygulamayı tercih ettik.

Çürük oluşumunu engellemek için kullanılan antimikrobiyal ajanlardan bir diğeri de fluordur. Fluor uygulamaları etkin ağız hijyeni ve diet düzenlenmesi ile beraber uygulandığı takdirde yeterli bir koruma sağlamaktadır. Ağız hijyeni ile diş yüzeylerinde biriken çürük yapıcı bakteriler uzaklaştırılırken fluor uygulaması ile de demineralizasyon engellenmiş ve remineralizasyon artırılmış ve bakteri enzimleri inhibe edilerek bakterilerin asit üretimi engellenmiş olur (Featherstone, 1999). Fluor özellikle çocuklarda etkili bir çürük önleyici ajan olarak kabul edilmektedir. Fluor dişin fizikokimyasal yapısını değiştirerek çürük ataklarına karşı daha dayanıklı olmasını sağlamaktadır. Aynı zamanda fluor enolaz, fosfataz ve profosfotaz gibi bakteri enzimlerinin inhibisyonunu da sağlamaktadır (Hamilton, 1990). Bakteri kompozisyonunu değiştirerek plak ekosistemini de değiştirmektedir (Bowden, 1990). Birçok çalışma fluorun bakterilerin karbonhidrat metabolizmalarına da etkili olduğunu göstermektedir (Bowden, 1990). Marsh ve Bradshaw (1990), yaptıkları in-vitro çalışmada fluorun streptokokus mutans büyümesini inhibe ettiğini bildirmişlerdir. Hamilton (1990), ağız içerisindeki yüksek konsantrasyondaki fluorun asit oluşumunu engellediğini ve total bakteri sayısını azalttığını yaptığı çalışma ile kanıtlamıştır. Yoshiara ve ark. (2001), ise uzun dönem fluor kullanımının ağız içerisindeki bakteri sayısını anlamlı derecede azalttığını yaptıkları çalışma ile açıklamışlardır.

Topikal fluor ajanları içerisindeki fluor bileşikleri, konsantrasyonları ve uygulama şeklindeki farklılıklara göre jel formunda, diş macunları içerisine katılarak, gargara şekliyle ve vernik olarak uygulanabilmektedir (Baygın ve ark., 2013). Topikal fluor ile ilgili çalışmalar 1940' lı yıllarda başlamış 1960' lı yıllarda ise, ilk fluor vernik geliştirilmiştir (Duraphat® sodyum fluor vernik) (Seppa, 2004). Fluorların vernik şekliyle kullanılması birçok avantaj sağlamaktadır. Avrupa' da birçok ülkede fluor vernik olarak Duraphat vernik kullanılmaktadır. Florür içeren vernikler, mine yüzeyini örterek fluor salan rezervuar olarak görev yaparlar

böylece uygulamanın hemen ardından oluşan fluor kaybı engellenmiş olur. Fluorun vernik şeklinde kullanılması fluorun diş üzerinde daha uzun süre kalmasına neden olmaktadır (Seppa, 2004). Son yıllarda yapılan birçok çalışmada, Duraphat verniklerin gerek daimi dişlenmede gerekse süt dişlenmede anlamlı derecede çürük gelişimini baskıladığı bildirilmiştir (Frostell ve ark., 1991; Peyron ve ark., 1992, Zimmer ve ark., 1999; Autio-Gold ve ark., 2001).

Diş çürüğünü önlemede başarılı bir ajan olan fluorun antibakteriyel etkisinin sınırlı olduğu yapılan çalışmalarla bildirilmektedir (Emilson, 1994). Fluorun antibakteriyel etkisini inceleyen az sayıda çalışma vardır. Zickert ve Emilson (1982), Duraphat uygulanmış çocuklardan 4, 10, 21 gün sonra aldıkları plak ve tükürük örneklerindeki S.mutans seviyelerinin değişmediğini bildirmişlerdir. Fluorun çürük önleyici etkisinin plak ya da tükürükteki S.mutans seviyeleri ile ilgili olmadığı; fluor verniklerinin daha çok erken çürük lezyonlarının remineralizasyonu üzerinde etkili olduğu sonucuna varmışlardır.

Son yıllarda fluorun çürük önleyici etkisine antimikrobiyal etkilerinin de katkıda bulunduğu görüşünün tartışmalı olduğu bildirilmektedir (Fejerskov, 2004; Sajjan ve ark., 2013). Jel teknikleri kullanarak gerçekleştirilen in-vitro deneysel çürük çalışmalarında, düşük ve optimal düzeyde fluor uygulamasının dişlerde tamamıyla benzer lezyon gelişim dereceleri oluşturduğu gösterilmiştir (Kidd ve ark., 1980; Fejerskov, 2004). Ayrıca fluorapatit içeren köpekbalığı minesinde dahi in-situ modelde çürük lezyonları geliştiği bildirilmiştir (Øgaard ve ark., 1988; Fejerskov, 2004). Bu gibi sebeplerden dolayı fluorun özellikle antimikrobiyal ajanlara dirençli olan biyofilm hücreleri üzerine etkisini değerlendiren çalışmalar planlanması gerektiği vurgulanmaktadır (Ten Cate, 2001; Van Loveren, 2001). Biz de bu nedenle tez çalışmamızda fluorun farklı zamanda oluşmuş biyofilm üzerine etkisini değerlendirmek için Duraphat® vernik kullanmayı tercih ettik.

Biyofilmin dirençli yapısı nedeniyle, patojenik özelliğini ve çürük oluşturma yeteneğini azaltmak için uygun preparat ve preparatların uzun süreli salınım yapmasını sağlayan sistemlere gereksinim vardır. Çürük oluşumu, biyofilm üzerine uygulanan mekanik ve kemoteröpatik girişimler ile durdurulabilir

(Steinberg ve Friedman, 2000). Uzun süreli salınım yapan sistemler, antimikrobiyal ajanın yavaşça salınmasını sağlayarak uzun dönem bakterisit etki göstermektedir (Emilson, 1994). Bizde tez çalışmamızda, antibakteriyel etki gösteren ajanların uzun süreli salınımlarının biyofilm oluşumunu ve canlılığını daha etkin bir şekilde azaltılabileceği görüşünden yola çıkarak deneysel ajan olarak florun vernik formunu kullanmayı tercih ettik.

Antimikrobiyal etkinliği bilinen klasik solüsyonların kimyasal ajan olarak kullanılmasının ötesinde ozon gibi yeni, modern ve etkili ajanların kullanılması da diş hekimliği pratiği içerisine girmiştir (Müller ve ark., 2007). Ozon, atmosferde doğal yollarla oluşan bir moleküldür. Ultraviyole ışınları, oksijen ile temasa geçtiğinde, oksijen atomlarını üçlü gruplar şeklinde geçici olarak birleştirerek, enerji yüklenmiş oksijen formu olan ozonu oluştururlar (Bocci, 2006).

Antibakteriyel etkinliği ile bilinen ozon tedavisi son yıllarda diş hekimliğinde gündeme gelen ve dikkat çeken bir konu olmuştur (Lynch, 2008; Nogales ve ark., 2008; Hauser-Gerspach ve ark., 2009; Lynch, 2009). Araştırmacılar, ozonun antimikrobiyal etkinliğinin; konsantrasyon ve uygulama süresi, ortam sıcaklığı, bakteri türleri ve organizasyonu gibi faktörlerden etkilenebileceğini bildirmişler ve ozon hakkında daha fazla çalışma yapılması gerektiğini belirtmişlerdir (Nagayoshi ve ark., 2004; Nogales ve ark., 2008).

Günümüze kadar Chx ve florun biyofilm üzerinde antibakteriyel ajan olarak kullanımıyla ilgili birçok araştırma yapılmış olmasına karşın antimikrobiyal tedavi stratejilerinden biri olan ozon uygulamaları ile ilgili yapılmış çalışma sayısı çok azdır. Bu çalışmaların hepsi de in-vitro koşullarda ve yetişkin bireyler üzerinde yapılmıştır. Bu nedenle biz de tez çalışmamızda; ilk kez olarak çocuk hasta üzerinde ve in-situ koşullarda ozonun antimikrobiyal ajan olarak kompleks biyofilm üzerine etkilerini konfokal lazer tarama mikroskobu ile değerlendirmeyi amaçladık.

Çalışmamızda, kullanılan ozon tedavisi, Almanya'da üretilen ozon cihazı olan OzonyTronX ile gerçekleştirilmiştir. Cihazın probu dişe temas ettiği anda ortamda

bulunan oksijen molekülü (O_2) atomlarına ayrılmaktadır. Bu atomik oksijen, bakterilerin ölümüne neden olmakta ve geçici olarak ortamdaki oksijen (O_2) ile birleşerek yüksek derecede dezenfeksiyon etkisi yapan ozon (O_3) gazını oluşturmaktadır (Anonymus, 2010b; 2011a; 2011b; 2011d).

Bilindiği gibi ozon gazı solunması sonucunda ağızda ve boğazda kuruluk, baş ağrısı, göğüste daralma hissi ve öksürük, astım krizinin tetiklenmesi ve akciğerlerde hasara neden olması gibi istenmeyen etkilere yol açabilmektedir (Millar ve Hodson, 2007). Bu konu ile ilgili olarak “TÜV SÜD (Teknik denetim kurumu/Technischer Überwachungs-Verein) Industrie Service GmbH” kuruluşu tarafından OzonyTronX cihazının ürettiği ozon gazı miktarı ve konsantrasyonu değerlendirilmiştir. Ozonun diş hekimliğinde kısa sürelerde (20–120 s) uygulanması sonucunda oluşabilecek maksimum ozon konsantrasyonunun (Kademe 5-120 s), insanlar için zararlı ozon konsantrasyonu eşik değerinin (TLV) %37’inde kalması nedeniyle, cihazın güvenli uygulanabilirliğine izin verilmiş ve herhangi bir toksik etki yaratmadığı “TÜV” belgesi ile bildirilmiştir (Anonymus, 2010a; 2010b; 2011c). İn situ koşullarda gerçekleştirdiğimiz çalışmamızda sığır dişinden elde ettiğimiz her bir örneğe üretici firmanın tavsiyesine göre 3. kademe 60 s ozon tedavisi uygulanmıştır (Anonymus, 2010b; 2011a; 2011b; 2011d). Bu uygulama insanlar için zararlı ozon konsantrasyonu eşik değerinin %1’inden daha düşük seviyede kalmaktadır (Anonymus, 2011c; 2011d).

Antimikrobiyal ajanların etkilerini artırmak için farklı ajanlarla kombine kullanılması fikri giderek artmıştır. Araştırmacılar farklı iki antimikrobiyal ajanı kombine kullanarak ajanların sahip oldukları özelliklerini artırmayı hedeflemektedirler. Araştırmacılar, fluorun etkisini artırmak için fluor verniğin farklı antimikrobiyal ajanlar ile kombine kullanımını önermektedirler (Maia ve ark., 2003). Antimikrobiyal ajanların fluor ile kombine kullanımı oluşabilecek çürüklerin engellenmesi için uygulanacak en etkili yol olarak nitelendirilmektedir (Øgaard ve ark., 2006). Baygın ve ark. (2013), ortodontik tedavi gören hastalarda ajanların çürük oluşumunu önleyici etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışmada antimikrobiyal ajan olarak %0.2’ lik Chx/%1 timol vernik, %0.1’lik florid vernik ve %0.2 Chx ve %0.2 sodyum florid kombine kullanılmıştır. Çalışma sonunda

Chx ve fluorun kombine kullanıldığı grupta tükürükteki toplam bakteri sayısının diğer gruplara oranla daha az olduğu bildirilmiştir.

Zaura-Arite ve Ten Cate (2000), Cervitec, Fluor Protector ve 1:1 karışımı (Cervitec ve Fluor Protector) ile plasebo verniğinin plaktaki S.mutans, laktobasil konsantrasyonu ve dentin demineralizasyonu üzerine etkilerini incelemişlerdir. Uygulamadan 3 hafta sonra incelenen plakta S.mutans, laktobasil oranlarının plasebo grubuyla farklılık göstermediğini saptamışlardır. Fluor verniklerinin demineralizasyonu önemli ölçüde durdurduğunu, klorheksidin verniğinin demineralizasyon üzerine etkilerinin sınırlı olduğunu, fluor ve klorheksidinin kombine kullanımının yüksek çürük risk grubundaki kişilerde tercih edilmesinin önemli avantajlar sağlayacağını bildirmişlerdir.

Twetman ve Petersson (1997), %1'lik klorheksidin verniği ile 1:1 oranında karıştırılan klorheksidin ve fluor verniğinin arayüzlerde plak S.mutans düzeyi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Birinci ay sonunda her iki vernik grubunda da plak S.mutans düzeyinde baskılanma saptanırken, üçüncü ay sonunda klorheksidin ve fluorun kombine kullanıldığı grupta antibakteriyel etkinin devam ettiği belirtilmiştir.

Yaptığımız literatür taramasında antimikrobiyal ajan olarak kullanılan Chx ve fluorun kombine kullanıldığı bir çok çalışma mevcutken ozonun diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine kullanıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Bu sebepten yola çıkarak biz de tez çalışmamızda, farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm üzerine etkisini daha da artıracığını düşündüğümüz için ozonu Chx ve fluor ile kombine kullanmayı tercih ettik.

Bugüne kadar biyofilmin mikro yapısının ortaya çıkarılması, bakterilerin fizyolojik özelliklerinin, birbiriyle olan iletişimlerinin anlaşılabilmesi için farklı teknikler kullanılmıştır (Lawrence ve ark., 1991; Assmus ve ark.,1997; Pratten ve ark., 2000; Merot ve ark., 2007). Tarama elektron mikroskobu (SEM), geçirimli elektron mikroskobu (TEM), konfokal lazer tarama mikroskobu, floresan mikroskobu, çeşitli mikro sensörler, optik uyumlu tomografiler

kullanılarak biyofilmin doğası anlaşılmaya çalışılmıştır (Sutton ve ark. 1994; Davey ve O' Toole, 2000; Perilli ve ark., 2000; Keevil, 2003).

Optik kesitlerin birbirini etkilemeksizin kaydedilebilmesi ve bir araya getirilmesiyle meydana getirilen görüntü elde etme teknolojisi olarak bilinen konfokal lazer tarama mikroskobu (KLTM) biyofilmlerin görüntülenmesinde kullanılan en yeni tekniklerden biridir. Birçok teknik değerlendirme esnasında hassas biyofilm yapısını bozarken, konfokal lazer tarama mikroskobu in-situ koşullarda oluşturulmuş canlı biyofilm yapısına zarar vermeden bakterileri inceleme olanağı sunmaktadır. Bu teknik sayesinde örneklerin herhangi bir yere gömülmesine hatta fiks edilmesine bile gerek kalmamaktadır. Mikron düzeyindeki ince kesitlerin konfokal mikroskobunda incelenmesi mümkün olup, elde edilen verileri 3 boyutlu olarak görüntülemekte mikroskobun büyük bir avantajıdır (Wood ve ark., 2000).

Öncelerde kullanılan elektron mikroskopisinde biyofilm preparatı hazırlanması esnasında dehidrasyon veya deformasyon gibi morfolojik değişiklikler ortaya çıkmaktadır ve fiksasyon esnasında %50 ye varan küçülmeler de izlenmektedir (Assmus ve ark.,1997; Pratten ve ark., 2000; Merot ve ark., 2007). Oysa KLTM tekniğinde transmisyon veya tarama elektron mikroskopisinde karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerle karşılaşmaz (Lawrence ve ark., 1991).

KLTM canlı floresan tekniği ile beraber kullanıldığında bozulmamış biyofilm yapısını incelememize, ayrıca farklı biyofilm kesitleri içindeki cansız ve canlı bakterilerin oransal dağılımını güvenilir bir şekilde elde etmemize olanak sağlamaktadır (Netuschil ve ark., 1998; Auschill ve ark., 2001; Zaura-Arite ve ark., 2001; Auschill ve ark., 2002). Canlı floresan tekniği, farklı antibakteriyel ajanların biyofilm üzerine etkilerinin incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (Arweiler ve ark., 2001,2002). Auschill ve ark. (2004), yaptıkları çalışmada ağız içerisinde farklı bölgelerde 48 saat süre sonunda oluşan biyofilm kalınlığının bölgeler arasındaki farkını inceledikleri çalışmalarında canlı floresan tekniği ile kombine olarak KLTM kullanmışlardır. Auschill ve ark. (2005), iki

farklı antibakteriyel ajanın biyofilm üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında canlı ve cansız biyofilm bakterilerini değerlendirmek için floresan tekniği ile KLTM' yi birlikte kullanmışlardır. Aynı şekilde Gu ve ark.' ları da (2012), yaptıkları çalışma da biyofilm bakterilerinin canlılığını floresan tekniği ve KLTM ile incelemişlerdir.

Biyofilm bakterileri çevresel streslere karşı hayatta kalma stratejileri geliştirmektedirler. Bunlardan biri de besin yetersizliğinde bakterilerin canlı fakat kültüre edilemeyen duruma geçmeleridir. Bakteriler bu durumdayken çoğalmazlar, ancak canlıdırlar ve koşullar düzeldiği zaman metabolik aktivitelerini tekrar kazanabilirler. Bu durumdaki bakteriler canlı olmalarına rağmen metabolik aktivitelerinin çok az olması nedeniyle kültür teknikleriyle tespit edilemezken boyama ile KLTM' de tespit edilebilir. Besin yoksunluğu gibi çevresel streslerin biyofilm bakterilerinin antimikrobiyal ajanlara karşı olan direncini artırdığı belirtilmektedir (Twetman, 2004).

Konfokal lazer tarama mikroskobunun sahip olduğu bu özelliklerinden dolayı biz de tez çalışmamızda, ozon, Cervitec®Plus ve Duraphat® cila gibi antibakteriyel etkinliği olan ajanların farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm bakterileri üzerine etkilerini ve farklı zamanlarda biyofilm kalınlık düzeylerini canlı floresan tekniği ile kombine kullandığımız konfokal lazer tarama mikroskobu ile inceledik.

İn situ modeller, fluorun, diğer remineralize edici ajanların, mikrobiyal virülans faktörlerin, kariyojenik gıdaların ve çürük önleyici sakızların etkilerinin incelenmesinde sıklıkla kullanılmaktadır. Farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm kompozisyonunu değerlendirmek için planlanan çalışmalar da genellikle in-situ koşullarda yapılmaktadır (Nyvad ve Kılıan, 1987; Macpherson ve ark., 1991). İn-vitro koşullarda yapılan çalışmaların ağız ortamındaki değişimleri değerlendirme etkisinin olmaması; in-vivo koşullarda yapılan çalışmaların ise deney sürelerinin uzun ve detaylı laboratuvar değerlendirmelerin yapılamaması gibi nedenler klinik ve laboratuvar olanaklarının birlikte kullanıldığı in-situ koşullarda yapılan çalışmaların ön plana çıkmasına neden olmuştur. İn-situ çalışmalar; in-vitro laboratuvar çalışmaları ya da hayvan çalışmalarının aksine deney ortamının

bireylerin doğal ağız ortamı olması gibi avantajlara sahiptir. Ayrıca farklı temel bilim dallarında kullanılan analitik tekniklerin de kullanımına imkan sağlamaktadır. Bu sayede çalışmanın hassasiyeti ve metodun bilimsel doğruluğu da arttırılmış olur. İn situ çalışmaların, az katılımcıya ihtiyaç duyulması, daha kısa deney süresi nedeniyle insanlarda yapılan pek çok çalışmada karşılaşılabilen etik ve motivasyon sorunlarının elimine edilmesine olanak tanınması ve uzun süreli çalışmalarla kıyaslandığında daha ekonomik olması nedenleriyle her geçen gün daha fazla tercih edildiği belirtilmektedir (Faller, 1995; Zero, 1995; Elmas, 2007).

İN-situ koşullarda yapılan çalışmaların mevcut avantajlarının yanında; katılımcı sayısının çoğu zaman 5 ile 40 gibi az sayıda olmasının, sorunun görüldüğü grubu temsil etmede yetersiz kalması, katılımcıların çalışma protokolüne gösterdikleri uyumun sorgulanabilir olması gibi dezavantajları da vardır (Zero, 1995; Silva ve ark., 2004).

Antiplak ajanların plak mikrobiyolojisi üzerine etkilerinin incelendiği in-vitro çalışmalarda, doğal tükürük ortamının ve farklı kompozisyonda plak birikiminin sağlanamaması ve hastaların kendilerine ait diyet alışkanlıklarını deney ortamına yansıtamaması gibi problemler bulunmaktadır. Oysa in-situ biyofilm modelleri ile bu problemler aşılmıştır. Örneklerin direkt tükürük ile temas etmesi ve katılımcıların kendi diyet alışkanlıklarını deney ortamına yansıtabilmesi sayesinde farklı bölgelerden güvenilir plak birikimi sağlanmakta ve antimikrobiyal ajanların var olan plak ile olan etkileşimleri kolaylıkla incelenebilmektedir (Manning ve Edgar, 1992; Ten Cate ve Marsh, 1994). Bu nedenlerden dolayı, farklı zamanlarda biyofilm oluşumunu sağlamak ve mikrobiyal kompozisyonunu daha güvenilir bir şekilde değerlendirebilmek için tez çalışmamızı in-situ koşullarda gerçekleştirmeyi tercih ettik.

Hay (1995), değişkenlerdeki çeşitlilik nedeniyle standartların oluşturulmasının mümkün olmadığı klinik çalışmalar ile deney şartları tamamen araştırmacı tarafından belirlenip kontrol edilebilen laboratuvar çalışmaları arasında bir köprü görevi üstlenen in-situ çürük modellerinin oluşturulmasında; deney parametreleri, çalışma dizaynı, katılımcı grubunun seçimi, uygulanacak klinik protokolün

oluşturulması, kullanılacak olan sert doku tipi ve modelin fiziksel şekli ile mineral içeriğin değerlendirilmesinde kullanılacak metodun seçimi konularına dikkat edilmesi gerektiğini belirtmektedir.

Katılımcıların seçiminin büyük önem taşıdığı in-situ çürük modellerinin kullanıldığı araştırmalarda; sistemik bir rahatsızlığı bulunmayan, ağız içi mikroflorayı etkileyen (antibiyotik vs) ve tükürük akışını azaltan ilaçları (antidepresan, antihistaminik) kullanmayan bireylerin seçilmesi gerektiği ancak bu şekilde bulguların daha güvenilir olabileceği konuyla ilgili yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Featherstone ve Zero, 1992; Cain ve ark., 1994; Amaral ve ark., 2006; Elmas, 2007).

Bu nedenlerle tez çalışmamıza, genel sağlık durumu iyi, yakın dönemde akut bir hastalık geçirmemiş, son 6 ay içinde sistemik ya da lokal etkili ilaç kullanmayan, periodontitis bulgusu ve yumuşak dokuda herhangi bir enfeksiyon bulunmayan 5'i yüksek çürük aktiviteli 5'i çürüksüz yaş ortalaması 12,7 olan toplam 10 gönüllü çocuk hasta dahil edilmiştir. Çalışmada yer alacak katılımcıların araştırma kriterlerini tümüyle temsil edecek yapıda olmasına özen gösterilmiştir (Cain ve ark., 1994; Elmas, 2007). Tez çalışmamızın katılımcılara ait kısmında, yapılması gereken bütün işlemleri düzgün bir şekilde anlayabilmeleri ve en doğru şekliyle yerine getirebilmeleri nedeni ile özellikle büyük yaşdaki çocukların seçilmesine özen gösterilmiştir.

Biyofilm içerisindeki bakterilerin canlılığını değerlendirmek amacıyla planlanan in-situ biyofilm modelleri için kullanılan örnekler çoğunlukla insan dişlerinden, sığır dişlerinden ve fabrikasyon cam kesitlerden ve hidroksiapatit disklerden elde edilmektedirler. Netuschill ve ark. (1998), akrilik plak içine gömülmüş mine ve cam örnekler üzerindeki biyofilm kalınlık değerlerini ölçtükleri çalışmalarında, mine ve cam örnekler üzerinde benzer biyofilm kalınlık değerleri bulduklarını iki yüzey arasında biyofilm tutulumu açısından anlamlı bir farklılığın oluşmadığını bildirmişlerdir.

İn situ çalışmalarda insan dişlerinden elde edilen örneklerin kullanımının bazı dezavantajları vardır. Genellikle yeterli kalitede insan dişi elde edebilmek oldukça zordur. Çekilmiş dişlerin çoğunda geniş çürük lezyonu ya da geniş defektler bulunmaktadır (Mellberg, 1992). Ayrıca insan dişi elde edebilmek için gerekli kaynak ve uygun yaş aralığı bulmakta oldukça güçtür. İnsan dişlerinin küçük ve kurvatürlü yüzeyleri özellikle geniş yüzey ve sabit kalınlık gerektiren spesifik çalışmalarda kullanmak için uygun değildir (Zero, 1995). İnsan dişi dışında birçok farklı tür dişler de in-vitro ve in-situ çalışmalar için kullanılmaktadır. Bunlardan en çok kullanılanları sığır dişleri, domuz dişleri, köpek balığı dişleri ve at dişleridir. Sığır dişleri insan dişlerine alternatif olarak çalışmalarda en çok kullanılan dişlerdir ve son 30 yıl içerisinde kullanımı hızlıca artmıştır. Yüksek kalitede sığır dişi elde etmek oldukça kolaydır ve insan dişleriyle karşılaştırıldıklarında sığır dişleri daha homojen bir yapıya sahiptir. Çürük lezyonu bulunmayışı, defekt ve kırıkların insan dişlerine göre daha az sayıda olması ve geniş yüzeye sahip olması gibi nedenler biyofilm bakterilerini incelemede kullanılan in-situ çalışmalarda sığır dişi kullanımını artırmıştır (Mellberg, 1992). Sığır dişleri ve insan dişleri kimyasal ve yapısal olarak birbirleriyle benzerlik göstermektedirler. Feagin ve ark. (1969), remineralizasyon ve demineralizasyon esnasında mine yüzeyindeki Ca/ F iyon değişimlerinin sığır dişi ve insan dişinde aynı şekilde olduğunu göstermiştir. Davidson ve ark. (1973), minenin kalsiyum içeriğini sığır dişlerinde %37.9 insan dişlerinde %36.8 oranında olduğunu bulmuşlar hatta sığır dişlerinde Ca iyonlarının daha homojen olduklarını bildirmişlerdir. Gwinnett ve ark. (1972), çekilmiş sığır ve insan dişlerinde fluor alınımları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığını yaptıkları çalışma ile bildirmişlerdir. Biz de biyofilm içerisindeki bakterileri incelediğimiz tez çalışmamızda, sığır dişleri ve insan dişlerinin benzer kimyasal ve fiziksel özellik taşımaları, geniş yüzeyi sayesinde 1 diştten fazla sayıda örnek almamıza olanak sağlaması nedeniyle sığır dişinden elde edilmiş örnekleri kullanmayı tercih ettik.

İn-situ araştırmalarda; kullanılan ağız içi apareylerin şekli ve büyüklüğü, sabit ya da hareketli olup olmamaları da önemli etkenler arasındadır (Wefel, 1990). Hem klinik, hem de analitik düzeyde deneyime gereksinim gösteren in-situ çürük

modellerinde örnekler; çıkartılabilir apareylerle, tek kesit halinde ya da direkt dişler üzerine yapıştırılarak kullanılabileceği belirtilmiştir (Zero, 1995).

İn-situ modellerin dizaynında sıklıkla çıkartılabilir apareyler hazırlanmaktadır. Hareketli in-situ modellerde, apareyin ağız boşluğundan çıkartılabilmesi sayesinde, hem apareyin hem de örneklerin sürekli kontrolü yapılabilmekte, ölçümlerin ve gerekli durumlarda çeşitli modifikasyonların yapılması veya örneklerin ağız dışında işleme tabi tutulabilmesi mümkün olabilmektedir (Featherstone ve Zero, 1992; Elmas, 2007). Biyofilm bakterilerinin incelendiği in-situ çalışmalar için hazırlanan hareketli apareylerin kullanıldığı çenenin alt ya da üst olması da önemli bir konudur. Auschill ve ark., (2004) ağız içerisindeki farklı bölgelerde biyofilm birikimini inceledikleri çalışmalarında, biyofilm kalınlığını ölçmek için hazırlanacak apareyin üst çene için hazırlanmasının uygun olduğunu bildirmişlerdir. Üst çene için hazırlanmış apareylere yerleştirilen örneklerde biyofilm oluşumu çok daha hızlı olmaktadır (Auschill ve ark., 2001). Aynı zamanda çift taraflı apareyler sert doku örneklerinin aproksimal, lingual ve vestibüler bölgelerde kullanılabilesine imkan vermektedir (Stookey ve ark., 1985; Clark ve ark., 1986; Dijkman ve ark., 1986; Reintsema ve Arends, 1988). Biz de tez çalışmamızda, yeterli kalitede ve kısa sürede güvenilir biyofilm yapısını oluşturmak için üst çene için hazırladığımız hareketli plakları hastalarımıza uygulamayı tercih ettik.

Plak birikimini sağlamak için şimdiye kadar farklı tipte bireysel apareyler tasarlanmıştır (Nyvad ve Kilian, 1987; Robinson ve ark., 1997; Wood ve ark., 2000; Zaura-Arite ve Ten Cate, 2000). İn situ koşullarda biyofilm elde edilmesi için tasarlanan ve şu an kullanılan apareyler geçmişte yapılan çalışmalardan elde edilen tecrübeler doğrultusunda dizayn edilmiştir (Netuschil ve ark., 1998; Auschill ve ark., 2001, Auschill ve ark., 2002,). Örneklerin aparey üzerinde bulunduğu bölgenin lokalizasyonu da in-situ model ile elde edilen sonuçları etkileyen bir diğer faktördür. Sert doku örnekleri aparey üzerinde aproksimal, lingual, vestibüler ve palatal bölgelere yerleştirilmektedir (Stookey ve ark., 1985; Clark ve ark., 1986; Dijkman ve ark., 1986; Reintsema ve Arends, 1988) Örnekler, aparey üzerinde vestibül bölgeye yerleştirildiğinde biyofilm

oluşumunun uzun zaman sonunda dahi çok seyrek ve ince olduğu görülmektedir (Netuschil ve ark., 1998). Biyofilm büyümesinde ve biyofilmin sert dokular üzerine tutulumunda tükürükteki asit glikoproteinleri ve diş eti cebi sıvısı büyük öneme sahiptir (Bradshaw ve ark., 1997; Bos ve ark., 1999). Tükürükte bulunan besinler ve çevredeki komşu mikroorganizma topluluklarının metabolik ürünleri de biyofilm gelişimi üzerine etkiye sahiptir (Gilbert ve ark., 1997). Aparey üzerinde palatal bölgeye yerleştirilen örnekler ağız içi besinlerin bu bölgeye ulaşamaması ve dişlerden uzak bir bölgede olduğu için dişeti cebi sıvısından ve çevre mikrobiyal topluluklarda uzak kalması nedeniyle çoğu zaman yetersiz ve kalitesiz biyofilm oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenlerden dolayı örneklerin palatal bölgeye yerleştirilmesi çalışmalarda tercih edilmemektedir (Auschill ve ark., 2004).

Aparey şeklinde yapılan birkaç değişim ile daha güvenilir, daha kolay ve daha iyi koşullarda plak gelişimi sağlanmış, bu sayede de aynı anda standart biyofilm elde etmek mümkün hale gelmiştir. Apareyde güvenilir biyofilm oluşumunu sağlamak için yanağa doğru bukkal bir çıkıntı hazırlanmıştır (Auschill ve ark., 2004; Auschill ve ark., 2005; Gu ve ark., 2011). Planlanan apareylerde, hazırlanan örnekler, dişlerin bukkal yüzeylerine bakacak şekilde ve dişlerle arasında 2mm' lik mesafe olacak şekilde yapışkan mum ile apareye gömülmüştür. Örneklerin bu şekilde yerleştirilmesinin amacı, biyofilm oluşumu esnasında dil, yanak ve dudağın etkilerinden korumaktır. Dişler arasındaki 2 mm' lik mesafe sayesinde ise, biyofilm bakterilerinin çoğalması için gerekli olan besleyici sıvı ortam sağlanmıştır. Örneklerin bukkal uzantıya yerleştirilmesi oluşacak biyofilmin interproksimal plak yapısını taklit etmesine de olanak sağlamakta ve çiğneme basıncının olumsuz etkilerinden biyofilm yapısını korumaktadır (Auschill ve ark., 2004). Yapmış olduğumuz tez çalışmamızda, biyofilm oluşumu esnasında oluşabilecek problemleri minimuma indirmek, kaliteli ve zarar görmemiş biyofilm yapısı oluşturabilmek için hazırladığımız örnekleri apareylerde bulunan bukkal uzantı içine yerleştirmeyi tercih ettik.

İn-situ çalışmalarda; kullanılan ağız içi modellere yerleştirilen mine örneklerinin çalışma öncesi tabi tutuldukları sterilizasyon işlemi önemli bir deney aşamasını

oluşturmaktadır. Günümüze kadar otoklavlar, kuru hava sterilizasyonu, klorun kullanıldığı kimyasal sterilizasyon, X-ışını, gama-ışını gibi iyonize radyasyonun kullanıldığı radyasyon sterilizasyonu, 10,8 °C'nin üzerindeki ısılarda gaz halinde bulunan etilen oksitin kullanıldığı gaz sterilizasyonu ve formaldehit ve alkol buharının kullanıldığı kimyasal buhar sterilizasyon yöntemleri kullanılmıştır (Elmas, 2007). Takeuchi ve ark. (2007), 2 farklı antimikrobiyal ajanın biyofilm oluşumu üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında biyofilm oluşumunu sağlamak için kullandıkları örneklerin sterilizasyonunu otoklav kullanarak yapmışlardır. Müller ve ark. (2007), ozonun biyofilm üzerine etkisini araştırdıkları çalışmalarında sığır dişinden elde etikleri örnekleri otoklavda steril etmişlerdir. Biz de tez çalışmamızda sığır dişlerinden elde ettiğimiz örnekleri otoklavda steril ettik.

İn-situ koşullarda yapılan çalışmalarda deney süresi; kullanılan analitik metodların hassasiyetine, araştırılan konuya ve kullanılan modele bağlı olarak 45 dakika ile 6 ay kadar sürebilmektedir (Zero, 1995).

Biyofilm yapısı farklı zamanlarda farklı yapısal, fiziksel ve genetik özellikler sergilemektedir. Bakterinin bir yüzeye tutunmasıyla başlayan biyofilm oluşumu dinamik bir olaydır (Hall-Stoodley ve Stoodly, 2002; Hall-Stoodley ve ark., 2004) Diş yüzeyi temizlendikten 8 saat sonrasında dişlerin yakınındaki yanak ve dil mukozasından veya tükürükten kaynaklanan bakteriyel birikintiler plak oluşumunun ilk safhasını oluşturmaktadır. Bu safhadaki plak, tükürükten çökelen müsin, epitel hücreleri, lenfositler, lökositler ve yiyecek artıklarını içerir ve oluşan plak genç plak olarak adlandırılır (Bayırlı ve Şirin, 1982; Newbrun, 1989). Ortaya çıkan ilk mikrobiyal bağlantı zayıf ve geri dönüşebilen karakterdedir. Başlangıç bağlantısını takiben organizmalar sessiz bir faza girerler. Sessiz faz sürecinde organizmalar genetik yapılarını değiştirebilirler. Genetik materyaldeki bu değişikliğin bağlanmadan hemen sonra şekillendiği bilinmektedir. Biyofilmler ekstrakromozomal DNA değişimleri için ideal ortamlar oluştururlar. Hücreler arasında DNA transferi gerçekleşir. Böylece genetik yapısı değişen hücreler çevreden gelebilecek olumsuz etkilere karşı daha direnç kazanmış olur (Post ve ark., 2004).

8–48 saat arasında geçen dönem hızlı mikroorganizma üreme safhası olarak bilinmektedir. Bu safhada mikroorganizmalar plaktaki diğer hücreleri ve besin maddelerini kullanarak çoğalır. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) başta olmak üzere bir grup mikroorganizma ortamdaki karbonhidratlardan EPS sentezi yapar. Glukanlar halindeki bu EPSler plağın dişe daha sıkı yapışmasını sağlar. Bu safha olgun plak adını da alır (Bayırlı ve Şirin, 1982; Newbrun, 1989). Bu evrede oluşmuş biyofilm yapısı çevreden gelebilecek olumsuz etkilere karşı daha dirençli hale gelir (Post ve ark., 2004). 48 saatin sonunda oluşan biyofilm yapısında mikroorganizmaların sayısında belirgin bir değişiklik gözlenmezken, çeşitliliğinde artış göze çarpar. Başlangıçta hakim olan aerob streptokoklar plak kalınlaştıkça yerini anaerob ve filamentöz mikroorganizmalara bırakır. Ancak üst tabakada halen aerob mikroorganizmalar mevcuttur (Bayırlı ve Şirin, 1982; Newbrun, 1989). Biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında mikroorganizmaların sergiledikleri fenotipik özellikler birbirinden oldukça farklı olabilir. Biyofilm oluşumundaki bu değişkenlik, antimikrobiyal ajanların biyofilm bakterileri üzerine etkilerinin değerlendirildiği çalışmalarda önemli bir konudur. Biyofilm çalışmalarında, biyofilm oluşum süresi çok farklılık göstermektedir. 24 saatten 6 haftaya kadar değişen sürelerde biyofilmler oluşturulmuş ve antimikrobiyal ajanların etkinlikleri değerlendirilmiştir (Arias-Moliz ve ark., 2009; Bryce ve ark., 2009; Shen ve ark., 2009; Williamson ve ark., 2009).

Yaptığımız literatür taramasında, yapılan çalışmalarda biyofilm oluşum süresine ilişkin bir standardizasyon belirlenememiştir. Biz de tez çalışmamızda, biyofilm içindeki bakterilerin özelliklerinin değişim zamanlarının 6, 24 ve 48. saatlere denk gelmesi, ayrıca in-situ çalışmalarda kullanılan apareylerdeki doku örneklerinin değerlendirilmesi amacıyla katılımcılardan alınıp değerlendirildiği sürenin mümkün olduğunca kısa tutulması, deney süresinin uzamaması ve katılımcıların klinik protokolden uzaklaşmaması için (Dijkman ve ark., 1990; Ogaard, 1990) antimikrobiyal ajanların etkinliklerini 6, 24 ve 48. saatte oluşmuş biyofilm yapısı üzerinde incelemeyi tercih ettik.

Dişlerin yüzey özelliklerinin farklı olması nedeniyle her katılımcı için 1 diştten toplam 18 adet örnek elde edilmiştir. Katılımcıların plakları taşıma süresi sonunda

plaklardan çıkarılan aynı diştten elde edilen örneklere rastgele olacak şekilde tedavi prosedürü uygulanmıştır. Bu sayede farklı dişlerde oluşabilecek yüzey özellik farklılıkları engellenmiştir. Çalışmamızda her katılımcı için aynı diştten elde edilen örneklerin kullanılması ve örneklerin farklı süreler boyunca aynı katılımcı tarafından taşınmasının, gruplar arası karşılaştırmaların değerlendirilmesinde daha güvenilir sonuçlar elde etmemize olanak tanıdığı düşüncesindeyiz.

İn situ koşullarda antimikrobiyal ajanların farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda, antimikrobiyal ajanlar, örnekler üzerine ağız içi ve ağız dışı olmak üzere 2 şekilde uygulanmaktadır. Biyofilm oluşumunun sağlandığı örneklere uygulanacak tedavi prosedürlerinin ağız dışında uygulanmasının 2 avantajı vardır. Birincisi ağız dışı yıkama sayesinde kişiye özgü tükürük özellikleri, tükürük akışkanlığı ve kişinin tükürük florasındaki farklılıklar gibi kişiden kişiye değişkenlik gösteren özellikler ortadan kaldırılmış böylece bu farklılıklardan dolayı oluşabilecek değişken sonuçlar devre dışı bırakılmış olur. İkinci sebebi ise, özellikle farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm yapısının incelendiği çalışmalarda, peş peşe uygulanan deney gruplarının aynı koşul ve benzer deneysel periyotlar çerçevesinde incelenmesine olanak sağlanmaktadır. Deney periyodunun peş peşe olduğu durumda, (6, 24, 48 saat biyofilm oluşumu) antimikrobiyal ajanın ilk örnekler için ağız içi uygulanması diğer gruba ait örneklerin de etkilenmesine ve yanlış sonuçların ortaya çıkmasına neden olacaktır (Zaura-Arite ve ark., 2001). Etkili bir antimikrobiyal ajan olan Chx' in uygulandığı zaman boyunca ağız içerisinde tutulumunun olduğu ancak aktif olduğu form boyunca ağız içi yumuşak dokulardan yayılımının olduğuna dair kanıtların olmadığı bildirilmiştir (Jenkins ve ark., 1988). Ancak Auschill ve ark. (2005), iki farklı antimikrobiyal ajanın biyofilm üzerine etkisinin incelediği çalışmalarında, Chx' in etkisinin uzun süre devam edeceği düşüncesiyle diğer antimikrobiyal ajanın kullanımından önce hastada 2 hafta ajan uygulamadan bekleme süresi uygulamışlardır.

İn situ koşullarda yapılan çalışmalarda, antimikrobiyal ajanın ağız içi ya da ağız dışı uygulanmasının çalışma sonuçları açısından herhangi bir fark oluşturmadığı

yapılan çalışmalarla vurgulanmıştır (Jenkins ve ark., 1988). Biz de tez çalışmamızda bir birini takip eden deney periyotlarının bir diğerinin sonuçlarını etkilememesi için örnekler üzerine uygulanan Chx, fluor ve ozon gibi antimikrobiyal ajanları ağız dışında uygulamayı tercih ettik.

Spesifik floresan problemlerinin kullanılması spesifik matriks komponentlerinin ve bakterilerin tanınmasına olanak sağlamaktadır (Costerton ve ark., 1995). Korber ve ark. (1993), bakterileri görüntülemek için acridine orange boyası kullanmışlardır. Wood ve ark (2000), plak matrikslerini floresan boyasıyla boyamıştır. İki çeşit fluoressan boyasıyla bakterilerin boyanma işlemi de canlı ve cansız bakterilerin ayrı renklerde boyanmasına olanak sağlamaktadır (Arweiler ve ark., 2004). Fluorescein diacetate (FDA) ve Ethidium bromide (EB) canlı ve cansız bakterilerin incelendiği çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. FDA intra selüler enzim aktivitelerini incelemek için kullanılmaktadır. FDA ışısız hücre geçirgen boyasıdır ve intrasellüler esteraz tarafından yeşil ışığa dönüştürülür. Uygulandığında hücre membranına penetre olarak enzimatik aktiviteyle sitoplazmaya bağlanır ve ışığa meydana getirir. Bağlandığı hücreden ayrılmaz (Rotman ve Papermaster, 1966) ve sadece canlı hücreleri boyama özelliğine sahiptir. EB cansız bakterilerin RNA ve DNA'larına bağlanma özelliği olan bir boyadır. Bağlanması ile birlikte fluoressan özelliği daha da artmakta ve cansız bakterileri kırmızı renge boyamaktadır (Arweiler ve ark., 2004).

Bu iki boyanın kombine kullanımı ilk defa 1980 yılında gündeme gelmiş olup 1983 yılında ilk kez biyofilm çalışmaları için kombine olarak kullanılmıştır (Arweiler ve ark., 2004). Bu canlı fluoressan tekniği sıklıkla farklı antibakteriyel ajanların plak üzerine etkisinin incelendiği çalışmalarda kullanılmaktadır (Arweiler ve ark., 2001,2002). Biz de tez çalışmamızda biyofilm içindeki cansız ve canlı bakterileri görüntülemek amacıyla fluoressan boyası olarak FDA ve EB boyalarını kullandık.

Biyofilm çalışmalarında mikroskobik değerlendirme önemli bir yer tutmaktadır. KLTM biyofilm yapılarının değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle hem biyofilmin 3 boyutlu görüntüsü hem de bu görüntülere ait kantitatif

veriler elde edilebilmektedir. Bu teknik örneklerin herhangi bir yere gömülmesine hatta fikse edilmesine bile gerek kalmadan güvenilir 3 boyutlu görüntü almamıza olanak sağlamaktadır (Wood ve ark., 2000). Ancak biyofilm bakterilerini incelemek için kullanacağımız KLTM' nin başka bir enstitüde olması, taşıma esnasında biyofilm yapısının bozulmaması ve inceleme yaptığımız örnekleri başka bir zaman tekrardan inceleme fırsatı sağlaması nedeniyle yapmış olduğumuz tez çalışmamızda örnekleri fikse etmeyi tercih ettik. Austchill ve ark. (2001), yaptıkları çalışmalarında hazırladıkları örnekleri fikse ettikten sonra KLTM' de incelemişlerdir. Aynı şekilde Netuschill ve ark. (1998), yaptıkları çalışmada örnekleri boyadıktan sonra fikse edip o şekilde KLTM' de incelemişlerdir.

Bahsedilen kriter ve koşullar altında gerçekleştirdiğimiz tez çalışmamızda, in-situ koşullarda çürüklü ve çürüksüz iki grupta 6, 24 ve 48 saat sonunda oluşmuş biyofilm örnekleri, ajanların antibakteriyel etkisini değerlendirmek için antibakteriyel ajan uygulamasını takiben benzer çalışmalarda olduğu gibi ethidium bromide ve fluoresan diasetat boyaları ile boyanmıştır (Netuschil ve ark., 1989). Boyama işlemini takiben konfokal lazer tarama mikroskobu ile biyofilm kalınlık ve canlılık değerleri ölçülmüştür. Biyofilm kalınlık değerleri, biyofilm oluşumunun sağlandığı örnek ile biyofilm yapısı içindeki yüksek hücre kültürünün tepe noktası arasındaki mesafenin ölçülmesi ile belirlenmiş μm cinsinden hesaplanmıştır (Auschill ve ark., 2004). Biyofilm canlılığı ise mikroskop ile elde edilen görüntüler üzerindeki kırmızı ve yeşil rengin toplam renge oranlanması ile % cinsinden hesaplanmıştır.

6, 24 ve 48. saat için ayrı ayrı hazırladığımız, sığır dişlerinden elde edilen örnekler üzerindeki biyofilm kalınlık değerleri, 6. saatte çürüklü grupta ortalama olarak $14,5 \mu\text{m}$, çürüksüz grupta $11,5 \mu\text{m}$, 24. saatte çürüklü grupta $34,8 \mu\text{m}$, çürüksüz grupta $26,3 \mu\text{m}$ olarak bulunmuştur. 48 saatte ise biyofilm kalınlık değerleri çürüklü grupta $81,1 \mu\text{m}$, çürüksüz grupta $62,4 \mu\text{m}$ ' dir. Çürüklü ve çürüksüz her iki grupta da zaman geçtikçe biyofilm kalınlık değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$). Her bir zaman diliminde, biyofilm kalınlık değerleri çürüklü grupta çürüksüz gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulunmuştur ($p<0.05$).

Biyofilm yapısı organik asit difüzyonuna karşı bariyer görevi görerek dış koruyabilme özelliğine sahip olduğu gibi nötralize edici ajanların mine yüzeyine ulaşmasını engelleyerek çürük oluşumunu tetikleme gibi özelliklere de sahiptir. Ağız içi hastalıklara neden olabilecek düzeyde biyofilm kalınlıklarının önemi dikkate alındığında, biyofilm kalınlıklarını değerlendiren oldukça az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu sebepten ötürü diğer çalışmalarla karşılaştırma yapmak oldukça zor olmaktadır (Auschill ve ark., 2004).

Biyofilm içindeki bakteriler zaman geçtikçe farklı yapısal özellikler sergilemekte buna bağlı olarakta biyofilm kalınlık değerleri değişmektedir. Özellikle genç plak olarakta adlandırılan biyofilm oluşumunun ilk evrelerinde daha ince ve dayanıksız biyofilm yapıları oluşurken zamanın geçmesiyle birlikte biyofilm kalınlık değerleri de artmakta ve daha heterojen ve kompleks biyofilm yapısı oluşmaktadır (Zaura-Arite ve ark., 2001). Biyofilm kalınlık değerlerinin biyofilm yaşının artmasıyla birlikte artış gösterdiği birçok çalışmayla desteklenmiştir (Zaura-Arite ve ark., 2001; Kara, 2007; Shen ve ark., 2011). Bu görüşü savunan Zaura-Arite ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada yüksek ve düşük çürük aktiviteli bireylerde 6, 24 ve 48. saattelerde biyofilm kalınlık değerlerini incelemişlerdir. Çalışma sonunda 6. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlık değerlerini 10µm olarak bulurken düşük çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlığının ölçülemeyecek kadar ince olduğunu bildirilmiştir. 24 ve 48 saatelerde biyofilm kalınlık değerlerinin zamanla birlikte arttığı, yüksek çürük aktiviteli grupta ise bu artışın düşük çürük aktiviteli gruba göre daha fazla olduğu vurgulanmıştır. Bu çalışmaya benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda 6, 24 ve 48. saatlerde biyofilm kalınlık değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır. Bu artış yüksek çürük aktiviteli grupta çürüksüz gruba göre her bir zaman diliminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olacak şekilde bulunmuştur.

Auschill ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada 48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlıklarının düşük çürük aktiviteli gruba göre daha fazla olduğunu ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığın bulunmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışma sonucundan farklı olarak tez çalışmamızda, yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlıklarını çürüksüz

gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla bulduk ($p<0.05$). Bu farklılığın sebebini, çalışmada kullanılan metodun tez çalışmamızdakinden farklı olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Auschill ve ark. (2005) yaptıkları çalışmada antimikrobiyal ajanları biyofilm yapısı oluşmadan uygularken biz ise antimikrobiyal ajanları oluşmuş biyofilm yapısı üzerine uygulamayı tercih ettik. Bu durumun farklı kalınlıkta biyofilm oluşumuna neden olabileceği düşüncesindeyiz. Ayrıca çalışmada katılımcılar yetişkin hastalardan seçilirken bizim çalışmamızda çocuk hastalardan seçilmiştir. Bu durumun farklı yapı ve miktarda plak birikimine neden olabileceği kanısındayız.

Netuschil ve ark. (1998), akrilik plak içine gömülmüş mine ve cam örnekler üzerindeki biyofilm kalınlık değerlerini ölçtükleri çalışmalarında, 72 saatte oluşmuş biyofilm kalınlık değerlerini 6-45 μ m olarak bulmuşlardır. Benzer in-situ plak dizaynını kullanan Auschill ve ark. (2001) mine örnekleri üzerindeki biyofilm kalınlıklarını 5. günün sonunda 15-31 μ m olarak bulmuşlardır. Biz ise tez çalışmamızda, 6, 24 ve 48. saatte biyofilm kalınlık değerlerini sırası ile çürüklü grupta ortalama 14,5 μ m, 34.8 μ m ve 81,1 μ m, çürüksüz grupta ise 11,5 μ m, 26,3 μ m ve 62,4 μ m olarak bulduk. Bu iki çalışma ile karşılaştırıldığında biyofilm kalınlık değerlerinin bizim çalışmamızdan daha az çıkmasını 2 sebebe bağlayabiliriz. İki çalışmada da biyofilm KLTM' de değerlendirilmeden önce fazla oranda yıkanmış ve gömülmüştür ve miktarın yarısı yaklaşık olarak ıslak biyofilme denk düşmektedir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi örnekler bukkal bir bariyer içine gömülmemiş, plak içine gömülen örnekler doğrudan yanak ile temas etmektedir. Bu da biyofilm yapısının zarar görmesine neden olmaktadır.

Wood ve ark. (2000), 1. ve 2. Molar dişlerin mine yüzeylerine tutturulmuş naylon yüzükler üzerindeki biyofilm kalınlık değerlerini ölçtükleri çalışmalarında 96 saat sonunda mineyle yüzüğün birleştiği yerde biyofilm kalınlıklarını 75- 220 μ m apareyin merkezinde ise, 35-215 μ m olarak bulmuşlardır. Yine aynı şekilde Zaura-Arite ve ark. (2001), dentin örneklerinde 48 saat sonunda ortalama biyofilm kalınlık değerlerini 34,4 μ m olarak bulmuşlardır. Bu iki çalışma biyofilm oluşum hızları açısından değerlendirildiğinde benzer zaman dilimlerinde farklı biyofilm

kalınlık değerlerinin oluşabileceğini, biyofilm kalınlığını etkileyen biręok faktör olduğunu göstermektedir (Auschill ve ark., 2004).

Yapmış olduğumuz tez çalışmamıza benzer şekilde planlanmış ve erişkinler üzerinde yapılmış bir çalışmada, 48 saat sonunda st çenede biyofilm kalınlık değerleri 77.6 ± 29.1 μm olarak bulunmuştur. (Auschill ve ark., 2004). Aynı şekilde biz de tez çalışmamızda 48. saatin sonunda biyofilm kalınlık değerlerini çürüklü grupta 81.1 μm , çürüksüz grupta ise, 62.4 μm olarak bulduk. Elde edilen değerler bu çalışma sonuçları ile benzerlik göstermektedir.

Antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerleri üzerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda, 6. saatin sonunda tüm ajanların biyofilm kalınlıklarında azalmaya neden olduğu, ancak kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ajanların sebep olduğu bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı bulunmuştur. 6. saatte çürüklü grupta en az biyofilm kalınlık değerleri 13.8 μm değeri ile ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Chx' in tek başına kullanıldığı grupta ise biyofilm kalınlık değerleri $14,2$ μm ' dir. Yaptığımız literatür taramasında in-situ koşullarda antimikrobiyal ajan olarak biyofilm zerine Chx' in ozon ile kombine uygulandığı bir çalışmaya rastlanılmamış olması nedeniyle biyofilm kalınlık değerleri açısından ozon, ozon-Chx ve ozon-fluor grubuna ait bulgular herhangi bir literatürle tartışılamamıştır.

24. saatte biyofilm kalınlık değerleri tüm gruplarda artmıştır ancak biyofilm üzerine uygulanan antimikrobiyal ajanlar biyofilm kalınlık değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalmaya neden olmamıştır. Ajan grupları arasında 24. saatte biyofilm kalınlık değerlerinde en fazla azalma çürüksüz grupta ozonun Chx ile kombine kullanıldığı örneklerde elde edilmiştir ($24,6$ μm). Bunu $24,9$ μm değeri ile ozonun fluor ile kombine kullanıldığı grup takip etmektedir. Ozonun tek başına uygulandığı grup ise 25 μm olarak bulunmuştur. Üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p > 0.05$).

48. saatte biyofilm kalınlık değerleri 6 ve 24. saate göre anlamlı şekilde artmıştır ($p < 0.05$). Biyofilm zerine uygulanan antimikrobiyal ajanlar kalınlık değerlerinde

azalmaya neden olsalar da bu azalma istatistiksel olarak anlamlılık yaratmamıştır ($p>0.05$). Ajan grupları arasında 48. saatte biyofilm kalınlık değerlerinde en fazla azalma çürüksüz grupta ozonun Chx ve fluor ile kombine kullanıldığı örneklerde elde edilmiştir (58,9 μm). Bunu 59,1 μm değeri ile ozonun tek başına uygulandığı grup ile Chx grubu takip etmektedir. Biyofilm kalınlık değerleri açısından üç grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). İn situ koşulda 24 ve 48. saatlerde oluşmuş biyofilm kalınlık değerleri üzerine ozonun tek başına ve diğer ajanlarla kombine kullanımının etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlanılmamış olması nedeniyle elde edilen bulgular başka bir çalışma ile karşılaştırılamamıştır.

Zaura-Arite ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada sığır dişinden elde ettikleri dentin örnekleri üzerinde in-situ koşullarda biyofilm oluşumunu sağlamışlardır. Bizim de tez çalışmamızda kullandığımız akrilik plağa benzer bir plak kullandıkları çalışmalarında 6, 24 ve 48 saatte oluşmuş biyofilm üzerine Chx' in etkisini incelemiştirler. 6. saatin sonunda yüksek çürük riski bulunan grupta Chx uygulaması sonrası biyofilm kalınlık değerlerini ortalama 10 μm olarak bulmuşlardır. 24 ve 48. saatte bu değerler sırası ile 27 μm ve 34.4 μm ' dir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Chx biyofilm kalınlık değerlerinde azalmaya neden olmuştur ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çalışma sonuçlarına benzer sonuçlar tez çalışmamız sonunda da elde edilmiştir. Chx her bir zaman diliminde (6, 24 ve 48) biyofilm kalınlık değerlerinde düşüşe neden olmuştur ancak fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). Çalışma sonuçlarımızdan farklı olarak başlangıç biyofilm kalınlık değerlerinin bizim çalışmamızdan daha düşük bulunmasını biyofilm oluşumunun sağlandığı yüzeyin farklı olmasından ve örnekler uygulanan yıkama prosedürünün fazla yapılmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Bu çalışmada biyofilm dentin yüzeyinde oluşturulurken bizim çalışmamızda mine yüzeyinde oluşturulmuştur. Ayrıca çalışmada örnekler her aşamada 5 dk süre ile yıkanmıştır. Bizim çalışmamızda ise bu süre 1dk olarak belirlenmiştir. Yıkama süresinin uzun olmasının biyofilm kalınlık değerlerinde de azalmaya neden olabileceği düşüncesindeyiz.

Auschill ve ark. (2005), in-situ koşullarda yaptıkları çalışmada 48 saat sonunda Chx ve amin fluorid/stanneusfluorid ajanlarının biyofilm canlılığı ve biyofilm kalınlığı üzerine etkisini incelemişlerdir. Çalışmada katılımcılara özel st çene plak hazırlanmış biyofilm plak içine yerleştirilen cam boncuklar üzerinde oluşturulmuştur. Çalışma sonunda araştırmacılar 48 saatte oluşmuş biyofilm kalınlık değerlerinin Chx için %89, aminfluorid için %80 oranında düştüğünü bulmuşlardır. Ortalama kalınlık değerleri fizyolojik salin uygulanan kontrol grubunda 76.7 μm iken Chx uygulanmış grupta 8.4 μm ' dir.

Tez alışmamızda 48. saat sonunda çürüklü grupta biyofilm kalınlık değerleri ortalama olarak kontrol grubunda 81.1 μm , Chx uygulanmış grupta ise 78,6 μm dir. Çürüksüz grupta ise bu değerler sırası ile 62,4 μm ve 59.1 μm ' dir. Yapmış olduğumuz tez alışmamızda Chx uygulaması biyofilm kalınlık değerlerinde çok az oranda azalmaya neden olmaktadır. Auschill ve ark. (2005)' nin yaptığı çalışmada ajanlar günde iki defa biyofilm yapısı oluşmadan uygulanmıştır. Biz ise tez çalışmamızda, hiçbir antimikrobiyal ajan uygulamadan biyofilm oluşturup, oluşmuş biyofilm yapısı üzerine antimikrobiyal ajanların etkisini değerlendirmeyi tercih ettik. Bu uygulama farklılığının biyofilm kalınlık değerlerinin bizim çalışmamızdan daha az olmasına neden olduğu düşüncesindeyiz. Ayrıca biyofilm oluşumunun sağlandığı yüzeyin cam olmasının da biyofilm kalınlık değerlerinin daha az olmasına neden olacağı kanısındayız.

Klorheksidin uygulanması sonrası biyofilm kalınlığında oluşan azalma biyofilmin esas yapısını oluşturan negatif yüklü EPS matriks ile pozitif yüklü Chx molekülü arasındaki iyonik etkileşim sonucu oluşmaktadır. Bu etkileşim EPS' nin fizikokimyasal yapısında değişime neden olur. Değişime uğramış EPS yapısında polimer zincirde lokalize, yüklenmiş alanlar meydana gelir. Polimer zincirdeki şarj alanlarının değişimi EPS zincirinin tersiyer yapısını ve komşu zincirlere bağlanma derecesini etkiler. Pozitif yüklü Chx molekülü ile negatif yüklü EPS molekülü arasındaki etkileşim esnasında, şarj olmuş matriks nötrale dönüşür, moleküllerin birbirinden uzaklaşmasını sağlayan itici kuvvetler azalır, zincirler arasındaki kapalı etkileşim aktive edilir ve bunun sonucunda biyofilm kütlesinde azalma meydana gelir (Hope ve Wilson, 2004; Kara, 2007). Bu durum antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerleri üzerine etkisini

değerlendirdiğimiz tez çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Biz de, çalışmamızda uyguladığımız antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerlerinde yapmış olduğu azalmanın sebebini, ajanların ve biyofilm EPS matriks moleküllerinin arasındaki iyonik etkileşimden kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Biyofilm kalınlığındaki azalma derecesi uygulanan ajanın konsantrasyonuna bağlı olarak da değişir. Hope ve Wilson (2004), Chx'in biyofilm yapısı üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, %0,2' lik Chx' in biyofilm kalınlık değerlerinde ölçülebilir nitelikte belirgin bir azalmaya neden olduğunu, oysa %0.05' lik Chx' in sebep olduğu biyofilm kalınlık değerlerindeki azalmanın çok az ve düzensiz nitelikte olduğunu bildirmişlerdir.

Shen ve ark. (2011), Chx' in biyofilm kalınlık değerleri üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında in-vitro ortamda 2 gün, 1, 2 ve 3 hafta süreyle oluşturdıkları biyofilm yapısının kalınlık değerlerini 2. günde 57 μm 1. haftada 87 μm , 2. haftada 105 μm ve 3. haftada 155 μm olarak bulmuşlardır. 3 haftalık periyot sonunda besin sınırlaması yaparak oluşturdıkları biyofilm yapısının ise kalınlık değerlerinin 6 ve 12 haftalarda değişmeden kısmen sabit kaldığını bildirmişlerdir.

Kara (2007), in-vitro ortamda 48, 96, 192 ve 264. saatlerde biyofilm oluşumunu sağladığı tez çalışmasında Chx' in biyofilm kalınlığı üzerine etkisini incelemiştir. Çalışmada *S. mutans* ve *V. parvula*'nın tek başına ve birlikte olduğu biyofilm yapısı oluşturulmuştur. Chx ile tedavi edilmemiş *S. mutans* biyofilminde 264. saatte oluşmuş biyofilm kalınlığı değeri 35.6 μm olarak diğer gruplara göre anlamlı derecede daha yüksek bulunmuştur. Chx ile tedavi edilmiş *S. mutans* biyofilimde kalınlık değerleri 264. saatte 33 μm olarak bulunmuştur. Chx uygulaması sonrası biyofilm kalınlık değerleri düşmüştür ama bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı değildir. *S. mutans* ve *V. parvula* ile oluşturulmuş biyofilm yapısında ise biyofilm kalınlık değerleri tek bir bakteri ile oluşturulan biyofilm kalınlık değerlerinden daha fazla olarak bulunmuştur. Chx uygulaması sonrası kompleks biyofilm yapısında biyofilm kalınlık değerleri düşmüştür ancak

bu düşüş anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır. Bu çalışmaya benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda biyofilm kalınlık değerleri bir önceki saatteki kalınlık değerlerinden anlamlı derecede daha yüksek bulunmuş ancak biyofilm üzerine uyguladığımız Chx kalınlık değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalmaya neden olmamıştır.

Biyofilm yapısının sahip olduğu ekoloji, fizikokimyasal ve biyolojik bir çok faktöre bağlıdır. Biyofilm kalınlığı biyofilm içinde bulunan organizma sayısı ve çeşidi ile alakalı olarak değişebilmektedir. Birden fazla bakteri ile oluşan biyofilm kalınlığı tek bir bakteri türü ile oluşan biyofilm kalınlığına göre daha fazladır (Al-Hmoud ve ark., 2013). Bilindiği gibi ağız içinde 1000 civarında bakteri türü izole edilmiş hala da yeni türlere rastlanılmaktadır (Ten Cate, 2006). Biyofilm yapısını in-situ koşullarda oluşturmak ağız içindeki birçok bakteri çeşidi ve türünün biyofilm yapısına katılmasına olanak sağlamaktadır. Bu da in-vitro koşullarda 1 ya da 2 bakteri türü ile oluşturulan biyofilm yapısına kıyasla birden fazla bakterinin oluşturduğu kompleks biyofilm yapısının oluşması demektir. Bu nedenle ki, çalışmamızda bulduğumuz biyofilm kalınlık değerlerimiz Kara (2007)'nin in-vitro koşullarda yaptığı tez çalışmasının sonuçlarından daha fazla çıkmıştır.

Antimikrobiyal ajanların biyofilm canlılığı üzerine etkisini incelediğimiz çalışmamızda 6, 24 ve 48. saatin sonunda elde ettiğimiz örneklerle antimikrobiyal ajan uygulaması ardından KLTm' de incelenmesi sonucu oluşan görüntüde, canlı boyama tekniğinde kullandığımız boyaların özellikleri doğrultusunda yeşil ve kırmızı renkten oluşan görüntüler elde edilmiştir. Elde edilen bu görüntüdeki yeşil ve kırmızı rengin total renk yoğunluğuna oranı yüzde olarak hesaplanmış ve çıkan sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonunda 6. saatte cansız hücre sayısı çürüklü grupta %19,6, çürüksüz grupta %20,2 olarak bulunmuş bu değerler 24. saatte çürüklü grupta %16,8 çürüksüz grupta % 19,2; 48 saatte ise çürüklü grupta %16,4 çürüksüz grupta %17,8 dir. Aktif çürüklü ve çürüksüz iki grupta da, zaman geçtikçe cansız bakteri yüzdesi azalmış canlı bakteri yüzdesi artmıştır ancak bu artış istatistiksel

olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır. Her bir zaman diliminde, canlı bakteri yüzdesi aktif çürüklü grupta çürüksüz gruba göre daha fazla bulunmuştur. Ancak iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çürük aktivitesi düşük bireylerde biyofilm içindeki canlı bakteri sayısı çürük aktivitesi yüksek bireylere oranla daha azdır. Özellikle genç plak olarak da adlandırılan erken saatte oluşmuş biyofilm içinde canlı bakteri yüzdesi oldukça azdır. Zaman geçtikçe biyofilm içindeki canlılık yüzdesi artmaktadır. Yaşlı biyofilm yapısında canlı bakteri topluluğu cansız materyaller ile birbirine karışmış halde bulunurlar (Zaura-Arite ve ark., 2001). Biyofilm yapısındaki zaman geçtikçe oluşan bu canlılık farklılığı yapılan birçok çalışmayla da desteklenmiştir (Zaura-Arite ve ark., 2001; Kara ve ark., 2006; Kara 2007). Bu görüşü savunan Zaura-Arite ve ark. (2001), yaptıkları çalışmada, yüksek çürük aktiviteli bireylerde canlı bakteri sayısının düşük çürük aktivitesi gösteren bireylere göre daha fazla olduğunu ancak bu fazlalığın anlamlı bir fark yaratmadığını bildirmişlerdir. Aynı şekilde Auschill ve ark. (2005)' de çürük prevelansının biyofilm canlılığı üzerine anlamlı bir etkisinin olmadığını yaptıkları çalışma ile göstermişlerdir. Bu çalışma sonuçlarına benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda da, biyofilm canlılığı biyofilm yaşı arttıkça artmış ancak bu artış istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmamıştır. Yüksek çürük aktivitesi gösteren grupta canlı bakteri sayısı çürüksüz gruba göre daha fazla olarak bulunmuştur ancak gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çalışmamızda 6. saatteki incelemede ise, çürüklü grupta tüm ajan gruplarının kontrol grubu ile karşılaştırıldığında biyofilm bakterileri üzerine istatistiksel olarak anlamlı derecede etkili olduğu ve canlı bakteri sayılarının düştüğü görülmüştür. Ozon-Chx grubu %96,6 cansız bakteri yüzdesi ile biyofilm bakteri canlılığı üzerine en etkili ajan olarak bulunmuştur. Ozonun fluor ile kombine uygulandığı grupta cansız bakteri yüzdesi %91, 6 iken ozonun tek başına uygulandığı grupta ise, %93, 4' tür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında biyofilm bakterilerinin canlılığındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). Klorheksidin ve fluorun tek başına uygulandığı grupta cansız bakteri yüzdesi sırası ile %77,2 ve %72 olarak bulunmuştur. Bu iki grup arasındaki fark

istatistiksel olarak anlamlı değildir. Çürüksüz grupta ise ajan gruplarına göre cansız bakteri yüzdesi ozon grubu için, %93, Chx için %79.2, fluor için %76.6, ozon-Chx için %95.2 ve ozon- fluor için %92,4 olarak bulunmuştur. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında biyofilm bakterilerinin canlılığındaki bu düşüş istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$).

24 saatin sonunda elde edilen örnekler üzerine antimikrobiyal ajan uygulaması sonrası elde edilen bulgularda cansız bakteri yüzdesi çürüklü grupta, ozon grubunda %83,4, Chx grubunda %71.8, fluor grubunda %63,8, ozon-Chx grubunda %85,6, ozon-fluor grubunda %86, 4 ve salin grubunda %16,8 olarak bulunmuştur. Çürüksüz grupta ise bu değerler, ozon grubunda %85.2, Chx grubunda %72, 8, fluor grubunda %66,4, ozon-Chx grubunda %88,6, ozon-fluor grubunda %88,6 ve salin grubunda %19,2' dir. Tüm ajan grupları çürüklü ve çürüksüz iki grupta da canlı bakteri yüzdelerini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0.05$). En fazla azalma her iki grupta da ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edilmiştir. Ozonun fluor ve Chx ile kombine kullanımı biyofilm bakteri canlılığını ozonun tek başına kullanıldığı gruba göre azaltmıştır ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlılığa neden olmamıştır. Fluor ve Chx biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerinde ozon kadar etkili bir azalmaya neden olamamıştır. Bu iki ajan arasında bakteri canlılığını azaltma anlamında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamıştır. Bu durum da fluor ve Chx' in ozonla kombine kullanıldığı gruplardaki başarıyı ozonun etkinliğine bağlanabileceğini düşünmekteyiz.

Bilindiği gibi klorheksidin uzun yıllar boyunca üzerinde çalışılan ve streptokokus mutans üzerine etkinliği bilinen kemoterapötik bir ajandır. Birçok çalışmada etkinliği araştırıldığı (Twetman ve ark., 1995; Pratten ve ark., 1998; Zaura-Arite ve ark., 2001; Decker ve ark., 2003, Foster ve ark., 2004 Cosyn ve ark. 2005, Vitkov ve ark., 2005; Ribeiro ve ark. 2008) gibi aynı zamanda diğer antimikrobiyal ajanların etkinliğini değerlendirmek için pozitif kontrol grubu olarak ta kullanılmaktadır (Emilson, 1994; Huth ve ark., 2006; Pizzo ve ark., 2008; Kshitish ve Laxman, 2010). Klorheksidini diğer antiseptiklerden ayıran en önemli özelliği, ağız içinde uygulandığında organik ve inorganik yapılara

bağlanarak uzun süreli salınım yapmasıdır. Mikroorganizmaların daha uzun süre antiseptik madde ile temasta bulunmaları etken maddenin bakterisit etkinliğini arttırmaktadır (Aktaş ve ark., 2008). Yapılan bir çok çalışma Chx'in mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkinliğini kanıtlar niteliktedir (Ekenback ve ark., 2000; Giertsen ve ark., 2000; Atukeren, 2001; Shapiro ve ark., 2002; Pizzo ve ark., 2008; Sajjan ve ark., 2013).

Zaura-Arite ve ark. (2001), in-situ koşullarda yetişkin hastada yaptıkları çalışmada, Chx' in farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm üzerine etkisini incelemişler,%0.02' lik Chx gargaranın 6, 24 ve 48 saatte oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığını kontrol grubu ile karşılaştırdıklarında anlamlı bir azalmaya neden olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmaya benzer sonuçlar bulduğumuz tez çalışmamızda da 6, 24 ve 48. saatte oluşmuş biyofilm bakterilerinin %1' lik Chx ile canlılık oranının anlamlı bir şekilde düştüğü görülmüştür.

Auschill ve ark. (2005), amin florid ve Chx' in biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, 48. saatte cam boncuklar üzerinde oluşturdukları biyofilm bakterilerinin, Chx uygulanmış grupta amin florid grubuna göre bakteri canlılığının daha fazla azaldığını ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığını bildirmişlerdir. Çalışmada iki ajan da biyofilm bakteri canlılığı üzerine istatistiksel olarak anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur.

Takeuchi ve ark. (2007), yaptıkları çalışmada, Chx/timol cila ve fluor cilanın in-vitro ortamda 3, 5, 7, 12 ve 20. saatte oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkilerini incelemişlerdir. Çalışmada kontrol grubu ile karşılaştırıldığında Chx/timol cila uygulanan grubun anlamlı şekilde mikroorganizma sayılarını azalttığı görülmüştür. Fluor cila uygulanan grupta ise, total bakteri sayısı kontrol grubuyla karşılaştırıldığında anlamlı düzeyde azalmaya neden olmamıştır. Biyofilm gelişimi açısından bakıldığında saat ilerledikçe bakteri sayıları hızlı bir şekilde yükselmiş antimikrobiyal ajanların etkinliği ise azalmıştır. Bu çalışmayla benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda, Chx/timol cila uygulanmış

örneklerde canlı bakteri yüzdesi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı şekilde azalmıştır ($p<0.05$). En fazla cansız bakteri yüzdesi antimikrobiyal ajanların uygulanmasından sonra 6. saatteki örneklerde (%79,2) kaydedilirken en az cansız bakteri yüzdesi 48 saatteki örneklerde (%53,4) kaydedilmiştir. Bizim çalışmamızda da fluor cila canlı bakteri yüzdelerinde etkili bir azalmaya neden olamamıştır.

Biyofilm bakterilerini incelemek için yapılan çalışmalarda karşılaşılan en büyük zorluk, biyofilm bakterilerinin biyofilm gelişim aşamalarının her döneminde farklı özellikler sergilemesinden kaynaklanmaktadır (Sauer ve ark., 2002). Biyofilm oluşumu dinamik bir süreçtir. Biyofilm içindeki cansız bakteri oranı uygulanan antimikrobiyal ajanın tipi, uygulama süresi, biyofilm yaşı, biyofilm bakterileri için gerekli besinden zengin çevrenin bulunması gibi birçok faktöre bağlı olarak değişmektedir (Shen ve ark., 2011).

Shen ve ark. (2011), Chx ve Chx plus 'ın farklı zamanda oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkisini inceledikleri çalışmalarında, biyofilm oluşumunu 2 gün, 1, 2 ve 3 hafta süreyle in-vitro koşullarda sağlamışlardır. Çalışma sonunda, 2 gün ve 2 haftalık biyofilmden kalınlık değerlerinin artmış olmasına rağmen benzer canlılık oranları sergilendiği, biyofilm bakterilerinin Chx' e 2 ve 3 hafta arasında direnç kazandığı bildirilmiştir. Chx' in 3. haftada oluşmuş biyofilm bakterilerinin canlılığını üzerine etkisi giderek azalmıştır. İn situ koşullarda yaptığımız tez çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmiş, Chx uyguladığımız grup canlı bakteri sayılarında salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı derecede azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Chx' in 6, 24 ve 48. saatlerde oluşturduğumuz biyofilm üzerine etkisi çalışma sonuçlarına benzer şekilde biyofilm yaşı arttıkça giderek azalmıştır.

Chx plak üzerine 1dk süre ile uygulanması sonrası 2mm derinliğe kadar penetre olabilmektedir (Melsen ve ark., 1983) bu durum Chx' in özellikle kalın plak varlığında yüzeysel bir antimikrobiyal etki göstermesine neden olmaktadır (Zaura-Arite ve ark., 2001). Tez çalışmamızda 48. saatte biyofilm kalınlıkları, yüksek çürük aktiviteli grupta 81,1 μ m; çürüksüz grupta 62,4 μ m değerleri ile istatistiksel

olarak anlamlı şekilde diğer gruplardan daha fazla bulunmuştur. Zaman geçtikçe biyofilm kalınlık değeri artmış olması Chx' in biyofilm tabakasının derin kısımlarına penetre olamamasına ve sınırlı antimikrobiyal etki göstermesine neden olmaktadır. Bizde tez çalışmamızda, Chx' in biyofilm yaşı ilerledikçe etkisinin azalmasını bu nedene bağlamaktayız.

Geçtiğimiz yıllar boyunca fluor vernikleri ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların birçoğunda fluor cila uygulamasının süt ve daimi dişlerde anlamlı şekilde çürük gelişimini durdurduğu bildirilmektedir. (Frostell ve ark., 1991; Zimmer ve ark., 1999; Autio-Gold ve Courts, 2001). Çürük oluşumunun engellenmesi için kullanılan fluor önemli bir antimikrobiyal ajan olarak bilinmesine rağmen, klinik faydalarının oluşmasına neden olan mekanizması hakkında halen tartışmalar sürmektedir. Özellikle biyofilm içindeki bakterilerin gelişimi ile ilgili bilgilerin artmasıyla birlikte bu konuyla alakalı daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Ten Cate, 2006; Van Lovaren, 2001).

Bradshaw ve ark. (2002), düşük konsantrasyondaki florun biyofilm bakterileri üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında florun antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu, bunu da S.mutans gibi bakterilerin metabolizmasını engelleyerek ve çürük yapıcı bakteriler için gerekli pH' ın düşmesini sağlayarak gerçekleştirdiği sonucuna varmışlardır.

Fluor cilaların antimikrobiyal etkilerinin var olmasının yanında klorheksidin kadar etkili bir antimikrobiyal ajan olmadığı yapılan birçok çalışma ile gösterilmiştir (Auschill ve ark., 2005; Takeuchi ve ark., 2007). Sajjan ve ark. (2013), Cervitec cila ve Duraphat cilanın plak streptokokus miktarları üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, Cervitec cilanın 1. ve 3. ayın sonunda streptococcus mutans sayısını anlamlı derecede düşürdüğünü Duraphat cila uygulanan grubun ise streptokokus mutans sayılarında anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını bildirmişlerdir. Antimikrobiyal ajanların biyofilm üzerine etkisini incelediğimiz tez çalışmamızda bu çalışma ile benzer şekilde biyofilm üzerine Chx uygulanmış grup fluor uygulanmış gruba oranla her bir zaman diliminde (6, 24 ve 48. saat) biyofilm canlılığını daha fazla düşürmüştür. Bu

Çalışma sonuçlarından farklı olarak ise, iki grup arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$). 48. saatte Chx uygulanmış grupta cansız bakteri yüzdesi çürüklü grupta %53,6 iken bu değer çürüksüz grupta %53, 4 olarak bulunmuştur. Fluor uygulanmış grupta ise yüksek çürük aktiviteli grupta cansız bakteri yüzdesi %52, 4 iken çürüksüz grupta bu değer %52 olarak bulunmuştur. Bu alışma sonuçları ile tez çalışmamız arasındaki farklılığı çalışmada kullanılan metodun farklı olmasına bağlamaktayız.

Aynı şekilde Giertsen ve ark. (2000), in-situ koşullarda biyofilm modelleri oluşturarak plak bakterilerine etkili olan farklı antimikrobiyal ajanların bakteriler üzerine olan etkilerini inceledikleri çalışmalarında, fluor, çinko, Chx, çinko-fluor kombinasyonu ve fluor-Chx kombinasyonunun 1 haftalık periyotta in-situ koşullarda oluşturulmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine etkilerini değerlendirmişlerdir. Çalışma sonucunda fluor, çinko asetat ve çinko asetat ile kombine fluor uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bakteri oranının azaldığı ancak gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlılığın bulunmadığı oysa Chx uygulanan grupta bakteri canlılığı ve toplam hücre sayısında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalma olduğu bildirilmiştir.

Bu sonuçlara benzer şekilde Kılıan ve ark. (1979), yaptıkları çalışmada antimikrobiyal ajan olarak fluor uygulamasının canlı bakteri sayılarında anlamlı derecede bir azalmaya neden olmadığını bildirmişlerdir. Klorheksidinin biyofilm bakterileri üzerine daha etkili bir antimikrobiyal ajan olduğu yapılan bir çok çalışma ile doğrulanmıştır (Jenkins ve ark., 1988; Netuschil ve ark., 1989; Giertsen ve Scheie, 1995).

Farklı metod ve teknik kullanmamıza rağmen bu çalışmaların sonuçlarına benzer sonuçlar elde ettiğimiz tez çalışmamızda da her bir saat grubunda (6, 24 ve 48) Chx uygulanan grup, fluor uygulanan gruba göre bakteri canlılığı açısından daha etkili olarak bulunmuştur. Chx grubunda cansız bakteri yüzdeleri sırası ile 6, 24 ve 48. saatlerde yüksek çürük aktiviteli grupta %77, 2; %71,8 ve %53,6 iken çürüksüz grupta bu değerler sırası ile, %79,2; %72,8 ve %53,4 olarak bulunmuştur. Fluor grubunda ise yüksek çürük aktiviteli grupta cansız bakteri

yüzdesi sırası ile %72; %63,8 ve %52,4 iken çürüksüz grupta bu değerler sırası ile %76,6; %66,4 ve %52 olarak bulunmuştur. Bu iki ajan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında canlı bakteri yüzdeleri anlamlı bir şekilde azaltmışlardır ($p<0.05$). Biyofilm kalınlık değerlerinin zaman geçtikçe artmasına bağlı olarak antimikrobiyal ajanların biyofilmin derin kısımlarına ulaşamamaları nedeniyle canlı bakteri yüzdeleri zaman geçtikçe giderek artmıştır.

Erdem ve ark. (2012) yaptıkları çalışmada bakteri kültür metodu ile 3 farklı flor verniğin *S. mutans* ve *S. sorbius* biyofilmine olan etkisini incelenmiştir. Çalışmada ajanlar 24, 48 saat ve 5 günlük biyofilm üzerine uygulanmıştır. Çalışma sonunda, Chx/ fluorun kombine kullanıldığı grubun 24 ve 48 saatte oluşmuş biyofilm üzerine diğer gruplarla karşılaştırıldığında daha etkili olduğu ancak 5 günlük biyofilm üzerine de aynı etkiyi oluşturmadığı bildirilmiştir. Bu çalışma tez çalışmamızda olduğu gibi biyofilm yaşı arttıkça ajanların biyofilm üzerine olan etkinliğinin giderek azaldığı gösterilmiştir.

Biyofilm içerisindeki çürük yapıcı bakterilerin sayısının azaltılması ya da çürük oluşumunun önlenmesi ve tedavi edilmesinde şimdiye kadar birçok koruyucu tedavi stratejileri uygulanmıştır (Johansson ve ark., 2009). Klorheksidin uzun yıllardır diş hekimliğinde en yaygın kullanılan antibakteriyel ajan olmuştur. Son yıllarda ise ozon gazı çürük yapıcı bakterilerin sayısının azaltılmasında kullanılan alternatif non-invaziv antibakteriyel, antiviral ve antifungal bir ajan olarak kullanılmaktadır. Ozon, bakteri hücre duvarını ve stoplazmik membranı hızlı ve etkili bir şekilde okside etme özelliğine sahiptir (Bocci, 2006). *S. mutans* gibi çürük yapıcı bakteriler üzerine antibakteriyel etkiye sahip olduğu bir çok çalışma ile kanıtlanmıştır (Baysan ve ark., 2000; Baysan ve Lynch, 2004; Castillo ve ark., 2008; Fagrell ve ark., 2008).

Johansson ve ark. (2009), yaptıkları çalışmalarında çürük yapıcı etkisi olan bakteriler üzerinde ozon uygulamasının etkilerini araştırmışlardır. *A. naeslundii*, *Laktobacillus casei* ve *S. mutans* bakterileri üzerine 10 s, 30 s ve 60 s ozon uygulamışlardır. Elde edilen sonuçlara göre *A. naeslundii*, *S. mutans* ve *L. casei* bakterilerinin sırasıyla %92, %73 ve %64'ünün öldüğünü bildirmişlerdir. 60 s

sonunda ise total bakterilerin %99,9'unun canlılığını yitirdiğini saptamışlardır. Ozonun 60 s boyunca uygulanması diğer gruplara göre daha etkin bulunmuştur. Biz de tez çalışmamızda ozonun 60 s boyunca uygulanması ile biyofilm içindeki canlı bakteri yüzdelerini salin grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalttığı sonucunu bulduk ($p<0.05$).

Benzer şekilde, Castillo ve ark. (2008), çalışmalarında ozon gazının in-vitro koşullarda 24 saat süreyle kültüre edilmiş streptokokus mutans üzerine antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Çalışmada ozon gazı 10, 20 ve 40 s boyunca uygulanmıştır. 10 ve 20 s ozon uygulanmış örneklerde canlı mutans sayılarında anlamlı düzeyde düşüş elde edilirken 40 s ozon uygulaması sonrası bakterilerin tamamının elimine edildiği bildirilmiştir. Çalışma sonuçlarından farklı olarak mevcut çalışmamızda ozon 6, 24 ve 48. saatte oluşturulmuş biyofilm bakterilerinin canlılığı üzerine % 100 başarı sağlayamamıştır. 6. saatte ozon uygulanmış grupta cansız bakteri yüzdesi çürüklü grupta %93, 3 iken çürüksüz grupta bu değer %93 olarak bulunmuştur. Salin grubu ile karşılaştırıldığında ozon istatistiksel olarak anlamlı derecede bakteri canlılığını azaltmıştır ($p<0.05$). Tez çalışmamızın sonuçları doğrultusunda 6. saatte ozonun %100 olmasa da % 100' e yakın bir başarı sergilemesi ozonun biyofilm üzerine etkili bir antimikrobiyal ajan olduğunu kanıtlar niteliktedir. 24 ve 48. saatte ise değerler düşüş göstermiş ve sırası ile 24. saatte çürüklü grupta %83,4, çürüksüz grupta %85,2; 48. saatte ise çürüklü grupta %57, 2, çürüksüz grupta %65 olarak bulunmuştur. Bu iki grup salin grubu ile karşılaştırıldığında aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0.05$). Çalışmamızın sonuçlarının bu iki çalışmanın sonuçlarından farklı olmasını çalışmalarda kullanılan mikroorganizma topluluklarının farklı özellikler sergiliyor olmasına bağlamaktayız. Bilindiği gibi mikroorganizmalar biyofilm oluşturarak bir dizi avantaja ve özelliğe sahip olmaktadır. İn vitro ortamda kültüre edilmiş çoğu mikroorganizma biyofilm yapısı oluşturamamaktadır. Bu yüzden ki ozon planktonik haldeki mikroorganizmalar üzerine daha etkilidir (Huth ve ark., 2011; Eick ve ark., 2012).

Ozon, in-vitro koşullarda bakteriler üzerine antibakteriyal etki sağlamasına rağmen farklı çevre şartlarında in-vivo koşullarda ozonun bakteriler üzerine nasıl

öldürücü etki sergilediği halen tartışmalıdır. Ağız içi yüzeylere uygulanmış ozon, tükürük ve biyofilm ile etkileşim içine girecektir. Bilindiği gibi biyofilm yapısı farklı tipteki antimikrobiyal tedavilere karşı oldukça dirençlidir (Wilson, 1996; Marsh, 2004; Scheie ve Peterson, 2004). Bu görüşü savunan Müller ve ark. (2007), ozon ve fotodinamik terapinin antimikrobiyal etkisini in-vitro olarak değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında 64.5 saatlik çoklu tür biyofilm modeli üzerine 60 s ozon ve fotodinamik tedavi uygulamışlardır. Sonuç olarak fotodinamik tedavi ve ozonun biyofilm içindeki çürük yapıcı mikroorganizmaların canlılığı üzerine çok düşük etkisinin olduğunu belirtmişlerdir.

Baysan ve ark. (2000), ozonun antibakteriyel etkisini değerlendirmeyi amaçladıkları çalışmalarında, cam boncuklar üzerinde *S. mutans* ve *S. sobrinus* biyofilmi oluşturarak 10 s ozon uygulamışlar ve ozonun karyojenik bakterilerin toplam sayısının azaltılması üzerinde önemli derecede etkili olduğunu bulmuşlardır.

Sadatullah ve ark. (2012), 0.1 ppm' lik ozon suyunun 24 saatte oluşturulmuş biyofilm bakterileri üzerine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, 24 saat sonunda hasta ağzından topladıkları biyofilm örnekleri üzerine ozon suyu ve kontrol grubu olarak salin uygulamışlardır. Çalışma sonunda 0.1' ppm' lik ozon suyunun biyofilm bakterilerinin sayısını azalttığı ancak tamamen elimine edemediği sonucuna varmışlardır.

Eick ve ark. (2012), ozonun periodontal patojen mikroorganizmalar üzerindeki etkisini değerlendirdikleri in-vitro çalışmalarında, 23 farklı mikroorganizma türü üzerine 6, 12, 18, 24 s süre ile ozon gazı uygulamışlardır. Bu çalışmada periodontopatojen olan *P.gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, gram (+) ve diğer gram (-) mikroorganizmalar değerlendirilmiştir. Başlangıç değerlerine göre tedavi sonrasında *P.gingivalis*, ozonun uygulandığı tüm test sürelerinde elime edilmiştir. *A. actinomycetemcomitans* türlerinin tamamına yakını ozonun 18 s süre ile uygulanması sonrası ortamdan kaldırılmıştır. Araştırmada serum varlığında ozonun etkisinin azaldığı da bildirilmiştir. Araştırmacılar ozonun periodontopatojenik mikroorganizmalar üzerinde güçlü bir antimikrobiyal

etkinliğinin olduğunu, ancak bu etkinin biyofilm varlığında azaldığını bildirmişlerdir.

Çalışmamızda ozon, biyofilm içindeki bakterilerin zaman geçtikçe uygulanan antimikrobiyal ajanlara karşı daha fazla direnç kazanması ve artan biyofilm kalınlığı nedeniyle uygulanan ajanın biyofilmin derin kısımlarındaki bakterilere ulaşamaması gibi nedenlerden dolayı 48. saatte biyofilm bakterileri üzerine daha az etki göstermiştir. 6. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta cansız bakteri yüzdesi %93,4 olarak bulunurken 24. saatte bu değerler %83,4' e 48. saatte ise, %57, 2 ye kadar düşmüştür. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ozon anlamlı derecede canlı bakteri yüzdelerinde azalmaya neden olmuştur ($p<0.05$). Meydana gelen canlı bakteri yüzdelerindeki bu artışı biyofilm yapısının sahip olduğu avantajlardan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Biyofilm içindeki bakteriler antimikrobiyal ajanlara planktonik formlarından çok daha dirençlidirler. Özellikle biyofilm yaşı arttıkça bu dirençte artmaktadır. Zaman geçtikçe antimikrobiyal ajanların biyofilm bakterileri üzerine etkisinin azaldığı bir çok çalışma ile de gösterilmiştir (Auschill ve ark., 2001; Zaura-Arite ve ark., 2001; Kara, 2007; Takeuchi ve ark., 2007; Shen ve ark., 2011; Erdem ve ark., 2012).

Huth ve ark. (2011), tarafından yapılan in-vitro çalışmada, planktonik ve biyofilm olmak üzere 2 ayrı kültür ortamında, periodontopatojen bakteriler üzerine farklı dozlarda ozonun sıvı, gaz formları ve Chx' in antibakteriyel etkinlikleri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Biyofilm ortamında test gruplarından hiçbiri *A. actinomycetemcomitans*'ın ortadan kaldırılmasını tam olarak sağlayamazken; %2' lik Chx ve ozon gazı uygulanan örneklerde *P.gingivalis*, *T. forsythia* ve *P. micra*'nın tamamen yok edildiği bildirilmiştir. Antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalara olan etkisi biyofilm kültürüne göre planktonik kültürde daha başarılı bulunmuştur. Araştırmada, hem biyofilm hem de planktonik kültür ortamında ozonize gazı %2' lik Chx uygulaması ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmadığı belirtilmiş, ancak %0.2 Chx uygulamasına göre daha başarılı olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışma sonuçlarından farklı olarak tez çalışmamızda 6 ve 24 saatte oluşmuş biyofilm bakterileri üzerine ozon uygulanmış grup, Chx uygulanmış gruba göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha etkili bulunmuştur. 6. saatte yüksek çürük

aktiviteli grupta ozon uygulanan grupta cansız bakteri yüzdesi %93,4 iken çürüksüz grupta %93 olarak bulunmuştur. Chx uygulanmış grupta ise yüksek çürük aktiviteli grupta cansız bakteri yüzdesi %77,2 iken çürüksüz grupta bu değerler %79,2 dir. 24. saatte ozon ve Chx' in cansız bakteri yüzdeleri sırası ile yüksek çürük aktiviteli grupta %83,4 ve %71,8 olarak bulunmuştur. Çürüksüz grupta ise bu değerler sırası ile %85,2 ve %72, 8 dir. 24. saatte ozon ve Chx uygulanmış grupların biyofilm bakterileri üzerine etkisi düşüş göstermiş olsa da salin grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde canlı bakteri yüzdelerini azaltmıştır ($p<0.05$). 24. saatte iki ajanın etkinliği karşılaştırıldığında ise ozon Chx' e göre daha başarılı bulunmuş, istatistiksel olarak anlamlı şekilde canlı bakteri yüzdelerini düşürmüştür ($p<0.05$).

Bu durum ile ilgili olarak Huth ve ark. (2009, 2011) yaptıkları iki çalışmada da ozonun etkisinin doza, zamana ve test edilen mikroorganizma türüne bağlı olarak farklılık gösterdiğini belirtmektedir. Ayrıca ozonun etkinliği uygulandığı bakteri topluluğunun özelliğine bağlı olarak ta değişmektedir (Shen ve ark. 2011).

Antimikrobiyal ajanların etkilerini artırmak için farklı ajanlarla kombine kullanılması fikri giderek yaygınlaşmıştır. Araştırmacılar farklı iki antimikrobiyal ajanı kombine kullanarak ajanların sahip oldukları özelliklerini artırmayı hedeflemektedirler. (Maia ve ark., 2003). Şimdiye kadar yaptığımız literatür taramasında Chx ve fluor gibi ajanların kombine kullanımıyla ilgili bir çok çalışmaya rastlanılmış bu çalışmalarda kombine kullanımının ajanların etkinliğini artırdığına dair sonuçlar elde edilmiştir (Tvetman ve Petersson, 1997; Zaura-Arite ve Ten Cate, 2000; Atukeren 2001; Baygın ve ark., 2013; Erdem ve ark., 2012).

Ozonun farklı antimikrobiyal ajanlar ile birlikte kullanımıyla ilgili yaptığımız inceleme sonrası, ozonun sadece kök kanal tedavisinde mevcut faydalarını artırmak adına sodyum hipoklorit ile kombine kullanıldığı 1 tez çalışmasına rastlanılmıştır. Songür (2013), in-vivo koşullarda yapmış olduğu tez çalışmasında, sodyum hipoklorit ile yapılan irrigasyondan sonra kök kanallarının ozon gazı ile dezenfekte edilmesinin sonucunda, *C. albicans* miktarında meydana gelen azalmayı %99,4 olarak bulurken, *E. faecalis* miktarında meydana gelen azalmayı

%99,3' oranında bulmuştur. Her iki mikroorganizma için de meydana gelen azalma başlangıç değerlerine göre istatistiksel olarak anlamlıdır ve ajanların tek başına olan etkinliklerine göre de istatistiksel olarak daha etkilidir ($p<0,05$). Bu durumu, ozonun organik doku çözücü özelliğinin bulunmamasına ilaveten tek başına kullanıldığında organik doku varlığının, ajanın antibakteriyel etkinlik süresini kısaltmasına bağlı olarak oluşabileceğini, %2,5'lik sodyum hipoklorit solüsyonu ile yapılan irrigasyonu takiben ozon ile dezenfeksiyonun ise, hem organik dokunun uzaklaştırılmış olması sebebi ile ozonun daha etkili olacağı, hem de iki kuvvetli ajanın birlikteliğinin ilave antibakteriyel etkinlik sağlayarak diğer gruplara oranla daha başarılı olmasına bağlamıştır.

Ozonun in-situ koşullarda fluor ve Chx ile kombine kullanımı ile ilgili şu ana kadar yaptığımız literatür taramasında herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. O yüzden ozonun tek başına ve diğer antimikrobiyal ajanlarla kombine kullanımının farklı zamanlarda elde edilmiş biyofilm bakterileri üzerine etkisini değerlendirdiğimiz tez çalışmamızın sonuçlarının başka bir çalışma ile karşılaştırılması yapılamamıştır.

İn situ koşullarda gerçekleştirdiğimiz tez çalışmamızda 6. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozonun tek başına uygulanması sonrası cansız bakteri yüzdesi yüksek çürük aktiviteli grupta %93,4 iken bu değerler ozonun fluor ile kombine uygulandığı grupta %91,6, ozonun Chx ile uygulandığı grupta ise % 96,6 olarak bulunmuştur. Çürüksüz grupta ise değerler ozon grubunda %93, ozon fluor grubunda %92,4, ozon Chx grubunda ise, %95,4 tir. Ajanların hepsi salin grubu ile karşılaştırıldığında cansız bakteri yüzdelerini anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0.05$). Ozonun Chx ile kombine uygulanması bu artışın daha da fazla olmasına neden olmuştur. Ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

24. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozonun tek başına uygulanması sonrası cansız bakteri yüzdesi yüksek çürük aktiviteli grupta %83,4 iken bu değerler ozonun fluor ile kombine uygulandığı grupta %85, 6, ozonun Chx ile uygulandığı grupta ise %86,4 olarak bulunmuştur. Çürüksüz grupta ise değerler ozon grubunda

%85,2, ozon-fluor ve ozon-Chx grubunda ise, %88, 6' dır. Uygulanmış antimikrobiyal ajanların hepsi salin grubu ile karşılaştırıldığında cansız bakteri yüzdelerini anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0.05$). Ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulanması bu artışın daha da fazla olmasına neden olmuştur. Ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

48. saatte oluşmuş biyofilm üzerine ozonun tek başına uygulanması sonrası cansız bakteri yüzdesi yüksek çürük aktiviteli grupta %57,2 iken bu değerler ozonun fluor ile kombine uygulandığı grupta %57,2, ozonun Chx ile uygulandığı grupta ise %58,2 olarak bulunmuştur. Çürüksüz grupta ise değerler ozon grubunda %65, ozon fluor grubunda %66,2, ozon Chx grubunda ise, %66, 4 tir. Ajanların hepsi salin grubu ile karşılaştırıldığında cansız bakteri yüzdelerini anlamlı şekilde artırmıştır ($p<0.05$). Ozonun Chx ile kombine uygulanması bu artışın daha da fazla olmasına neden olmuştur. Yüksek çürük aktiviteli grupta ozon ve ozonun fluor ile kombine kullanımı aynı düzeyde artışa neden olmuştur. Çürüksüz grupta ise ozonun fluor ve Chx ile kullanımı ozonun tek başına kullanımına göre daha etkili bulunmuştur. Ancak aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0.05$).

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

OzonyTronX® cihazı ile 60 s ozon uygulamasının farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm kalınlık değerleri üzerine etkinliğinin fluor ve klorheksidin ile karşılaştırmalı olarak in-situ koşullarda değerlendirildiği çalışmamızda,

- 6, 24 ve 48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlıklarının çürüksüz gruba göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla olduğu ($p<0.05$)
- Yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da, en fazla biyofilm kalınlık değerlerinin 48. saatte en az biyofilm kalınlık değerlerinin ise 6. saatte olduğu; 6, 24 ve 48. saatler biyofilm kalınlık değerleri açısından değerlendirildiğinde ise aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerlerini kontrol grubuna göre azalttığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da en az biyofilm kalınlık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile ozon-fluor, ozon, Chx ve fluor gruplarının takip ettiği ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$)
- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerlerini kontrol grubuna göre azalttığı ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta en az biyofilm kalınlık değerinin ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu aynı biyofilm kalınlık değeri ile ozon ve Chx grubunun takip ettiği, fluor grubunun ise biyofilm kalınlık değerlerinde en az azalmaya neden olduğu ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$)

- 24. saatte çürüksüz grupta, en az biyofilm kalınlık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile ozon-fluor, ozon ve aynı biyofilm kalınlık değeri ile Chx ve fluor gruplarının takip ettiği ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm kalınlık değerlerinde kontrol grubuna göre azalmaya neden olduğu ancak bu azalmanın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en az biyofilm kalınlık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile ozon-fluor, ozon, Chx ve fluor gruplarının takip ettiği ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte çürüksüz grupta en az biyofilm kalınlık değerinin ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu aynı biyofilm kalınlık değeri ile ozon ve Chx grubunun takip ettiği, fluor grubunun ise biyofilm kalınlık değerlerinde en az azalmaya neden olduğu ancak antimikrobiyal ajan grupları arasında biyofilm kalınlık değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunmadığı ($p>0.05$) sonucuna varılmıştır.

OzonyTronX® cihazı ile 60 s ozon uygulamasının farklı zamanda oluşmuş biyofilm canlılık değerleri üzerine etkinliğinin fluor ve klorheksidin ile karşılaştırmalı olarak in-situ koşullarda değerlendirildiği çalışmamızda,

- 6, 24 ve 48. saatte yüksek çürük aktiviteli gruptaki canlı bakteri yüzdelерinin çürüksüz gruba göre daha fazla olduğu ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı ($p>0.05$)

- 6, 24 ve 48. saatlerde yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da biyofilm canlılık değerlerinin zaman geçtikçe arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa neden olmadığı ($p>0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı ($p>0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da en az biyofilm canlılık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile, ozon, ozon-fluor, Chx ve fluor gruplarının takip ettiği, ozonun tek başına, Chx ve fluor ile kombine uygulandığı gruplar Chx ve fluorun tek başına uygulandığı grup ile biyofilm canlılık değerleri açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da ozonun tek başına uygulandığı grup ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grup ile biyofilm canlılığı açısından değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 6. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruplar biyofilm canlılığı açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı ($p<0.05$)
- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en az biyofilm canlılık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile ozon-fluor, ozon, Chx ve fluor gruplarının takip ettiği, ozonun tek başına, Chx ve fluor ile kombine uygulandığı gruplar Chx ve fluorun tek başına uygulandığı grup ile biyofilm canlılık değerleri açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$)
- 24. saatte çürüksüz grupta, en az biyofilm canlılık değerinin aynı cansız bakteri yüzdesi ile ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı iki grupta elde edildiği, bunu sırası ile, ozon, Chx ve fluor gruplarının takip ettiği,

ozonun tek başına, Chx ve fluor ile kombine uygulandığı gruplar Chx ve fluorun tek başına uygulandığı grup ile biyofilm canlılık değerleri açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p<0.05$)

- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da ozonun tek başına uygulandığı grup ozonun Chx ve fluor ile kombine uygulandığı grup ile biyofilm canlılığı açısından değerlendirildiğinde aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 24. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx ve fluorun tek başına uygulandığı gruplar biyofilm canlılığı açısından karşılaştırıldığında aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da uygulanan antimikrobiyal ajanların biyofilm canlılık değerlerini kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı ($p<0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta, en az biyofilm canlılık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası aynı cansız bakteri yüzdesi ile ozon-fluor ve ozon grubunun takip ettiği, bu üç grup biyofilm canlılık değerleri açısından karşılaştırıldığında ise aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte çürüksüz grupta, en az biyofilm canlılık değerinin ozonun Chx ile kombine uygulandığı grupta elde edildiği, bunu sırası ile ozon-fluor ve ozon grubunun takip ettiği, bu üç grup biyofilm canlılık değerleri açısından karşılaştırıldığında ise aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da Chx' in, fluor grubuna göre biyofilm canlılığını daha fazla düşürdüğü ancak aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ($p>0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun tek başına uygulandığı grubun Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ($p<0.05$)
- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun Chx ile kombine uygulandığı grubun Chx ve fluorun tek başına uygulandığı

gruba göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ($p<0.05$)

- 48. saatte yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grup ta da ozonun fluor ile kombine uygulandığı grubun Chx ve fluor grubuna göre bakteri canlılığını istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde düşürdüğü ($p<0.05$) sonucuna varılmıştır.

Ozon ve ozonun diğer antimikrobiyal ajanlar ile kombine kullanımının farklı zamanlarda oluşmuş biyofilm üzerine etkinliğini konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak in-situ koşullarda değerlendirdiğimiz tez çalışmamızda, ozonun altın standart olarak ta değerlendirilen ve antimikrobiyal etkinlikleri birçok çalışma ile kanıtlanmış klorheksidin ve fluora göre çok daha başarılı antimikrobiyal etki gösterdiği özellikle erken zamanda oluşmuş biyofilm üzerine nerdeyse %100' e yakın bir başarı sağladığı ve bu nedenlerden ötürü çocuklarda çürük oluşumunun engellenmesi adına klinikte güvenilir bir şekilde kullanılabileceği kanısındayız.

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara dayanarak, ozon gazının fluor cila ve Chx cila ile kombine kullanımının antimikrobiyal etkiyi daha da fazla arttırdığı bu nedenle de ozon gazı ile etkin bir antimikrobiyal etki sonrası, fluor cila kullanımının fluorun remineralize edici özelliğinden dolayı oluşabilecek çürük lezyonlarının gelişimini daha iyi durdurulabileceği kanısındayız. Ayrıca çocuk hasta üzerinde ozonun fluor ve Chx ile kombine kullanımının biyofilm üzerine etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmaya rastlanılmaması nedeniyle, tez çalışmamızın sonuçlarının diş hekimliği klinik pratiğine yansıtılabileceğini ve bulgularımızın bu alanda yapılacak araştırmalara ışık tutabileceğini düşünmekteyiz. Ancak, biyofilm bakterilerinin sahip olduğu avantajlar nedeni ile antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin zaman geçtikçe azaltılabileceği ve her klinikte yüksek maliyetli bir ozon cihazı bulunamayacağı da göz önünde bulundurularak, ozonize su ile kombine edilerek yeni materyallerin geliştirilebileceği ya da biyofilm yapısının doğasının daha iyi anlaşılabilmesi ve klinikte rutin olarak kullandığımız fluor ve Chx gibi ajanların dirençli biyofilm yapısı üzerine etkinliğinin nasıl daha da fazla artırılabilceği ile ilgili klinik çalışmaların yapılması gerektiği kanısındayız.

ÖZET

Ozonun biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi

Bu çalışmada OzonyTronX® cihazı ile 60 s. ozon gazı uygulaması, Cervitec® Plus, Duraphat® cila ve ozon ile diğer ajanların birlikte kullanılmasının, diş çürüklerine neden olduğu bilinen biyofilm yapısının kalınlığı ve canlılığı üzerindeki etkinliğinin in-situ koşullarda konfokal lazer tarama mikroskobu ile karşılaştırmalı olarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamız, kliniğimize başvuran yaşları 11- 14 arasında değişen, üst çenesinde diş eksikliği bulunmayan tamamen sağlıklı 5'i yüksek çürük aktiviteli 5'i çürüksüz olmak üzere toplam 10 çocuk üzerinde gerçekleştirilmiştir. İn-situ koşullarda biyofilm elde etmek için çocukların üst çenelerine, üzerinde sığır dişlerinden elde edilmiş 6 adet örneğin yer aldığı, özel akrilik plaklar hazırlanmıştır. Bir sığır dişinden hassas kesit alma cihazı yardımı ile ~2mm genişliğinde ~3mm yüksekliğinde kesitler alınmış otaklavda steril edilmiştir. Örnekler, plak üzerinde hazırlanmış bukkal çıkıntı içine gömülmüş bu sayede biyofilm yapısı çevreden gelebilecek zararlı etkilere karşı korunmuştur. Örneklerin plaklara yerleştirilmesini takiben katılımcılara plakları 6, 24 ve 48 saat süreyle taşımaları gerektiği anlatılmıştır. Her bir saatin sonunda örnekler plaktan dikkatli bir şekilde alınmış aynı sığır dişinden elde edilmiş diğer 6 örnek ise plaklara yerleştirilmiştir. Örneklerin plaklardan uzaklaştırılmasını takiben laboratuvar işlemlerine geçilmiştir. Çürüksüz 5 kişinin yer aldığı grup Grup-1, yüksek çürük aktivitesine sahip 5 kişinin bulunduğu grup ise Grup- 2 olacak şekilde ayrılmıştır. 6. saatin sonunda grup-1'e ait örneklerden rastgele seçilmiş 1 örnek 1 dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış, ardından OzonyTronX® cihazı kullanılarak 60s boyunca 3. seviyede ozon tedavisi uygulanmıştır. 2. Örnek 1dk fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1 dk boyunca Cervitec® Plus cila uygulanmıştır. Örnekler fizyolojik salin ile tekrar yıkandıktan sonra ozon tedavisi uygulanmıştır. 3. örnek 1dk fizyolojik salin ile yıkanmış sonrasında 1dk boyunca Duraphat® cila uygulanmıştır. Tekrardan fizyolojik salin ile yıkanan örnekler ozon tedavisi uygulanmıştır. 4.örnek 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1dk boyunca Cervitec® Plus cila uygulanmıştır. 5. örnek 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmış ardından 1dk boyunca Duraphat® cila uygulanmıştır. 6.örnek sadece 1dk boyunca fizyolojik salin ile yıkanmıştır. Bu tedavi prosedürünün aynısı tüm katılımcılar için 24 ve 48 saat plak taşıdıktan sonrada da uygulanmıştır. Grup-2 ye ait katılımcılardan 6, 24 ve 48 saat sonunda elde edilen örnekler de rastgele olacak şekilde seçilmiş ve Grup-1' e uygulanan tedavi prosedürleri aynı şekilde uygulanmıştır. Örnekler uygulanan tedavi prosedürü sonrası tüm örnekler etidum bromide ve floresan diacetate boyaları ile boyanmıştır. Boyama işlemini takiben konfokal lazer tarama mikroskobunda değerlendirilmiştir.

Çalışmamızda gruplar arasında canlı mikroorganizma sayısı ve cansız hücre oranları yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testiyle incelenirken, gruplar içindeki farkın önemliliği ise Mann Whitney U testiyle değerlendirilmiş, $p<0.05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edilmiştir.

Konfokal lazer mikroskobu kullanılarak elde edilen biyofilm kalınlık değerlerinin istatistiksel analizi sonucu, yüksek çürük aktiviteli grupta biyofilm kalınlık değerlerinin çürüksüz gruptan istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha fazla olduğu bulunmuştur ($p<0.05$). Zaman geçtikçe biyofilm kalınlık değerleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde artmıştır ($p<0.05$). Uygulanan antimikrobiyal ajanlar biyofilm kalınlık değerlerinde azalmaya neden olmuştur ancak bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bir fark yaratmamıştır ($p>0.05$). Başarı sıralaması 6. saat için yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz iki grupta da; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması >

fluorun tek başına uygulanması > salin; 24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması = ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması = Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin; 24. saatte çürüksüz grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması = fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir. 48. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir. 48. saatte çürüksüz grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması = ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması = Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir.

Konfokal lazer mikroskobu kullanılarak elde edilen biyofilm canlılık değerlerinin istatistiksel analizi sonucu, zaman geçtikçe biyofilm canlılık oranlarının arttığı ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmadığı bulunmuştur ($p>0.05$). Antimikrobiyal ajanlar ise her bir zaman diliminde canlı bakteri yüzdeleri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür ($p<0.05$). Başarı sıralaması 6. saat için yüksek çürük aktiviteli ve çürüksüz grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir. 24. saatte yüksek çürük aktiviteli grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin, çürüksüz grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması = ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir. 48. saatte ise yüksek çürük aktiviteli grupta; ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması = ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin; çürüksüz grupta, ozon gazının Chx ile birlikte uygulanması > ozon gazının fluor ile birlikte uygulanması > ozon gazının tek başına uygulanması > Chx' in tek başına uygulanması > fluorun tek başına uygulanması > salin şeklindedir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara dayanarak, ozon gazının biyofilm bakterileri üzerine etkili bir ajan olması nedeniyle özellikle klinikte rutin olarak kullanılan fluor cila ya da alternatif olarak kullanılabileceği bununla birlikte antimikrobiyal etkisini artırmak adına fluor cila ve Chx cila ile kombine kullanımının daha etkili sonuçlar verebileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca ozon gazı ile etkin bir antimikrobiyal etki sonrası, fluor cila kullanımının fluorun remineralize edici özelliğinden dolayı oluşabilecek çürük lezyonlarının gelişimini de daha iyi durdurulabileceği kanısındayız. Ancak biyofilm bakterilerinin sahip olduğu avantajlar nedeni ile antimikrobiyal ajanların etkilerinin zaman geçtikçe azaldığı ve bu nedenle biyofilm yapısının doğasının daha iyi anlaşılabilmesi ve ozon gibi etkili ajanların dirençli biyofilm üzerine etkinliğinin nasıl daha da fazla artırılabilmesiyle ilgili klinik çalışmaların yapılması gerektiği düşüncesindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Biyofilm, antimikrobiyal ajan, klorheksidin, fluor, ozon, konfokal lazer tarama mikroskobu, in-situ

SUMMARY

Assessment of antibacterial efficiency of the ozone on biofilm

The purpose of this study is to make a comparative assessment of the efficiency of ozone gas application with OzonyTronX[®] device for 60 s and use of Cervitec[®]Plus, Duraphat[®] polish and ozone and other agents on thickness and vitality of the biofilm structure known to cause tooth decays using a confocal laser scanning microscope on in-situ conditions.

Our study was applied to 10 children applying to our clinic, 5 of whom being with active decays and 5 without any decays, who are in completely healthy condition without any missing teeth on the maxilla and whose ages vary between 11-14. Special acrylic plaques, on which 6 samples obtained from cattle teeth are located, were arranged for the maxillae of the children to obtain the biofilm on in-situ conditions. With the help of the sectioning device, sections at ~2mm width and ~3mm height were taken from a cattle tooth and sterilized in the autoclave. The samples were embedded in the buccal protrusion prepared on the plaque, thus the biofilm structure was protected against external harmful effects. Following the positioning of the samples on the plaques, the participants were told to carry the plaques for 6, 24 and 48 hours. At the end of every hour, the samples were carefully taken from the plaque and other 6 samples obtained from the same cattle tooth were positioned on the plaques. After the samples were removed from the plaques, laboratory studies began. They were separated as Group 1 made of 5 participants with without any decays and Group 2 of 5 participants with high decay activity. At the end of six hours, 1 sample randomly selected among the samples from Group 1 was washed with physiologic salin for 1 minute, then 3rd level ozone treatment was applied for 60 s using OzonyTronX[®] device. The second sample was washed with physiologic salin and Cervitec[®]Plus polish was applied for 1 minute. After the samples were washed again with physiologic salin, ozone treatment was applied. The third sample was washed with physiologic salin and Duraphat[®] polish was applied for 1 minute. After the samples were washed with physiologic salin, ozone treatment was applied again. The fourth sample was washed with physiologic salin and Cervitec[®]Plus polish was applied for 1 minute. The fifth sample was washed with physiologic salin and Duraphat[®] polish was applied for 1 minute. The sixth sample was only washed with physiologic salin for 1 minute. The same treatment procedure was applied for all participants after they have carried the plaques for 24 and 48 hours. Samples obtained from participants in Group 2 at the end of 6, 24 and 48 hours were selected randomly and the same treatment procedure applied to Group 1 was applied to Group 2. Following the treatment procedure applied to samples, all samples were colored with ethidium bromide and fluorescent diacetate dyes. After coloring, the samples were evaluated at the confocal laser scanning microscope.

While the significance of difference between the groups in our study in terms of number of viable microorganisms and the dead cell rates was reviewed with the Kruskal Wallis test, the significant of difference between the groups was evaluated with the Mann Whitney U test, results for $p < 0.05$ was considered statistically significant.

As a result of the statistical analysis of the biofilm thickness values obtained by using the confocal laser microscope, the biofilm thickness values in the group with active decays were obtained to be statistically significantly higher than that of the group with not decays ($p < 0.05$). The biofilm thickness values increased statistically significantly in time ($p < 0.05$). The applied antimicrobial agents caused a decrease in the biofilm thickness values, but this decrease did not result in a statistically significant difference ($p > 0.05$). The success rating for the 6th hour in both of the group with active decays and

the group without decay is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin; for the 24th hour in the group with decays, application of the ozone gas with Chx = application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely = application of Chx solely > application of fluorine solely > application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely = application of fluorine solely > salin. For the 48th hour in the group with active decays, it is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin. For the 48th hour in the group with no decays, it is application of the ozone gas with Chx = application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely = application of Chx solely > application of fluorine solely > salin.

As a result of the statistical analysis of the biofilm viability values obtained by using the confocal laser microscope, it was determined that the biofilm viability rates increased in time but this increase did not cause a statistically significant difference was found ($p < 0.05$). Antimicrobial agents decreased the viable bacteria percentages statistically significantly in every time period ($p < 0.05$). The success rating for the 6th hour in the groups with active decays and with no decays, is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas solely > application of the ozone gas with fluorine > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin. For the 24th hour in the group with active decays, it is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin; and for the group without decays, it is application of the ozone gas with Chx = application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin. For the 48th hour in the group with active decays, it is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas with fluorine = application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin; and for the group without decays, it is application of the ozone gas with Chx > application of the ozone gas with fluorine > application of the ozone gas solely > application of Chx solely > application of fluorine solely > salin.

Basing on the findings of our study, we suggest that the ozone gas, for being an efficient agent on biofilm bacteria, can be used as an alternative to fluorine polish used especially in clinic on routine basis, and use in combination with fluorine polish and Chx polish to increase the antimicrobial effects can provide more efficient results. Furthermore, we believe use of fluorine polish after an efficient antimicrobial effect with the ozone gas can better prevent development of decay lesions possibly to occur due to remineralizing character of fluorine. We believe, however, further clinical studies are required with regard to decreased amount of antimicrobial agents in time due to advantages of biofilm bacteria, better understanding of the biofilm nature and how the efficiency of agents like ozone on the enduring biofilm can be enhanced.

Key words: Biofilm, antimicrobial agent, chlorhexidine, fluorid, ozone, confocal laser scanning microscope, in-situ.

KAYNAKLAR

- ACHONG, R.A., BRISKIE, D.M., HILDEBRANDT, G.H., FEIGAL, R.J., LOESCHE, W.J. (1999). Effect of chlorhexidine varnish mouthguards on the levels of selected oral microorganisms in pediatric patients. *Pediatr Dent.*, **21**: 169-75
- AKTAŞ, A., GİRAY, B., MENEMENLİOĞLU, D., HAYRAN, M. (2008). %0.2 Klorheksidin Diglukonat Gargara Kullanımının Oral Flora Üzerine Kısa Dönem Etkileri. *Hacettepe Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, **32** : 81-93.
- ALAÇAM, T. (2000). Dentin ve pulpa tedavileri. In: Endodonti, Ed.: T. Alaçam, İ. Uzel, A. Alaçam, M. Aydın. Ankara: Barış Yayınları
- AL-HMOUD, N.D., AL-ADHAM, I.S.I., KIERANS, M., BUULTJENS, T.E.J., COLLIER, P.J. (2013). A Novel Binary Biofilm Model For The Study Of The Development Of Antimicrobial Tolerance In *Pseudomonas Aeruginosa* Pao1 And *Escherichia Coli*. *International Arabic Journal of Antimicrobial Agents.*, **3**: 1-9
- ALTUN, H.U., ŞENER, B. (2008). Biyofilm infeksiyonları ve antibiyotik direnci. *Hacettepe Tıp Dergisi*, **39**: 82-8
- AMARAL, M.T., GUEDES-PINTO, A.C., CHEVITARESE, O. (2006). Effects of a glass ionomer cement on the remineralization of occlusal caries-an in situ study. *Braz Oral res.*, **20**: 91-96
- ANONYMUS (2010a). Technolgy. Erişim: [<http://www.ozonedentistry.eu>]. Erişim tarihi: 14.11.10.
- ANONYMUS(2010b).OzonytronX.Erişim:[<http://web.mac.com/hayesdavies/ozonytron/X.html>]. Erişim tarihi: 15.11.10.
- ANONYMUS (2011a). OzonytronX. Erişim: [<http://www.ozonedentistry.eu/cgi-bin/download.cgi>] Erişim Tarihi: 08.3.2011.
- ANONYMUS (2011b). OzonytronX. Erişim: [<http://www.topikalozon.com.tr>] Erişim Tarihi: 08.03.2011.
- ANONYMUS (2011c). OzonytronX. Erişim: [<http://www.tuev-sued.de>] Erişim Tarihi: 10.03.2011
- ANONYMUS (2011d). OzonytronX. Erişim: [<http://www.meditazone.com>] Erişim Tarihi: 02.03.2011
- ANWAR, H., STRAP, J.L., COSTERTON, J.W. (1992). Establishment of aging biofilms: possible mechanism of bacterial resistance to antimicrobial therapy. *Antimicrob Agents Chemother.*, **36**: 1347-51
- ARAUJO, A. M., NASPITZ, G. M., CHELOTTI, A., CAI, S. (2002). Effect of Cervitec on Mutans streptococci in plaque and on caries formation on occlusal fissures of erupting permanent molars. *Caries Research.*, **36**: 373–376
- ARIAS-MOLIZ, M.T., FERRER-LUQUE, C.M., ESPIGARES-GARCIA, M., BACA, P. (2009). *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *J Endod.*, **35**: 711-714

- ARITA, M., NAGAYOSHI, M., FUKUIZUMI, T., OKINAGA, T., MASUMI, S., MORIKAWA, M., ET, A.L. (2005). Microbicidal efficacy of ozonated water against *C.Albicans* adhering to acrylic denture plates. *Oral Microbiology & Immunology.*, **20**: 206-10
- ARWEILER, N.B., HENNING, G., REICH, E., NETUSCHIL, L.(2002). Effect of an amine-fluoride-triclosan mouth-rinse on plaque regrowth and biofilm vitality.*Clin Periodontol.*, **29**: 358–363
- ARWEILER, N.B., NETUSCHIL, L., REICH, E.(2001).Alcohol-free mouthrinse solutions to reduce supragingival plaque regrowth and vitality: A controlled clinical study. *J Clin Periodontol*,**28**:168–174.
- ARWEILER, N.B., HELLWIG, E., SCULEAN, A., HEIN, N., AUSCHILL, T.M. (2004). Individual vitality pattern of in situ dental biofilms at different locations in the oral cavity. *Caries Res.*, **38** : 442-7
- ASSMUS, B., HAUSNER, M., GRENIER, D., SCHLOTER, M., HARTMANN, A., GOLDNER, M. (1997). Direct examination of subgingival plaque from adiseased periodontal site using confocal laser scanningmicroscopy (CLSM). *New Microbiol.*, **20**: 155–9
- ATAOĞLU, T., GURSEL, M. (1997). Dişler Üzerindeki Eklentiler. *Periodontoloji Damla Ofset*; 25–30.
- ATTİN, R., TUNA, A., ATTIN, T., BRUNNER, E., NOACK, M.J. (2003). Efficacy of differently concentrated chlorhexidine varnishes in decreasing Mutans streptococci and Lactobacilli counts. *Archives of Oral Biology.*, **48**: 503–509
- ATUKEREN, J. (2001). Klorheksidin vernikleri ve floridile kombine kullanımlarının çocuklarda tükürük ve plak florasına etkileri. Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enst. Doktora Tezi; İSTANBUL.
- AUSCHILL, T. M., HELLWIG, E., HEIN, N., SCULEAN, A. & ARWEILER, N. B. (2004). Impact of the intraoral location on the rate of biofilm growth. *Clinical Oral Investigations.*, **8**: 97–101
- AUSCHILL, T.M., ARWEILER, N.B., NETUSCHIL, L., BRECX, M., REICH, E., SCULEAN, A. (2001). Spatial distribution of vital and dead microorganisms in dental biofilms. *Arch Oral Biol.*, **46**: 471–476
- AUSCHILL, T.M., ARWEILER, N.B., SCULEAN, A., BRECX, M., REICH, E., NETUSCHIL, L. (2002). The effect of dental restorative materials on dental biofilm. *Eur J Oral Sci.*, **110**: 48–53
- AUSCHILL, T.M., HEIN, N., HELLWIG, E., FOLLO, M., SCULEAN, A., ARWEILER, N.B. (2005). Effect of two antimicrobial agents on early in situ biofilm formation. *J Clin Periodontol.*, **32**: 147–152
- AUTIO-GOLD, J., COURTS, F. (2001). Assessing the effect of fluoride varnish on early enamel carious lesions in the primary dentition. *J Am Dent Assoc.*, **132**: 1247–1253

- AXELSSON, P., KRISTOFFERSSON, K., KARLSSON, R., BRATTHALL, D. (1987). A 30-month longitudinal study of the effects of some oral hygiene measures on *Streptococcus mutans* and approximal dental caries. *J Dent Res.*, **66**: 761-5
- AXELSSON, P., LINDHE, J. (1987). Efficacy of mouthrinses in inhibiting dental plaque and gingivitis in man. *J Clin Periodontol.*, **14**: 205-12
- AZARPAZHOOH, A., LIMEBACK, H. (2008). The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent.*, **36**: 104-16
- BAEHNI, P.C., TAKEUCHI, Y. (2003). Anti-plaque agents in the prevention of biofilm-associated oral diseases. *Oral Dis.*, **9**: 23-29
- BAYGIN, O., TUZUNER, T., OZEL, M.B., BOSTANOGLU, O. (2013). Comparison of combined application treatment with one-visit varnish treatments in an orthodontic population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, **18**: 362-70
- BAYIRLI, G., ŞİRİN, Ş. (1982). Konservatif Diş Tedavisi. İstanbul: Dünya Tıp Kitabevi Ltd. Şti.
- BAYSAN, A., LYNCH, E. (2004). Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent.*, **17**: 56-60
- BAYSAN, A., WHILEY, R.A., LYNCH, E. (2000). Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on micro-organisms associated with primary root carious lesions in vitro. *Caries Res.*, **34**: 498-501
- BELTRAN-AGUILAR, E.D., GOLDSTEIN, J.W., LOCKWOOD, S.A. (2000). Fluoride varnishes: A review of their clinical use, cariostatic mechanism, efficacy and safety. *J Am Dent Assoc.*, **131**: 589-596
- BERNİMOULİN, J.P. (2003). Recent concepts in plaque formation. *J Clin Periodontol.*, **30**: 7-9
- BEZIRTZOĞLOU, E., CRETOIU, S.M., MOLDOVEANU, M., ALEXOPOULOS, A., LAZAR, V., NAKOU, M. (2008). A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *Journal of Dentistry.*, **36**: 600-5
- BIEDLINGMAIER, J.F., SAMARANAYAKE, R., WHELAN, P. (1998). Resistance to biofilm formation on otologic implant materials. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, **118**: 444-51
- BOCCI, V.A. (2006). Scientific and medical aspects of ozone therapy. State of the art. *Arch Med Res.*, **37**: 425-35
- BORSATTO, M.C, CORONA, S.A, DIBB, R.G, RAMOS, R.P, PECORA, J.D. (2001). Microleakage of resin sealant after asit-etching, Er:Yag laser irradiation and airabrasion of pits and fissures. *J Clin. Laser Med Surg.*, **19**: 83-87
- BOS, R., VAN DER MEI, H.C., BUSCHER, H.J. (1999). Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev.*, **23**: 179-230

- BOTHWELL, M.R., SMITH, A.L., PHILLIPS, T. (2003). Recalcitrant otorrhea due to *Pseudomonas* biofilm. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, **129** :599-601
- BOWDEN, G.H. (1998). Effects of fluorides on the microbial ecology of dental plaque. *J Dent Res.*, **79**: 261-263
- BOWDEN, G., EDWARDSSON, S. (1994). Oral ecology and dental caries. Thylstrup A., Fejerskov O. Textbook of Clinical Cariology, *Munksgaard, Copenhagen, Third Edition; Chapter 3*: 51–69
- BOWDEN, G.H. (1990). Microbiology of root surface caries in humans. *J Dent Res.*, **69**: 1205-10
- BRADSHAW, D.J., MARSH, P.D., HODGSON, R.J., VISSER, J.M. (2002). Effect of glucose and fluoride on competition and metabolism within in vitro dental bacterial communities and biofilms. *Caries Res.*, **36**: 81-86
- BRADSHAW, D.J., MARSH, P.D., WATSON, G.K., ALLISON, C. (1997). Effect of conditioning films on oral microbial biofilm development. *Biofoul.*, **11**: 217–226
- BROCK, T. D. (2003). Great Events in Microbiology: Significant Events of the Last 125 Years. www.scientifichistory.com(erişim tarihi: 08.04.2003).
- BROWN, M.R., ALLISON, D.G., GILBERT, P. (1988). Resistance of bacterial biofilms to antibiotics: a growth-rate related effect? *J Antimicrob Chemother.*, **22**: 777-80
- BRYCE, G., O'DONNELL, D., READY, D., NG, Y.L., PRATTEN, J., GULABIVALA, K. (2009). Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. *J Endod.*, **35**: 1243-1248
- BULLITT, E., MAKOWSKI, L. (1995). Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature*. **12** : 164-7
- CAIN, B.E., CORPRON, R.E., FEE, C.L., STRACHAN, D.S., KOWALSKI, C.J. (1994). Dose related remineralization using intraoral fluoride-releasing devices in situ. *Caries Res.*, **28**: 284-290
- CAMOSCI, D.A., TINANOFF, N. (1984). Anti-bacterial determinants of stannous fluoride. *J Dent Res.*, **63**: 1121-1125
- CAMP, J.H., FUKS, A.B. (2006). Pediatric endodontics: Endodontic treatment for the primary and young permanent dentition. In: *Pathways of the Pulp*, Ed.: S. Cohen, K.M. Hargreaves. IX. Baskı, Toronto, Mosby Inc, Chapter 22.
- CARVALHO, J.C., EKSTRAND, K.R., THYLSTRUP, A. (1989). Dental plaque and caries on occlusal surfaces of first permanent molars in relation to stage of eruption. *J Dent Res.*, **68**: 773-9
- CASTILLO, A., GALINDO-MORENO, P., AVILA, G., VALDERRAMA, M., LIÉBANA, J., BACA, P. (2008). In vitro reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application. *Quintessence Int.*, **39**: 827-31

- CAUFIELD, P.W., CUTTER, G.R., DASANAYAKE, A.P. (1993). Initial acquisition of mutans streptococci by infants: evidence for a discrete window of infectivity. *J Dent Res.*, **72**: 37-45
- CAUFIELD, P.W., LI, Y., DASANAYAKE, A. (2005). Dental caries: an infectious and transmissible disease. *Compend Contin Educ Dent.*, **26** :10-6
- CERI, H., OLSON, M.E., STREMECK, C., READ, R.R., MORCK, D., BURET, A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol.*, **37**: 1771-6
- CLARK, J.W., MORE, F.G., CORPRON, R.E., KORYTNICKI, D., KOWALSKI, C.J.(1986). Effects on Artificial Enamel Lesions In Vivo By Exposure To Naf Lozenges. *Caries Res.*, **20**: 465-472
- COLLINS, L.M., DAWES, C. (1987). The surface area of the adult human mouth and thickness of the salivary film covering the teeth and oral mucosa. *J Dent Res.*, **66**: 1300-2
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent Infections., *Science.*, **284**: 1318-22
- COSTERTON, J.W., LEWANDOWSKI, Z., CALDWELL, D.E., KORBER, D.R., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1995). Microbial Biofilms. *Annu Rev Microbiol.*, **49**: 711-45
- COSTERTON, J. W., GEESEY, G.G., CHENG, G.K. (1978). How bacteria stick. *Sci. Am.*, **238**: 86–95
- COSTERTON, J. W., LEWANDOWSKI, Z., DEBEER, D., CALDWELL, D., KORBER, D., JAMES, G. (1994). Biofilms the Customized Microniche. *J. Bacteriol.*, **176**: 2137-2142
- COSTERTON, J.W., CHENG, K.J., GEESEY, G.G., LADD, T.I., NICKEL, J.C., DASGUPTA, M., MARRIE, T.J. (1987). Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol.*, **41**: 435-64
- COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent Infections. *Science.*, **284**: 1318-22
- COSYN, J., WYN, I., DE, ROUCK, T., COLLYS, K., BOTTENBERG, P., MATTHIJS, S., SABZEVAR, M.M. (2005). Short-term anti-plaque effect of two chlorhexidine varnishes. *J Clin Periodontol.*, **32**: 899-904
- CVITKOVITCH, D.G. (2001). Genetic competence and transformation in oral streptococci. *Crit Rev Oral Biol Med.*, **12**: 217–43
- ÇİFTÇİ, Z. (2005). Kronik tonsillitte biyofilmin rolü. İstanbul: Taksim Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Uzmanlık Tezi: 1-69
- DAVEY, M.E., O'TOOLE, G.A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **64**: 847-67
- DAVISON, J. (1999). Genetic exchange between bacteria and environment. *Plasmid.*, **42**: 73-91

- DAVIDSON, C.L., BOOM, G., ARENDS, J. (1973). Calcium distribution in human and bovine surface enamel. *Caries Res.*, **7**: 349-59
- DAVIES, D. (2014). Biofilms Erişim: [<http://2011.igem.org/Team:Glasgow/Biofilm>] Erişim Tarihi: 18.1.2014.
- DAVIES, D.G., PARSEK, M.R., PEARSON, J.P., IGLEWSKI, B.H., COSTERTON, J.W., GREENBERG, E.P. (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science.*, **280**: 295-298
- DECKER, E.M., WEIGER, R., VON OHLE, C., WIECH, I., BRECX, M. (2003). Susceptibility of planktonic versus attached *Streptococcus sanguinis* cells to chlorhexidine. *Clin Oral Investig.*, **7**: 98-102
- DEPAOLA, L.G., OVERHOLSER, C.D., MEILLER, T.F., MINAH, G.E., NIEHAUS, C. (1989). Chemotherapeutic inhibition of supragingival dental plaque and gingivitis development. *J Clin Periodontol.*, **16**: 311-5
- 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 fluorescence in situ hybridization. *Eur J Oral Sci. Dec.*, **115**: 459-67
- DIJKMAN, A., HUIZINGA, E., RUBEN, J., ARENDS, J. (1990). Remineralization of Human Enamel In-Situ After 3 Months: The Effect of Not Brushing Versus The Effect of An F Dentifrice and an F-Free Dentifrice. *Caries Res.*, **24**: 263-266
- DIJKMAN, A.G., SCHUTHOF, J., ARENDS, J. (1986). In-Vivo Remineralization of Plaque-induced Initial Enamel Lesions-a Microradiographic Investigation. *Caries Res.*, **20**: 202-208
- DONLAN, R.M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Inf. Disease.*, **8**: 881-890
- DONLAN, R.M., COSTERTON, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms Review. *Clin Microbiol.*, **15**: 167-93
- DREWNOWSKI, A., POPKIN, B. (1997). The Nutrition Transition: New Trends In The Global Diet. *Nutr Rev.*, **55**: 31-43
- DUGGAL, M.S., TOUMBA, K.J., AMAECHI, B.T., KOWASH, M.B., HIGHAM, S.M. (2001). Enamel Demineralization In-Situ with Various Frequencies of Carbohydrate Consumption With and Without Fluoride Toothpaste. *J Dent Res.*, **80**: 1721-1724
- EDGAR, W.M., HIGHAM, S.M. (1995). Role of Saliva in Caries Models. *Adv Dent Res.*, **9**: 235-238
- EICK, S., TTGAN, M., SCULEAN, A. (2012). Effect of ozone on periodontopathogenic species: an in vitro study. *Clin Oral Investig.*, **16**: 537-44
- EKENBACK, S.B., LINDER, L.E., SUND, M-L., LO ÈNNIES, H. (2001). Effect of fluoride on glucose incorporation and metabolism in biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Eur J Oral Sci.*, **109**: 182-186

- EKENBÄCK, S.B., LINDER, L.E., LÖNNIES, H. (2000). Effect of four dental varnishes on the colonization of cariogenic bacteria on exposed sound root surfaces. *Caries Res.*, **34**: 70-4
- ELMAS, E.Y. (2007). Şekersiz (tatlandırıcı) sakızlara ilave edilen florid içerikli bileşiklerin mine başlangıç çürük lezyonları üzerindeki remineralizasyon etkisinin, insitu değerlendirilmesi. *İstanbul Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*.
- EMILSON, C.G. (1994). Potential efficacy of chlorhexidine against mutans streptococci and human dental caries. *J Dent Res.*, **73**: 682-691
- ERDEM, A.P., SEPET, E., KULEKCI, G., TROSOLA, S.C., GUVEN, Y. (2012). Effects of Two Fluoride Varnishes and One Fluoride/Chlorhexidine Varnish on Streptococcus mutans and Streptococcus sobrinus Biofilm Formation in Vitro. *International Journal of Medical Sciences.*, **9**:129-136
- FAGRELL, T.G., DIETZ, W., LINGSTRÖM, P., STEINIGER, F., NORÉN, J.G. (2008). Effect of ozone treatment on different cariogenic microorganisms in vitro. *Swed Dent J.*, **32**:139-47
- FALLER, R.V. (1995). The Application of Insitu Models for Evaluation of New Fluoride-Containing Systems. *Adv Dent Res.*, **9**: 290-299
- FARDAL, O., TURNBULL, R.S. (1986). A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc.*, **112**: 863-9
- FEAGIN, F., KOULOURIDES, T., PIGMAN, W. (1969). The characterization of enamel surface demineralization, remineralization, and associated hardness changes in human and bovine material. *Arch Oral Biol.*, **14**: 1407-17
- FEATHERSTONE, J.D., ZERO, D.T. (1992). An In-situ Model for Simultaneous Assessment of Inhibition of Demineralization and Enhancement of Remineralization. *J Dent Res.*, **71**: 804-810
- FEATHERSTONE, J.D.B. (1999). Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol.*, **27**: 31-40
- FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A. (1994). The oral environment- an introduction. In: Textbook of Clinical Cariolog., Ed.: Thystrup, O. Fejerskov. 2nd Ed. Copenhagen: Munksgaard, p.:16.
- FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A., LARSEN, M.J. (1981). Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand.*, **39**: 241-249
- FEJERSKOV, O. (2004). Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. *Caries Res.*, **38**: 182-91
- FEJERSKOV, O., NYVAD, B. (2003). Is dental caries an infectious disease? Diagnostic and treatment consequences for the practitioner; in Schou L (ed): Nordic Dentistry 2003 Yearbook. Copenhagen, Quintessence Publishing, pp 141– 151
- FOLEY, I., MARSH, P., WELLINGTON, E.M., SMITH, A.W., BROWN, M.R. (1999). General stress response master regulator rpoS is expressed in human infection: a possible role in chronicity. *J Antimicrob Chemother.*, **43** :164-5

- FOSTER, J.S., KOLENBRANDER, P.E. (2004). Development of a multispecies oral bacterial community in a saliva-conditioned flow cell. *Appl Environ Microbiol.*, **70**: 4340-8
- FOSTER, J.S., PAN, P.C., KOLENBRANDER, P.E. (2004). Effects of antimicrobial agents on oral biyofilms in saliva conditioned flowcell. *Biyofilms.*, **1**: 5-12
- FRAUD, S., MAILLARD, J.Y., DENYER, S.P., KAMINSKI, M.A., HANLON, G.W. (2007). A simulated oral hygiene model to determine the efficacy of repeated exposure of amine oxide on the viability of *Streptococcus mutans* biyofilms. *Eur J Oral Sci.*, **115**: 71-6
- FROSTELL, G., BIRKHED, D., EDWARDSSON, S., GOLD-BERG, P., PETERSSON, L.G., PRIWE, C., WINHOLT, A.S. (1991). Effect of partial substitution of invert sugar for sucrose in combination with Duraphat treatment on caries development in preschool children: *The Malmo study. Caries Res.*, **25**: 304–310
- GERARDU, V.A., BUIJS, M.J., TEN CATE, J.M., VAN LOVEREN, C. (2003). The effect of a single application of 40% chlorhexidine varnish on the numbers of salivary mutans streptococci and acidogenicity of dental plaque. *Caries Res.*, **37**: 369-73
- GIERTSEN, E., SCHEIE, A.A. (1995). Effects of chlorhexidine-fluoride mouthrinses on viability, acidogenic potential, and glycolytic profile of established dental plaque. *Caries Res.*, **29**: 181-7
- GILBERT, P., J. DAS., I. FOLEY. (1997). Biyofilms susceptibility to antimicrobials. *Adv. Dent. Res.*, **11**: 160–167
- GIERTSEN, E., GUGGENHEIM, B., THURNHEER, T., GMÜR, R. (2000). Microbiological aspects of an in situ model to study effects of antimicrobial agents on dental plaque ecology. *Eur J Oral Sci.*, **108**: 403-11
- GJERMO, P. (1989). Chlorhexidine and related compounds. *J.Dent.Res.*, **68**: 1602-1608
- GODOY, G.F., HICKS, M.J. (2008). Maintaining the integrity of the enamel and remineralization preventive agents in enamel demineralization surface: The role of dental biyofilm, saliva and remineralization. *J Am Dent Assoc.*, **139**: 25- 34
- GU, H., FAN, D., GAO, J., ZOU, W., PENG, Z., ZHAO, Z., LING, J., LEGEROS, R.Z. (2012). Effect of ZnCl₂ on plaque growth and biyofilm vitality. *Arch Oral Biol.*, **57**: 369-75
- GUSBERTI, F.A., SAMPATHKUMAR, P., SIEGRIST, B.E., LANG, N.P. (1988). Microbiological and clinical effects of chlorhexidine digluconate and hydrogen peroxide mouthrinses on developing plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.*, **15**: 60-7
- GWINNETT, A.J., BUONOCORE, M.G., SHEYKHOLESLAM, Z. (1972). Effect of fluoride on etched human and bovine tooth enamel surfaces as demonstrated by scanning electron microscopy. *Arch Oral Biol.*, **17**: 271-8.

- HALL-STOODLEY, L., COSTERTON, J.W., STOODLEY, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.*, **2**: 95-108
- HALL-STOODLEY, L., STOODLEY, P. (2002). Developmental regulation of microbial biofilms. *Curr Opin Biotechnol.*, **13**: 228-33
- HAMILTON, I.R., BOWDEN, G.H. (1988). Effects of fluoride on oral microorganisms. içinde: Fejerskov O; Ekstrand J, SILVERSTONE LM; *Fluoride in Dentistry*, 1st ed., Munksgard, Copenhagen: 77-103.
- HAMILTON, I.R. (1990). Biochemical effects of fluoride on oral bacteria. *J Dent Res.*, **69**: 660-667
- HAND, J.S., HUNT, R.J., BECK, J.D. (1988). Incidence of coronal and root caries in an older adult population. *J Public Health Dent.*, **48**: 14-19
- HAUSER-GERSPACH, I., PFÄFFLI-SAVTCHENKO, V., DÄHNHARDT J.E., MEYER, J., LUSSI, A. (2009). Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children in vivo. *Clin Oral Investig.*, **13**: 287-91
- HAVARSTEIN, L.S., GAUSTAD, P., NES, I.F., MORRISON, D.A. (1996). Identification of the streptococcal competence-pheromone receptor. *Mol Microbiol.*, **21**: 863-9
- HAY, D.I. (1995). Salivary Factors In Caries Models. *Adv Dent Res.*, **3**: 239-243
- HAZELRIGG, C.O., DEAN, J.A., FONTANA, M. (2003). Fluoride varnish concentration gradient and its effect on enamel demineralization. *Pediatric Dentistry.*, **25**: 119-126
- HEUKELEKIAN, H., HELLER, A. (1940). Relation between Food Concentration and Surface for Bacterial Growth. *J Bacteriol.*, **40**: 547-58
- HOOD, S.K., ZOTTOLA, E.A. (1997). Adherence to stainless steel by foodborne microorganisms during growth in model foodsystems. *Int. J. Food. Microbiol.*, **37**: 145-153
- HOPE, C.K., WILSON, M. (2004). Analysis of the effects of chlorhexidine on oral biofilm vitality and structure based on viability profiling and an indicator of membrane integrity. *Antimicrob Agents Chemother.*, **48**: 1461-8
- HUTH, K.C., JAKOB, F.M., SAUGEL, B., CAPPELLO, C., PASCHOS, E., HPLLWECK, R., HICKEL, R., BRAND, K. (2006). Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci.*, **114**: 435-40
- HUTH, K.C., QUIRLING, M., MAIER, S., KAMERECK, K., ALKHAYER, M., PASCHOS, E., WELSCH, U., MIETHKE, T., BRAND, K., HICKEL, R. (2009). Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int. Endod J.*, **42**: 3-13
- HUTH, K.C., QUIRLING, M., LENZKE, S., PASCHOS, E., KAMERECK, K., BRAND, K., HICKEL, R., ILIE, N. (2011). Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms. *Eur J Oral Sci.*, **119**: 204-210

- IE. Y. L., SCHAEKEN. M. J. (1993). Effect of single and repeated application of chlorhexidine varnish on Mutans streptococci in plaque plaque from fissures of premolar and molar teeth. *Caries Research.*, **27**: 303–306
- JAMES, G.A., BEAUDETTE, L., COSTERTON, J.W. (1995). Interspecies bacterial interactions in biyofilms. *J. IndustrialMicrobiology.*, **15**: 257-262
- JAYARAMAN, A., WOOD, T.K. (2008). Bacterial Quorum Sensing: Signals, circuits, and implications for biyofilms and disease. *Annual Review of Biomedical Engineering.* **10**: 145-67
- JEEVARATHAN, J., DEEPT,I A., MUTHU, M. S., RATHNA PRABHU, V., CHAMUNDEESWARI, G. S. (2007). Effect of fluoride varnish on Streptococcus mutans counts in plaque of caries- free children using dentocult SM strip mutans test: A randomized controlled triple blind study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.*, **25**: 157-63
- JENKINS, S., ADDY, M., WADE, W. (1988). The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *J Clin Periodontol.*, **15**: 415-24
- JENKINSONH, F., LAPIN-SCOTT, H.M. (2000). Biyofilms adhere to stay. *Trends Microbiol.*, **9**: 9-10
- JENKINS, S., ADDY, M., NEWCOMBE, R.G. (1994). A comparison of cetylpyridinium chloride, triclosan and chlorhexidine mouthrinse formulations for effects on plaque regrowth. *J Clin Periodontol.*, **21**: 441-4
- JOHANSSON, E., CLAESSON, R., VAN DIJKEN, J. (2009). Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *Journal of Dentistry.*, **37**: 449 - 53.
- JONES, C.G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol 2000.*, **15**: 55-62.
- JONES, H.C., ROTH, I.L., SANDERS, W.M. (1969). Electron microscopic study of a slime layer. *J Bacteriol.*, **99**: 316-25
- JOUX. F., LEBARON. P. (2000). Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single-cell level. *Microbes Infect.*, **2**: 1523-35
- KARA D. (2007). İnteractions Between Oral Biyofilm Bacteria Streptococcus Mutans &Veillonella Parvula doktora tezi
- KARA, D., LUPPENS, S.B.I., TEN, CATE, J.M. (2006). Difference between single and dual species biyofilms of Streptococcus mutans and Veillonella parvula in growth, acidogenecity and susceptibility to chlorhexidine. *Eur J Oral Sci.*, **114**: 58-63
- KEEVIL, C.W. (2003). Rapid detection of biyofilms and adherent pathogens using scanning confocal laser microscopy and episcopic differential interference contrast microscopy. *Water Sci Technol.*, **47**: 105-16
- KIDD, E.A. (1991). Role of chlorhexidine in the management of dental caries. *Int Dent J.*, **41**: 279-86
- KIDD, E.A.M., THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O., BRUUN, C. (1980). The influence of fluoride in surface enamel and degree of dental fluorosis on caries development in vitro. *Caries Res.*, **14**: 196–202

- KILLOY, W.J. (1988). The use of local delivered chlorhexidine in the treatment of periodontitis. Clinical results. *J Clin. Periodontol.*, **25**: 953-958
- KLEIN, U., KANELIS, M.J., DRAKE, D. (1999). Effects of four anticaries agents on lesion depth progression in an in vitro caries model. *Pediatr Dent.*, **21**: 176-80
- KOLENBRANDER, P. E., LONDON, J. (1993). Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J. Bacteriol.*, **175**: 3247-3252
- KOLUMAN, A. Biyofilm ve gıda hijyeni yönünden önemi. Erisim 4/04/2009. <http://vetgida.veterinary.ankara.edu.tr/bilimsel/biyofilm.pdf>.
- KOO, H., SCHOBEL, B., SCOTT-ANNE, K., WATSON, G., BOWEN, W.H., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., PARK, Y.K. (2005). Apigenin and tt-Farnesol with fluoride effects on *S.mutans* biyofilms and dental caries. *J Dent Res.*, **84**: 1016-1020
- KORAY. F. (1981). Diş Çürükleri. İstanbul: Altın Matbaacılık.
- KORBER, D.R., CHOİ, A., WOLFAARDT, G.M., CALDWELL, D.E. (1996). Bacterial plasmolysis as a physical indicator of viability. *Appl Environ Microbiol.*, **62**: 3939-3947
- KSHITISH, D., LAXMAN, V.K. (2010). The use of ozonated water and %0.2 CHX in the treatment of periodontitis patients: a clinical and microbiological study. *Indian J Dent Res.*, **21**: 341-348
- KÜLEKÇİ, G. (2000). Ağız mikroorganizmaları üzerine florürün etkisi. *İ.Ü. Dis Hek.Fak. Derg.*, **34**: 1-6
- LAGIDO, C., WILSON, I.J., GLOVER, L.A., PROSSER, J.I. (2003). A model for bacterial conjugal gene transfer on solidsurfaces. *FEMS Microbiol.Eco.*, **44**: 67-78
- LARSSON, K.S., BORGSTRÖM, M.K. (2001). Effect of an antimicrobial varnish on lactic acid production in plaque adjacent to fixed orthodontic appliances. *Clin Oral Invest.*, **5**: 118-121
- LAWRENCE, J.R., KORBER, D.R., HOYLE, B.D., COSTERTON, J.W., CALDWELL, D.E. (1991). Optical sectioning of microbial biyofilms. *J Bacteriol.*, **173**: 6558-67
- LI, Y.H., TANG, N., ASPIRAS, M.B., LAU, P.C., LEE, J.H., ELLEN, R.P., CVİTKOVİTCH, D.G. (2002). A quorum-sensing signaling system essential for genetic com-petence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J Bacteriol.*, **184**: 2699-708
- LILJEMARK, W.F., BLOOMQUİST, C.G., REILLY, B.E., BERNARDS, C.J., TOWNSEND, D.W., PENNOCK, A.T., LEMOINE, J.L. (1997). Growth dynamics in a natural biyofilm and its impact on oral disease management. *Adv Dent Res.*, **11**: 14-23
- LOUMA, H., FEJERSKOV, O., THYLSTRUP, A. (1986). The effect of fluoride on dental plaque, tooth structure and dental caries. In: THYLSTRUP, A., FEJERSKOV, O. Textbook of cariology. Copenhagen: Munksgaard; Chapter: 16.

- LUAN, W.-M., BAELUM, V., FEJERSKOV, O., CHEN, X. (2000). Tenyear incidence of dental caries in adult and elderly Chinese. *Caries Res.*, **34**: 205-213
- LYNCH, E. (1996). Antimicrobial management of primary root carious lesions: a review. *Gerodontology.*, **13**: 118-29
- LYNCH, E. (2008). Evidence-based caries reversal using ozone. *J Esthet Res Dent.*, **20**: 218-22
- LYNCH, E. (2009). Comment on "The application of Ozone in dentistry: A systematic review of the literature". *J Dent.*, **37**: 406-10
- MACPHERSON, L.M.D., MACFARLANE, T.W., WEETMAN, D.A., STEPHEN, K.W. (1991). Comparison of the plaque microflora from natural and appliance-borne enamel surfaces. *Caries Res.*, **25**: 58-64
- MADLENA, M., VITAYOS, G., MARTON, S., NAGY, G. (2000). Effect of chlorhexidine varnish on bacterial levels in plaque and saliva during orthodontic treatment. *Journal of Clinical Dentistry.*, **11**: 42-46
- MAGER, D.L., XIMENEZ-FYVIE, L.A., HAFFAJEE, A.D., SOCRANSKY, S.S. (2003). Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol.*, **30**: 644-65
- MAÏA, L.C., DE SOUZA, I.P., CURY, J.A. (2003). Effect of a combination of fluo-ride dentifrice and varnish on enamel surface rehardening and fluo- ride uptake in vitro. *Eur J Oral Sci.*, **111**: 68-72
- MANDEL, I.D. (1988). Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. *J Clin Periodontol.*, **15**: 488-498
- MANNING, R.H., EDGAR, W.M. (1992). Intra-oral models for studying de- and remineralization in man: methodology and measurement. *Dent Res.*, **71**: 895-900
- MARSH, P.D. (1993). Antimicrobial strategies in the prevention of dental caries. *Caries Res.*, **1**: 72-6
- MARSH, P.D. (2003). Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral Dis.*, **9**: 16-22
- MARSH, P.D. (2004). Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, **38**: 204-11
- MARSH, P.D., BRADSHAW, D.J. (1990). The effect of fluoride on the stability of oral bacterial communities in vitro. *J Dent Res.*, **69**: 668-71
- MARSH, P.D. (2010). Controlling the oral biofilm with antimicrobials. *J Dent.*, **38**: 11-5
- MARSH, P.D. (2012). Contemporary perspective on plaque control. *Br Dent J.*, **212**: 601-6
- MATTHIJS, S., ADRIAENS, P.A. (2002). Chlorhexidine varnishes: a review *J Clin Periodontol.*, **29**: 1-8

- MCNAB, R., FORD, S.K., EL-SABAENY, A., BARBIERI, B., COOK, G.S., LAMONT, R.J. (2003). LuxS-based signaling in *Streptococcus gordonii*: autoinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.*, **185**: 274–84
- MELLBERG, J.R. (1992). Hard-tissue substrates for evaluation of cariogenic and anti-cariogenic activity in situ. *J Dent Res.*, **71**: 913-9
- MELSEN, B., KAAE, O., ROLLA, G. (1983). Penetration of fluoride and chlorhexidine in human dental plaque in vitro. *Caries Res.*, **17**: 113-7
- MEROD, R.T., WARREN, J.E., MCCASLIN, H., WUERTZ, S. (2007). Toward automated analysis of biofilm architecture: bias caused by extraneous confocal laser scanning microscopy images. *Appl Environ Microbiol.*, **73**: 4922–30
- MILLAR, B.J., HODSON, N. (2007). Assessment of the safety of two ozone delivery devices. *Journal of Dentistry.*, **35**: 195-200
- MINAH, G.E. (1981). Dental plaque. In: *Pediatric Dental Medicine*, Ed.: D.J. Forrester, M.L. Wagner, J. Fleming. Philadelphia: Lea&Febiger, Chapter 9.
- MOLLER, S., STERNBERG, C., ANDERSEN, J., CHRISTENSEN, B., RAMOS, J., GIVSKOV, M., MOLIN, S. (1998). In situ expression in Mixed-Culture Biofilms: Evidence of Metabolic Interactions Between Community Members. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**: 721-732
- MÜLLER, P., GUGGENHEIM, B., SCHMIDLIN, P.R. (2007) Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm in vitro. *Eur J Oral Sci.*, **115**: 77–80
- NADELL, C.D., XAVIER, J.B., FOSTER, K.R. (2009). The sociobiology of biofilms. *International Journal Antimicrobial Agents.*, **33**: 8-13
- 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**: 240-6
- NETUSCHIL, L., REICH, E., UNTEREGGER, G., SCULEAN, A., BRECX, M. (1998). A pilot study of confocal laser scanning microscopy for the assessment of undisturbed dental plaque vitality and topography. *Arch Oral Biol.*, **43**: 277-85
- NETUSCHIL, L., REICH, E., BRECX, M. (1989). Direct measurement of the bactericidal effect of chlorhexidine on human dental plaque. *J Clin Periodontol.*, **16**: 484-8
- NEWBRUN, E. (1989). Cariology. 3rd Ed. Chicago: Quintessence Publishing Co. Inc.
- NOGALES, C.G., FERRARI, P.H., KANTOROVICH, E.O., LAGE-MARQUES, J.L. (2008). Ozone therapy in medicine and dentistry. *J Contemp Dent Pract.*, **9**: 75-84
- NYVAD, B., KILIAN, M. (1987). Microbiology of the early colonization of human enamel and root surfaces in vivo. *Scand J Dent Res.*, **95**: 369-80

- ØGAARD, B. (1990). Effects of Fluoride on Caries Development Progression in vivo. *J Dent Res.*, **69**: 813-819
- ØGAARD, B., RØLLA, RUBEN, J., DÍJKMAN, T., ARENDS, J. (1988). Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res.*, **96**: 209–211
- ØGAARD, B., ALM, A.A., LARSSON, E., ADOLFSSON, U. (2006). A prospective, randomized clinical study on the effects of an amine fluoride/stannous fluoride toothpaste/mouthrinse on plaque, gingivitis and initial caries lesion development in orthodontic patients. *Eur J Orthod.*, **28**: 8-12
- OVERMAN, P.R. (2000). Biofilm: a new view of plaque. *J Contemp Dent Pract.*, **1**: 18-29
- ÖZTÜRK, Ş.B., SAKARYA, S., ÖNCÜ, S., ERTUĞRUL, M.A. (2008). Biofilmler ve yabancı cisim infeksiyonları. *Klinik dergisi.*, **21**: 79-86
- PATTI, J.M., ALLEN, B.L., MCGAVIN, M.J., HÖÖK, M. (1994). MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annu Rev Microbiol.*, **48**: 585-617
- PERILLI, R., MARZIANO, M.L., FORMISANO, G., CAIAZZA, S., SCORCIA, G., BALDASSARRI, L. (2000). Alteration of organized structure of biofilm formed by *Staphylococcus epidermidis* on soft contact lenses. *J Biomed Mater Res.*, **49**: 53-7
- PETERSEN, P.E. (2003). The World Oral Health Report Continuous Improvement Of Oral Health In The 21st Century The Approach Of The WHO Global Oral Health Programme. *Community Dent Oral Epidemiol.*, **1**: 3–24
- PETERSSON, L.G. (1993). Fluoride mouthrinses and fluoride varnishes. *Caries Res.*, **27**: 35-42
- PETERSSON, L.G., MAKI, Y., TWETMAN, S., EDWARDSAN, S. (1991). Mutans streptococci in saliva and interdental spaces after topical applications of an antibacterial varnish in schoolchildren. *Oral Microbiol Immunol.*, **6**: 284-287
- PEYRON, M., MATSSON, L., BIRKHED, D. (1992). Progression of approximal caries in primary molars and the effect of Duraphat treatment. *Scand J Dent Res.*, **100**: 314–318
- PIZZO, G., LA CARA, M., LICATA, M.E., PIZZO, I., D'ANGELO, M. (2008). The Effects of an Essential Oil and an Amine Fluoride/Stannous Fluoride Mouthrinse on Supragingival Plaque Regrowth. *J Periodontol.*, **79** :1177-83
- POST, J.C., STOODLEY, P., HALL-STOODLEY, L., EHRLICH, G.D. (2004). The role of biofilms in otolaryngologic infections. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.*, **12**: 185-90
- POURESLAMI, H.R., VAN AMERONGEN, W.E. (2009). Early Childhood Caries (ECC): An Infectious Transmissible Oral Disease; *Indian. J Pediatr.*, **76**: 191-4

- PRATTEN, J., ANDREWS, C.S., CRAIG, D.Q., WILSON, M. (2000). Structural studies of microcosm dental plaques grown under different nutritional conditions. *FEMS Microbiol Lett.*, **189**: 215–8
- PRATTEN, J., BARNETT, P., WILSON, M. (1998). Composition and susceptibility to chlorhexidine of multi-species biofilms of oral bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**: 3515-3519
- PRATTEN, J., SMITH, A.W., WILSON, M. (1998). Response of single species biofilms and microcosm dental plaques to pulsing with chlorhexidine. *J Antimicrob Chemother.*, **42**: 453–459
- QIN, M., LI, J., ZHANG, S., MA, W. (2008). Risk factors for severe early childhood caries in children younger than 4 Years old in Beijing, China. *Pediatr Dent.*, **30**: 122-8
- REINTSEMA, H., ARENDS, J. (1988). An In vivo Study of Microhardness and Fluoride Uptake in Partially Demineralized Human Enamel Covered by Plaque. *J Dent Res.*, **67**: 471- 473
- RIJNAARTS, H.H., NORDE, W., BOUWER, E.J., LYKLEMA, L., ZEHNDER, H. (1993). Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 3255-65
- RIBEIRO, L.G., HASHIZUME, L.N., MALTZ, M. (2008). Effect of different 1% chlorhexidine varnish regimens on mutans streptococci levels in saliva and dental biofilm. *Am J Dent.*, **21**: 295-9
- RICKARD, A.H., PALMER, R.J., BLEHERT, D.S., CAMPAGNA, S.R., SEMMELHACK, M.F., EGLAND, P.G., BASSLER, B.L, KOLENBRANDER, P.E. (2006). Autoinducer 2: a concentration-dependent signal for mutualistic bacterial biofilm growth. *Mol Microbiol.*, **60**: 1446- 56
- RICKARD. A.H., GILBERT. P., HIGH. N.J., KOLENBRANDER. P.E., HANDLEY. P.S. (2003). Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.*, **11**: 94-100
- RIEDEL, K., HENTZER, M., GEISENBERGER, O. (2001). N-acylhomoserine lactone mediated communication between *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia* in mixed biofilms. *Microbiology*, **147**: 3249-3262
- ROBINSON, C., KIRKHAM, J., PERCIVAL, R., SHORE, R.C., BONASS, W.A., BROOKES, S.J., KUSA, L., NAKAGAKI, H., KATO, K., NATRESS, B. (1997). A method for the quantitative site specific study of the biochemistry within dental plaque biofilms formed in vivo. *Caries Res.*, **31**: 194–200
- RODE SDE, M., GIMENEZ, X., MONTOYA, V.C., GÓMEZ, M., BLANC, S.L., MEDINA, M., SALINAS, E., PEDROZA, J., ZALDIVAR-CHIAPA, R.M., PANNUTI, C.M., CORTELLI, J.R., OPPERMAN, R.V. (2012). Daily biofilm control and oral health: consensus on the epidemiological challenge--Latin American Advisory Panel. *Braz Oral Res.*, **26**: 133-43
- ROLLA, G., EKSTRAND, J. Fluoride in oral fluids and dental plaque. içinde Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in Dentistry* 2nd ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996: 215-229.

- ROLLAND, S.L., MCCABE, J.F., ROBINSON, C., WALLS, A.W. (2006). In vitro biofilm formation on the surface of resin-based dentine adhesives. *Eur J Oral Sci.*, **114**: 243-9
- ROSENBERG, M., JUDES, H., WEISS, E. (1983). Cell surface hydrophobicity of dental plaque microorganisms in situ. *Infect Immun.*, **42**: 831-4
- ROSZAK, D.B., COLWELL, R.R. (1987). Survival strategies of bacteria in the natural environment *Microbiol Rev.*, **51**: 365-79
- ROTMAN, B., PAPERMASTER, B.W. (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **55**: 134-41
- RÖLLA, G., MELSEN, B. (1975). On the mechanism of the plaque inhibition by chlorhexidine. *J Dent Res.*, **54**: 57-62
- RUDNEY, J.D. (2000). Saliva and dental plaque. *Adv Dent Res.*, **14** :29-39
- SADATULLAH, S., MOHAMED, N.H., RAZAK, F.A. (2012). The antimicrobial effect of 0.1 ppm ozonated water on 24-hour plaque microorganisms in situ *Braz Oral Res.*, **26**: 126-31
- SAJJAN, P.G., NAGESH, L., SAJJANAR, M., REDDY, S.K., VENKTESH, U.G. (2013). Comparative evaluation of chlorhexidine varnish and fluoride varnish on plaque Streptococcus mutans count--an in vivo study. *Int J Dent Hyg.*, **11**: 191-7
- SARAÇLI, M.A. (2006). "Quorum sensing": mikroorganizmalar iletişim mi kuruyor?. *Gülhane Tıp Dergisi.*, **48**: 244-250
- SAUER, K., CAMPER, A.K., EHRLICH, G.D., COSTERTON, J.W., DAVIES, D.G. (2002). Pseudomonas aeruginosa displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.*, **184**: 1140-54
- SCHAEKEN, M.J., DE HAAN, P. (1989). Effects of sustained-release chlorhexidine acetate on the human dental plaque flora. *J Dent Res.*, **68**: 119-23
- SCHAEKEN, M. J., SCHOUTEN, M. J., VAN DEN KIEBOOM, C. W., VAN DER HOEVEN, J. S. (1991). Influence of contact time and concentration concentration of chlorhexidine varnish on Mutans streptococci in interproximal dental plaque. *Caries Research.*, **25**: 292-295
- SCHAEKEN, M. J., VAN DER HOEVEN, J. S., VAN DEN KIEBOOM, C. W. (1994). Effect of chlorhexidine varnish on Streptococci in dental plaque from occlusal fissures. *Caries Research.*, **28**: 262-266
- SCHAUDER, S., BASSLER, B.L. (2001). The languages of bacteria. *Genes Dev.*, **15**: 1468-80
- SCHEIE, A.A. (1989). Modes of currently known chemical antiplaque agents other than chlorhexidine. *J Dent Res.*, **68**: 1609-1616
- SCHEIE, A.A. (2003). The role of antimicrobials. in: Fejerskov O, Kidd E. *Dental Caries: The Disease and Its Clinical Management*. Denmark, Copenhagen: Blackwell Publishing Ltd.; 2003: 179-188.

- SCHEIE, A.A., PETERSEN, F.C. (2004). The Biofilm Concept: Consequences For Future Prophylaxis Of Oral Diseases? *Crit Rev Oral Biol Med.*, **15** :4-12
- SCHEIE, A.A. (1994). Mechanisms of dental plaque formation. *Adv Dent Res.*, **8**: 246-53
- SEPPÄ, L. (2004). Fluoride Varnishes in Caries Prevention. *Med Princ Pract.*, **13**: 307-11
- SHANI, S., FRIEDMAN, M., STEINBERG, D. (2000). The anticariogenic effect of amine fluorides on *Streptococcus sobrinus* and glucosyltransferase in biofilms. *Caries Res.*, **34**: 260-7
- SHAPIRO, S., GIERTSEN, E., GUGGENHEIM, B. (2002). An in vitro oral biofilm model for comparing the efficacy of antimicrobial mouthrinses. *Caries Res.*, **36**: 93-100
- SHEN, Y., QIAN, W., CHUNG, C., OLSEN, I., HAAPASALO, M. (2009). Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod.*, **35**: 981-985
- SHEN, Y., STOJICIC, S., HAAPASALO, M. (2011). Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod.*, **37**: 657-61
- SHIH, P., HUANG, C. (2002). Effects of quorum sensing deficiency on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and antibiotic resistance. *J Antimicrobiol Chemother.*, **49**: 309-314
- SILVA, M.F., GINIGER, M.S., ZHANG, Y.P., DEVIZIO, W. (2004). The Effect of a Triclosan /Copolymer /Fluoride Liquid Dentifrice on Interproximal Enamel Remineralization and Fluoride Uptake. *JADA.*, **135**: 1023-1029
- SISSONS, C.H., CUTRESS, T.W., HOFFMAN, M.P., WAKEFIELD, J.S. (1991). A multi-station dental plaque microcosm (artificial mouth) for the study of plaque growth, metabolism, pH, and mineralization. *J Dent Res.*, **70**: 1409-16
- SKOLD, K., TWETMAN, S., HALLGREN, A., YUCEL-LINDBERG, T., MODEER, T. (1998). Effect of chlorhexidine/thymol-containing varnish on prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid. *European Journal of Oral Sciences.*, **106**: 571-575
- SOCRANSKY, S.S., HAFFAJEE, A.D. (1994). Evidence of bacterial etiology: a historical perspective. *Periodontol 2000.*, **5**: 7-25
- SONGÜR, E. (2013). Enfekte Süt Dişi Kök Kanalında Yer Alan Seçilmiş Odontopatojenik Mikroorganizmalara Karşı Ozonun Etkinliğinin İn Vitro ve İn Vivo Koşullarda Değerlendirilmesi doktora tezi
- SREENIVASAN, P., GAFFAR, A. (2002). Antiplaque biocides and bacterial resistance: a review. *J Clin Periodontol.*, **29**: 965-974
- STEINBERG, D., HELING, I., DANIEL, I., GINSBURG, I. (1999). Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus*

- sobrinus, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Rehabil.*, **26**: 151-6
- STEINBERG, D., FRIEDMAN, M. (2000). Development of sustained-release devices for modulation of dental plaque biofilm and treatment of oral infectious diseases. *Drug Dev Res.*, **50**: 555-565
- STICKLERS, D., MORRIS, N., MCLEAN, R., FUQUA, C. (1998). Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum sensing signal molecules *in situ* and *in vitro*. *Appl Environ Microbiol.*, **64**: 3486-3490.
- STOODLEY, P., LEWANDOWSKI, Z., BOYLE, J.D., LAPPIN-SCOTT, H.M. (1999). The formation of migratory ripples in a mixed species bacterial biofilm growing in turbulent flow. *Environ Microbiol.*, **1**: 447-55.
- STOOKEY, G.K., SCHEMEHORN, B.R., CHEETHAM, B.L., WOOD, G.D., WALTON, G.V. (1985). In-Situ Fluoride Uptake From Fluoride Dentifrices By Carious Enamel. *J Dent Res.*, **64**: 900- 903
- STRECKFUSS, J.L., PERKINS, D., HORTON, I.M., BROWN, L.R., DRIEZEN, S., GRAVES, L. (1980). Fluoride resistance and adherence of selected strains of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces after exposure of fluoride. *J Dent Res.*, **59**: 151-8
- SUTHERLAND, I.W. (2001). Biofilm exopolysaccharides: A strong and sticky framework. *Microbiology.*, **147**: 3-9
- SUTTON, N.A., HUGHES, N., HANDLEY, P.S. (1994). A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and the electroscan wet scanning electron microscope to study the structure of a biofilm of *Streptococcus cristatus* CR3J. *Appl Bacteriol.*, **76**: 448-54
- SWIFT, S., THROUP, J.P., WILLIAMS, P., SALMOND, G.P., STEWART, G.S. (1996). Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci.*, **21** :214-9
- TAKEUCHI, Y., GUGGENHEIM, B., FILIERI, A., BAEHNI, P. (2007). Effect of chlorhexidine/thymol and fluoride varnishes on dental biofilm formation *in vitro*. *Eur J Oral Sci.*, **115**: 468-472
- TATEVOSSIAN, A. (1990). Fluoride in dental plaque and its effects. *J Dent Res.*, **69**: 645-652
- TEN CATE, J.M. (2001). Consensus statements on fluoride usage and associated research questions. *Caries Research.*, **35**: 71-73
- TEN CATE, J.M. (2006). Biofilms, a new approach to the microbiology of dental plaque. *Odontology.*, **94**: 1-9
- TEN CATE, J.M., MARSH, P.D. (1994). Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. *J Dent Res.*, **73**: 695-703

- TEUGHEL, W., VAN ASSCHE, N., SLIEPEN, I., QUIRYNEN, M. (2006) Effect of material characteristics and/or surface topography on biofilm development. *Clin Oral Implants Res.*, **17**: 68-81
- THAMAN, D., SOOD, P. (2012). Ozone therapy in conservative dentistry and endodontics: an overview. *Indian J Stomatol.*, **3**: 165-169
- THOMAS, C.M., NIELSEN, K.M. (2005). Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. *Nat Rev Microbiol.*, **3**: 711–21
- THOMAS, J.G., NAKAISHI, L.A. (2006). Managing the complexity of a dynamic biofilm. *JADA.*, **137**: 10-5
- THURNHEER, T., PLOEG, J.R., GIERTSEN, E., GUGGENHEIM, B. (2006). Effects of *Streptococcus mutans* gtfC deficiency on mixed oral biofilms in vitro. *Caries Res.*, **40**: 163–71
- TOLKER-NIELSEN, T., MOLIN, S. (2000). Spatial organisation of microbial biofilm communities. *Microb.Ecol.*, **40**: 75-84
- TOOLE, G., KAPLAN, H.B., KOLTER, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.*, **54**: 49-79
- TTHITAMOSOKUL, S., THEARMONTREE, A. (2006). A Longitudinal Study of Early Childhood Caries in 9-to 18 – month-old Thai infants. *Community Dent Oral Epidemiol.*, **34**: 429-436
- TWETMAN, S. (2004). Antimicrobials in future caries control? A review with special reference to chlorhexidine treatment. *Caries Res.*, **38**: 223-9
- TWETMAN, S. (2010). Treatment protocols: Nonfluoride management of the caries disease process and available diagnostics. *Dent Clin North Am.*, **54**: 527-540
- TWETMAN, S., HALLGREN, A., PETERSSON, L.G. (1995). Effect Of An Antibacterial Varnish On Mutans Streptococci In Plaque From Enamel Adjacent To Orthodontic Appliances. *Caries Research.*, **29**: 188–191
- TWETMAN, S., PETERSSON, L.G. (1997). Effect of different chlorhexidine varnish regimens on Mutans streptococci levels in interdental plaque and saliva. *Caries Research.*, **31**: 189–193
- ULUSOY, A.T. (2010). Pedodontide güncel koruyucu yaklaşımlar. *Atatürk Üniv. Dis Hek. Fak. Derg.*, **3**: 28-37
- US DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICE (2000). Oral Health In America: A Report Of The Surgeon General. *J Calif Dent Assoc.*, **28**: 685–695.
- VAİKUNTAM, J. (2000) Fluoride varnishes: should we be using them? *Pediatric Dentistry.*, **22**: 513-516
- VAN LOVEREN, C. (2001). Antimicrobial activity of fluoride and its in vivo importance: Identification of research questions. *Caries Research.*, **35**: 65-70

- VAN LOVEREN, C., BUIJS, J.F., BUIJS, M.J., TEN CATE, J.M. (1996). Protection of bovine enamel and dentine by chlorhexidine and fluoride varnishes in a bacterial demineralization model. *Caries Res.*, **30**: 45-51
- VAN RIJKOM, H.M., TRUIN, G.J., VAN 'T HOF MA. (1996). A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. *J Dent Res.*, **75**: 790-5
- VAN STRIJP, A.J., VAN STEENBERGEN, T.J., TEN, CATE, J.M. (1997). Effects of chlorhexidine on the bacterial colonization and degradation of dentin and completely demineralized dentin in situ. *Eur J Oral Sci.*, **105**: 27-35
- VÍTKOV, L., HERMANN, A., KRAUTGARTNER, W.D., HERRMANN, M., FUCHS, K., KLAPPACHER, M., HANNIG, M. (2005). Chlorhexidine-induced ultrastructural alterations in oral biofilm. *Microscopy Research and Technique.*, **68**: 85-89
- VIVALDI-RODRIGUES, G., DEMITO, C.F., BOWMAN, S.J., RAMOS, A.L. (2006). The effectiveness of a fluoride varnish in preventing the development of white spot lesions. *World J Orthod.*, **7**: 138-44
- WAALER, S.M., ROLLA, G. (1985). Importance of teeth and tongue as possible receptor sites for chlorhexidine in relation to its clinical effect. *Scand J Dent Res.*, **93**: 222-6
- WALKER, J.T., BRADSHAW, D.J., FULFORD, M.R., MARSH, P.D. (2003). Microbiological evaluation of a range of disinfectant products to control mixed-species biofilm contamination in a laboratory model of a dental unit water system. *Appl Environ Microbiol.*, **69**: 3327-32
- WALTERS, M.C., ROE, F., BUGNICOURT, A., FRANKLIN, M.J., STEWART, P.S. (2003). Contributions of antibiotic penetration, oxygen limitation, and low metabolic activity to tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms to ciprofloxacin and tobramycin. *Antimicrob Agents Chemother.*, **47**: 317-23
- WARREN, J.J., LEVY, S.M. (1999). Systemic fluoride: sources, amounts and effect of ingestion. *Dent Clin North Am.*, **43**: 695-711
- WATNICK, P., KOLTER, R. (2000). Biofilm city of microbes. *J. Bacteriol.*, **182**: 2675-2679
- WEFEL, J.S. (1990). Effects of Fluoride on Caries Development and Progression Using intra-Oral Models. *J Dent Res.*, **69**: 626-633
- WHITCHURCH, C.B., ALM RA, MATTICK, J.S. (1996). The alginate regulator AlgR and an associated sensor FimS are required for twitching motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **93**: 9839-43
- WHITELEY, M., BANGERA, M.G., BUMGARNER, R.E., PARSEK, M.R., TEITZEL, G.M., LORY, S., GREENBERG, E.P. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Natura.*, **413**: 860-4
- WILLIAMSON, A.E., CARDON, J.W., DRAKE, D.R. (2009). Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.*, **35**: 95-97

- WILSON, M.(1996). Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol.*, **44**: 79-87
- WOLZ, C., GOERKE, C., LANDMANN, R., ZIMMERLI, W., FLUCKIGER, U. (2002) Transcription of clumping factor A in attached and unattached *Staphylococcus aureus* in vitro and during device-related infection. *Infect Immun.*, **70**: 2758-62
- WOOD, S.R., KIRKHAM, J., MARSH, P.D., SHORE, R.C., NATTRESS, B., ROBINSON, C. (2000). Architecture of intact natural human plaque biofilms studied by confocal laser scanning microscopy. *J Dent Res.*, **79**: 21–27
- YASSIEN, M., KHARDORI, N. (2001). Interaction between biofilms formed by *Staphylococcus epidermidis* and quinolones. *Diagn Microbiol Infect Dis.*, **40**: 79-89
- YAZICIOĞLU, B. (1987). Köysel bölgelerde erişkinlerin diş sağlığı düzeyi. *A.Ü.DİŞ Hek.Fak.Derg.*, **14**: 131 -135
- YILMAZ, A.B. (1993). Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesine başvuran hastaların diş sağlığı düzeyi. *Atatürk Üni.Diş Hek.Fak.Derg.*, **3**: 13-15
- YILMAZ, M., CELİK, G. Y. (2007). Bakteriyel Ekstraselüler Polisakkaritler (EPS) *Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi.*, **5**: 7-13
- YOSHIARA, A., SAKUMA, S., KOBAYASHI, S., MIYAZAKI, H. (2001). Antimicrobial effect of fluoride mouth rinse on mutans streptococci and lactobacilli in saliva. *Pediatr Dent.*, **23**: 113-7
- YUCEL-LINDBERG, T., TWETMAN, S., SKOLD-LARSSON, K., MODEER, T. (1999). Effect of an antibacterial varnish on the levels of prostanooids, leukotriene B₄, and interleukin-1_β in gingival crevicular fluid. *Acta Odontologica Scandinavica.*, **57**: 23–27.
- ZAURA-ARITE, E., TEN CATE, J.M. (2000). Effect of fluoride- and chlorhexidine containing varnishes on plaque composition and on demineralisation of dentinal grooves in situ. *Eur J Oral Sci.*, **108**: 154–164
- ZAURA-ARITE, E., VAN MARLE, J., TEN CATE, J.M. (2001). Conofocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res.*, **80**: 1436-40.
- ZERO, D.T.(1995). In situ caries models. *Adv. Dent. Res.*, **9**: 214-230
- ZHANG, N.A., TAYLOR, J.L. (1994). Biofilms: A review. *Microbiol.Molec.Biol.*, **21**: 486-505
- ZICKERT, I., EMILSON, C.G. (1982). Effect of a fluoride-containing varnish on *Streptococcus mutans* in plaque and saliva. *Scand J Dent Res.*, **90**: 423 428
- ZIMMER, S., ROBKE, F.J., ROULET, J.F. (1999). Caries prevention with fluoride varnish in a socially deprived community. *Community Dent Oral Epidemiol.*, **27**: 103–108

EKLER

EK-1



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

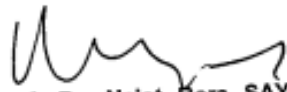
Bölüm: Personel Şefliği
Sayı : B.30.2.ANK.0.21.71.00/4-10/ 826 - 16 08

ANKARA
21.07.2009 .

PEDODONTİ
ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞINA

Anabilim Dalınız öğretim üyesi Prof.Dr.Firdevs Tulga Öz'ün sorumluluğunda yürütülecek olan "Antiplak ajanların biofilm üzerine etkilerinin in situ koşullarda konfokal lazer tarama mikroskobu ile değerlendirilmesi" başlıklı çalışma dosyası hakkında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığından alınan 16.07.2009 tarih ve 16811 sayılı yazı ve eklerinin birer örneği ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi ve ilgiliye tebliğini saygılarımla rica ederim.


Prof. Dr. Nejat Bora SAYAN
Dekan

EKLER:
1) Yazı Örneği ve Ekleri (3 Sayfa)

EK-2



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
DEKANLIĞI



Sayı : B.30.2.ANK.0.20.05.04

16811 16.07.2009

Konu :

Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
 Dekanlığına

İlgi:21.05.2009 tarih ve 8-14-1137 sayılı yazınız.
 Fakülteniz Pedodonti Anabilim Dalı Öğretim üyesi Prof.Dr.Firdevs Tulga Öz'ün sorumluluğunda yürütülecek olan "Antiplak ajanların biofilm üzerine etkilerinin in situ koşullarda konfokal lazer tarama mikroskobu ile değerlendirilmesi" başlıklı çalışma dosyası etik kurulumuzun 29 Haziran 2009 tarihli toplantısında görüşülmüş, alınan karar örneği ilişik olarak sunulmuştur. Bilgilerinizi ve ilgiliye tebliğini saygı ile arz ve rica ederim.


 Prof.Dr.T.Murat ÖZSAN
 Dekan Yardımcısı

Eki:2 adet karar örneği

Ank. Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Genel Evrak	
Ne	: 3201
Tarihi	: 20-07-09
Verildiği Yer	:
Eki	: 2010-07-09

Santral :0(312) 310 30 10 Faks: 0 (312) 310 63 70
 ANKARA
 E-posta: dekanlik@medicine.ankara.edu.tr

06100-Sahhiye /

EK-3

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
RESEARCH ETHICS COMMITTEE OF MEDICAL FACULTY, ANKARA UNIVERSITY
ANKARA-TÜRKİYE
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAYI

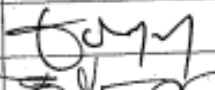
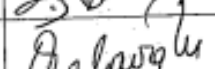
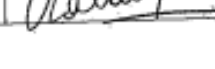
BAŞVURU BİLGİLERİ	PROTOKOL KODU	
	PROTOKOL ADI	Antiplak ajanların biofilm üzerine etkilerinin in situ koşullarda konfokal lazer tarama mikroskobu ile değerlendirilmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI / ADI	Prof.Dr.Firdevs Tulga Öz
	ARAŞTIRMA MERKEZİ	Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
	DESTEKLEYİCİ FİRMA	

DEĞERLENDİRİLEN İLGİLİ BİLGİLER	Belge Adı	Değişiklik No. / Tarihi	Dili
	PROTOKOL		
	ARAŞTIRICI BROŞÜRÜ		
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLURU		
	OLGU RAPOR FORMU		

CALIŞMA ESASI	İYİ KLİNİK UYGULAMALARI KLAVUZU
---------------	---------------------------------

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 154-4903	Tarih: 29 Haziran 2009
	Araştırma protokolüne tamamen uyulmak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve Yönergenin 11/h maddesi gereği sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere klinik çalışmanın yürütülmesinde etik sakınca bulunmadığına toplantıya katılan öğretim üyelerinin oybirliği ile karar verildi.	

ETİK KURUL ÜYELERİ

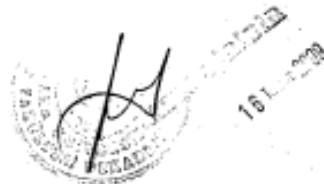
Ünvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İmza
Prof. Dr. İsmail Hakkı Ayhan Başkan	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	
Prof. Dr. Efser Kerimoğlu Başkan Yardımcısı	Çocuk Psikiyatrisi	Ankara Tıp Fakültesi	K	
Prof. Dr. Özden Palaoglu Sekreter	Farmakoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	



Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

EK-4

Prof. Dr. Handan Onur Üye	Tıbbi Onkoloji	Ankara Tıp Fakültesi	E	Handan Onur
Prof. Dr. Ajlan Tükün Üye	Tıbbi Genetik	Ankara Tıp Fakültesi	K	Ajlan Tükün
Prof. Dr. Esra Erden Üye	Patoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Esra Erden
Prof. Dr. Aydan İkinciogulları Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aydan İkinciogulları
Prof. Dr. Ethem Geçim Üye	Genel Cerrahi	Ankara Tıp Fakültesi	E	Ethem Geçim
Prof. Dr. Erdal Onar Üye	Hukuk	Ankara Üniv. Hukuk Fakültesi	E	Erdal Onar
Prof. Dr. Yasemin Oğuz Üye	Deontoloji	Ankara Tıp Fakültesi	K	Yasemin Oğuz
Prof. Dr. Bülent Gümüşel Üye	Farmakoloji-Eczacı	Hacettepe Üniv. Eczacılık Fakültesi	E	Bülent Gümüşel
Doç. Dr. Aslıhan Avcı Üye	Biyokimya	Ankara Tıp Fakültesi	K	Aslıhan Avcı
Gülsüm Aslan	Sağlık Mesleği Dışı	Emekli	K	Gülsüm Aslan



Hasan TUNA
A. Ü. Tıp Fakültesi
İdari Personel Bürosu Şefi

EK-5**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Ozonun biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi isimli çalışmamızda çocuğunuz için özel olarak hazırlanacak üst çene plaklarına sığır dişlerinden elde edilmiş mine blokları yerleştirilecektir. Bu işlemi yapmamızın amacı; sığır dişleri üzerinde plak birikimini sağlamak ve plak üzerine uygulayacağımız antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalar üzerine etkisini değerlendirmektir. Çocuğunuz çalışmamıza; sığır dişlerinden hazırlanmış mine blokları yerleştirilmiş plakları taşıyarak, biyofilm elde etmemizi sağlamak amacıyla katılacaktır. Bu uygulama çocuğunuz için hiçbir şekilde rahatsızlık ve risk taşımamaktadır.

Çocuğunuzun taşıyacağı plaklara sığır dişinden hazırlanmış 6 adet mine bloğu yapışkan mumlar vasıtası ile doğal dişlere bakacak şekilde yerleştirilecektir. Plak kullanımı esnasında; çocuğunuzun dili, yanağı ve dişleri sığır dişlerinden oluşturulmuş bloklara değmeyecektir. Çocuğunuz yemek yeme ve dişlerin fırçalanması işlemlerinin dışında 6 saat boyunca plağı taşıyacaktır ve kullanım esnasında dişlerini sadece su ile fırçalayacak herhangi bir gargara ve diş macunu kullanmayacaktır. 6 saat sonunda çocuğunuzun taşıdığı plak alınacak ve üzerine yerleştirmiş olduğumuz sığır dişlerinden hazırlanmış bloklar plaktan uzaklaştırılacaktır. Böylelikle çalışmamızın sizinle ilgili olan kısmı tamamlanmış olacaktır.

Bu klinik çalışmada çocuğumun yer almasını kabul ediyorum. Çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım.

Tarih :

Hastanın Adı-Soyadı :

Hastanın Yaşı- Cinsiyeti :

Velinin Adı-Soyadı :

Tanıklık eden kurum yetkilisi imzası :

Hastanın İmzası :

Veli İmzası :

Araştırmacı imzaları :

EK-6**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Ozonun biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi isimli çalışmamızda çocuğunuz için özel olarak hazırlanacak üst çene plaklarına sığır dişlerinden elde edilmiş mine blokları yerleştirilecektir. Bu işlemi yapmamızın amacı; sığır dişleri üzerinde plak birikimini sağlamak ve plak üzerine uygulayacağımız antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalar üzerine etkisini değerlendirmektir. Çocuğunuz çalışmamıza; sığır dişlerinden hazırlanmış mine blokları yerleştirilmiş plakları taşıyarak, biyofilm elde etmemizi sağlamak amacıyla katılacaktır. Bu uygulama çocuğunuz için hiçbir şekilde rahatsızlık ve risk taşımamaktadır.

Çocuğunuzun taşıyacağı plaklara sığır dişinden hazırlanmış 6 adet mine bloğu yapışkan mumlar vasıtası ile doğal dişlere bakacak şekilde yerleştirilecektir. Plak kullanımı esnasında; çocuğunuzun dili, yanağı ve dişleri sığır dişlerinden oluşturulmuş bloklara değmeyecektir. Çocuğunuz yemek yeme ve dişlerin fırçalanması işlemlerinin dışında 6 saat boyunca plağı taşıyacaktır ve kullanım esnasında dişlerini sadece su ile fırçalayacak herhangi bir gargara ve diş macunu kullanmayacaktır. 24 saat sonunda çocuğunuzun taşımış olduğu plak alınacak ve üzerine yerleştirmiş olduğumuz sığır dişlerinden hazırlanmış bloklar plaktan uzaklaştırılacaktır. Böylelikle çalışmamızın sizinle ilgili olan kısmı tamamlanmış olacaktır.

Bu klinik çalışmada çocuğumun yer almasını kabul ediyorum. Çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım.

Tarih :

Hastanın Adı-Soyadı :

Hastanın Yaşı- Cinsiyeti :

Velinin Adı-Soyadı :

Tanıklık eden kurum yetkilisi imzası :

Araştırmacı imzaları :

Hastanın İmzası :

Veli İmzası :

EK-7**BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU**

Ozonun biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkisinin değerlendirilmesi isimli çalışmamızda çocuğunuz için özel olarak hazırlanacak üst çene plaklarına sığır dişlerinden elde edilmiş mine blokları yerleştirilecektir. Bu işlemi yapmamızın amacı; sığır dişleri üzerinde plak birikimini sağlamak ve plak üzerine uygulayacağımız antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalar üzerine etkisini değerlendirmektir. Çocuğunuz çalışmamıza; sığır dişlerinden hazırlanmış mine blokları yerleştirilmiş plakları taşıyarak, biyofilm elde etmemizi sağlamak amacıyla katılacaktır. Bu uygulama çocuğunuz için hiçbir şekilde rahatsızlık ve risk taşımamaktadır.

Çocuğunuzun taşıyacağı plaklara sığır dişinden hazırlanmış 6 adet mine bloğu yapışkan mumlar vasıtası ile doğal dişlere bakacak şekilde yerleştirilecektir. Plak kullanımı esnasında; çocuğunuzun dili, yanağı ve dişleri sığır dişlerinden oluşturulmuş bloklara değmeyecektir. Çocuğunuz yemek yeme ve dişlerin fırçalanması işlemlerinin dışında 6 saat boyunca plağı taşıyacaktır ve kullanım esnasında dişlerini sadece su ile fırçalayacak herhangi bir gargara ve diş macunu kullanmayacaktır. 48 saat sonunda çocuğunuzun taşımış olduğu plak alınacak ve üzerine yerleştirmiş olduğumuz sığır dişlerinden hazırlanmış bloklar plaktan uzaklaştırılacaktır. Böylelikle çalışmamızın sizinle ilgili olan kısmı tamamlanmış olacaktır.

Bu klinik çalışmada çocuğumun yer almasını kabul ediyorum. Çalışma bana sözlü olarak da açıklandı. Çalışma ile ilgili tüm sorularıma tatmin edici cevaplar aldım.

Tarih :

Hastanın Adı-Soyadı :

Hastanın Yaşı- Cinsiyeti :

Velinin Adı-Soyadı :

Tanıklık eden kurum yetkilisi imzası :

Hastanın İmzası :

Veli İmzası :

Araştırmacı imzaları :

ÖZGEÇMİŞ

I-Bireysel bilgiler

Adı : Burcu
 Soyadı : NAMAZOĞLU
 Doğum yeri ve tarihi : Ankara 20.08.1981
 Uyruğu : T.C.
 Medeni durumu : Evli
 İletişim adresi : 328. Sok 13/11 Abidinpaşa/ANKARA
 Telefon : 05334309064
 e-mail : dtburcukoc@hotmail.com

II-Eğitimi

2007- : Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı, Doktora
 2005-2000 : Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Lisans
 1999- 1995 : Başken Lisesi Süper Lise, Ankara
 1995-1992 : 29 ekim ilköğretim okulu, ankara
 1992-1987 : Abidinpaşa ilköğretim okulu, ankara
Yabancı Dil : İngilizce

III-Ünvanları

2007 : Diş Hekimi

IV-Mesleki Deneyimi

2011- :Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Ana Bilim Dalı, Araştırma görevlisi
 2008-2011 :Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Pedodonti Ana Bilim Dalı, Doktora öğrencisi

V-Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

- 1- Türk Pedodonti Derneği

VI-Bilimsel İlgi Alanları

Ulusal Dergilerde Yayımlanan Makaleler

- 1) ÇELİKTEN, B., KIZILELMA ÇELİKTEN, Z., **NAMAZOĞLU, B.**, BİLİCİ, Ö., MAVİŞ, A.O. (2012). İntrüze Olmuş Daimi Kesici Dişlerin Cerrahi Ekstrüzyon İle Tedavisi: Bir Olgu Sunumu. *Atatürk Üniv. Diş. Hek. Fak. Derg.* **6**: 24-29

Bilimsel Toplantılarda Taktim Edilen ve Bildiri Kitabında Basılan Posterler ve Sunumlar:

1. **NAMAZOĞLU B.**, SÖZNMEZ H. (2009). Daimi Dişlerde Horizontal Kök Kırığının Endodontik Tedaviyle İyileşmesi. Ege Bölgesi Diş Hekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi, 24-26 Nisan 2009; Fethiye
2. **NAMAZOĞLU, B.**, ÖZ, F.T. (2012). Epilus Fissuratum: Bir Olgu Sunumu. Ege Bölgesi Diş Hekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongresi, 19-22 Nisan 2012. Antalya
3. **NAMAZOĞLU, B.**, ÖZ, F.T. (2012). Apeksifikasyon Tedavisinde İki Farklı Yaklaşım: Bir Olgu Sunumu. Ege Bölgesi Diş Hekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongresi, 19-22 Nisan 2012. Antalya
4. ÇETİNKAYA, M., ÖZ, F.T., **NAMAZOĞLU, B.** (2012). Ozon Tedavisi Uygulanan Ve Uygulanmayan İki Fissur Örtücünün İn Situ Koşullarda Değerlendirilmesi. 19. Türk Pedodonti Derneği Bilimsel Kongresi, 4-7 Ekim 2012, Antalya

VII-Bilimsel Etkinlikleri

Katıldığı Bilimsel Sempozyum ve Kongreler:

12th Congress of the Bass. 12-14 April 2007, İstanbul, TURKEY

15. Türk Pedodonti Derneği Uluslararası Kongresi. 17-21 Ekim 2007, Antalya, TÜRKİYE

11. Ege Bölgesi Dişhekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi.

24-26 Nisan 2009, Fethiye, TÜRKİYE

17. Ege Bölgesi Dişhekimleri Odaları Uluslararası Bilimsel Kongre ve Sergisi. 19-22 Nisan 2012, Antalya, TÜRKİYE

19. Türk Pedodonti Derneği Uluslararası Kongresi. 4-7 Ekim 2012, Antalya, TÜRKİYE

