T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ PEDODONTİ ANABİLİM DALI

FARKLI TİPTE DİŞ FIRÇALARININ KULLANIMINA BAĞLI OLARAK GÖRÜLEN MİKROPLASTİK SALINIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ: BİR DENEYSEL ÇALIŞMA

Hazırlayan
Arş. Gör. Dt. Gözde ÜLKER

Danışman
Doç. Dr. Özgür DOĞAN

Tez No: 58
2025 – AFYONKARAHİSAR

T.C
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

Pedodonti Anabilim Dalı

FARKLI TİPTE DİŞ FIRÇALARININ KULLANIMINA BAĞLI OLARAK GÖRÜLEN MİKROPLASTİK SALINIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ: BİR DENEYSEL ÇALIŞMA

Arş. Gör. Dt. Gözde ÜLKER
DİŞ HEKİLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

Danışman
Doç. Dr. Özgür DOĞAN

Bu çalışma; Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi BAP Komisyonu tarafından 24.DUS.007 proje numarası ile desteklenmiştir.

2025 – AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI

Bu çalışmanın etik kurul onayı Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan alınmıştır (07.06.2024 tarihli 2024/4 sayılı karar). (EK-1)

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın hazırlanmasında ve tüm akademik hayatım boyunca bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, her daim ufkumu açan ve yol gösterici olmuş kıymetli tez danışman hocam Doç. Dr. Özgür DOĞAN'a,

Uzmanlık eğitim süresince desteklerini hep hissettiğim ve bana rehber olan Doç. Dr. Burcu GÜÇYETMEZ TOPAL, Dr. Öğr. Üyesi İsmail Haktan ÇELİK, Dr. Öğr. Üyesi Mehmet ÜNAL, Dr. Öğr. Üyesi Hatice Türkoğlu ve Dr. Öğr. Üyesi Ayça Hande SARİ'ye

Bu çalışmanın deney aşamasında bilgi ve tecrübeleriyle bana hep destek olan Dr. Öğr. Üyesi Sadık KAĞA, Dr. Öğr. Üyesi Elif KAĞA, Prof. Dr. Korhan ALTUNBAŞ ve Müh. Gizem ERGÜNER'e,

Uzmanlık süresince yoldaşlarım olan, her zaman yanımda olduklarını bildiğim ve hissettiğim canım arkadaşlarım Dt. Ayşenur KULA, Dt. Büşra YILDIZ ve Dt. Seray DOĞAN'a

Uzmanlık eğitim süreci boyunca birlikte çalışmaktan keyif aldığım tüm Pedodonti Anabilim Dalı asistanlarına ve yardımcı sağlık personeline,

Hayatımın her döneminde olduğu gibi uzmanlık eğitimi sürecimde de yanımda olan, koşulsuz sabır, sevgi ve fedakarlıklarıyla bana güç veren, motivasyon kaynaklarım olan canım annem Fatma ÜLKER'e, canım babam Eyüp ÜLKER'e ve canım ablam Özge ÜLKER'e,

Çocukluk yıllarımdan itibaren dostluklarını, sevgilerini ve güvenlerini hiçbir zaman eksik etmeyen canım arkadaşlarım Başak Tekin ve Ege Bilaloğlu'na, üniversite sıralarından bu yana desteğini ve sevgisini hep hissettiğim Ayşen Çağlı ve Beyzanur Bingöl'e,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

Arş. Gör. Dt. Gözde ÜLKER
Afyonkarahisar, Eylül 2025

FARKLI TİPTE DİŞ FIRÇALARININ KULLANIMINA BAĞLI OLARAK GÖRÜLEN MİKROPLASTİK SALINIMININ DEĞERLENDİRİLMESİ: BİR DENEYSEL ÇALIŞMA

Arş. Gör. Dt. Gözde ÜLKER

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Pedodonti Anabilim Dalı Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi
Eylül 2025
Danışman Doç. Dr. Özgür DOĞAN

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, farklı markalara ait çocuk diş fırçalarının kullanımı sonrası tükürük örneklerinde mikroplastik varlığını ortaya koymak ve diş fırçası kıllarının oral mikroplastik maruziyetine olası katkısını değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya 7–14 yaş arası çocuklar dahil edilerek, beş farklı markaya ait diş fırçaları (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) katılımcılara dağıtılmıştır. Deney grubunda, fırçaların bir aylık kullanımından sonra tükürük örnekleri toplanmış; ön çalışma grubunda ise fırça kullanımı öncesinde alınan tükürükler çeşitli kombinasyonlarla (saf tükürük, tükürük + RIPA, tükürük + mikroplastik + RIPA) hazırlanarak analiz edilmiştir. Çalışmada mikroplastik tespit yöntemlerinden, etiketleme yöntemlerinden biri olan Nile Red boyası kullanılarak floresan mikroskobu (Texas Red, Parlak Alan ve Faz Kontrast filtreleri altında görüntüleme) tercih edilmiş; bunun yanı sıra Dijital Mikroskop analizi de yapılmıştır.

Bulgular: Ön çalışma grubuna ait tükürük örneklerinde floresan mikroskobu altında anlamlı bir ışıma tespit edilmezken, deney grubunda fırça kullanımından sonra toplanan tüm örneklerde tükürüklerde benzer morfolojide ve yoğunlukta tekrarlanabilir şekilde mikroplastik partiküller gözlenmiştir. Görsellerde mikrometre ölçeğinde farklı boyutlarda partiküller belirlenmiştir. Dijital mikroskop altında ön çalışma grubunda herhangi bir boyama gözlenmezken, deney grubunda Nile Red kaynaklı kırmızı renkli boyalı alanlar yine mikroplastik varlığına işaret etmektedir.

Sonuç: Mikroplastikler çevresel kirliliğin önemli bir bileşeni haline gelmiş ve hem ekosistemler hem de insan sağlığı üzerinde potansiyel riskler oluşturmaktadır. Bu çalışma, çocuk diş fırçalarının kullanım süreci boyunca mikroplastik salınımına neden olabileceğini ve bu partiküllerin tükürük yoluyla ağız ortamına geçebileceğini göstermiştir. Gelecekte plastik fırçaların ağız sağlığı için sunduğu faydalar göz ardı edilmeden biyobozunur veya doğal materyallerden üretilmiş alternatif diş fırçalarının geliştirilmesi, oral mikroplastik maruziyetini azaltmak için önemli bir adım olabilir.

Anahtar Kelimeler: plastik diş fırçası, floresan mikroskop, dijital mikroskop, RIPA, mikroplastik

EVALUATION OF MICROPLASTIC RELEASE DUE TO THE USE OF DIFFERENT TYPES OF TOOTHBRUSHES: AN EXPERIMENTAL STUDY

Gözde ÜLKER

Afyonkarahisar Health Sciences University Faculty of Dentistry
Department of Pediatric Dentistry Specialty Thesis in Dentistry
September 2025
Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Özgür DOĞAN

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to demonstrate the presence of microplastics in saliva samples collected after the use of different brands of children's toothbrushes and to evaluate the potential contribution of toothbrush bristles to oral microplastic exposure.

Materials and Methods: Children aged 7–14 years were included in the study, and five different brands of toothbrushes (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) were distributed to the participants. In the preliminarygroup, saliva samples were collected after one month of toothbrush use, while in the control group, saliva collected before toothbrush use was prepared in various combinations (pure saliva, saliva + RIPA, saliva + microplastic + RIPA) and analyzed. For the detection of microplastics, Nile Red staining, one of the labeling methods, was applied. Imaging was performed using fluorescence microscopy (Texas Red, Phase Contrast, and Bright Field filters), and digital microscopy analyses were also conducted.

Results: While no significant fluorescence emission was observed in the control group saliva samples, microplastic particles with similar morphology and density were consistently detected in all preliminary group samples collected after toothbrush use. Micrometer-scale particles of varying sizes were identified in the images. Under digital microscopy, no staining was observed in the control group, whereas red-stained areas derived from Nile Red indicated the presence of microplastics in the experimental group.

Conclusion: Microplastics have become a major component of environmental pollution, posing potential risks to both ecosystems and human health. This study demonstrated that children's toothbrushes may release microplastics during use, which can subsequently be transferred into the oral cavity through saliva. In the future, without disregarding the oral health benefits of plastic toothbrushes, the development of biodegradable or natural-material alternatives may represent an important step toward reducing oral microplastic exposure.

Keywords: Plastic toothbrush, fluorescence microscopy, digital microscopy, RIPA, microplastic

İÇİNDEKİLER

Sayfa

İÇ KAPAK i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK SAYFASI ii
TEŞEKKÜR iii
ÖZET iv
ABSTRACT v
İÇİNDEKİLER vi
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ x
TABLOLAR DİZİNİ xii
ŞEKİLLER DİZİNİ xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. MİKROBİYAL DENTAL PLAK 3
2.2. MİKROBİYAL DENTAL PLAĞIN UZAKLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ 4
2.2.1. Kimyasal Yöntemler 4
2.2.1.1. Diş Macunları 4
2.2.1.2. Ağız Gargaraları 6
2.2.2. Mekanik Yöntemler 6
2.2.2.1. Arayüz Temizleyicileri 6
2.2.2.1.1. Arayüz Fırçaları 7
2.2.2.1.2. Diş İpi 7
2.2.2.2. Dil Temizleyicileri 8
2.2.2.3. Ağız Duşu (Oral İrrigatör) 8
2.2.2.4. Diş Fırçaları 9
2.2.2.4.1. Plastik Başlıklı Diş Fırçaları 10
2.2.2.4.2. Diş Fırçalama Teknikleri 11
2.3. TÜKÜRÜK 11
2.3.1. Tükürük Bezleri 12
2.3.2. Tükürüğün Organik İçeriği 13
2.3.2.1. Enzimler 13
2.3.2.2. Proteinler 13
2.3.2.3. Lipitler 13

2.3.3. Tükürüğün İnorganik İçeriği 14
2.3.3.1. Sodyum ve Potasyum 14
2.3.3.2. Kalsiyum ve Fosfat 14
2.3.3.3. Bikarbonat ve pH Dengesi 14
2.3.3.4. Magnezyum 15
2.3.4. Tükürüğün İşlevi 15
2.3.5. Diş Hekimliğinde Tükürüğün Tanısal Rolü 15
2.3.6. Tükürük Tespit ve Analiz Yöntemleri 16
2.3.6.1. Enzimatik Tespit (α-Amilaz Aktivitesi) 16
2.3.6.2. İmmünolojik Testler (IgA ve Spesifik Antijenler) 16
2.3.6.3. DNA Analizi 16
2.3.6.4. Spektroskopik Yöntemler 17
2.3.6.5. Biyosensörler 17
2.4. PLASTİKLER 17
2.5. MİKROPLASTİKLER 18
2.5.1. Mikroplastiklerin Sınıflandırılması 18
2.5.2. Mikroplastiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Potansiyel Etkileri 19
2.5.3. Mikroplastiklerin Diş Hekimliğinde Kullanımı ve Yeri 19
2.5.4. Mikroplastik Tespit Yöntemleri 20
2.5.4.1. Mikroskopik Yöntemler 21
2.5.4.2. Spektroskopik Yöntemler 22
2.5.4.3. Kütle Spektrometrisi ve Gaz Kromatografisi 23
2.5.4.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC) 24
2.5.4.5. Optik Temelli Partikül Karakterizasyon Yöntemleri 24
2.5.4.5.1. Akım Sitometrisi 24
2.5.4.5.2. Dinamik Işık Saçılması (DLS) 25
2.5.4.6. Etiketleme Yöntemleri 25
2.5.4.7. Termal Analiz 26
2.5.4.8. Sensörler 26
2.5.5. Mikroplastik Ayrıştırma Yöntemleri 26
2.5.5.1. Fiziksel Yöntemler 27
2.5.5.1.1. Yoğunluk Ayrıştırma 28
2.5.5.1.2. Filtrasyon (Süzme) 28
2.5.5.1.3. Eleme 28

2.5.5.1.4. Santrifüjleme 28
2.5.5.2. Kimyasal Yöntemler 28
2.5.5.2.1. Asidik ve Bazik Çözeltilerle Ayrıştırma 29
2.5.5.2.2. Mikroplastiklerin Çözücülerde Çözünmesi 29
2.5.5.2.3. Enzimatik Sindirim 29
2.5.5.2.4. Şelatlama 30
2.5.5.3. Biyolojik Yöntemler 30
2.5.5.3.1. Mikroorganizmalar Yoluyla Ayrıştırma 30
3. GEREÇ VE YÖNTEM 32
3.1. GEREÇ 32
3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kimyasallar 32
3.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 32
3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzeme ve Kimyasallar 35
3.2. YÖNTEM 39
3.2.1. Örneklem Seçimi ve Örnek Toplanması 39
3.2.2. Mikroplastik Kontaminasyonunu Önlemeye Yönelik Katılımcı Yönergeleri 40
3.2.3. Ön Çalışma Numune Grubunun Hazırlığı 42
3.2.4. Deney Grubunun Hazırlığı 53
4. BULGULAR 57
4.1. FLORESAN MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ 57
4.1.1. Diş Fırçası Gruplarına Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri 58
4.1.1.1. Oral-B Diş Fırçası Grubu Görüntüleri 58
4.1.1.2. Splat Diş Fırçası Grubu Görüntüleri 59
4.1.1.3. TePe Diş Fırçası Grubu Görüntüleri 60
4.1.1.4. Curaprox Diş Fırçası Grubu Görüntüleri (Şekil 4.4.) 61
4.1.1.5. Rocs Diş Fırçası Grubu Görüntüleri 62
4.1.2. Ön Çalışma Grubuna Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri 63
4.1.3. Deney Grubuna Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri 73
4.1.3.1. Oral-B Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü 73
4.1.3.2. Splat Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü 75

4.1.3.3. TePe Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü 77
4.1.3.4. Curaprox Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü 79
4.1.3.5. Rocs Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü 81
4.2. DİJİTAL MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ 84
4.2.1. Ön Çalışma Grubu Dijital Mikroskop Görüntüleri 84
4.2.2. Deney Grubu Dijital Mikroskop Görüntüleri 87
4.2.2.1. Oral-B Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü 87
4.2.2.2. Splat Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü 89
4.2.2.3. TePe Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü 90
4.2.2.4. Curaprox Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü 92
4.2.2.5. Rocs Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü 93
5. TARTIŞMA 95
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 112
7. KAYNAKLAR 114
EKLER 129
EK-1 ETİK KURUL ONAYI 129
EK 2 – BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU 130

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

%	: Yüzde
°C	: Santigrat Derece
µg	: Mikrogram
µL	: Mikrolitre
µm	: Mikrometre
ADA	: Amerikan Diş Hekimleri Birliği
BPA	: Bisfenol A
Ca^{+2}	: Kalsiyum İyonu
Cl^{-}	: Klorür İyonu
cm	: Santimetre
DLS	: Dinamik Işık Saçılması
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DNAaz	: Deoksiribonükleaz
EDS	: Enerji Dağılımlı Spektroskopi
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EDX	: Enerji Dağılımlı X-Işını Spektroskopisi
ELISA	: Enzim Bağlantılı İmmünosorbent Analizi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GC	: Gaz Kromatografisi
GC-MS	: Kütle spektrometrisi ve gaz kromatografisi
GPC	: Jel Geçirgenlik Kromatografisi
Gustin	: Karbonik Anhidraz
H_2O_2	: Hidrojen Peroksit
H_2SO_4	: Sülfirik Asit
HCl	: Hidroklorik Asit
IgA	: İmmünoglobulin A
IgG	: İmmünoglobulin G
IgM	: İmmünoglobulin M
IR	: Kızılötesi (Infrared)
ISO	: Uluslararası Standart Organizasyonu
K^{+}	: Potasyum
KCl	: Potasyum Klorür

KOH : Potasyum Hidroksit

L : Litre

LC-MS : Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi

mg : Miligram

Mg^{+2} : Magnezyum

MP : Mikroplastik

mL : Mililitre

mm : Milimetre

MS : Kütle Spektrometresi

n : örneklem büyüklüğü

Na^{+} : Sodyum

NaCl : Sodyum Klorür

NaOH:: Sodyum Hidroksit

nm : Nanometre

PA : Poliamid

PBS : Fosfat Tamponlu Salin

PE : Polietilen

pH : Hidrojen İyon Konsantrasyonu

PP : Polipropilen

PRG : Prolin Zengin Glikoprotein

PS : Polistiren

RIPA : Radyoimmün Presipitasyon Analizi Tamponu

RNA : Ribonükleik Asit

RNAaz : Ribonükleaz

SDS : Sodyum Dodesil Sülfat

SEC : Boyut Dışlama Kromatografisi

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SLPI : Sekretuar Lökosit Proteaz İnhibitörü

TEM : Transmisyon Elektron Mikroskobu

THF : Tetrahidrofuran

UV : Ultraviyole

VEGH : Vasküler Endotel Büyüme Faktörü

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 2.1. Diş fırçalama yöntemleri ve diş fırçasının hareketi 11
Tablo 2.2. Tükürüğün Görevleri 15
Tablo 2.3. Mikroplastik Tespit Yöntemleri 21
Tablo 2.4. Mikroplastik Ayrıştırma Yöntemleri 27
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar 32
Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar 35
Tablo 3.3. RIPA Solüsyonu İçeriği 43
Tablo 3.4. Ön çalışma grubu hasta örnekleri için optimizasyon çalışma şeması tablosu 43

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 3.1. Vorteks Karıştırıcı 33
Şekil 3.2. Hassas Terazi 33
Şekil 3.3. Mikroskop ve kamerası 34
Şekil 3.4. Santrifüj Cihazı 34
Şekil 3.5. Dijital mikroskop 34
Şekil 3.6. Pipet ve Pipet ucu 35
Şekil 3.7. Nile Red Boyası 36
Şekil 3.8. Teksoll çözeltisi 36
Şekil 3.9. İnsülin enjektörü 36
Şekil 3.10. Mikroskop Lam ve Lameli 37
Şekil 3.11. RIPA Solüsyonu 37
Şekil 3.12. Tüp standı 37
Şekil 3.13. Eppendorf Tüpü 38
Şekil 3.14. Falkon Tüpü 38
Şekil 3.15. Akış Diyagramı 41
Şekil 3.16. Çalışmanın birinci günü alınan tükürük örnekleri 44
Şekil 3.17. Vorteks cihazının çalışması 45
Şekil 3.18. Pipet yardımıyla tükürük alınması 45
Şekil 3.19. Eppendorf tüpüne tükürük ve RIPA solüsyonu çözeltisi eklenmesi 46
Şekil 3.20. İnsülin enjektörü ile ‘çek- bırak’ yöntemi uygulaması 46
Şekil 3.21. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra eppendorf tüpünde oluşan süpernatant ve pellet fazı görüntüsü 47
Şekil 3.22. Nile Red stok ve boya solüsyonunun hazırlanması 48
Şekil 3.23. Boyama süresi tamamlandıktan sonraki eppendorf tüpü görüntüsü 49
Şekil 3.24. Kullanılan Teksoll çözeltisi 50
Şekil 3.25. Yıkama işlemleri sonrası eppendorf tüpü görüntüsü 51
Şekil 3.26. Floresan mikroskopta incelenmek üzere hazırlanmış örnekler 52
Şekil 3.27. Kesilmiş fırça kıllarının (soldan sağa sırasıyla; Oral-B, Tepe, Curaprox, Splat ve Rocs) ve zımpara kullanılarak fırça kıllarından elde edilen tozların görüntüsü 52
Şekil 3.28. Curaprox grubu fırça kılının boyama sonrası görüntüsü 53

Şekil 4.1. Oral-B diş fırçası grubu görüntüleri 58
Şekil 4.2. Splat diş fırçası grubu görüntüleri 59
Şekil 4.3. TePe diş fırçası grubu görüntüleri 60
Şekil 4.4. Curaprox diş fırçası grubu görüntüleri 61
Şekil 4.5. Rocs diş fırçası grubu görüntüleri 62
Şekil 4.6. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü 64
Şekil 4.7. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü 65
Şekil 4.8. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü 66
Şekil 4.9. Tükürük+RIPA grubu floresan mikroskobu görüntüleri 68
Şekil 4.10. Tükürük+Mikroplastik grubu floresan mikroskobu görüntüleri 70
Şekil 4.11. Tükürük+RIPA+Mikroplastik grubu floresan mikroskobu görüntüleri 72
Şekil 4.12. Oral-B diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü 74
Şekil 4.13. Splat marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü 76
Şekil 4.14. TePe marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü 78
Şekil 4.15. Curaprox marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü 80
Şekil 4.16. Rocs marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü 82
Şekil 4.17. Ön çalışma grubu örneklerinin dijital mikroskoptaki görüntüsü 85
Şekil 4.18. Oral-B diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü 88
Şekil 4.19. Splat diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü 89
Şekil 4.20. TePe diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü 91
Şekil 4.21. Curaprox diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü 92
Şekil 4.22. Rocs diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü 93

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik, 20. yüzyılın ortalarından itibaren endüstriyel üretimin en temel materyallerinden biri haline gelmiş, düşük maliyetli, dayanıklı ve çok yönlü yapısıyla günlük yaşamın vazgeçilmez bir parçası olmuştur (1). Ancak plastik atıkların çevrede birikimi, zamanla parçalanarak mikroplastik (MP) adı verilen 5 mm'den küçük parçacıklara dönüşmesiyle çevre ve sağlık sorunlarına yol açmıştır. Mikroplastikler ilk kez okyanuslarda tespit edilmiş olsalar da günümüzde toprakta, tatlı sularda, havada ve hatta insan vücudunda dahi varlıkları kanıtlanmıştır (2–4). Giderek artan sayıda çalışmada, mikroplastiklerin besin zinciri, solunum ya da temas yoluyla insan vücuduna girdiği ortaya konulmuştur. Bu giriş yolları arasında özellikle oral yol, en sık rastlanan ve doğrudan sindirim sistemi ile bağlantılı olanıdır. İçme suyu, deniz ürünleri, tuz, bal gibi sıklıkla tüketilen gıdaların yanı sıra anne sütünde bile mikroplastiklere rastlanmış olması, ağız boşluğunun ve tükürüğün mikroplastik kontaminasyonuna maruz kalabileceği varsayımını güçlendirmektedir (2).

Tükürük; tat ve koku alma, sindirim, tamponlama ve antimikrobiyal etki gibi işlevlerinin yanı sıra aynı zamanda bireyin genel sağlık durumunu yansıtan biyobelirteçleri taşıyan kompleks bir vücut sıvısıdır. İçeriğinde enzimler, proteinler, elektrolitler, mukus ve çeşitli hücreler barındıran tükürük bu yönüyle hem sistemik hem de lokal çevresel maruziyetlerin belirlenmesinde önemli bir biyolojik örnek olarak değerlendirilmiştir (3).

Literatürde, mikroplastiklerin insan vücudundaki varlığına dair çalışmalar çoğunlukla dışkı, kan, plasenta ve akciğer dokusu gibi örnekler üzerinde yoğunlaşmıştır. Ancak mikroplastiklerin üst gastrointestinal sistemdeki varlığına dair bilgiler hâlâ sınırlıdır (3). Bu noktada tükürük örneklerinin incelenmesi hem toplama kolaylığı hem de ağız boşluğu gibi ilk temas bölgelerine dair bilgi edinme fırsatı sunmaktadır.

Özellikle gıda tüketimi ve kişisel hijyen ürünlerinin kullanımı sonrası ağız boşluğuna taşınan mikroplastiklerin, burada bir süre kalabileceği veya doğrudan tükürükle birlikte yutularak sindirim sistemine geçebileceği öngörülmektedir. Bununla birlikte, sigara kullanımı, ağız hijyeni alışkanlıkları, yaşanılan çevredeki hava kirliliği

ve kullanılan diş fırçası ya da ağız çalkalama suyu gibi faktörlerin de tükürükteki mikroplastik yoğunluğunu etkileyebileceği düşünülmektedir (2).

Tükürükte mikroplastiklerin tespit edilmesi, yalnızca maruziyetin ortaya konması açısından değil, aynı zamanda potansiyel toksikolojik etkilerin anlaşılması bakımından da önemlidir. Mikroplastiklerin taşıdığı katkı maddeleri, ağır metaller veya bakteriyel patojenler, ağız mukozası gibi geçirgen dokularda iltihaplanmalara, hücresel stres yanıtlarına veya uzun vadede sistemik etkilere neden olabilmektedir. Özellikle nanoplastik boyutuna inmiş parçacıkların hücresel düzeyde absorbe edilme olasılığı, ağız epitelyumu açısından potansiyel bir risk teşkil etmektedir (4). Dolayısıyla tükürükte mikroplastik varlığının belirlenmesi, yalnızca çevresel maruziyetin değil, aynı zamanda oral sağlık üzerindeki potansiyel etkilerin de değerlendirilmesine katkı sağlayacaktır.

Bu çalışmanın amacı, farklı tipte diş fırçası kullanımına bağlı olarak insan tükürük örneklerinde mikroplastik partikül varlığını araştırmak aynı zamanda bu varlığın bazı çevresel ve bireysel faktörlerin (ağız bakım ürünlerinin kullanımı) etkisiyle olan ilişkisini analiz etmek ve değerlendirmektir. Ayrıca, kullanılan numune toplama ve analiz yöntemlerinin optimize edilmesiyle birlikte, ileride yapılacak çalışmalar için metodolojik bir temel oluşturulması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. MİKROBİYAL DENTAL PLAK

Ağız içerisinde bulunan mikroorganizmaların çoğaldığı ve diş yüzeyine yapışarak biyofilm oluşturduğu yapıya mikrobiyal dental plak adı verilir (5). Biyofilm, ağız içerisinde doğal olarak kendiliğinden bulunan çeşitli bakteri, virüs ve mantar türlerinin zamanla bir araya gelerek oluşturduğu karmaşık bir yapıdır (5,6).

Dental plak genellikle renksiz, şeffaf ve jelatinimsi bir tabaka olarak görülür ancak zamanla mineralize olup diş taşına dönüşebilir (7). Dental plak, beyaz nokta lezyonlarından diş çürüklerine hatta diş eti ve alveolar kemiği dahi etkileyen periodontal hastalıklara kadar pek çok dental hastalığa yol açabilmektedir (8).

Dental plak oluşumu, diş yüzeyine bakteri ve diğer mikroorganizmaların yapışması ile başlar. Bu ilk mikroorganizma kolonizasyonu, genellikle ağızda bulunan *Streptococcus Mutans* gibi karyojenik bakteriler tarafından gerçekleştirilir (9). Zamanla bakteriler çoğalır, kolonize olur ve plak içinde farklı bakteriyel gruplar arasında etkileşim başlar. Bu süreç, plak içinde bakterilerin büyümesi ve birbirleriyle etkileşimde bulunarak daha karmaşık bir biyofilm yapısının oluşmasına yol açar (10). Karyojenik bakteriler, şekerli besinlerle beslenerek asidik ortamlar yaratır ve diş minesinin demineralizasyonuna ve yıkımına sebep olur (11).

Biyofilm, çeşitli mikroorganizmaların oluşturduğu kompleks bir yapıdır (12). Ağızda *Fusobacterium Nucleatum* ve *Porphyromonas Gingivalis* gibi periodontal hastalıklara yol açabilen patojenler bulunur (13). Periodontal hastalıklar, bu patojen bakterilerin inflamasyon oluşturmasıyla birlikte diş eti iltihabından diş kaybına kadar ilerleyebilir (13). Dental plak, *Porphyromonas Gingivalis* gibi patojenik bakteriler tarafından oluşturulan inflamasyonla ilişkilidir. Bu bakteriler, diş eti dokusuna zarar verir ve diş eti kanaması, şişlik ve ağrı gibi belirtiler ortaya çıkar, ilerleyen aşamalarda diş kaybına yol açabilir. Dental plağın yapısal özellikleri; mikroorganizmaların besin maddeleri, pH seviyeleri, oksijen miktarı gibi çevresel faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir (14).

2.2. MİKROBİYAL DENTAL PLAĞIN UZAKLAŞTIRMA YÖNTEMLERİ

Diş çürükleri ve periodontal hastalıklar gibi ağız sağlığı problemlerinin başlıca etkenlerinden biri olan mikrobiyal dental plağın kontrolü hem ağız sağlığı hem de genel vücut sağlığını korumak için önemlidir (8). Mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasında en temel yöntem, bireylerin günlük olarak uyguladığı ağız hijyeni uygulamalarıdır (15). Mikrobiyal dental plak, diş çürükleri, periodontal hastalıklar, diş eti hastalıkları, kök kanal enfeksiyonları, alveolit ve çeşitli boğaz enfeksiyonlarının gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, dental plağın uzaklaştırılması, ağız ve intraoral çevre dokuların sağlığını korumak açısından gereklidir (16).

Dental plağın diş yüzeylerinden ve komşu dokulardan temizlenmesi için iki ana yöntem kullanılmaktadır: kimyasal ve mekanik yöntemler. Bu yöntemler, plağın ortadan kaldırılmasına ve ağızda sağlıklı bir bakteri dengesinin sağlanmasına yardımcı olur (17).

2.2.1. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal plak kontrolünde mikroorganizma adezyonunun engellenmesi ve bu sayede biyofilm oluşumunun önüne geçilmesi amaçlanır. Aynı zamanda kimyasal plak kontrolünde kullanılan materyal içeriğiyle de antimikrobiyal etki sağlanmış olur (18).

Kimyasal plak kontrolü için en yaygın kullanılan ajanlar, diş macunları ve ağız gargaralarıdır. Diş macunları, özellikle antibakteriyel ajanlar ve florür içerikleri ile plak oluşumunu engellemeye yardımcı olurken (19), ağız gargaraları oral dokulardaki mikroorganizmaların sayısını azaltarak plak oluşumunun önüne geçer (20).

2.2.1.1. Diş Macunları

Diş macunları, günlük ağız bakımının önemli bir bileşenidir ve dişlerin temizliğini sağlamak, ağız hijyenini korumak ve diş çürüklerini engellemek amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır. Diş macunları yalnızca fiziksel temizlik sağlamakla kalmaz, aynı zamanda birçok durumda diş çürüğü, periodontal hastalıklar, diş hassasiyeti ve diğer ağız hastalıklarına karşı koruma sağlar (21). Diş macunlarının ana bileşenleri arasında, yüzey aktif ajanlar, aşındırıcılar, bağlayıcılar, nemlendiriciler, aktif bileşenler, koruyucular ve tatlandırıcılar yer alır (22). Yüzey aktif ajanlar,

deterjan etkilidir ve kararlı bir yapıya sahiptir. Yüzey aktif ajanlar diş macunlarına %1-2 oranında eklenir ve sıklıkla sodyum lauril sülfat kullanılır. Antimikrobiyal etkiye sahip bir köpürtücüdür. Mikroorganizmaları öldürür, yüzey enerjisini düşürür ve proteinleri denatüre eder (23). Diş macunlarında bulunan aşındırıcı maddeler; kalsiyum karbonat, dikalsiyum fosfat gibi bileşenlerdir. Aşındırıcılar, dişlerdeki bakteri plağını hızlı ve etkili bir şekilde ortadan kaldırır (24). Diş macunlarının stabilitesini ve kıvamını kontrol eden maddeler bağlayıcılardır. Bağlayıcılar arasında en yaygın kullanılanlar karragenan, aljinat, sodyum karboksimetilselüloz, magnezyum alüminyum silikat, sodyum magnezyum silikat ve kolloidal silikadır. Diş macununun ağızda kolayca dağılmasını, tüpten kolayca sıkılmasını ve diş fırçasında düzgün bir şekilde kalmasını sağlayan yapılardır (24). Nemlendiriciler, nem kaybını ve sertleşmeyi önler ve tatlandırıcı etkileri de olabilir. Yaygın olarak kullanılanlar; gliserin, sorbitol, propilen glikol ve mannitoldür. Koruyucu olarak kullanılan benzoat, mikroorganizmaların büyümesini engelleyici bir etkiye sahiptir (24).

Diş macunlarına tatlandırıcı olarak eklenen maddeler arasında sodyum aspartam, sakarin, sodyum siklamat ve asesülfam-K bulunur. Bu maddeler, çürük yapıcı mikroorganizmalar tarafından metabolize edilmez. Bunların yanı sıra, ksilitol, sorbitol ve izomalt da diş macunlarına eklenen tatlandırıcı maddeler arasında sayılır (24). Tatlandırıcıların yanı sıra, diş macunlarında mentol, nane, anason, limon ve okaliptüs gibi aroma verici maddeler de kullanılır. Son zamanlarda diş macunlarına Potasyum nitrat gibi hassasiyet önleyici ve diş taşı oluşumunu engelleyen Tetrasodyum Pirofosfat gibi ajanlar eklenmiştir (25).

Florür, diş macunlarının en yaygın aktif bileşenidir. Hem sistemik (örneğin içme suyu ve tabletler yoluyla) hem de topikal (diş macunu, ağız gargaraları, jel ve vernikler aracılığıyla) formlarda uygulanabilmektedir. Temel etki mekanizması, mine yüzeyinde florapatit oluşumunu destekleyerek asidik ortamlara dirençli bir yapı sağlamasıdır. Bunun yanı sıra florür, plak mikroorganizmalarının asit üretimini baskılayarak demineralizasyon sürecini yavaşlatmakta ve bu sayede çürük oluşumunu engellemektedir. Aynı zamanda erken dönemde başlayan lezyonlarda remineralizasyonu destekler (26). Diş macunları triklosan, çinko sitrat, klorheksidin, sodyum bikarbonat gibi antimikrobiyal ajanlar da içerir. Bu bileşenler, bakteriyel yüke etki ederek bakterisit ve bakteriostatik etki gösterirler (25). Ağız kokusunun (halitozis)

da azaltılmasına yardımcıdır (7). Özellikle periodontal hastalıkların önlenmesinde, triklosan gibi antimikrobiyal ajanların etkili olduğu gösterilmiştir (27).

2.2.1.2. Ağız Gargaraları

Ağız gargaraları, ağız hijyenini sağlamak, diş sağlığını korumak ve çeşitli ağız hastalıklarını önlemek amacıyla yaygın olarak kullanılan genellikle sıvı formülasyonlardır (28). Ağız gargaraları, plak birikimini azaltmada yardımcı olur. Antimikrobiyal ağız gargaraları, bakteri çoğalmasını engelleyerek plak oluşumunu önlemeye yardımcı olur. Bu gargaralar, özellikle fırçalamadan sonra uygulanarak ağızda kalan mikroorganizmaların sayısını azaltabilir (29).

Ağız gargaralarının etkinliği, içeriklerine ve kullanım amacına bağlı olarak değişiklik gösterebilir (30). Gargaralar, genellikle klorheksidin gibi antimikrobiyal, sodyum bikarbonat gibi antienflamatuar, lidokain ya da benzidamin gibi ağrı kesici ve florür gibi dental dokuları reminalize edici özelliklere sahip bileşenler içerir (29).

Ağız gargaraları güvenli olsa da yanlış ve uzun süreli kullanıldığında bazı olumsuz etkilere yol açabilir (20). Özellikle, klorheksidin gibi güçlü antimikrobiyal bileşenler içeren gargaraların uzun süreli kullanımı, ağızda hoş olmayan bir tat, dişlerde renk değişikliği ve ağız kuruluğuna yol açabilir (20). Ayrıca, florür içeren gargaraların aşırı kullanımı, dental ya da sistemik florozis gibi istenmeyen yan etkilere yol açabilir (31).

2.2.2. Mekanik Yöntemler

Literatüre bakıldığında dental mikrobiyal dental plağın uzaklaştırılmasında en etkili yöntem düzenli olarak uygulanması gereken mekanik plak kontrolüdür (15). Ağız ve diş sağlığının bütünlüğünün sağlanmasında karşımıza çıkan mekanik yöntemler; diş fırçaları, arayüz temizleyicileri (arayüz fırçaları ve diş ipi), dil temizleyicileri, ağız duşudur (32).

2.2.2.1. Arayüz Temizleyicileri

Mekanik plak kontrolü, dişlerin arasındaki plak ve mikroorganizmaların temizlenmesi için önemli bir yöntemdir ve bu amaçla çeşitli arayüz temizleyicileri kullanılmaktadır (33). Bu araçlar, diş fırçası ile ulaşılması güç olan dişler arası

boşluklarda etkili bir temizlik sağlamak için geliştirilmiştir. Arayüz temizleyicileri arayüz fırçası ve diş ipi olmak üzere iki ana başlıkta incelenir (34). Diş fırçalamaya ek olarak arayüz fırçaları ve diş ipi ile yapılan temizlik, dişler arasındaki plağın uzaklaştırılmasında oldukça etkilidir. Özellikle diş fırçası ile ulaşılması zor olan bölgelerde, bu araçların kullanımı plak kontrolünü iyileştirir ve periodontal hastalıkların önlenmesine katkı sağlar (35).

2.2.2.1.1. Arayüz Fırçaları

Arayüz fırçaları, özellikle dişlerin interproksimal alanlarında biriken dental plak ve mikroorganizmaların uzaklaştırılması amacıyla dişler arasındaki boşluğa uygun olarak farklı genişliklerde üretilmiş konik ve silindirik yapıda olan küçük başlı diş fırçalarıdır (36). Arayüz fırçalarının yapısı incelendiğinde tipik olarak ince, küçük başlıklı ve esnek kıllara sahip diş temizleme araçları olduğu görülür. Genellikle plastik saplı ve farklı boyutlarda üretilirler (37).

Arayüz fırçalarının kılları genellikle naylon veya benzeri materyallerden yapılır, bu da diş etlerine zarar vermeden etkili bir temizlik sağlamayı mümkün kılar. Ayrıca, bazı arayüz fırçaları antimikrobiyal özelliklere sahip kıllara sahiptir, bu da ağızda bakteriyel çoğalmayı ve arayüz çürüklerinin oluşumunu engellemeye yardımcı olur (38). Aynı zamanda ortodontik tedavi gören hastalara ve dental implanta sahip hastalara da arayüz temizliğinde arayüz fırçaları ve diş ipi kullanımı önerilir (39)(40).

2.2.2.1.2. Diş İpi

Diş ipi, genellikle naylon, teflon veya polietilen malzemelerden üretilmiş, dişlerin aproksimal bölgesini temizlemek için kullanılan bir arayüz temizleyicisidir (17). Naylon diş ipi, çok sayıda telin bükülmesiyle üretilir ve genellikle daha ince arayüzlerde kullanılabilirken, teflon diş ipi kaygan yapısı sayesinde daha rahat bir kullanım sunar ve diş etlerine zarar vermeden temizlik sağlar (41). Diş ipi, dişler arasındaki mikroorganizmaların ve plakların ortadan kaldırılmasında önemli bir araç olarak, ağız hijyeninin korunmasına yardımcı olur (17). Yapılan çalışmalar, diş ipi kullanımının diş eti iltihaplarını azalttığını, diş etlerindeki iltihaplanmayı %30 oranında azalttığı, diş eti kanamasını önlediğini (42,43) ve plak birikimini engellediğini göstermektedir (44).

2.2.2.2. Dil Temizleyicileri

Dil temizleyicileri, dil yüzeyindeki bakteriler, yiyecek artıkları ve ölü hücrelerin temizlenmesi amacıyla kullanılan araçlardır (45). Ağız sağlığı açısından önemli olan dil bakımı, diş fırçalama ve diş ipinin ötesinde, ağızdaki bakteri florasının dengede tutulmasına yardımcı olur (46). Ağız kokusunun en yaygın nedenlerinden biri olan dil yüzeyinde biriken plak, aynı zamanda periodontal hastalıkların gelişimine de zemin hazırlar (47). Dil temizleyicileri, bu birikintilerin temizlenmesinde etkili bir yöntem olarak ağız hijyeninin önemli bir parçası olarak kabul edilir (46).

Dil temizleyicileri, genellikle metal veya plastik malzemeden yapılmış, dil yüzeyine sürtünerek veya kazıyarak mekanik temizlik yapan aletlerdir (45). Paslanmaz çelik ve plastikten yapılan dil temizleyicileri en yaygın kullanılan tiplerdir. Paslanmaz çelik, dayanıklı ve uzun ömürlüdür, ancak plastik dil temizleyicileri daha hafif ve ergonomiktir (48). Her iki tip de dil yüzeyine zarar vermeden temizlik yapacak şekilde tasarlanmıştır (48).

Dil temizleyicilerinin, dildeki bakteriyel yükü azaltmaya yönelik etkisi, çeşitli klinik çalışmalarda kanıtlanmıştır. Yapılan bir çalışmada dil temizleyicilerinin bakteriyel plak ve ağız kokusu üzerinde olumlu etkiler yarattığını ve dil temizliği yapan bireylerde, diş fırçalamaya ek olarak dil temizleyicisi kullanımının, oral flora üzerinde daha dengeli bir etki yarattığını göstermektedir (49).

Dil temizleyicileri yalnızca dil yüzeyindeki plakları temizler; ancak diş eti hastalıkları ve diş çürükleri gibi diğer ağız sağlığı sorunlarının çözümü için yeterli değildir. Bu nedenle, dil temizleyicileri diğer ağız bakım araçlarıyla birlikte kullanılmalı ve düzenli olarak temizlenmelidir (50).

2.2.2.3. Ağız Duşu (Oral İrrigatör)

Ağız duşu (oral irrigatör), ağız içindeki bakteriyel plakların ve ağız içindeki yiyecek artıklarının temizlenmesinde kullanılan bir cihazdır (41). Bu cihaz, su veya özel bir ağız bakım çözeltisi ile ağız içindeki bölgeleri püskürterek temizlik sağlar (41). Ağız duşları, özellikle diş fırçası ve diş ipinin ulaşamadığı bölgelerde etkili bir plak kontrolü sağlayarak, ağız hijyenini iyileştirir (51).

Ağız duşları, su veya antiseptik solüsyonları yüksek basınç altında ağız içine püskürterek çalışır. Bu basınçlı akış, dişler arasındaki boşlukları, diş etlerini ve ağız içinde zor ulaşılabilen alanları temizler (52). Araştırmalar, ağız duşunun periodontal hastalıkların önlenmesinde ve gingivitis tedavisinde etkili olduğunu göstermiştir (53–57). Ancak, ağız duşlarının bazı sınırlamaları da vardır. Özellikle aşırı basınçlı su kullanımı, hassas diş etlerine zarar verebilir. Bu yüzden cihazın kullanımında dikkatli olunmalı ve doğru basınç ayarı yapılmalıdır (52). Ağız duşu etkili bir plak temizliği sağlar ancak diş fırçalama gibi temel ağız bakım yöntemleriyle desteklenmelidir (57). Ayrıca, ağız duşları bazı antiseptik solüsyonlarla kullanıldığında, ağızdaki patojenik mikroorganizmaların sayısını azaltarak ağız kokusunu da önler (58).

2.2.2.4. Diş Fırçaları

Diş fırçası, ağız hijyeninin sağlanmasında en yaygın ve temel araçtır. Dişlerin düzenli olarak fırçalanması, diş çürükleri, periodontal hastalıklar ve diş eti hastalıklarının önlenmesinde kritik bir rol oynar (59). Diş fırçaları, mekanik bir temizlik sağlarken, dişlerin yüzeyinden plak, bakteriler ve yiyecek artıklarının uzaklaştırılmasına yardımcı olur. Bununla birlikte, diş fırçalarının etkinliği, kullanılan fırçanın türüne, fırçalama tekniğine ve sıklığına bağlı olarak değişir (60). Ağız hijyenini etkili bir şekilde sağlamak için dişlerin günde en az iki kez ve iki dakika fırçalanması önerilmektedir (61).

Diş fırçaları, manuel ve elektrikli olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Manuel diş fırçaları, genellikle daha düşük maliyetli olup, bireylerin kendi kontrolünde dişlerini fırçalamalarını sağlar. Elektrikli diş fırçaları ise, ayarlanabilir dental temizlik modları ve fırçalama teknikleri içerir (30). Diş fırçası başlıkları, dişlerin yapısına uygun şekilde tasarlanmış farklı şekil ve boyutlarda olabilir. Diş fırçası başlıklarının boyutu, bireylerin ağzındaki erişilebilirliğe göre değişir. Küçük başlıklar, arka dişler gibi ulaşılması zor bölgelerde daha etkili temizlik sağlarken, büyük başlıklar daha geniş alanlarda kullanılabilir (62). Diş fırçası kılları ise farklı sertliklerde (yumuşak, orta, sert) ve çeşitlerde olabilir.

Yumuşak kıllı fırçalar, genellikle diş etleri için daha nazik olup, diş etlerinde tahriş yapmadan temizlik sağlar. Sert kıllı fırçalar, daha derin temizlik sağlasa da aşırı kullanıldığında diş etlerinde hasara yol açabilir (39). Diş fırçalamanın etkinliği, sadece

kullanılan diş fırçasının türüne değil, aynı zamanda fırçalama tekniğine de bağlıdır. Etkili ve doğru fırçalama tekniğinde diş etlerinden dişlere doğru süpürme hareketi yapılır ve iki dakikalık diş fırçalama süresi, plakların etkin bir şekilde temizlenmesine olanak tanır (63). Ağız hijyeni uygulamaları yalnızca diş yüzeyini değil, aynı zamanda diş etlerini ve dilin yüzeyini de temizleyecek şekilde yapılmalıdır (64). Piyasada bulunan bazı diş fırçalarının arka yüzeyine silikondan oluşan dil temizleyicileri eklenmiştir. Bu sayede fırçalama ile dil yüzeyinin temizliği de sağlanmış olur (49). Bununla birlikte, diş fırçalarının aşırı kullanımı diş minesine zarar verebilir ve diş etlerinde çekilmelere yol açabilir (61). Aşınmış fırça kılları, etkili temizlik sağlamaz ve diş etlerine zarar verebilir. Bu sebeple diş fırçasının her üç ayda bir değiştirilmesi gerektiği önerilmiştir (65).

2.2.2.4.1. Plastik Başlıklı Diş Fırçaları

1930'lu yıllarda diş fırçalarında naylon kılların kullanılmaya başlamasıyla toplumlarda diş fırçalama alışkanlıkları gelişmeye başlamış ve günümüze kadar diş fırçalarının tasarımı konusunda önemli gelişmeler olmuştur. İdeal bir diş fırçası sert ve yumuşak dokulara zarar vermeden etkili bir biçimde plağı temizleyebilmelidir (66).

Avrupa Çalışma Grubunun 'Mekanik Plak Kontrolü' isimli bildirgesinde ideal diş fırçası tarif edilmiştir. İdeal diş fırçası; kullanan bireyin yaşına, yeteneğine ve ağız büyüklüğüne uygun bir fırça başlığı içermelidir (67). Ayrıca Uluslararası Standart Organizasyonu (ISO) standartlarına uygun yumuşaklıkta, naylon veya polyesterden imal edilmiş, uçları yuvarlatılmış ve çapları 0,25 mm'den büyük olmayan fırça kıllarına sahip olmalıdır (68). Etkili bir diş fırçası, boyutu ve şekliyle kullanıcının gereksinimlerine uygun, kullanımı kolay olmalıdır. (69). Amerikan Diş Hekimleri Birliği (ADA); dişeti çekilmelerini ve diş aşınmalarını en aza indirmek için, fırça kıl uçlarında keskin veya tırtıklı kenarların olmaması gerektiğini belirtmiştir (70).

Zamanla plastik başlıklı diş fırçalarının kıl yapıları modifiye edilmiş ve gümüş nanopartikül ve aktif kömür gibi antimikrobiyal ajanlar fırça kıllarına eklenmiştir. (71,72). Gümüş nanopartiküller biyofilm oluşumunu kontrol altına alarak karyojenik bakterilerin üremesini engeller (73). Ayrıca, düşük maliyetli olmaları ve düşük sitotoksisiteye sahip olmaları da önemli avantajlarındandır (73,74) . Güçlü ve geniş

spektrumlu antimikrobiyal özellikleri, oksidatif streslerin indüklenmesini, tiyol gruplarına bağlanarak bakteriyel enzimlerin deaktivasyonunu sağlar (75).

2.2.2.4.2. Diş Fırçalama Teknikleri

Manuel fırçalarla farklı diş fırçalama yöntemleri bulunmaktadır (76). Diş fırçalama yöntemleri, fırçanın hareketi ve konumuna göre Tablo 2.1'deki gibi sınıflandırılmıştır (77).

Tablo 2.1. Diş fırçalama yöntemleri ve diş fırçasının hareketi (77)

Fırçalama Yöntemi	Fırçanın hareketi
Leonard	Dikey
Bass	Sulkuler
Modifiye Stilman	Yuvarlak
Stilman/Charters/Bass	Titreşimli
Fonlar	Dairesel
Smith	Fizyolojik
Scrub	
Yatay	

Yukarıdaki tablodan da anlaşılacağı üzere çeşitli fırçalama yöntemleri bulunmasına rağmen yapılan çalışmalar fırçalama teknikleri arasında dental plağın etkili temizliği ve gingival inflamasyonu azaltma açısından anlamlı bir farklılık bulunmadığını göstermiştir (78,79). Yapılan çalışmalar incelendiğinde Modifiye Stilman tekniğinin uygulama kolaylığı ve etkili plak temizliği sağlaması sebebiyle bu tekniği etkili kılmıştır (65,80–82). Bu teknikte fırça kılları diş yüzeyinde 45° açı yapacak şekilde yerleştirilir ve hafif, kısa titreşimlerle dişler fırçalanır (83). Fırça kılları dişeti oluğu içerisine girmediği için diş eti çekilmesi olan bölgede rahatlıkla kullanılabilir (83).

2.3. TÜKÜRÜK

Tükürük, ağız boşluğunda bulunan hafif asidik (pH 6.5-7.2) bir vücut sıvısıdır (84–86). Tükürük salgısının yaklaşık %99,5'ini esas olarak su oluştururken, geri kalanı ise tükürük bezlerinde lokal olarak üretilen tükürük ve bileşiklerinin yanı sıra kan dolaşımı yoluyla vücutta bulunan bileşenlerden oluşur. Organik bileşenlerden α-amilaz, laktoferrin gibi proteinler, lipitler ve nükleik asit parçaları bulunurken, inorganik bileşenlerden Sodyum (Na^+), Potasyum (K^+), Kalsiyum (Ca^{2+}), Magnezyum

(Mg^{2+}) ve Klorür (Cl^{-}) gibi iyonlar bulunur(84,87,88). Tükürük yalnızca tükürük bezlerinin salgılarının değil, aynı zamanda diş eti oluğu sıvısı, bronşiyal/burun salgıları, bukkal/mukozal/kan (plazma) transüdası, hücresel bileşenler, mikroorganizmalar/ virüsler ve bunların metabolizma ürünleri, yiyecek artıkları ve ekzojen kimyasalların/ilaçların artıkları gibi tükürük dışı kökenli birçok bileşenin kompleks bir karışımını ifade eder (84,89–91).

Ağız sağlığının korunmasında kritik bir rol oynayan tükürük, sindirim, koruma, temizlik ve kayganlık gibi çok çeşitli biyolojik işlevlere sahiptir (92). Tükürük bezleri tarafından üretilen bu sıvı, yutkunma, konuşma gibi fonksiyonel süreçlerin düzgün işlemesine yardımcı olur (92). Ayrıca tükürük, ağız içinde bakteriyel dengeyi sağlayarak, diş çürüklerini ve periodontal hastalıkları önlemeye yardımcı olur (92) Ayrıca, tükürükteki immünolojik parametreler, glukoz, üre gibi metabolitler, enzim ve hormon gibi biyobelirteçler, kanser, diyabet ve bağışıklık sistemi hastalıklarının tespiti için bir teşhis aracı olarak kullanılmaktadır (93,94).

2.3.1. Tükürük Bezleri

Ağzın çiğneme, fonksiyon ve fonasyon gibi birçok işlevi, ağız boşluğunun nemli kalmasını gerektirir. Majör ve minör tükürük bezleri, seröz, müsinöz veya serömüsinöz sıvının sürekli salgılanması yoluyla ağız dokuları nemini korur. Majör tükürük bezleri parotis, submandibular ve sublingual bezlerdir (95).

1. Parotis Bezi: Yüzde, kulak önünde yer alan ve en büyük tükürük bezi olan parotis bezi, seröz tükürük üretir. Bu bez, Stensen kanalı aracılığıyla tükürüğü ağza iletir (96).
2. Submandibular Bez**:** Alt çene altında yer alan submandibular bez hem seröz hem de muköz tükürük üretir ve Wharton kanalı aracılığıyla tükürüğü ağza boşaltır (96).
3. Sublingual Bez**:** Dilin alt kısmında yer alan sublingual bez, muköz tükürük üretir ve küçük kanallar aracılığıyla tükürüğünü ağza boşaltır (96).

Minör tükürük bezleri, dudak mukozasından ve damaktan dile ve ağız tabanına kadar ağız boşluğunun her yerinde bulunur. Bunlara ek olarak, ağız içinde küçük tükürük bezleri de bulunur ve bunlar, genellikle muköz tükürük üretirler (97). Tükürük bezlerinin fonksiyon kaybı, ağız kuruluğuna neden olabilir. Ağız kuruluğu, tükürük

üretiminin azalmasıyla ortaya çıkar ve genellikle yaşlanma, ilaç kullanımı, radyoterapi gibi faktörlerle ilişkilidir (98). Bu durum, diş çürüklerinin, periodontal hastalıkların, ağız enfeksiyonlarının ve yutkunma zorluklarının artmasına yol açabilir (99,100,101).

2.3.2. Tükürüğün Organik İçeriği

Tükürüğün organik bileşenleri, vücudun pek çok biyolojik fonksiyonunun gerçekleşmesinde kritik rol oynar. Bu bileşenler arasında proteinler, enzimler, peptitler, amino asitler ve lipitler yer alır (102).

2.3.2.1. Enzimler

Tükürük, sindirim sürecinde önemli rol oynayan bir dizi enzime sahiptir. En bilinen enzimlerden biri olan amilaz, karbonhidratların sindirimine yardımcı olur. Amilaz, polisakkaritleri daha küçük birimlere dönüştürerek karbonhidratların sindirilmesini kolaylaştırır. Lingual lipaz, ağızda bulunan yağların sindirilmesine katkı sağlar Lizozim bakteriyel hücre duvarlarını parçalayarak mikroorganizmaların büyümesini engeller. Bu sayede tükürük, ağız içindeki mikroorganizmaların kontrol edilmesinde önemli bir rol oynar (103).

2.3.2.2. Proteinler

Tükürük, vücudun metabolik süreçlerine dahil olan çeşitli serbest amino asitler içerir. Glisin ve glutamin gibi amino asitler, tükürüğün biyolojik işlevlerini düzenlerken, aynı zamanda vücudun stres yanıtlarını modüle eder (104). Tükürükte bulunan antimikrobiyal peptitler, bağışıklık sisteminin bir parçası olarak çalışır. Histatinler ve salyosin gibi peptitler, ağızdaki patojenlerle savaşır. Ayrıca, mukoproteinler (mukus) tükürüğün viskozitesini artırarak, ağız dokusunun korunmasına yardımcı olur. Ayrıca mukus ağız içindeki dokuların kayganlığını sağlayarak, yiyeceklerin yutulmasını kolaylaştırır (104).

2.3.2.3. Lipitler

Tükürükteki lipitler, hücre zarlarının yapısal bileşenleri olan fosfolipitlerden oluşur. Bu lipitler, ağız mukozasının korunmasına ve dokuların onarımına yardımcı olur. Ayrıca bazı lipitler, mikroorganizmaların çoğalmasını engelleyen antimikrobiyal özelliklere sahiptir (104).

2.3.3. Tükürüğün İnorganik İçeriği

Tükürüğün pH dengesinin düzenlenmesi, mineral dengesinin korunması ve özellikle diş çürüklerinin önlenmesi, tükürüğün mineral içeriğine bağlıdır. Kalsiyum ve fosfat iyonlarının varlığı, diş minesinin mineralizasyonuna ve demineralizasyona karşı korunmasına yardımcı olur. Bikarbonat iyonları ise ağızdaki asidik ortamın nötralize edilmesini sağlayarak, dişlerin asidik etkilerden korunmasına katkıda bulunur (105). Ayrıca tükürüğün inorganik içeriği ağızdaki mikroorganizmaların çoğalmasını engeller böylece periodontal hastalık zemini olan mikrobiyal dental plak oluşumu da kısmen engellenmiş olur (106).

2.3.3.1. Sodyum ve Potasyum

Tükürüğün en bol bulunan inorganik bileşenlerinden biri olan sodyum, tükürüğün osmotik basıncını düzenler. Potasyum ise, hücre zarlarının elektriksel dengesinin ve asidik ortamın düzenlenmesinde önemli rol oynar. Potasyum ve sodyum arasındaki dengenin bozulması, ağızdaki asidik ortamı etkileyerek diş çürüklerine yol açar (104).

2.3.3.2. Kalsiyum ve Fosfat

Kalsiyum ve fosfat iyonları, diş sağlığı üzerinde kritik bir etkiye sahiptir. Tükürükteki kalsiyum, diş minesinin mineralizasyonunu desteklerken, fosfat iyonları ile, diş yüzeylerinin asidik ortamlardan korunmasına ve pH dengesini sağlamaya yardımcı olur. Tükürüğün içindeki bu iyonlar, diş minesini remineralize etme özelliği sergileyerek diş çürüklerinin önlenmesini sağlar (104).

2.3.3.3. Bikarbonat ve pH Dengesi

Bikarbonat (HCO_3^-), tükürüğün önemli inorganik bileşenlerinden biridir ve asidik ortamları nötralize etme işlevine sahiptir. Bu iyon, ağızda pH dengesini koruyarak, asidik yiyeceklerin veya içeceklerin tükürükle temas ettikten sonra diş minesine zarar vermesini engeller. Bikarbonat, ayrıca tükürüğün tamponlama kapasitesini artırarak, mikroorganizmaların ağızda çoğalmasını engeller ve bu sayede ağız sağlığın korunmasına yardımcı olur (107).

2.3.3.4. Magnezyum

Magnezyum iyonları tükürüğün pH seviyesini düzenlemenin yanı sıra, diş minesinin korunmasına yardımcı olur ve diş çürüklerinin önlenmesinde etkili olur. Ayrıca, magnezyumun, tükürük bezlerinin işlevselliğinde rol oynayarak, ağız kuruluğu gibi patolojileri engellemeye yardımcı olduğu düşünülmektedir (104).

2.3.4. Tükürüğün İşlevi

Tükürüğün dişler, gıdalar ve mikroorganizmalar olmak üzere üç ana başlıkta işlevleri bulunmaktadır. Bu başlıklar altında işlevleri ve bu işlevleri yerine getiren bileşikler aşağıdaki Tablo 2.2.'de gösterilmektedir (108).

Tablo 2.2. Tükürüğün Görevleri (108)

Kategori	Görev / Fonksiyon	İlgili Bileşenler
Gıda	Bolus Oluşumu	Müsin, Su
Dişler	Tat	Gustin (karbonik anhidraz), Zn^{2+}, Su
	Sindirim	Amilaz, Proteaz, Lipaz, DNAaz, RNAaz
	Tampon	Bikarbonat, Fosfat, Protein
	Demineralizasyona Karşı Koruma	Müsin, Ca^{2+}, Fosfat
	Remineralizasyon	PRG (Prolinden zengin glikoprotein), Staterin, Ca^{2+}, Fosfat
Mikroorganizmalar	Kayganlık	Müsin, PRG
	Anti-Bakteriyel	Lizozim, Laktoferrin, Kalprotektin, Laktoperoksidaz, İmmünoglobulin, Kromogranin A
	Anti-Viral	Histatin, Kromogranin A, İmmünoglobulin
	Anti-Fungal	Sistatin, Histatin, VEGH (Vasküler Endotel Büyüme Faktörü), SLPI (Sekretuar Lökosit Proteaz İnhibitörü)
	Anti-Fungal (destekleyici)	Sistatin, Müsin, İmmünoglobulin, SLPI

2.3.5. Diş Hekimliğinde Tükürüğün Tanısal Rolü

Tükürük analizleri, ağız sağlığının belirlenmesinde ve sistemik hastalıkların teşhisinde kullanılır. Son yıllarda, tükürük biyobelirteçlerinden özellikle organik içeriğin hastalıkların erken teşhisinde önemli bir etken olduğu anlaşılmıştır. Ağız sağlığında diş çürüğü riski ve periodontal hastalıkların ve vücudun genel sağlığında ise kanser, çeşitli enfeksiyonlar, diyabet ve Sjogren sendromu gibi sistemik hastalıkların teşhisinde potansiyel bir yardımcıdır. Tükürük örnekleri, hastaların sağlık

durumlarını anlamak için non-invaziv bir yöntem sunar ve tıbbi teşhislerde önemli bir araçtır (109).

- Çürük riski değerlendirmesi: Tükürük pHsi, tamponlama kapasitesi ve laktik asit üretimi testleri ile değerlendirme yapılır (110).
- Periodontal durumun takibi: İnflamatuar mediatörler (IL-1β, MMP-8) tükürükte tespit edilebilir (111).
- Oral kanser erken tanısı: Tükürükteki DNA metilasyonu, mRNA, protein biyobelirteçleri analiz edilebilmektedir (112,113).
- Sistemik hastalıkların taranması: Diyabet, HIV, HCV gibi durumların biyobelirteçleri tükürükte saptanabilir (114,115).

2.3.6. Tükürük Tespit ve Analiz Yöntemleri

Günümüzde enzim aktivitesi, immünolojik testler, DNA analizleri, spektroskopik yöntemler ve biyosensörler sayesinde tükürükte analizler yapılabilmektedir (116).

2.3.6.1. Enzimatik Tespit (α-Amilaz Aktivitesi)

Adli bilimlerde tükürüğün varlığını belirlemede yaygın olarak kullanılan α-amilaz enzimi, diş hekimliği açısından da önemlidir. Artmış α-amilaz seviyesi, stres, diş eti iltihabı gibi durumlarla ilişkili olabilir ve α-amilaz enziminin nişastayı parçalaması sebebiyle nişasta içeren testlerle tükürük varlığı kolayca tespit edilebilir (116).

2.3.6.2. İmmünolojik Testler (IgA ve Spesifik Antijenler)

İmmünolojik testlerde, tükürükteki insan özgü proteinlere karşı antikorlar kullanılır. Diş hekimliğinde bu yöntem, tükürükteki IgA düzeylerinin değerlendirilmesiyle oral bağışıklık durumunun izlenmesini sağlar (117).

2.3.6.3. DNA Analizi

Tükürükten elde edilen hücrelerdeki DNA hem genetik testler hem de adli kimliklendirme açısından önemlidir. DNA analizi diş hekimliğinde genetik yatkınlıkların belirlenmesi ve oral kanser tanısına yönelik biyobelirteçlerin analizi için kullanılabilir (109).

2.3.6.4. Spektroskopik Yöntemler

Fourier dönüşümlü yakın kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Raman spektroskopisi gibi tekniklerle tükürük bileşenleri tanımlanabilir. Spektroskopik yöntemler oral kanser tanısı taramalarında erken dönemde kullanılabilecek veriler sağlar (118).

2.3.6.5. Biyosensörler

Gelişmekte olan teknolojiler sayesinde, kliniklerde tükürükten glukoz, kortizol, laktat gibi biyobelirteçlerin anında ölçülebileceği taşınabilir cihazlar (biyosensörler) kullanılmaya başlanmıştır (119).

Tükürük hem diş hekimliği hem de tıp bilimleri için vazgeçilmez bir biyolojik örnek haline gelmiştir. Kolay elde edilebilirliği, non-invazif doğası ve içerdiği zengin biyobelirteç profili sayesinde; tanı, izlem ve araştırma alanlarında güvenilir bir araç olarak değerlendirilmektedir (119).

2.4. PLASTİKLER

Plastikler, modern yaşamın vazgeçilmez malzemeleri arasında yer almakta ve pek çok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Diş hekimliği de bu alanlardan biridir ve diş tedavileri, akrilik protezler, dolgu malzemeleri, diş beyazlatma ürünleri, ağız bakım ürünleri ve klinikte kullanılan dental aletler gibi çeşitli alanlarda plastikler sıklıkla tercih edilir (120,121) . Plastiklerin bu denli yaygın kullanılmasının nedeni, materyallerin dayanıklılığı, esneklikleri ve estetik açıdan sağladığı avantajlardır. Özellikle diş dolgularında, kompozit rezinler ve polimer bazlı materyallerin kullanımı hem hastaların estetik beklentilerini karşılamakta hem tedavi süreçlerini hızlandırma hem de maliyeti düşürmektedir (1). Ancak, plastik materyallerin zaman içinde deformasyona uğrayabilmesi, tükürük ve ağızda bulunan diğer biyolojik materyallerle reaksiyona girerek istenmeyen kimyasal salınımlara neden olabilir (122). Plastiklerin diş hekimliğindeki kullanımının artması, beraberinde bazı sağlık risklerini de getirmektedir. Plastiklerin içeriğinde yer alan kimyasallar, biyolojik uyumsuzluk yaratabilir ve vücuda zarar verebilir. Bu risklerin başında, plastiklerin bileşiminde yer alan monomerler, plastikleştiriciler ve diğer zararlı kimyasallar gelmektedir (123).

Plastik malzemeler, ağızda uzun süre kaldıklarında, özellikle ısının etkisiyle kimyasal bileşikler salınımına neden olabilirler. Bu kimyasalların, özellikle kompozit dolguların içeriğinde bulunan bisfenol A (BPA) gibi maddeler, hormonal bozukluklara ve diğer sağlık sorunlarına yol açabilir. BPA, östrojen benzeri etkileri nedeniyle dikkatle incelenmiştir ve bazı araştırmalar, diş tedavileri sırasında bu kimyasalların ağız yoluyla emilerek dolaşım sistemine girdiği bulunmuştur (124). Diş hekimliği uygulamalarında kullanılan plastikler, doğada uzun süre çözünmeyen ve biyolojik olarak parçalanmayan maddelerdir. Diş hekimliğinde kullanılan plastik malzemelerin, özellikle tek kullanımlık olanların (örneğin eldivenler, solüsyon şişeleri, sterilizasyon paketleri, restorasyon materyallerinin kapakları ve dış kapları) çevresel etkileri ekosistem sürdürülebilirliği açısından önemli bir sorun oluşturmaktadır (125).

2.5. MİKROPLASTİKLER

Mikroplastikler, çeşitli polimerlerden oluşan, boyutları 5 mm'den küçük olan plastik parçacıkları olarak tanımlanır. Son yıllarda çevresel kirlilikle birlikte mikroplastiklerin varlığı, ekosistemler üzerinde yarattığı tehditler ve potansiyel insan sağlığı riskleri nedeniyle önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir (126). Mikroplastikler, birincil ve ikincil mikroplastikler olmak üzere iki ana başlıkta incelenir (126). Birincil mikroplastikler, doğrudan bu boyutlarda üretilen plastik ürünlerdir ve çoğunlukla kozmetik, temizlik ürünleri ve bazı endüstriyel uygulamalarda bulunurlar. İkincil mikroplastikler ise daha büyük plastiklerin, çevresel faktörlerin etkisiyle zamanla çözünmesi ve küçük parçalara ayrılmasına bağlı olarak oluşur (127).

2.5.1. **Mikroplastiklerin Sınıflandırılması**

Mikroplastikler, farklı özelliklerine göre çeşitli başlıklarda sınıflandırılabilir:

- Şekil: Mikroplastikler granüler, lifler veya parçalı halde değişik morfolojilere sahip olabilir. Bu şekiller, mikroplastiklerin ekosistemlerde nasıl hareket ettiklerini ve biyolojik organizmalar tarafından nasıl tüketildiklerini etkiler (128).

- Polimer Türü: Mikroplastikler, polietilen (PE), polipropilen (PP) ve polistiren (PS) gibi çeşitli sentetik polimerlerden oluşur. Bu polimerlerin her biri, çevrede farklı çözünürlük hızlarına ve toksikolojik özelliklere sahiptir (128).

2.5.2. Mikroplastiklerin İnsan Sağlığı Üzerindeki Potansiyel Etkileri

Mikroplastiklerin insan sağlığı üzerindeki etkileri henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır ancak yapılan çalışmalarda çevreden insana olan maruziyet kesinlik kazanmıştır (129,130) . İnsanların mikroplastiklere olan maruziyeti, çeşitli yollardan olabilir:

- Biyolojik ve Kimyasal Maruziyet: Mikroplastikler, insan vücuduna girerek birikebilir. Örneğin, yapılan bazı çalışmalarda mikroplastikler insan kanında tespit edilmiştir (129,131). Mikroplastikler, üretim sırasında kullanılan plastikleştiriciler ve diğer kimyasal maddeleri içerebilir. Bu maddeler, hormon sistemini etkileyebilir ve potansiyel olarak toksik olabilir (129).
- Toksisite: Mikroplastiklerin taşıdığı kimyasal maddeler, insan hücreleri üzerinde toksik etkilere yol açabilir. Bu etkiler, iltihaplanma ve genetik hasar gibi sorunlara yol açabilir (129).

2.5.3. Mikroplastiklerin Diş Hekimliğinde Kullanımı ve Yeri

Diş hekimliği uygulamalarında, mikroplastik kullanımı yaygındır. Diş dolguları, kompozit rezinler ve diş beyazlatma ürünleri mikroplastik içerir (129). Ağız bakım ürünlerinde bulunan mikroplastikler özellikle diş etlerine zarar verebilir ve uzun vadede ağızda birikerek hem lokal hem de sistemik riskler oluşturabilir (129,132). Ayrıca mikroplastiklerin, taşıdıkları kimyasallar nedeniyle toksik etkiler yaratabileceği yönünde bulgular bulunmaktadır (124). Bu kimyasalların diş dokusunda birikmesi, diş minesinin zarar görmesine, dişlerin aşınmasına ve periodontal hastalıkların gelişmesine yol açabilir (133).

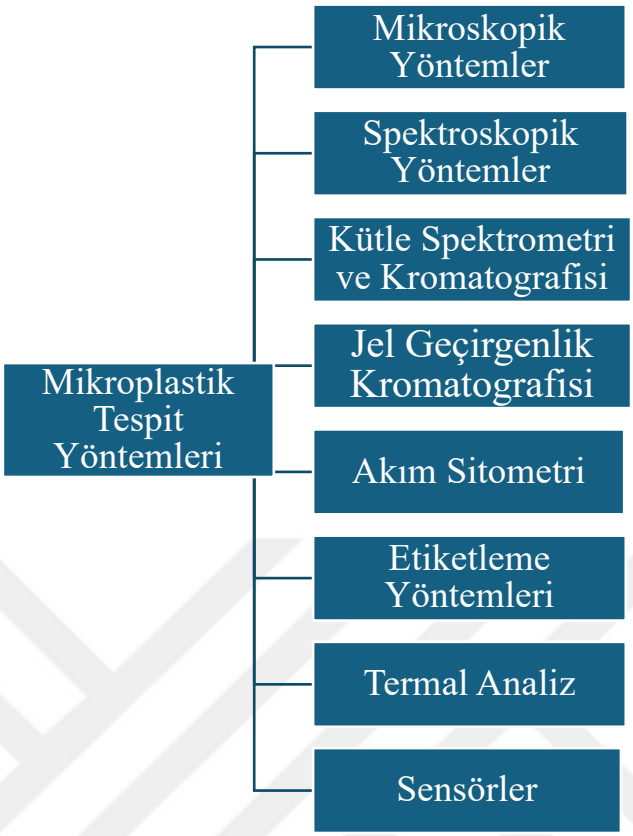
Mikroplastikler yalnızca insan sağlığını değil, çevreyi de tehdit eder. Diş hekimliği uygulamalarında kullanılan bazı plastik malzemeler, doğrudan çevreye salınabilir (1). Özellikle diş tedavileri sonrasında kullanılan tek kullanımlık malzemeler, mikroplastik kirliliğine neden olmaktadır (134). Bu nedenle, diş hekimliğinde daha sürdürülebilir, biyolojik olarak parçalanabilir (biyobozunur)

malzemelerin kullanımı önemli bir araştırma konusu haline gelmiştir. Biyobozunur dental materyallerin kullanımı, mikroplastik kirliliğini azaltmaya yardımcı olarak ve dental endüstride daha sürdürülebilir bir yaklaşımı teşvik edeceği belirtilmiştir (133).

2.5.4. Mikroplastik Tespit Yöntemleri

Mikroplastiklerin çevredeki varlığını tespit etmek için kullanılan yöntemler, genellikle plastik parçacıklarının boyutlarına, şekillerine ve bileşenlerine dayalı olarak farklılık göstermektedir. Bu yöntemler, laboratuvar ortamlarında veya saha çalışmalarında mikroplastiklerin nicel ve nitel analizlerini yapmak için kullanılır (135). Tablo 2.3.'de mikroplastik tespit yöntemleri gösterilmektedir.

Tablo 2.3. Mikroplastik Tespit Yöntemleri



2.5.4.1. Mikroskopik Yöntemler

Mikroskopik analizler, mikroplastiklerin tespiti için ilk ve en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu yöntem, mikroplastiklerin boyutunu, şekil özelliklerini ve kimyasal yapısını belirlemeye yardımcı olur. Optik mikroskopi, mikroplastiklerin hızlı bir şekilde tanımlanabilmesi için basit ve etkili bir araçtır (136). Yüksek miktarda büyük mikroplastik içeren numunelerin tanımlanması hızlı bir şekilde yapılır ve düşük maliyetle kısa sürede mikroplastiklerin genel bir resmi elde edilir (136). Ancak, bu yöntem, özellikle benzer boyuttaki diğer organik ve inorganik partikülleri ayırt etmekte zorlanabilir ve genellikle sınırlı çözünürlük sunar (136). Numunelerin niteliği belirlenemediğinden, genellikle diğer tanımlama yöntemleriyle birleştirme önerilir (137). Mikroplastiklerin biyolojik örneklerde tespitinde kullanılan yöntemler, araştırmaların güvenilirliği ve özgünlüğü açısından büyük önem taşımaktadır. Bu bağlamda floresan mikroskobu, boyama teknikleri ile kombine edildiğinde mikroplastiklerin görselleştirilmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir. Özellikle hidrofobik yapıya sahip boyalar, mikroplastik parçacıkların seçici olarak işaretlenmesini sağlamakta ve floresan mikroskop aracılığıyla bu partiküllerin yüksek

kontrastla görüntülenmesine imkân tanımaktadır. Böylece mikroplastiklerin biyolojik matriks içinden ayrıştırılması kolaylaşmakta ve gözlem doğruluğu artmaktadır (137) .

Öte yandan, dijital mikroskopi teknolojisi, yüksek çözünürlüklü görüntüleme kapasitesi ve yazılım tabanlı analiz olanakları sayesinde mikroplastiklerin morfolojik özelliklerinin ayrıntılı biçimde incelenmesine katkı sağlamaktadır. Dijital mikroskop, farklı büyütme seviyelerinde elde edilen görüntülerin kaydedilmesine, ölçümler yapılmasına ve partikül boyut dağılımının değerlendirilmesine olanak tanıyarak mikroplastik araştırmalarında tamamlayıcı bir rol üstlenmektedir (138). Bu nedenle, floresan ve dijital mikroskopi yöntemlerinin bir arada kullanımı hem görüntüleme hem de ölçümsel doğruluk açısından çalışmalara metodolojik güç kazandırmaktadır.

Daha yüksek çözünürlük sunan bir başka mikroskopik yöntem ise taramalı elektron mikroskopisi (SEM)'dir. SEM, mikroplastiklerin yüzey yapısını ve şekillerini daha detaylı bir şekilde inceleyebilir (139). Ayrıca, enerji dağılım spektrometresi (EDS) ile birleşerek, mikroplastiklerin kimyasal bileşimini analiz etmek mümkündür. SEM, özellikle mikroplastiklerin türünü ve kaynağını belirlemek açısından oldukça yararlı olduğu belirtilmiştir (139). Mikroplastiklerin biyolojik sistemler üzerindeki etkilerinin anlaşılabilmesi için kullanılan yöntemlerin çeşitliliği, elde edilen bulguların güvenilirliğini artırmaktadır. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) ve ona entegre Enerji Dağılımlı X-ışını Spektroskopisi (EDX) yöntemi, çalışmalara hem morfolojik hem de elementel düzeyde derinlik kazandırmaktadır. SEM ile parçacıkların yüzey yapıları ve morfolojik özellikleri yüksek çözünürlükte görüntülenebilirken, EDX analizi sayesinde bu parçacıkların element bileşimleri ortaya konulmaktadır. Böylelikle incelenen partiküllerin yalnızca şekilsel değil aynı zamanda kimyasal açıdan da doğrulanması mümkün olmaktadır. Özellikle mikroplastik araştırmalarında EDX'in kullanımı, karbon, oksijen ve diğer elementlerin ayırt edilmesiyle plastik kökenli partiküllerin daha güvenilir şekilde tanımlanmasına imkân tanımakta ve bu yönüyle araştırmalara güçlü bir metodolojik katkı sunmaktadır (137).

2.5.4.2. Spektroskopik Yöntemler

Spektroskopik yöntemler, mikroplastiklerin kimyasal bileşenlerini ve plastik türlerini tanımlamak için yaygın olarak kullanılır. Fourier dönüşümlü yakın kızılötesi (FTIR) spektroskopisi, mikroplastiklerin bileşenlerini tanımlamak için güçlü bir

tekniktir (136). Numuneler kızılötesi radyasyona tabi tutulur ve maddenin bileşimi ve moleküler yapıları uyarılabilir titreşimler yayar (140). Bu yöntem, mikroplastiklerin kimyasal bileşenlerini yüksek hassasiyetle analiz edebilir ve özellikle mikroplastiklerin türlerini ayırt etmek için kullanılır (140).

FTIR spektroskopisi, mikroplastiklerin çevresel örneklerden izole edilmesini kolaylaştırarak, su, toprak veya hava örneklerinde mikroplastiklerin varlığını tespit etmek için uygundur (140). 500 μm'den büyük parçacık boyutlarını analiz edebilir ve mikroskopi ile birleştirilmiş FTIR, 20 μm'ye kadar olan parçacıkları analiz edebilir (140). Tekniğe entegre edilebilen yazılımlar sayesinde karmaşık agregatlar veya kümeler içindeki tek tek parçacıkların tanınmasını sağlayarak etkili parçacık ölçümüne yol açar (118).

Raman spektroskopisi de benzer şekilde mikroplastiklerin kimyasal yapısını analiz etmek için kullanılan bir başka tekniktir (141). Raman spektroskopisi, plastiklerin polimer yapısını doğrudan analiz ederek, daha az hazırlık gereksinimiyle daha hızlı sonuçlar verir (142). Mikroskopi ile birleştirilmiş Raman Spektroskopisi, >1 μm parçacık boyutunun tespiti için uygundur (142). Ancak, FTIR'ye kıyasla örnekte bulunan organik inorganik içerik sebebiyle daha düşük çözünürlüğe sebep olabilir ve bazı mikroplastik türlerinin tespiti zor olduğu belirtilmiştir (142).

2.5.4.3. Kütle Spektrometrisi ve Gaz Kromatografisi

Kütle spektrometrisi (MS) ve gaz kromatografisi (GC), mikroplastiklerin daha karmaşık kimyasal analizlerini yapmak için kullanılır (143). Bu yöntemler, mikroplastiklerin içerdiği plastikleştiriciler, katkı maddeleri veya diğer toksik bileşiklerin analiz edilmesine olanak tanır (143). Plastiklerin ısı ile parçalanması sonrası çıkan gazlar analiz edilir (143). Bu yöntem, 500 μm'den büyük numuneleri tespit edebilir (143).

Özellikle GC-MS, organik bileşenlerin ayrılmasında etkili olup, mikroplastiklerin kimyasal bileşenlerinin tespitinin hassasiyetini arttırır. Kütle spektrometrisi, mikroplastiklerin ayrıştırılmasında yüksek hassasiyet sunar, ancak genellikle pahalı ve zaman alıcıdır (143).

2.5.4.4. Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC)

Jel Geçirgenlik Kromatografisi (GPC), polimerlerin moleküler özelliklerini incelemek amacıyla yaygın olarak kullanılan bir sıvı kromatografisi tekniğidir (144). Bu yöntem, özellikle molekül ağırlığı dağılımı ve ortalama molekül ağırlıklarının belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. GPC, molekülleri kimyasal yapılarına veya fonksiyonel gruplarına göre değil, hidrodinamik hacimlerine, yani çözeltide kapladıkları fiziksel boyuta göre ayırır. Bu yönüyle boyut dışlama kromatografisi (SEC) olarak da adlandırılır (145).

Ayırma işlemi, gözenekli yapıya sahip sabit faz içeren kolonlar aracılığıyla gerçekleştirilir. Analiz sırasında numune, uygun bir çözücüde çözülerek sisteme enjekte edilir ve sabit faz üzerinden taşınan bir hareketli faz yardımıyla kolondan geçirilir (144,145). Büyük moleküller, sabit fazdaki gözeneklere giremediği için kolondan daha hızlı geçerken; küçük moleküller, gözeneklere girip daha uzun bir yol izlediklerinden kolondan daha geç çıkarlar. Böylece farklı büyüklükteki moleküller, kolondan ayrılma zamanlarına göre sıralanır. Bu ayrım sonucunda, genellikle kırılma indeksi dedektörü, çok açılı ışık saçılımı, viskozimetre veya Ultraviyole (UV) dedektörü gibi sistemlerle ölçüm yapılır. Bu dedektörlerden elde edilen veriler, özel yazılımlar aracılığıyla işlenerek molekül ağırlığı dağılım eğrisi, ortalama molekül ağırlıkları ve polidispersite indeksi gibi kritik parametreler hesaplanır (144,145).

GPC yöntemi, özellikle sentetik ve doğal polimerlerin karakterizasyonu, biyomalzeme geliştirme, farmasötik ürünlerin formülasyonu ve diş hekimliğinde kullanılan kompozit rezinlerin analizinde sıkça tercih edilen güvenilir bir analitik yöntemdir (146).

2.5.4.5. Optik Temelli Partikül Karakterizasyon Yöntemleri

2.5.4.5.1. Akım Sitometrisi

Akım sitometrisi, 0.2–150 μm büyüklüğündeki partiküllerin genellikle de hücrelerin tek tek, bir ışık demetinin önünden, bir sıvı içinde geçerken, anlık olarak ölçümlerini yapan daha sonra da çoklu fiziksel özelliklerini analiz eden bir teknolojidir (147).

Mikroplastiklerin hızlı ve otomatik bir şekilde sayılmasını ve boyutlarının analiz edilmesini sağlayan bir tekniktir (147). Bu yöntemin, mikroplastiklerin boyutlarına göre farklı sınıflandırmalar yapabildiği ve özellikle su örneklerinde mikroplastiklerin yoğunluğunu belirlemek için uygun olduğu belirtilmiştir. Ancak, bu yöntemin dezavantajı, yüksek hassasiyet gerektiren analizlerde düşük çözünürlük sunmasıdır (147).

2.5.4.5.2. Dinamik Işık Saçılması (DLS)

Dinamik Işık Saçılması (DLS), çözelti içerisindeki partiküllerin boyutunu nanometre düzeyinde belirlemek amacıyla kullanılan, yaygın ve hassas bir karakterizasyon tekniğidir. DLS cihazı, genellikle kolloidal sistemlerde, nanoparçacıkların hidrodinamik çapını ölçmek amacıyla tercih edilir (148).

DLS cihazı, numuneye bir lazer ışını göndererek, çözeltideki partiküllerin ışığı saçma biçimlerini analiz eder. Partiküller Brownian hareket sergilediğinden, zaman içinde saçılan ışığın yoğunluğunda dalgalanmalar gözlemlenir. Bu dalgalanmalar, korelasyon fonksiyonları aracılığıyla analiz edilerek partiküllerin difüzyon katsayısı hesaplanır. Ardından, Stokes–Einstein denklemi kullanılarak bu difüzyon katsayısından partiküllerin hidrodinamik çapı elde edilir (148). DLS tekniği oldukça hızlı ve çoğunlukla numunenin ön işlemesini gerektirmez. Özellikle biyolojik makromoleküller, polimerler ve nanoparçacıkların boyut dağılımının ölçülmesinde önemli avantajlar sunar (148).

2.5.4.6. Etiketleme Yöntemleri

Bu yöntemde sıklıkla boyalar tercih edilir. Mikroplastik yüzeyler tespit için kullanılan hidrofobik boyayı emer, bu nedenle mavi ışıkla ışınlandığında floresans yayılır (4). Mikro ölçekli aralıktaki mikroplastikler görselleştirilebilir ve sayılabilir.

Nile Red gibi boyalarla bazı mikroplastikler (özellikle polietilen ve polipropilen) floresan altında görülebilir (4). Düşük maliyetle mikroplastikler hızlı bir şekilde taranır. Dezavantajı ise örneklerdeki mikroplastiklerin yanı sıra organik moleküller de boyanabilir, bu nedenle tespit edilen mikroplastik olduğundan daha fazla tespit edilebilir (4).

2.5.4.7. Termal Analiz

Termal analiz tekniği tipik olarak maddelerin termal stabilitelerine bağlı olarak kimyasal ve fiziksel özelliklerinde meydana gelen her türlü değişikliği ölçer ve spektroskopik tekniklere alternatif olarak kabul edilir. Termal analiz, polimer kompozisyon bilgilerini termal stabilitelerini veya termal bozulmalarını analiz eder. Diferansiyel Tarama Kalorimetrisi bir termal analiz yöntemidir ve amacı mikroplastik içinde bulunan polimerlerin erime sıcaklıklarını ve termal özelliklerini ölçmekte kullanılır.

Bir diğer termal analiz; Termogravimetrik Analizdir. TGA, bir numunenin kütlesinin sıcaklık veya zaman fonksiyonu olarak değişimi izlenerek, numunenin termal özelliklerini ve kararlılığını belirleyen bir termal analiz yöntemidir. Bu analiz, numunenin kütle kaybını veya kazanımını (örneğin, dehidrasyon, bozunma, oksidasyon) sıcaklığa veya zamana bağlı olarak ölçer (143).

2.5.4.8. Sensörler

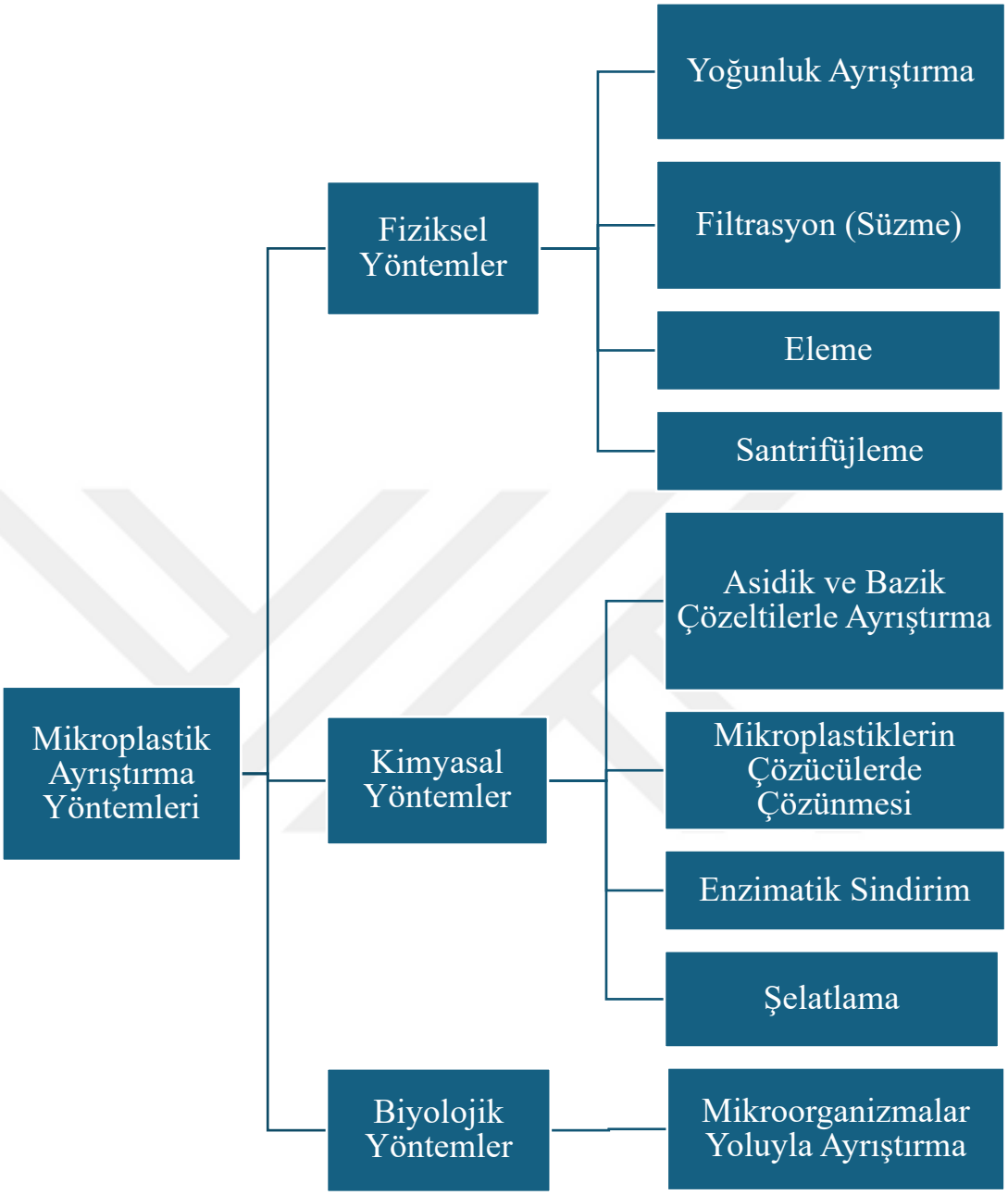
Mikroplastikler çevre ve insan sağlığı açısından artan bir tehdit oluşturmakta olup, geleneksel analiz yöntemleri (örneğin Raman spektroskopi ve GC-MS) duyarlılık, hız ve sahadaki uygulanabilirlik açısından bazı sınırlamalara sahiptir (2).

Bu ihtiyaç çerçevesinde biyosensör tabanlı sistemler, hidrofilik ve hidrofobik plastik parçacıkları tanıma yeteneklerinin yanı sıra yüksek duyarlılık, hızlı sonuç ve etiket kullanmadan tanıma kabiliyetiyle çevre analizlerine yenilikçi bir yaklaşım sunmaktadır (149). Ancak pratik kullanıma geçebilmek için; seçicilik, çok hedefli tanıma kapasitesi ve saha koşullarına uyumluluk gibi teknik zorlukların aşılması gerekmektedir (3).

2.5.5. Mikroplastik Ayrıştırma Yöntemleri

Mikroplastiklerin ayrıştırılması, çevresel örneklerden bu maddelerin etkin bir şekilde izole edilmesi ve kimyasal, fiziksel özelliklerinin belirlenmesi için önemlidir. Bu yöntemler mikroplastiklerin türünü, boyutunu ve yoğunluğunu belirlemeyi amaçlar. Mikroplastik ayrıştırma yöntemleri; fiziksel, kimyasal ve biyolojik olmak üzere üç ana grupta Tablo 2.4.'te sınıflandırılmıştır (135).

Tablo 2.4. Mikroplastik Ayrıştırma Yöntemleri



2.5.5.1. Fiziksel Yöntemler

Fiziksel ayrıştırma yöntemleri, mikroplastiklerin çevresel örneklerden izole edilmesi için yaygın olarak kullanılan basit ancak etkili tekniklerdir. Bu yöntemler, genellikle sıvı örneklerde mikroplastiklerin yoğunluk farklarını veya boyut farklarını kullanarak ayrıştırma işlemi yapar. Mikroplastik ayrıştırmada kullanılan fiziksel

yöntemler, parçacıkların boyutu, yoğunluğu, manyetik özellikleri gibi fiziksel farklarına dayanır (135).

2.5.5.1.1. Yoğunluk Ayrıştırma

Yoğunluk ayrıştırması, mikroplastiklerin farklı plastik türlerine ait yoğunluk farklarını kullanarak bu maddeleri ayıran ve genelde sıvı örneklerde tercih edilen bir yöntemdir. Mikroplastikler genellikle suya göre daha az yoğun olduğundan, yoğunluk farkından faydalanarak suyun içinde yüzmelerine veya dibe batmalarına dayalı ayrıştırma yapılabilir. Bu işlem için kullanılan yoğunlaştırıcı sıvılar arasında su, tuz çözeltisi veya zenginleştirilmiş asidik çözeltilerinin kullanılması mümkündür (150).

2.5.5.1.2. Filtrasyon (Süzme)

Mikroplastikleri ayırmak için filtrasyon yöntemleri de kullanılmaktadır. Bu süreç, örneklerin belirli bir büyüklükteki filtrelerden geçirilmesi ile yapılır. Mikroplastikler genellikle 0.45 µm – 5 mm arası boyutta olduğu için uygun gözenekli filtrelerle ayrılabilir. Örneğin Sıvı örnekler cam elyaf, poliamid veya paslanmaz çelik filtrelerle süzülebilir (151).

2.5.5.1.3. Eleme

Farklı çaplarda elekler kullanılarak mikroplastikler boyutlarına göre sınıflandırılır. Bu yöntem genellikle katı örneklerde (toprak, tortu) kullanılır (152).

2.5.5.1.4. Santrifüjleme

Mikroplastik ve diğer parçacıklar farklı ağırlıklarda olduğu için yüksek devirli santrifüjle ayrıştırılabilir. Özellikle yoğunluk farkını artırmak için yoğun çözeltilerle birlikte kullanılır (139).

2.5.5.2. Kimyasal Yöntemler

Kimyasal ayrıştırma yöntemleri, mikroplastiklerin kimyasal bileşenlerine dayalı olarak ayrıştırılmasını sağlar. Bu yöntemler, fiziksel tekniklere göre daha hassas sonuçlar verebilir ve farklı plastik türlerinin ayrılmasını kolaylaştırabilir.

Mikroplastik ayrıştırmada kimyasal yöntemler, örnekteki organik maddeyi, biyolojik artıkları veya inorganik örnekleri çözerek mikroplastik parçacıklarını ayrıştırmayı hedefler. Bu yöntemler, genellikle fiziksel yöntemlerle birlikte kullanılır ve mikroplastik dışı bileşenleri ortamdan uzaklaştırmak için kullanılır. Kimyasal yöntemler seçilirken, kullanılan reaktiflerin mikroplastik yapısına zarar vermemesi çok önemlidir. Her plastik türü (Polietilen, polipropilen, polistiren, polietilen tereftalat, polivinil klorür vb.) kimyasallara farklı dayanıklılıktadır (153).

2.5.5.2.1. Asidik ve Bazik Çözeltilerle Ayrıştırma

Kimyasal çözücüler, mikroplastiklerin alınan örneklerden izole edilmesinde kullanılır. Örneğin, hidrojen peroksit (H_2O_2), sülfürik asit (H_2SO_4), Sodyum hidroksit (NaOH), Potasyum hidroksit (KOH), RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) solüsyonu ve Fenton reaktifi ($H_2O_2 + Fe^{2+}$) gibi çözeltiler mikroplastikleri alınan örneklerden ayırmak için kullanılan kimyasal maddelerdir.

Bu çözeltiler, mikroplastiklerin biyolojik ve organik materyallerden ayrılmasına yardımcı olur, böylece alınan örneklerde mikroplastiklerin doğru bir şekilde tanımlanmasına olanak tanır. Aşırı agresif kullanılırsa bazı plastik türlerini (örneğin Polietilen Tereftalat, poliamid (naylon)) bozabilir (137,154).

2.5.5.2.2. Mikroplastiklerin Çözücülerde Çözünmesi

Bazı mikroplastikler, özellikle polietilen (PE) veya polipropilen (PP) içerikli materyaller, belirli çözücülerle (Sıcak toluen, yüksek sıcaklıkta ksilen) çözünebilmektedir. Çözünürlük yöntemiyle, örneklerden mikroplastiklerin ayrılması sağlanır. Bununla birlikte, bu yöntem sadece belirli plastik türleri için geçerli olup, her tür mikroplastik için uygulanabilir değildir. Bu tür kimyasal çözücüler genellikle ayrıştırma işlemi sonrası plastiklerin kimyasal bileşenleri analiz edilebilir (130).

Yapılan araştırmalarda genellikle mikroplastiklerin çözücülerle çözülmeleri istenmez, çünkü çözünmeleri yapılan analizi zorlaştırır. (130,155,156).

2.5.5.2.3. Enzimatik Sindirim

Enzimatik sindirimin amacı, mikroplastiklerin kimyasal yapısını bozmadan biyolojik dokuları çözmektir. Kullanılan enzimler genel olarak Proteinaz K**,** lipaz**,**

selülaz**,** pepsin gibi enzimlerdir (154)**.** Proteinaz K proteinleri parçalarken, lipaz yağ içeriğini ve selülaz ise bitkisel selüloz yapılarını parçalar. Özellikle FTIR/Raman gibi hassas spektroskopik analizlerden önce tercih edilir. Bu yöntemin avantajı, enzimatik sindirim esnasında mikroplastiklere zarar vermemesidir ancak pahalı ve zaman alıcıdır. Sıcaklık ve pH gibi koşullar dikkatle ayarlanmalıdır (154) .

2.5.5.2.4. Şelatlama

Ağır metallerin veya inorganik komplekslerin çözülmesi prensibine dayanır. Örneğin Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) gibi şelatlayıcılar bazı metal iyonlarını bağlayıp kompleks oluşturarak ortamdan uzaklaştırmak için kullanılabilir. Bir diğer çalışmada, doğal bir polimer olan kitosan, polialüminyum klorür ile birleştirilerek mikroplastiklerin uzaklaştırılmasında kullanılmıştır (157)

2.5.5.3. Biyolojik Yöntemler

Biyolojik yöntemler, mikroplastiklerin çevreye daha az zararlı bir şekilde ayrılmasını amaçlayan yaklaşımlar olarak gelişmektedir (135).

2.5.5.3.1. Mikroorganizmalar Yoluyla Ayrıştırma

Bu yöntemde belli mikroorganizmaların plastikleri parçalayabilme potansiyelinden yararlanılır. Bazı mikroorganizmalar (özellikle bakteriler ve mantarlar), belirli plastik türlerini sınırlı şekilde parçalayabilir. Örneğin *Ideonella sakaiensis* bakterisi Polietilen Tereftalatı parçalayabilen bakteri türüdür ve bu bakteriyle alakalı literatürde halen çalışmalar devam etmektedir (157).

Bu çalışmanın amacı, insan tükürük örneklerinde mikroplastik partikül varlığını araştırmak aynı zamanda bu varlığın bazı çevresel ve bireysel faktörlerin (ağız bakım ürünlerinin kullanımı) etkisiyle olan ilişkisini analiz etmek ve değerlendirmektir. Ayrıca, kullanılan numune toplama ve analiz yöntemlerinin optimize edilmesiyle birlikte, ileride yapılacak çalışmalar için metodolojik bir temel oluşturulması hedeflenmektedir.

Bu çalışma deneysel bir çalışma olup, çalışmaya katılan hastalardan toplanan tükürük örneklerinde farklı tipte diş fırçası kullanımına bağlı olarak mikroplastik salınımını tespit etmeyi amaçlamaktadır. Çalışmada mikroplastik tespit

yöntemlerinden, etiketleme yöntemlerinden biri olan Nile Red boyası kullanılarak floresan mikroskobu tercih edilmiş; bunun yanı sıra Dijital Mikroskop analizleri de uygulanmıştır.

Mikroplastik ayrıştırma yöntemlerinden ise santrifüjleme ve bazik çözelti ile ayrıştırma olmak üzere iki yöntem kullanılmış; bazik çözelti olarak aynı zamanda organik dokuları çözme özelliğine sahip olan RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay) solüsyonu tercih edilmiştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Müdahale Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 07.06.2024 tarih ve 2024/4 sayılı karar numarası ile onaylanmıştır (EK-1). Çalışma; klinik ve laboratuvar koşullarında gerçekleştirilen deneysel bir çalışma olup, hastalara diş fırçası dağıtımı ve tükürük toplama aşamaları Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'nda yapılmıştır. Toplanan tükürük örneklerinin deneye hazır hale getirilmesi Afyon Kocatepe Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Biyomedikal Mühendisliği Biyomalzeme Laboratuvarı ve Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarlarında yapılmıştır. Deneysel analizler; Afyon Kocatepe Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Histoloji ve Embriyoloji Laboratuvarı'nda yapılmıştır. Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'na başvuran 7-14 yaş aralığında, sistemik bir hastalığı bulunmayan hastalar çalışmamıza dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan gönüllü bireylerin velilerinden Gönüllü Bilgilendirme ve Onam Formu'nu okumalarının ardından imzalı onayları alınmıştır (EK-2).

3.1. GEREÇ

3.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar, Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

3.1.1.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

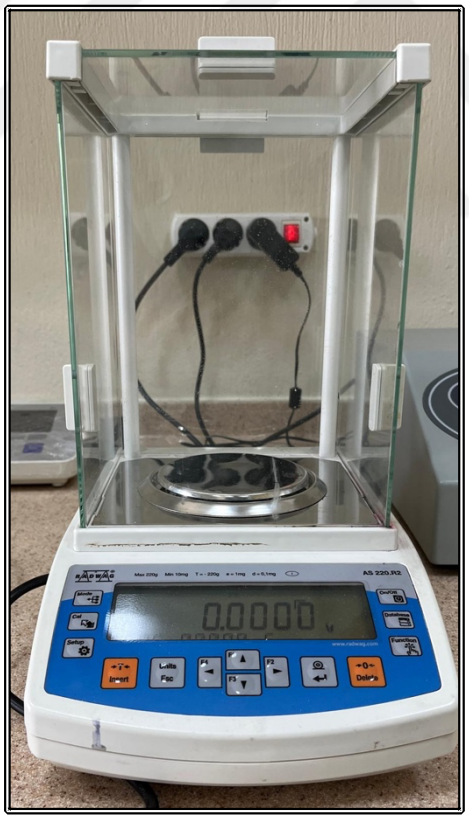
Tablo 3.1. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Üretici	Model/Katalog No	Cihaz
Bosch	KDN76XWE0N	Derin dondurucu buzdolabı
Dlab	MX-S	Vorteks Karıştırıcı
Gilson	Pipetman F123601	20-100 µL pipet
Gilson	Pipetman F123602	200-1000 µL pipet
Zeiss	490 016-0002-000	Floresan mikroskobu
Zeiss Axiocam 506 mono	426 557-0000-000 r 1.1	Mikroskop kamerası
VWR	Micro Star 30	Santrifüj cihazı
Radwag	LB.RW.WL-227-0001	Hassas terazi
AndonStar	AD106S	Dijtal Mikroskop

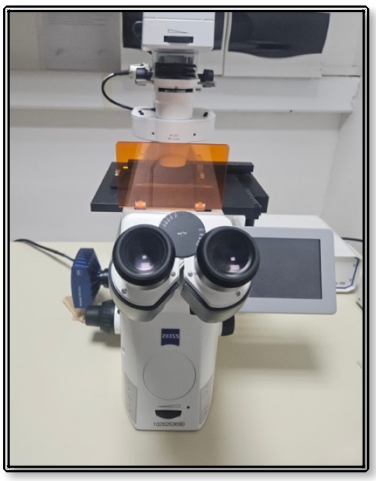
Çalışmada Kullanılan Cihaz Görselleri



Şekil 3.1. Vorteks Karıştırıcı



Şekil 3.2. Hassas Terazi



Şekil 3.3. Mikroskop ve kamerası



Şekil 3.4. Santrifüj Cihazı



Şekil 3.5. Dijital mikroskop

3.1.1.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzeme ve Kimyasallar

Tablo 3.2. Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasallar

Üretici	Model/Katalog No	Sarf malzeme/ Kimyasal
Gilson	Pipetman F123601	20-100 µL pipet
Gilson	Pipetman F123602	200-1000 µL pipet
Isolab	LB.IS.005.01.003	1000 µL pipet ucu
Isolab	LB.IS.005.01.002	200 µL pipet ucu
Borox	B07101.076+B07201.018	Mikroskop lam ve lameli
Orlab	C385013	Eppendorf tüpü
Cistron	LRB08-100	RIPA Buffer
B-good	BG. SS01.2613	1 mllik insülin enjektörü
İnvitrogen	N1142	25 mg Nile Red boyası
Isolab	LB.IS.092.01.001R	50 delikli tüp standı
Isolab	LB.IS.078.02.008	Falkon tüpü
Teksoll	TK.200650.25001	Etanol
Stony Lab	B091JW4BYK	Cam numune kabı

Çalışmada Kullanılan Sarf Malzemeler ve Kimyasalların Görselleri



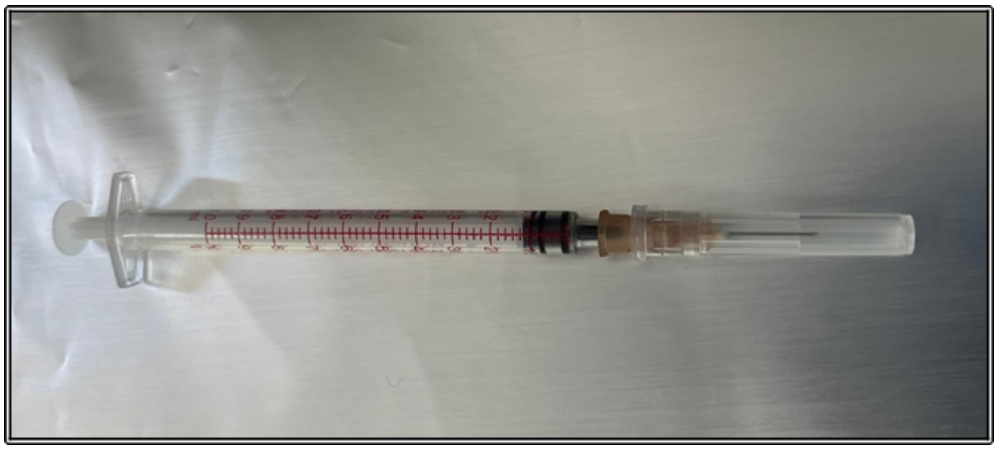
Şekil 3.6. Pipet ve Pipet ucu



Şekil 3.7. Nile Red Boyası



Şekil 3.8. Teksoll çözeltisi



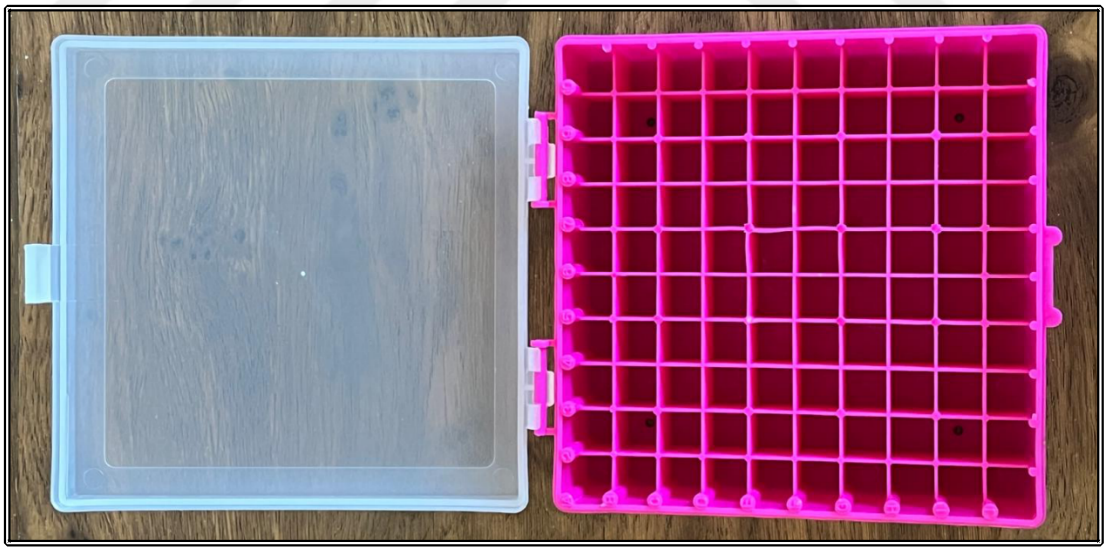
Şekil 3.9. İnsülin enjektörü



Şekil 3.10. Mikroskop Lam ve Lameli



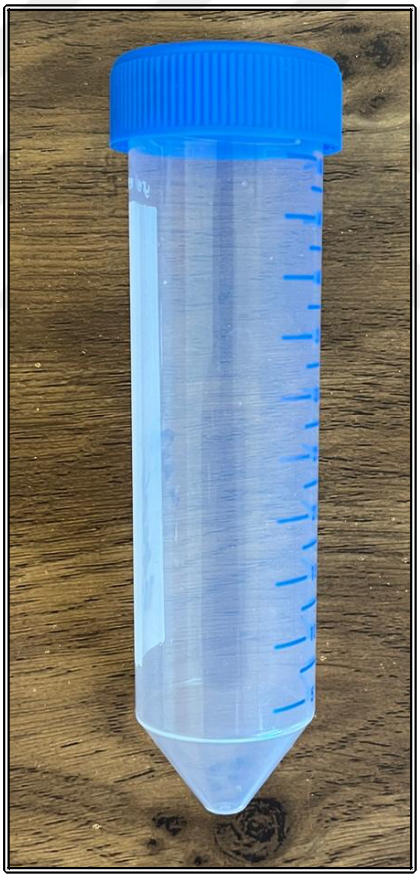
Şekil 3.11. RIPA Solüsyonu



Şekil 3.12. Tüp standı



Şekil 3.13. Eppendorf Tüpü



Şekil 3.14. Falkon Tüpü

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Örneklem Seçimi ve Örnek Toplanması

Yapılan çalışmada, beş ayrı grupta diş fırçası tipi incelenmiştir. İlk üç grup başlığı ve fırça kılları plastik olan diş fırçası, dördüncü grup başlığı ve fırça kılları plastik ancak başlığın arka yüzeyinde silikon içeren dil temizleyicili plastik diş fırçası ve beşinci grup ise başlığı plastik ancak fırça kıllarında %20 oranında gümüş nanopartikül içerikli plastik diş fırçası kullanmıştır. Literatürde benzer çalışma olmadığından örneklem hesabı etki büyüklüğü üzerinden yapılmıştır. Beş farklı tipte diş fırçası arasında birinci ay sonundaki mikroplastik varlığı bakımından farka ait etki büyüklüğü 0,4 olarak alındığında 0,05 anlamlılık düzeyinde 0,80 güç ile Ki-kare testi kullanılarak örneklem hesabı yapıldığında minimum 89 hastalık örneklem çalışma için yeterli bulunmuştur. Çalışma dışı kalabilme ihtimalinden dolayı fazla hasta ile çalışılmıştır. Çalışmaya, her gruptan 20 katılımcı olmak üzere toplamda 100 katılımcı dahil edilmiştir. Çalışma başında katılımcılardan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu alınarak ve çalışma kapsamı dahilinde yazılı ve sözlü bilgilendirme yapılarak diş fırçaları katılımcılara randomize şekilde dağıtılmıştır.

Çalışmaya dahil edilme kriterleri:

1) 7-14 yaş aralığında bulunmak
2) Sistemik rahatsızlığı bulunmamak
3) Son üç ay içerisinde ağız gargarası kullanmamak
4) Herhangi bir ilaç kullanmamak veya ilaca karşı alerji öyküsü olmamak
5) Ağzında aktif çürük dişi bulunmamak
6) Periodontal patolojisi bulunmamak
7) Kötü oral alışkanlıkları olmamak (ağızdan solunum, parmak emme vb.)
8) Çalışmaya gönüllü olarak katılmayı kabul etmek

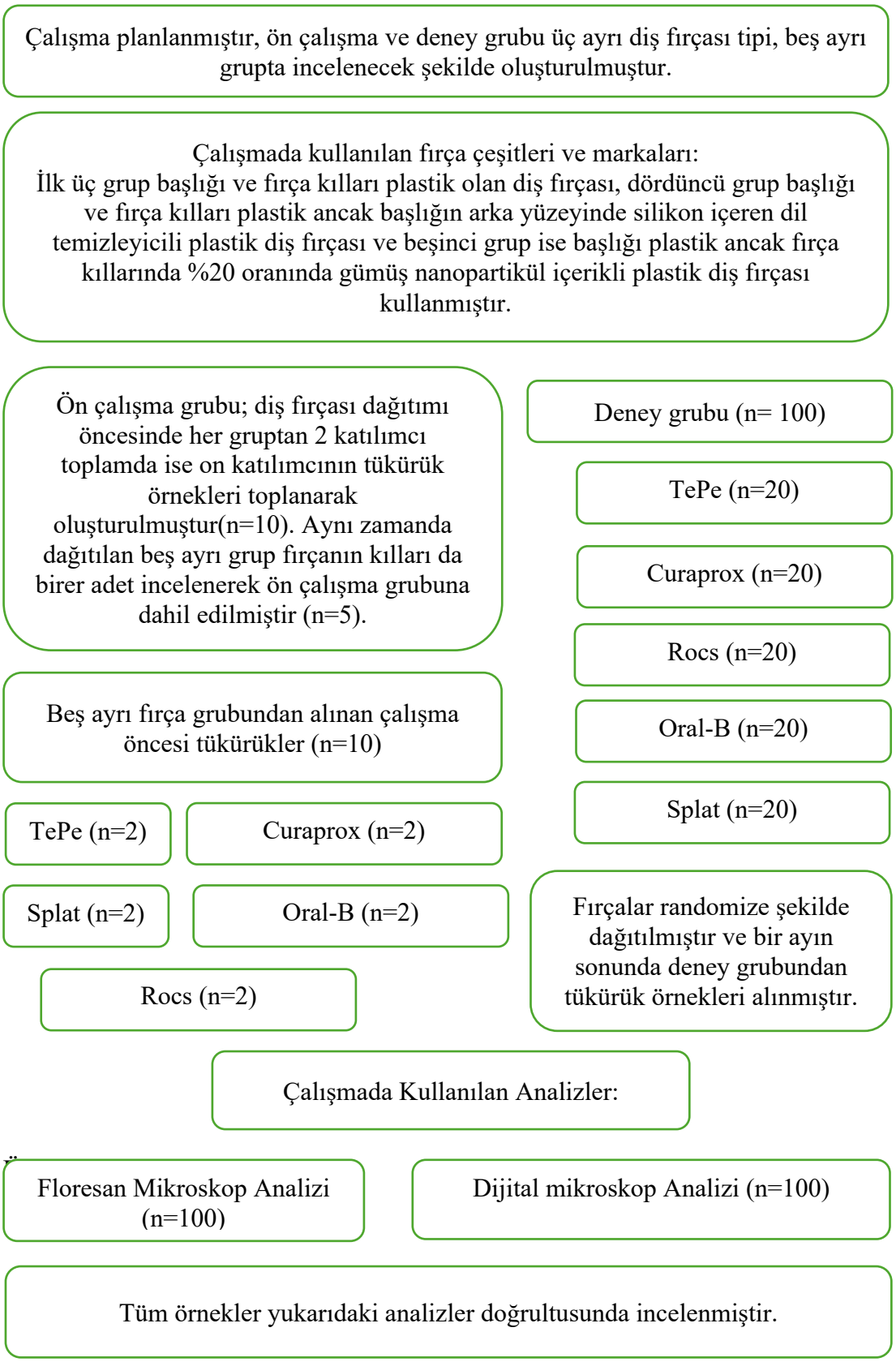
Katılımcılara dağıtılan fırçalarla bir ay süreyle ve yönergelere uyarak, diş fırçalarını sabah ve akşam olmak üzere günde 2 defa kullanmış ve bir ayın sonunda Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş Hekimliği Anabilim Dalı'na yeniden başvurarak tek hekim tarafından tükürük örnekleri toplanmıştır.

Tükürük örneklerinde çevresel mikroplastik kontaminasyonunu en aza indirmek ve analiz sonuçlarının güvenilirliğini artırmak amacıyla, katılımcılardan bir aylık süre boyunca aşağıdaki hususlara dikkat etmeleri istenmiştir:

3.2.2. Mikroplastik Kontaminasyonunu Önlemeye Yönelik Katılımcı Yönergeleri

1. Numune alımı öncesi en az 1–2 saat herhangi bir gıda ya da içecek tüketilmemesi sağlanmıştır. Bu uygulama, özellikle işlenmiş gıdalar ve plastik ambalajlı ürünlerin olası mikroplastik içeriğinden kaynaklı bulaşmayı önlemeye yöneliktir.
2. Numune alım günü diş macunu, ağız gargarası, dudak kremi ve benzeri kozmetik ürünlerin kullanılmaması önerilmiştir. Bu tür ürünlerin içerdiği polimer bileşenler, tükürükte analiz edilen mikroplastiklerle karışarak sonuçları etkileyebileceğinden dışlanmıştır.
3. Katılımcıların plastik pipet, plastik şişe veya plastik bardak gibi tek kullanımlık materyallerden sıvı tüketmemeleri istenmiştir. Bunun yerine cam ya da metal kaplar tercih etmeleri istenmiştir.
4. Kıyafet ve aksesuarlar üzerinden geçiş yapabilecek partiküllerin tükürük örneğine karışmasını önlemek amaçlanmıştır. Plastik esaslı yüz koruyucular (maske), eldiven ya da takı kullanımından mümkün olduğunca kaçınılması tavsiye edilmiştir.
5. Numune alım öncesinde katılımcılardan ağızlarını yalnızca içme suyu ile çalkalamaları istenmiştir. Bu işlem, oral mukozada kalabilecek yabancı partiküllerin uzaklaştırılmasına yöneliktir.

Bu çalışma, çocuklara dağıtılan diş fırçalarının kullanımının tükürükteki mikroplastik varlığı üzerindeki olası etkilerini incelemeyi amaçlayan öncü bir araştırmadır. Daha önce bu konuda benzer bir çalışma yapılmamış olması nedeniyle, bu belirsizliği ortadan kaldırmak ve gözlemlenen değişimleri daha doğru yorumlayabilmek amacıyla, fırça dağıtılmadan önce de her gruptan 2 katılımcı toplamda ise 10 katılımcının tükürük örneklerinden oluşan bir ön çalışma grubu oluşturulmuştur. Böylece fırça kullanımı öncesi ve sonrası durumlar karşılaştırmalı olarak değerlendirilebilmiştir. Aşağıda ön çalışma ve deney grubu için oluşturulan akış şeması gösterilmektedir. (şekil 3.15.)



Şekil 3.15. Akış Diyagramı

3.2.3. Ön çalışma Numune Grubunun Hazırlığı

Bu çalışmada, diş fırçası kullanımının tükürükte mikroplastik maruziyetine etkisini araştırmak amacıyla hem ön çalışma hem de deney grupları oluşturulmuştur. Literatürde, özellikle diş hekimliği alanında, tükürük örnekleri üzerinden mikroplastik analizine yönelik çalışmaların sınırlı olması nedeniyle, deneysel bulgulara temel oluşturmak ve kullanılacak analiz yöntemlerinin uygulanabilirliğini değerlendirmek amacıyla fırça kullanımı öncesinde ön çalışma grubu oluşturulmuştur.

Bu kapsamda, çalışma dahilinde herhangi bir diş fırçası kullanmamış katılımcılardan alınan tükürük örnekleri;

1) Tükürük,

2) Tükürük + RIPA

3) Tükürük + Mikroplastik

4) Tükürük + Mikroplastik + RIPA kombinasyonları şeklinde hazırlanmış ve ayrıca beş farklı markaya (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) ait diş fırçası kılları da referans materyal olarak değerlendirilmiş ve analiz edilmiştir.

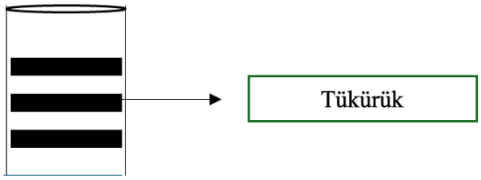
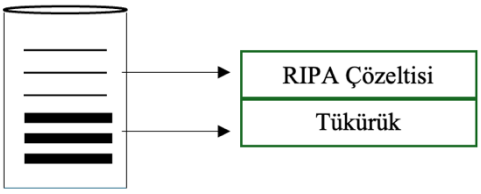
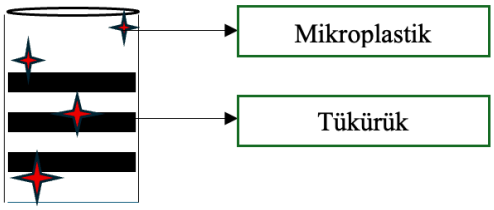
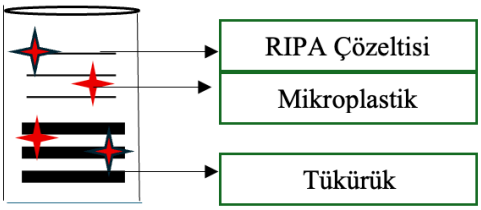
Çalışmanın başlangıç aşamasında, diş fırçası dağıtılmadan önce elde edilen tükürük örnekleri üzerinde çeşitli kombinasyonlar uygulanarak ön analizler gerçekleştirilmiştir. Birinci günde alınan tükürük örneklerinin kombinasyon şeklinde incelenmesinin sebebi; mikroplastik analizine yönelik laboratuvar protokollerinin biyolojik örnek olan tükürük matriksi üzerinde nasıl çalıştığını değerlendirmek, örnek hazırlama sürecindeki etkileşimleri gözlemlemek ve yöntemsel optimizasyon sağlamaktır. Tükürük yüksek oranda protein, epitel hücresi ve organik madde içeren kompleks ve doğal bir biyolojik sıvı olduğundan, mikroplastik tespiti ve analizi güçleşebilmektedir. Bu nedenle, protein ve hücresel bileşenleri parçalayarak RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay**)** çözeltisinin örneğe dahil edilmesiyle mikroplastiklerin ayırt edilebilirliğine katkısı incelenmiştir. RIPA solüsyonu aşağıdaki tabloda yer alan bileşiklerin karışımıyla oluşur. (Tablo 3.3.)

Tablo 3.3. RIPA Solüsyonu İçeriği

Bileşen	Konsantrasyon	İşlev
Hidroklorik Asit (HCl) (pH 7.4))	50 mm	pH dengesi sağlar.
Sodyum Klorür (NaCl)	150 mm	İyonik güç sağlar.
NP-40 / Triton X-100	%1	Membranları parçalar.
Sodyum deoksilat	%0.5	Membran proteinlerini çözer.
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	%0.1	Protein-protein bağlarını kırar.
Proteaz inhibitörleri	İsteğe bağlı	Protein parçalanmasını önler.

Öte yandan, dışarıdan kontrollü miktarda eklenen mikroplastikler ile yapılan kombinasyonlar sayesinde, kullanılan analiz yönteminin mikroplastikleri ne ölçüde geri kazanabildiği ve tespit edebildiği değerlendirilmiştir. (Tablo 3.4.)

Tablo 3.4. Ön çalışma grubu hasta örnekleri için optimizasyon çalışma şeması tablosu

Tükürük grubu örnek çizimi	
Tükürük+ RIPA grubu örnek çizimi	
Tükürük + Mikroplastik grubu örnek çizimi	
Tükürük + RIPA + Mikroplastik grubu örnek çizimi	

Bu çalışmada diş fırçalarının üretimden kaynaklı potansiyel mikroplastik salımını değerlendirmek amacıyla fırça kılı analizleri de gerçekleştirilmiştir.

Analizlerde, beş farklı markaya (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) ait diş fırçaları, kullanılmamış ambalajından doğrudan çıkarılmış ve kullanılmadan önceki hâlleriyle değerlendirilmiştir. Fırça kılları saf su ile muamele edilmiş; bu işlem sonrasında elde edilen pellet kısmından mikroplastik içeriği ve görüntüsü yönünden incelenmiştir. Bu yaklaşım, fırça materyallerinin kullanım öncesi koşullarda materyal bazlı değerlendirmeleri de içermesi sağlanmıştır. Böylece, çalışma kapsamında ilerleyen aşamalarda elde edilecek deneysel verilerin güvenilirliğini artıracak şekilde örnek hazırlama ve analiz stratejileri önceden test edilmiş ve doğrulanmıştır. Aynı zamanda bu süreç, tükürükteki çevresel yani müdahale dışı mikroplastik kontaminasyon düzeylerinin belirlenmesine ve bu sayede verilerin daha rahat analiz edilmesine olanak sağlamıştır.

Çalışmaya dahil olan katılımcılardan, fırça dağıtımı öncesinde her gruptan 2 katılımcı toplamda ise on katılımcının tükürük örnekleri toplanarak fırça ön çalışma grubu verisi oluşturulmuştur. Katılımcılardan, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla, pasif salivasyon yöntemiyle herhangi bir dış müdahale olmadan, 10 mL'lik plastik içermeyen steril cam tüplere doğrudan tükürmeleri istenmiştir. Dış kontaminasyonun önlenmesi amacıyla her katılımcıdan alınan örnekler, ayrı tüplerde ve tek kullanımlık eldivenlerle çalışılarak alınmıştır. (Şekil 3.16.)



Şekil 3.16. Çalışmanın birinci günü alınan tükürük örnekleri

Toplanan tükürük örnekleri, analiz gününe kadar biyolojik bütünlüğün korunması amacıyla -20 °C'de derin dondurucuda saklanmıştır. Analiz günü −20 °C'de saklanan numuneler, oda sıcaklığında çözdürüldü. Homojen bir karışım elde edilmesi amacıyla çözünen numunelere vorteks karıştırıcı uygulaması yapılmıştır. (Şekil 3.17.)

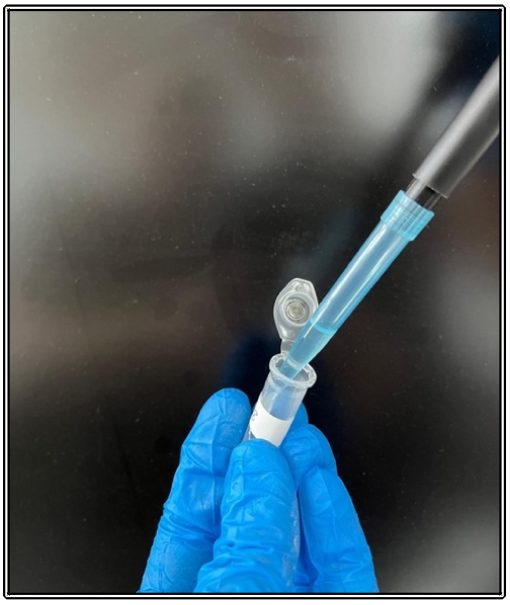


Şekil 3.17. Vorteks cihazının çalışması

Hızlı bir şekilde her numuneden pipet yardımıyla 1 mL alınarak 2 mL'lik eppendorf tüplerine transfer edildi. (Şekil 3.18.) Protein ekstraksiyonu amacıyla tüplere 1:1 oranında pipet yardımıyla RIPA çözeltisi ilave edildi. (Şekil 3.19.)



Şekil 3.18. Pipet yardımıyla tükürük alınması



Şekil 3.19. Eppendorf tüpüne tükürük ve RIPA solüsyonu çözeltisi eklenmesi

Ardından hücre lizisinin sağlanması ve proteinleri parçalayarak çözünmesi için karışımlar 4 °C'de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresinin sonunda hem vorteks yardımıyla hem de numunelere insülin iğnesi ile 'çek-bırak' yöntemi uygulanarak, mekanik sürtünme etkisiyle organik yapıların çözünme oranı ve hızı artırılmıştır. (Şekil 3.20.)



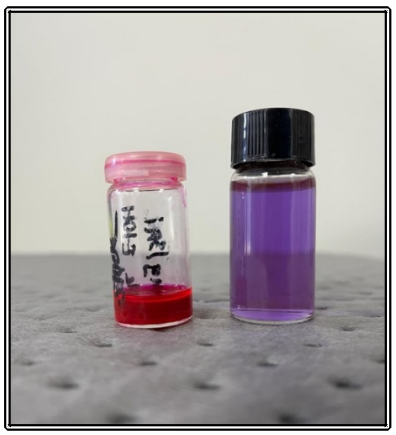
Şekil 3.20. İnsülin enjektörü ile 'çek- bırak' yöntemi uygulaması

Ardından numuneler 30.000 rpm devirde ve 20 dakika boyunca santrifüj edildi. (Şekil 3.21.)



Şekil 3.21. Santrifüj işlemi tamamlandıktan sonra eppendorf tüpünde oluşan süpernatant ve pellet fazı görüntüsü

Santrifüj süresinde Nil Red (Thermo Fisher Scientific, Amerika Birleşik Devletleri) boyasından hassas terazi ile ölçüm yapılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. (Şekil 3.22.) Nile Red boyası solüsyonu her analiz öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Bunun nedeni, Nile Red'in özellikle ışığa ve çözücü ortamına karşı duyarlı olması, zamanla kimyasal stabilitesini kaybederek floresan özelliklerinde azalma veya bozunma göstermesidir. Bu tür yapısal değişiklikler, boyanın mikroplastik partiküllerle etkileşimini ve floresan sinyal gücünü olumsuz etkileyebileceğinden güvenilirliğin sağlanması amacıyla her çalışma gününde boyanın taze hazırlanması tercih edilmiştir. Metal spatül aracılığıyla 1 mg Nile Red, hassas teraziye taşınmış ve tartılmıştır. 3 mL etanolde çözüldü. Nile Red boyası da plastik maruziyetinin önüne geçmek ve boyanın plastiğe adezyonunun önlenmesi amacıyla cam tüpte hazırlanmıştır. Stok çözeltisinden 300 µL alınmış ve toplam hacim 10 mL'ye saf su ile tamamlanmıştır. Hazırlanan Nile Red'in son konsantrasyonu yaklaşık 10 µg/mL olarak hesaplanmıştır.



Şekil 3.22. Nile Red stok ve boya solüsyonunun hazırlanması

Boyama işleminden önce, tükürük örnekleri 30.000 rpm devirde 20 dakika süreyle santrifüj edilerek üst faz (süpernatant) ve alt faz (pellet) fazlarına ayrıştırılmıştır. Üstte yer alan süpernatant**,** çoğunlukla çözünmüş proteinler ve düşük yoğunluklu bileşenleri içerirken; altta toplanan pellet fraksiyonu, daha yoğun partikülleri, hücresel kalıntıları ve potansiyel mikroplastik parçacıklarını barındırmaktadır. Bu ayrışma sayesinde mikroplastiklerin biyolojik matrikslerden daha etkin bir şekilde izole edilmesi mümkün olmuştur. Santrifüj işlemi sonrasında üstte kalan süpernatant faz dikkatlice pipet yardımıyla uzaklaştırılmış, analiz için yalnızca altta kalan pellet fraksiyonu kullanılmıştır.

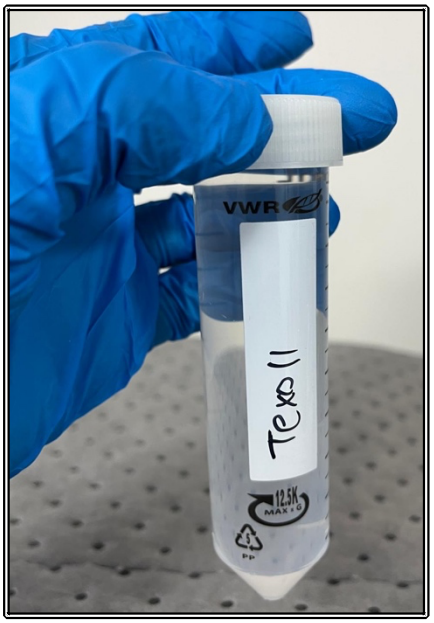
Elde edilen pellet üzerine 1 mL saf su ve ardından hazırlanan Nile Red çözeltisinden 1 ml, eppendorf tüpündeki oran 1:1 olacak şekilde eklenmiştir. Her örneğe eklenen Nile Red'in son konsantrasyonu yaklaşık 5 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tükürük örneklerinde mikroplastiklerin boyanması amacıyla hazırlanan Nile Red çözeltisi, floresan bozulmasını engellemek için örneklerin üzerine eklendikten sonra karanlık ortamda üzerleri alüminyum folyo ile örtülerek 37 °C de oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. (Şekil 3.23.) Bu süre, Nile Red'in mikroplastik yüzeyleriyle yeterli düzeyde etkileşime girerek adsorbe olmasını ve floresan sinyalin maksimum düzeyde ortaya çıkmasını sağlamak amacıyla belirlenmiştir.



Şekil 3.23. Boyama süresi tamamlandıktan sonraki eppendorf tüpü görüntüsü

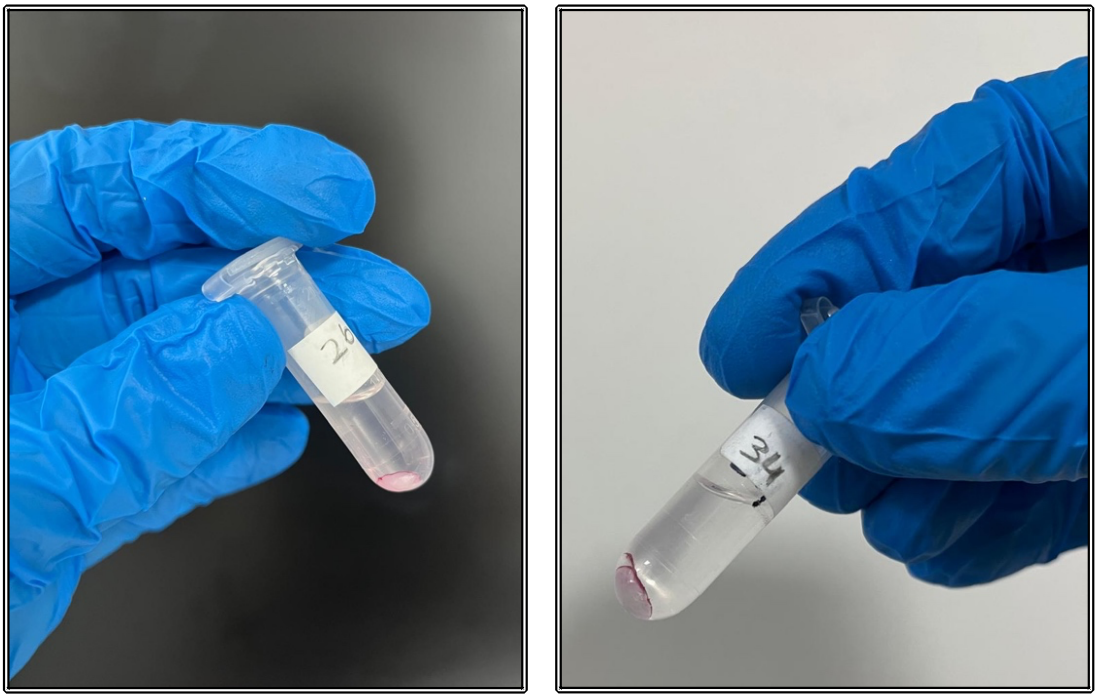
Belirlenen bekleme süresi tamamlandıktan sonra, boyanın örnek içeriğiyle homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla tüm tüpler vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminin ardından örnekler yeniden 30.000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edilerek boyalı mikroplastiklerin çökelmesi sağlanmıştır. Bu aşama da tamamlanınca oluşan üst faz (süpernatant) pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Boyama işleminin ardından, eppendorf tüpünde yer alan üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmış ve pellet kısmında kalan boyalı mikroplastiklerin spesifik olmayan bağlanmalarını ortadan kaldırmak amacıyla yıkama aşamalarına geçilmiştir.

Eppendorf tüpünde yer alan pellet kısmının üstüne 1 mL Teksoll (%96 lık etil alkol + %2 lik propanol) çözeltisi eklenmiş ve yıkama işlemi başlatılmıştır, çözelti homojenitesi için vorteksleme işleminin ardından aynı santrifüj prosedürü uygulanmıştır ve üst faz (süpernatant) uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, olası Nile Red artıkları ve tükürük kaynaklı artık bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Her yıkama döngüsünde pellet üzerine taze Teksoll çözeltisi eklenmiş, vortekslenmiş ve ardından santrifüj işlemi uygulanmıştır. (Şekil 3.24.)



Şekil 3.24. Kullanılan Teksoll çözeltisi

Son yıkama sonrası elde edilen pellet, floresan mikroskobunda inceleme için hazırlanmak üzere sonraki aşamaya alınmıştır. Boyama sonrası yapılan yıkama işlemlerinde Teksoll çözeltisinin tercih edilmesinin temel nedeni, spesifik olmayan bağlantıları ortadan kaldırmak içindir. Teksoll, özellikle yağ, protein ve boya gibi molekülleri çözmede etkili bir yüzey aktif madde içeriğine sahip olduğundan, Nile Red ile boyanmış mikroplastiklerin arka plan sinyaliyle maskelenmesini önlemekte ve floresan mikroskobu gözlemlerinde görüntü kalitesini artırmaktadır. Bu sayede, mikroskop altında daha net, kontrastlı ve tanımlanabilir floresan sinyaller elde edilmesi hedeflenmiştir.



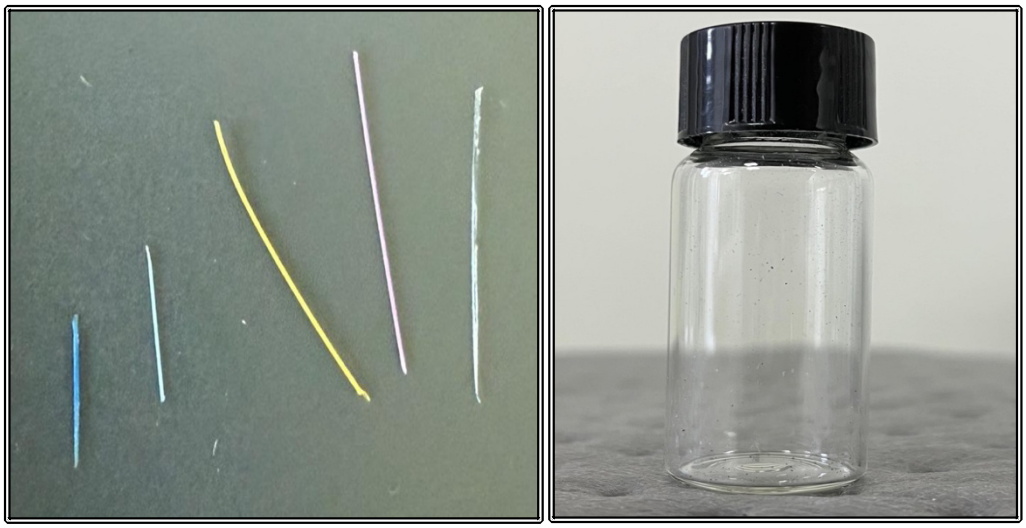
Şekil 3.25. Yıkama işlemleri sonrası eppendorf tüpü görüntüsü

Yıkama işlemleri tamamlanan boyalı örnekler (Şekil 3.25.), floresan mikroskop analizine kadar geçen sürede yapısal bozulmayı ve olası floresan sinyal kaybını önlemek amacıyla -20 °C'de saklanmıştır. Düşük sıcaklıkta muhafaza, biyolojik örneklerde enzimatik veya mikrobiyal bozunmayı engellediği gibi, Nile Red gibi ışığa ve sıcaklığa duyarlı boyaların stabilitesinin korunmasına da katkı sağlamaktadır. Bu koşul, örneklerin floresan mikroskop altında değerlendirileceği ana kadar boyama kalitesinin ve sinyal yoğunluğunun tutarlı kalmasını hedeflemiştir. Boyama ve saklama işlemleri tamamlanan örnekler, floresan görüntüleme amacıyla analiz gününde çözdürülerek mikroskop aşamasına hazırlanmıştır. Her örnekten uygun hacimde (yaklaşık 30 µL) steril lam üzerine alınmıştır ve floresan mikroskobunda incelenmiştir. Mikroskopik incelemeler, floresan görüntülemeye uygun optik sistemlere sahip Zeiss marka floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiş; analizlerde 10x objektif büyütme tercih edilmiştir. Gözlemler sırasında hem yapısal hem de floresan sinyal bazlı değerlendirmelere olanak tanımak amacıyla Parlak Alan**,** Faz Kontrast ve Texas Red filtreleri kullanılmıştır. Nile Red ile boyanmış mikroplastik partiküllerin tespiti için özellikle Texas Red filtresi tercih edilmiştir. Görüntüleme sırasında oluşan veriler, yüksek çözünürlüklü Axiocam 506 mono dijital kamera (Zeiss, Almanya) ile kaydedilmiş; elde edilen görüntüler ZEN 2 Pro (Zeiss, Almanya) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir.



Şekil 3.26. Floresan mikroskopta incelenmek üzere hazırlanmış örnekler

Çalışmanın ön çalışma grubu kapsamında, beş ayrı markaya ait kullanılmamış diş fırçalarından alınan kıllar mikroskopik analiz ve mikroplastik kaynaklarının yüzey morfolojisi için değerlendirmeye dahil edilmiştir. Her bir fırçadan alınan kıllar steril makas yardımıyla kesilerek ayrı tüplere yerleştirilmiş ve zımpara kullanılarak fırça kıllarından elde edilen tozlar da 2 mL'lik steril cam tüpe ardından da eppendorf tüpüne eklenmiştir ve her örneğe 1 ml saf su ile 1 ml taze hazırlanmış Nile Red boyası çözeltisi eklenmiştir. (Şekil 3.27.)



Şekil 3.27. Kesilmiş fırça kıllarının (soldan sağa sırasıyla; Oral-B, Tepe, Curaprox, Splat ve Rocs) ve zımpara kullanılarak fırça kıllarından elde edilen tozların görüntüsü

Numuneler boyama işlemine tabi tutulmuştur. Boyama işlemi sırasında örnekler karanlık ortamda 30 dakika inkübe edilmiş, ardından vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrası elde edilen üst faz (süpernatant) kısım pipet aracılığıyla uzaklaştırılmış ve altta kalan pellet kısmı Teksoll çözeltisiyle üç kez yıkanmış, her yıkama sonrasında yeniden santrifüj uygulanmıştır.



Şekil 3.28. Curaprox grubu fırça kılının boyama sonrası görüntüsü

Yıkama işlemlerinin tamamlanmasının ardından örnekler mikroskop analizine alınmıştır. Görüntüleme işlemleri, Zeiss marka floresan mikroskop ile 10x büyütme kullanılarak ve Texas Red (540–590 nm uyarma ve 600–650 nm emisyon dalga boyu aralığında çalışacak şekilde ayarlanmıştır.), Bright Field (parlak alan) ve Phase Contrast (faz kontrast) filtresi eşliğinde gerçekleştirilmiştir. Görüntüleme sırasında oluşan veriler, yüksek çözünürlüklü Axiocam 506 mono dijital kamera ile kaydedilmiş; elde edilen görüntüler ZEN 2 Pro (Zeiss) yazılımı kullanılarak analiz edilmiştir. Floresan mikroskobu için Nile Red ile boyanarak hazırlanan tüm örnekler, aynı zamanda 4x büyütme ile dijital mikroskop (Andonstar AD106S, Çin) altında da incelenmiştir. Bu yaklaşım sayesinde floresan görüntülerin morfolojik doğrulaması yapılmış, partikül yapılarının yüzey özellikleri ve morfolojik farklılıkları daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir. Dijital mikroskop, yüksek çözünürlüklü görüntüleme kapasitesi sayesinde mikroplastik benzeri partiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin net bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanımıştır. Böylelikle, mikroplastik tanımlamasında yalnızca floresan boyamaya bağlı kalınmamış, dijital görüntüleme ile desteklenen çift yönlü bir analiz stratejisi uygulanmıştır.

3.2.4. Deney Grubunun Hazırlığı

Deney grubunu oluşturan katılımcılara (toplam 100 katılımcı) çalışma başlangıcında bu beş markadan (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) birine ait diş

fırçaları dağıtılmış, günlük kullanım sağlanmış, gerekli yönergeler anlatılmış ve bir aylık kullanım süresinin sonunda tükürük örnekleri toplanmıştır. Bu çalışmada deney grubuna ait tükürük örnekleri alınmadan önce katılımcılara diş macunu kullanmadan dişlerini fırçalatmak tercih edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışmada macunsuz fırçalatma yöntemi uygulanarak diş macunu kaynaklı olası mikroplastik kontaminasyonu en aza indirgenmiş, yalnızca fırça materyalinden kaynaklanabilecek salınımların değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Böylece elde edilen bulguların metodolojik doğruluğu artırılmış ve yorumlamada olası yanılgıların önüne geçilmiştir. Deney grubuna ait örnekler de ön çalışma grubuyla aynı analiz protokolü kullanılarak incelenmiştir. Bu yöntemle, fırça kullanımına bağlı olası mikroplastik maruziyeti değerlendirilmeye çalışılmıştır.

Çalışmaya dahil olan katılımcılardan, her gruptan 20 katılımcı toplamda ise 100 katılımcının tükürük örnekleri toplanarak deney grubu verisi oluşturulmuştur. Katılımcılardan, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla, pasif salivasyon yöntemiyle herhangi bir dış müdahale olmadan, 10 mL'lik plastik içermeyen steril cam tüplere doğrudan tükürmeleri istenmiştir. Dış kontaminasyonun önlenmesi amacıyla her katılımcıdan alınan örnekler, ayrı tüplerde ve tek kullanımlık eldivenlerle çalışılarak alınmıştır. Toplanan tükürük örnekleri, analiz gününe kadar biyolojik bütünlüğün korunması amacıyla -20°C' de derin dondurucuda saklanmıştır. Analiz günü −20 °C'de saklanan numuneler, oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Homojen bir karışım elde edilmesi amacıyla çözünen numunelere vorteks karıştırıcı uygulaması yapılmıştır. Hızlıca her numuneden pipet yardımıyla 1 ml alınarak 2 mL'lik eppendorf tüplerine transfer edildi. Protein ekstraksiyonu amacıyla tüplere 1:1 oranında pipet yardımıyla RIPA çözeltisi ilave edilmiştir.

Ardından hücre lizisinin sağlanması ve proteinlerin tamamen çözünmesi için karışımlar 4 °C'de 30 dakika süreyle inkübasyona bırakılmıştır. Bekleme süresinin sonunda, numunelere insülin iğnesi ile 'çek-bırak' yöntemi uygulanarak, mekanik sürtünme etkisiyle organik yapıların çözünme oranı ve hızı artırılmıştır. Homojen bir karışım elde edilmesi amacıyla çözünen numunelere Vorteks karıştırıcı uygulaması yapılmıştır. Ardından numuneler 30.000 devirde ve 20 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj süresinde Nil Red boyasından hassas terazi ile ölçüm yapılarak çalışma çözeltisi hazırlanmıştır. Nile Red boyası solüsyonu her analiz öncesinde taze

olarak hazırlanmıştır. Boyama işleminden önce, tükürük örnekleri belirli hız ve sürede santrifüj edilerek üst faz (süpernatant) ve pellet fazlarına ayrıştırılmıştır. Santrifüj işlemi sonrasında üstte kalan süpernatant faz dikkatlice pipet yardımıyla uzaklaştırılmış, analiz için yalnızca altta kalan pellet fraksiyonu kullanılmıştır. Elde edilen pellet üzerine 1 mL saf su ve ardından hazırlanan Nile Red çözeltisinden 1 ml, eppendorf tüpündeki oran 1:1 olacak şekilde eklenmiştir. Her örneğe eklenen Nile Red'in son konsantrasyonu yaklaşık 10 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Tükürük örneklerinde mikroplastiklerin boyanması amacıyla hazırlanan Nile Red çözeltisi, örneklerin üzerine eklendikten sonra karanlık ortamda üzerleri alüminyum folyo ile örtülerek 37°C de oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu süre, Nile Red'in mikroplastik yüzeyleriyle yeterli düzeyde etkileşime girerek adsorbe olmasını ve floresan sinyalin maksimum düzeyde ortaya çıkmasını sağlamak amacıyla belirlenmiştir. Ayrıca, boyamanın tutarlılığını artırmak ve floresan mikroskopisiyle yapılacak analizlerde sinyal yoğunluğunun yeterli olmasını temin etmek için inkübasyon süresi boyunca ışık ve sıcaklık değişimlerinden kaçınılmıştır. Belirlenen bekleme süresi tamamlandıktan sonra, boyanın örnek içeriğiyle homojen bir şekilde karışmasını sağlamak amacıyla tüm tüpler vortekslenmiştir. Vorteksleme işleminin ardından örnekler yeniden 30.000 rpm devirde 20 dakika santrifüj edilerek boyalı mikroplastiklerin çökelmesi sağlanmıştır. Bu aşama da tamamlanınca oluşan üst faz pipet yardımıyla dikkatlice uzaklaştırılmıştır. Boyama işleminin ardından, eppendorf tüpünde yer alan üst faz uzaklaştırılmış ve pellet kısmında kalan boyalı mikroplastiklerin daha saf bir şekilde elde edilebilmesi amacıyla yıkama aşamalarına geçilmiştir.

Bu kapsamda, eppendorf tüpünde yer alan pellet kısmının üstüne 1 ml Teksoll (%96 lık etil alkol %96 + %2 lik propanol) çözeltisi eklenmiş ve yıkama işlemi başlatılmıştır, çözelti homojenitesi için vorteksleme işleminin ardından aynı santrifüj prosedürü uygulanmıştır ve üst faz uzaklaştırılmıştır. Bu işlem, olası Nile Red artıkları ve tükürük kaynaklı artık bileşenlerin uzaklaştırılması amacıyla toplamda üç kez tekrarlanmıştır. Her yıkama döngüsünde pellet üzerine taze Teksoll çözeltisi eklenmiş, vortekslenmiş ve ardından santrifüj işlemi uygulanmıştır. Son yıkama sonrası elde edilen pellet, floresan mikroskopik inceleme için hazırlanmak üzere sonraki aşamaya alınmıştır. Yıkama işlemleri tamamlanan boyalı örnekler, floresan mikroskop analizine kadar geçen sürede yapısal bozulmayı ve olası floresan sinyal kaybını

önlemek amacıyla -20 °C'de saklanmıştır. Düşük sıcaklıkta muhafaza, biyolojik örneklerde enzimatik veya mikrobiyal bozunmayı engellediği gibi, Nile Red gibi ışığa ve sıcaklığa duyarlı boyaların stabilitesinin korunmasına da katkı sağlamaktadır.

Boyama ve saklama işlemleri tamamlanan örnekler, floresan görüntüleme amacıyla analiz gününde çözdürülerek mikroskop aşamasına hazırlanmıştır. Her örnekten uygun hacimde (yaklaşık 30 µL) bir kısım steril lam üzerine alınarak lamel ile kapatılmış ve gözlem öncesinde örneklerin homojen dağılımı sağlanmıştır. Mikroskopik incelemeler, floresan görüntülemeye uygun optik sistemlere sahip Zeiss marka floresan mikroskop kullanılarak gerçekleştirilmiş; analizlerde 10x objektif büyütme tercih edilmiştir. Gözlemler sırasında hem yapısal hem de floresan sinyal bazlı değerlendirmelere olanak tanımak amacıyla Parlak Alan, Faz Kontrast ve Texas Red filtreleri kullanılmıştır. Nile Red ile boyanmış mikroplastik partiküllerin tespiti, morfolojik yapısı ve boyutu için özellikle Texas Red filtresi tercih edilmiştir. Görüntüleme sırasında oluşan veriler, yüksek çözünürlüklü Axiocam 506 mono dijital kamera ile kaydedilmiş; elde edilen görüntüler ZEN 2 Pro (Zeiss) yazılımı kullanılarak analiz edilmiş ve kaydedilmiştir. Floresan mikroskobu için Nile Red ile boyanarak hazırlanan tüm örnekler, aynı zamanda 4x büyütme ile dijital mikroskop (Andonstar AD106S, Çin) altında da incelenmiştir.

Bu yaklaşım sayesinde floresan görüntülerin morfolojik doğrulaması yapılmış, partikül yapılarının yüzey özellikleri ve morfolojik farklılıkları daha ayrıntılı bir şekilde değerlendirilmiştir. Dijital mikroskop, yüksek çözünürlüklü görüntüleme kapasitesi sayesinde mikroplastik benzeri partiküllerin boyut ve yüzey morfolojisinin net bir şekilde gözlemlenmesine olanak tanımıştır. Böylelikle, mikroplastik tanımlamasında yalnızca floresan boyamaya bağlı kalınmamış, dijital görüntüleme ile desteklenen çift yönlü bir analiz stratejisi uygulanmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmada mikroplastik tespit yöntemlerinden, etiketleme yöntemlerinden biri olan Nile Red boyası kullanılarak floresan mikroskobu tercih edilmiş; bunun yanı sıra Dijital Mikroskop analizleri de uygulanmıştır.

4.1. FLORESAN MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ

Çalışma dahilinde herhangi bir diş fırçası kullanmamış katılımcılardan alınan tükürük örnekleri;

1) Tükürük,

2) Tükürük + RIPA

3) Tükürük + Mikroplastik

4) Tükürük + Mikroplastik + RIPA kombinasyonları şeklinde hazırlanmış ve ayrıca beş farklı markaya (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) ait diş fırçası kılları da referans materyal olarak değerlendirilmiş ve analiz edilmiştir.

Floresan mikroskopi ile yapılan incelemeler, farklı marka ve materyale sahip diş fırçalarının kullanım öncesi ve sonrası tükürük örneklerinde belirgin farklılıklar olduğunu ortaya koymuştur. Ön çalışma grubunda, yani fırça kullanılmadan alınan tükürük örneklerinde mikroplastik parçacıklar gözlenmezken; deney grubunda, bir aylık diş fırçası kullanımının ardından tükürük örneklerinde daha yoğun ve çeşitli boyutlarda floresan sinyaller kaydedilmiştir.

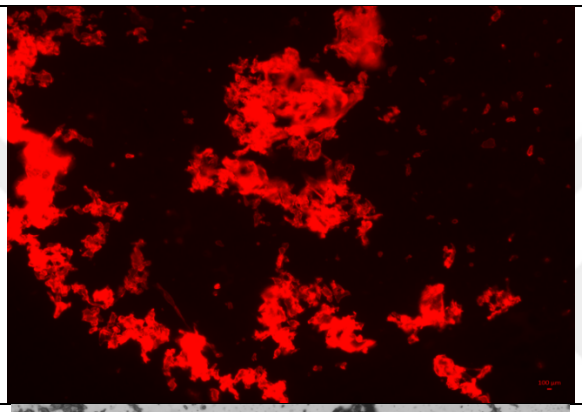
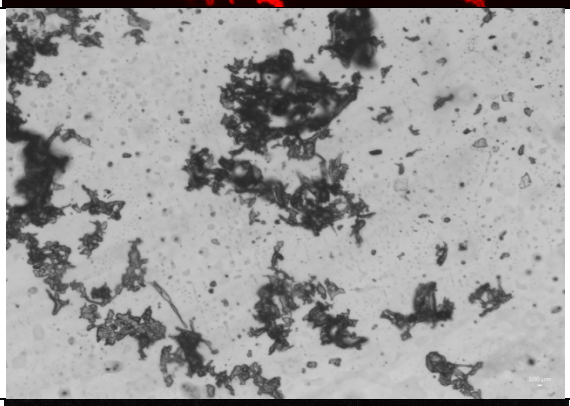
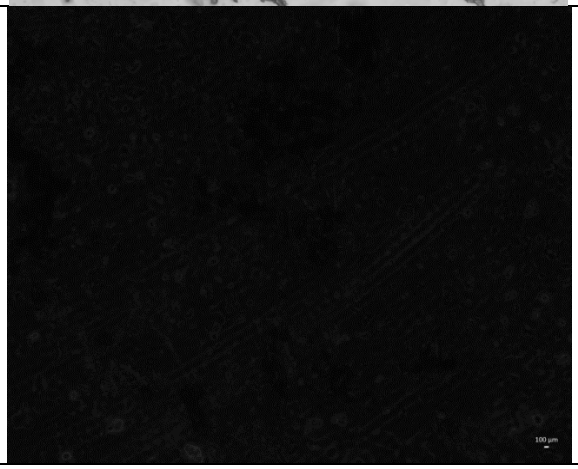
Bu çalışmada diş fırçalarının üretimden kaynaklı potansiyel mikroplastik salımını değerlendirmek amacıyla fırça kılı analizleri de gerçekleştirilmiştir. Analizlerde, beş farklı markaya (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) ait diş fırçaları, kullanılmamış ambalajından doğrudan çıkarılmış ve kullanılmadan önceki hâlleriyle değerlendirilmiştir.

4.1.1. Diş Fırçası Gruplarına Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri

Her bir diş fırçası grubunda Texas Red, Parlak Alan ve Faz Kontrast filtresi kullanılarak floresan mikroskobu analizi sonucunda elde edilen görüntüler Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4. ve Şekil 4.5.' te gösterilmiştir.

4.1.1.1. Oral-B Diş Fırçası Grubu Görüntüleri

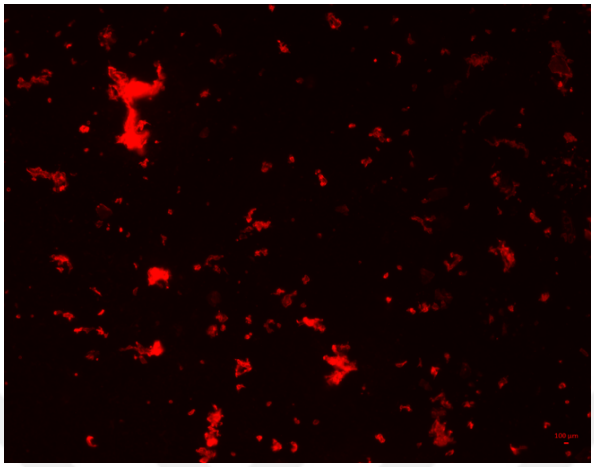
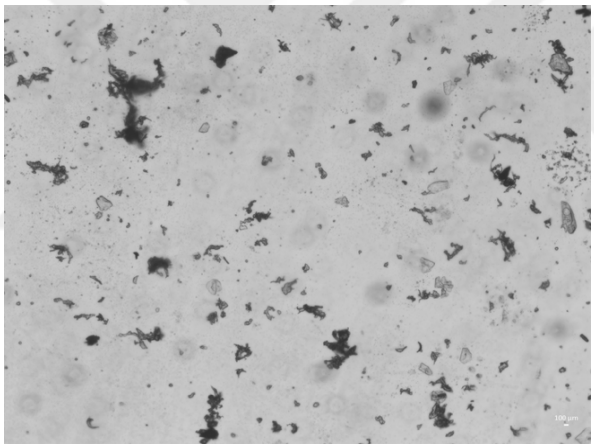
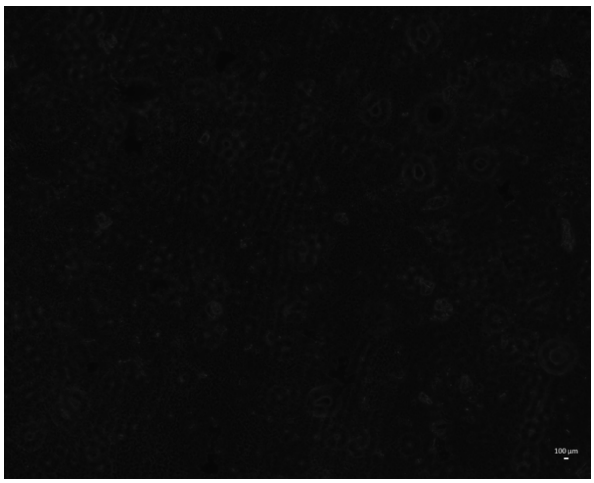
Aşağıda Oral-B marka diş fırçasının kullanım öncesi floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.1.)

	10x büyütme altında Oral-B diş fırçasının Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Faz kontrast filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü

Şekil 4.1. Oral-B diş fırçası grubu görüntüleri

4.1.1.2. Splat Diş Fırçası Grubu Görüntüleri

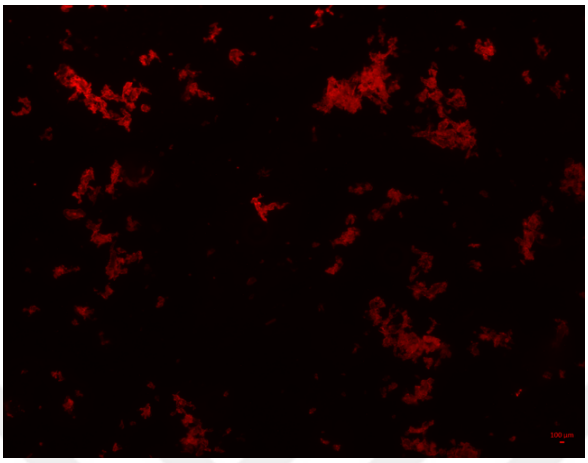
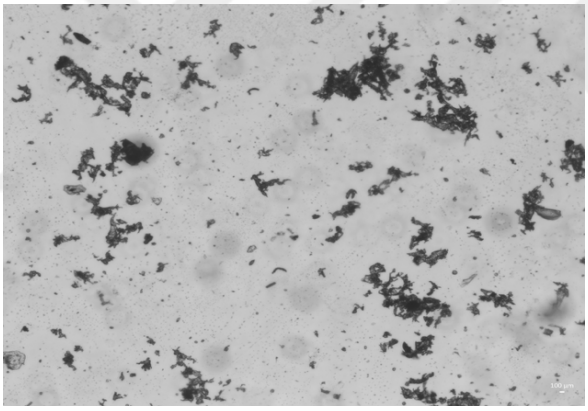
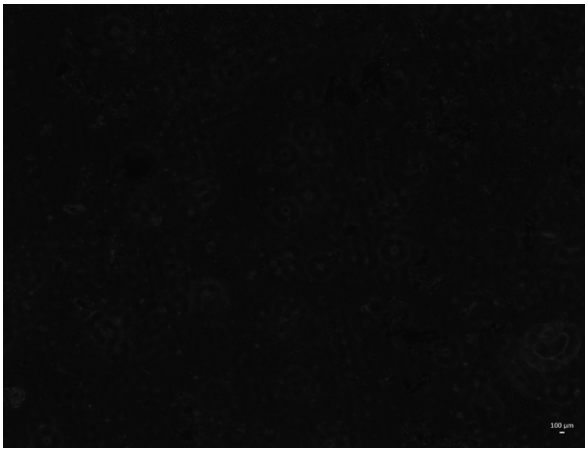
Aşağıda Splat marka diş fırçasının kullanım öncesi floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.2.)

	10x büyütme altında Splat diş fırçasının Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Faz kontrast filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü

Şekil 4.2. Splat diş fırçası grubu görüntüleri

4.1.1.3. TePe Diş Fırçası Grubu Görüntüleri

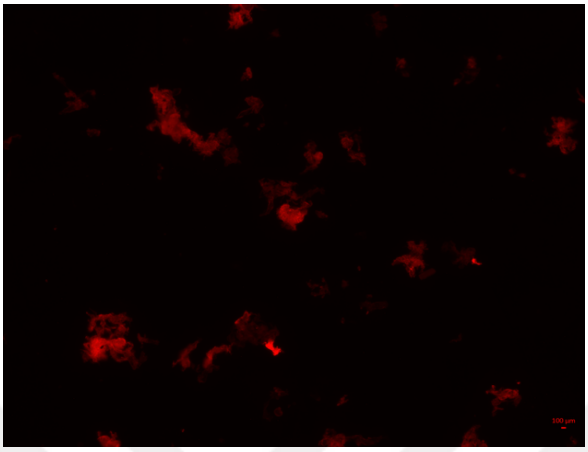
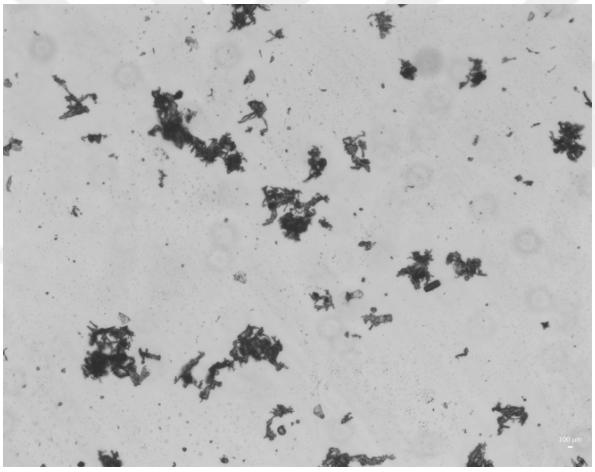
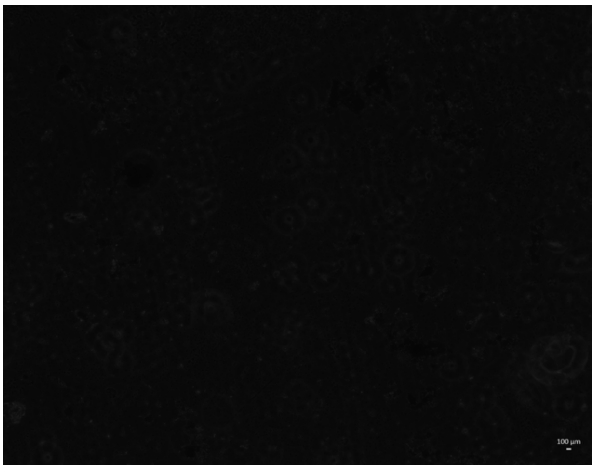
Aşağıda TePe marka diş fırçasının kullanım öncesi floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.3.)

	10x büyütme altında TePe diş fırçasının Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Faz kontrast filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü

Şekil 4.3. TePe diş fırçası grubu görüntüleri

4.1.1.4. Curaprox Diş Fırçası Grubu Görüntüleri (Şekil 4.4.)

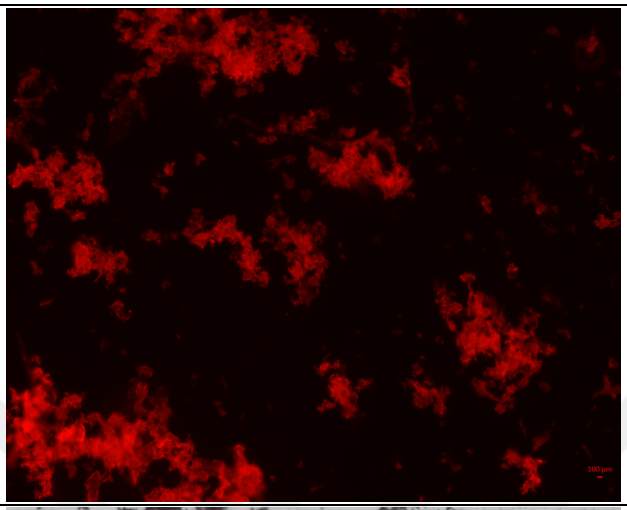
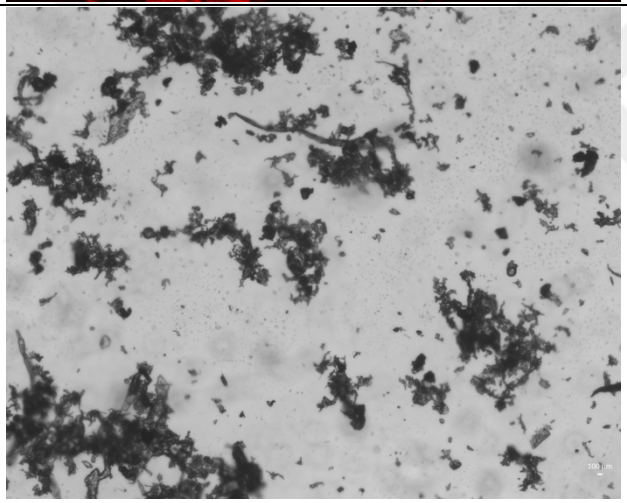
Aşağıda Curaprox marka diş fırçasının kullanım öncesi floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.4.)

	10x büyütme altında Curaprox diş fırçasının Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Faz kontrast filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü

Şekil 4.4. Curaprox diş fırçası grubu görüntüleri

4.1.1.5. Rocs Diş Fırçası Grubu Görüntüleri

Aşağıda Rocs marka diş fırçasının kullanım öncesi floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.5.)

	10x büyütme altında Rocs diş fırçasının Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	10x büyütme altında Faz kontrast filtresi kullanılarak elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü

Şekil 4.5. Rocs diş fırçası grubu görüntüleri

Ön çalışma grubuna ait diş fırçası kıllarının zımparalanmış örnekleri Texas Red filtresi altında incelendiğinde, yoğun ve yaygın floresan sinyalleri gözlenmiştir. Görüntülerde, düzensiz kenarlara sahip, farklı boyutlarda ve kümelenme eğilimi gösteren partiküller tespit edilmiştir. Bu partiküllerin parlak floresan yoğunluğu, mikroplastik karakterine işaret etmekte olup, özellikle kılların mekanik aşındırma sonrasında polimerik yapıdan ayrılan parçacıkların varlığını düşündürmektedir. Ayrıca, görüntüdeki partiküllerin homojen dağılmaması ve bazı bölgelerde birikim göstermesi, mikroplastiklerin agregasyon eğilimini destekleyen bir bulgu olarak değerlendirilebilir.

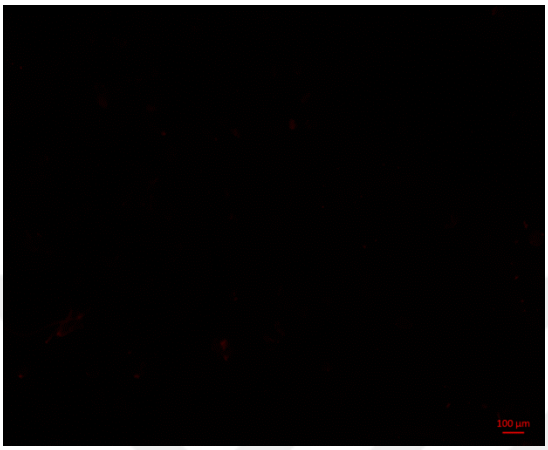
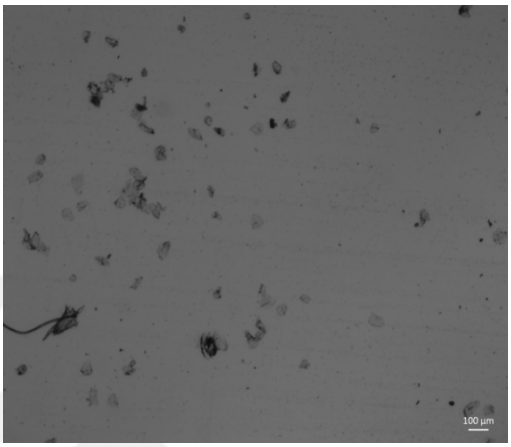
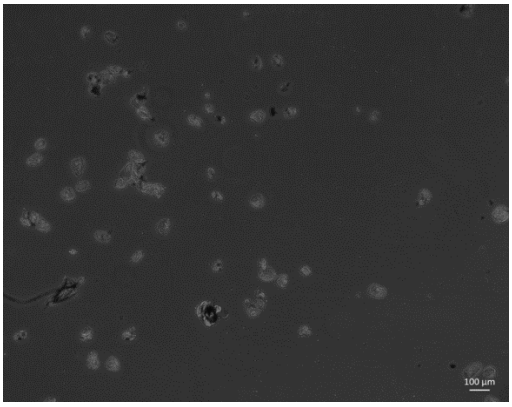
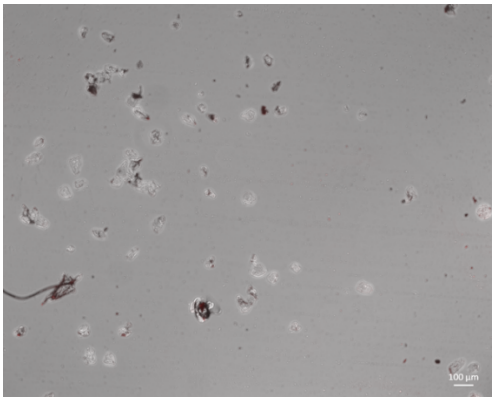
Parlak Alan filtresi altında elde edilen görüntülerde, Texas Red filtresi ile floresan veren bölgelerin morfolojik özellikleri daha ayrıntılı şekilde gözlenmiştir. Görüntüde düzensiz konturlara sahip, farklı boyutlarda ve yoğun kümeler halinde bulunan partiküller seçilebilmektedir. Parçacıkların belirgin kontrast oluşturması, bunların organik arka plan matriksinden farklı bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir. Bu bulgular, diş fırçası kıllarının mekanik aşındırılması sonucu oluşan ve floresan mikroskobunda işaretlenen mikroplastik benzeri partiküllerin morfolojik olarak da desteklendiğini ortaya koymaktadır.

Faz kontrast filtresi altında elde edilen görüntülerde, yüzey dokusu ve partikül dağılımı farklı bir yöntem ile değerlendirilmiştir. Görüntülerde diş fırçası kılına ait çizgisel yapılar izlenirken, yüzey üzerinde yer alan düzensiz partiküller düşük kontrastla seçilebilmektedir. Bu bulgu, Texas Red filtresinde floresan sinyali veren ve Parlak Alan'da kontrast oluşturan partiküllerin, kıl yüzeyine bağlı veya yüzeyden ayrışmış yapılar olduğunu doğrulamaktadır. Böylece, farklı filtrelerden elde edilen sonuçların birlikte değerlendirilmesi, zımparalanmış fırça kıllarından mikroplastik karakterinde parçacıkların açığa çıktığını desteklemektedir.

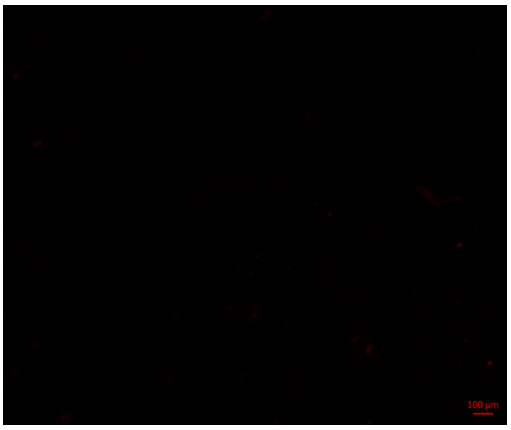
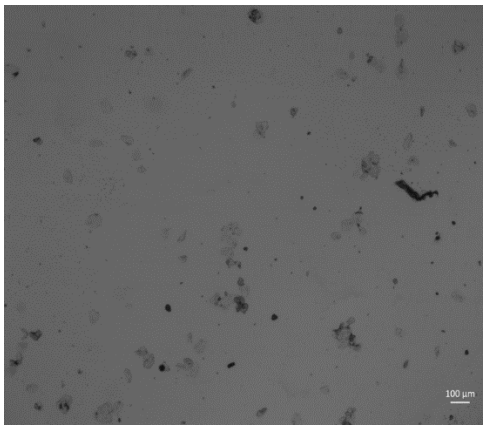
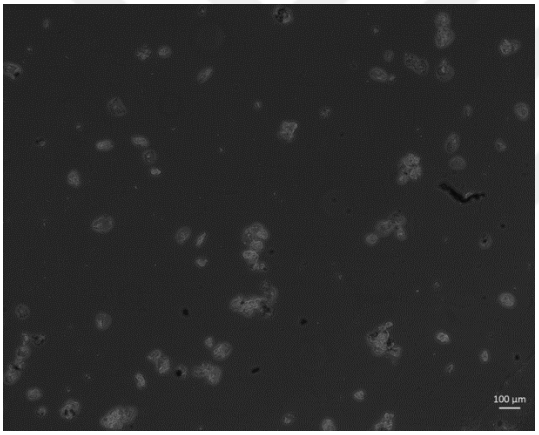
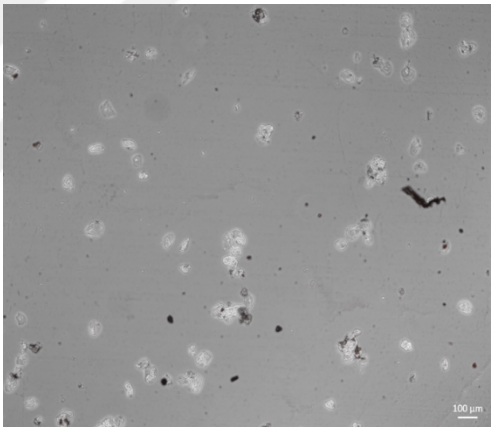
4.1.2. Ön çalışma Grubuna Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri

İlk üç görsel tükürüğün, devamında sırasıyla tükürük + RIPA, tükürük + mikroplastik ve tükürük+ RIPA+ mikroplastik ön çalışma gruplarının 10x büyütme altında floresan mikroskobu görüntüleri Şekil 4.6., Şekil 4.7. ve Şekil 4.8.'de gösterilmiştir.

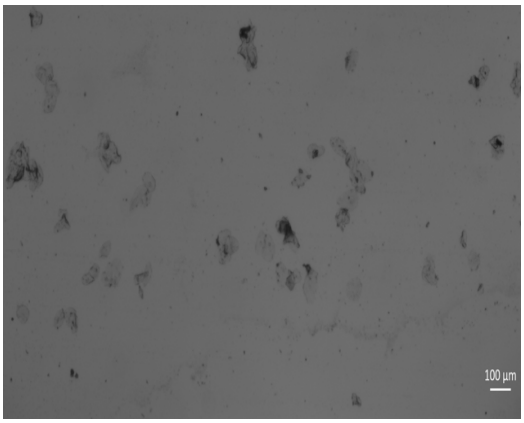
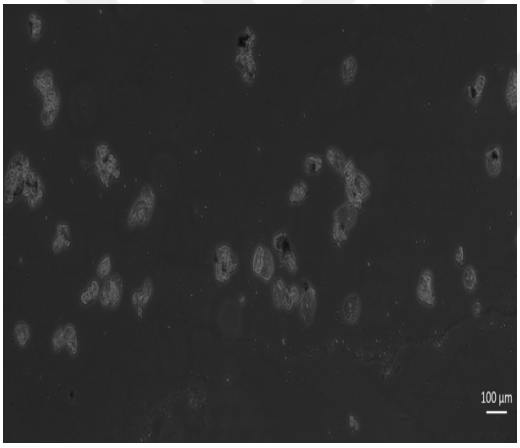
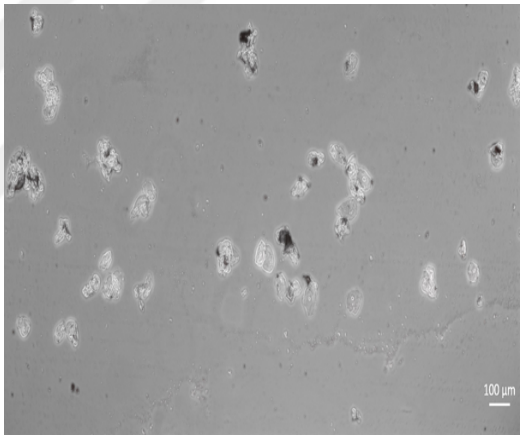
Ön çalışma grubundan alınan örneklerde herhangi bir mikroplastik salınımı olmadığından floresan mikroskobundan Texas Red filtresi kullanılarak elde edilen görüntü siyah olarak gözlenmiş yani herhangi bir ışıma olmamıştır. Dışarıdan mikroplastik partikül eklenen ön çalışma grubu örneklerinde ise Texas Red filtresinde kırmızı renkli ışımalar görülmüştür.

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.6. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.7. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.8. Ön çalışma Grubu Tükürüğü floresan mikroskobu görüntüsü

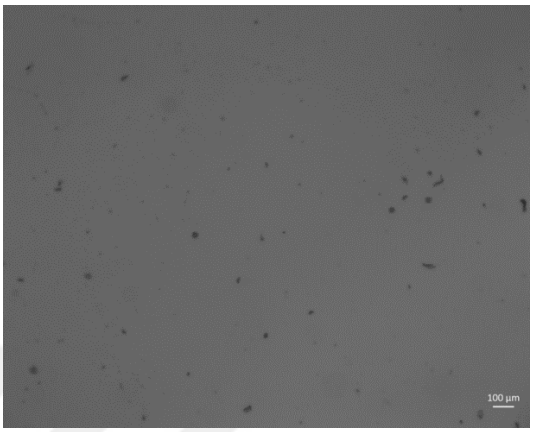
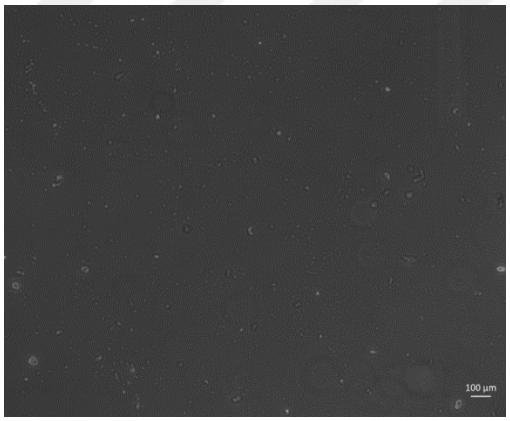
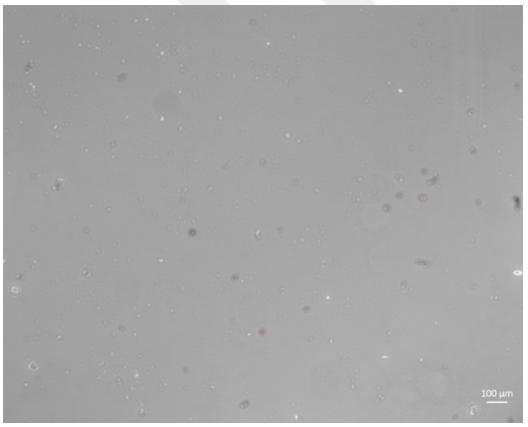
Ön çalışma grubuna ait tükürük örnekleri floresan mikroskobu altında Texas Red, Parlak Alan, Faz kontrast filtrelerle ve filtrelerin çakıştırılmış görüntüsüyle değerlendirilmiştir. Ön çalışma grubuna ait floresan mikroskobu görüntülerinde, Texas Red filtresi altında elde edilen veriler incelendiğinde, örneklerde kırmızı floresan sinyali gözlemlenmemiştir. Görüntü genelinde yalnızca zayıf, dağınık ve düzensiz şekilde dağılmış minimal düzeyde floresan ışıma dikkat çekmekte olup, bu sinyallerin büyük olasılıkla arka plan gürültüsüne, non-spesifik bağlanmaya ya da olası

otofloresans kaynaklarına bağlı olduğu düşünülmektedir. Nile Red ile boyanan bu ön çalışma örneklerinde, mikroplastik varlığına işaret edebilecek şekilde belirgin sınırlara sahip, partiküler yapıda ya da kümelenmiş kırmızı floresan sinyallere rastlanmamıştır. Bu durum, ön çalışma grubunda mikroplastik kontaminasyonunun bulunmadığını ve uygulanan boyama-yıkama protokolünün spesifikliği koruyacak şekilde etkili olduğunu göstermektedir. Ön çalışma grubuna ait örneklerin Parlak Alan filtresi altında yapılan incelemesinde, yüzey üzerinde farklı boyut ve morfolojilere sahip çok sayıda partikülün yer aldığı gözlemlenmiştir. Bu yapılar arasında amorf, düzensiz kenarlı ve yoğunluğu farklılık gösteren partiküller dikkat çekmektedir. Ancak bu morfolojik yapılar, Texas Red filtresi altında herhangi bir anlamlı floresan sinyali göstermemiştir. Dolayısıyla bu partiküllerin Nile Red ile spesifik boyanmadığı ve mikroplastik karakteri taşımadığı anlaşılmaktadır. Ayrıca görüntüde yer yer lif benzeri yapıların ve biyolojik organik dokuda olabilecek formların varlığı da dikkati çekmektedir. Bu bulgular, Parlak Alan görüntülemenin, floresan boyamanın spesifikliğini değerlendirmek ve arka plan partikül varlığını görsel olarak desteklemek açısından tamamlayıcı bir yöntem olduğunu göstermektedir.

Faz kontrast filtresinin kullanıldığı görüntülerde parlak alanlarla çevrili, düzensiz şekilli partiküller izlenmektedir. Bu partiküllerin, optik kontrast farkları nedeniyle daha belirgin hale gelmiş olup, biyolojik doku kalıntıları veya çevresel kontaminantlar olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu yapıların Texas Red filtresinde floresan sinyali oluşturmaması, mikroplastik karakteri taşımadıklarını göstermektedir. Faz kontrast görüntüde parçacıkların konturları ve yüzey morfolojileri daha net seçilse de floresan işaretleme ile desteklenmediği için mikroplastik olarak değerlendirilemez.

Çakıştırılmış görüntüde partiküllerin genel morfolojisi ve konumları daha net şekilde izlenmektedir. Ancak Texas Red filtresine ait belirgin bir floresan ışıma olmadığı için gözlenen yapılar mikroplastik olarak değerlendirilemez. Çakıştırılmış görüntü, Parlak Alan ve Faz kontrast filtrelerinde saptanan düzensiz şekilli partiküllerin floresan sinyal ile eşleşmediğini doğrulamaktadır. Bu durum, ön çalışma grubunda var olan partiküllerin biyolojik doku veya çevresel artefakt olabileceği ve mikroplastik özellik göstermediği bulgusunu güçlendirmektedir. Ön çalışma grubu grup deney grubundan elde edilecek sonuçlarla karşılaştırma için güvenilir bir kontrol sağlamaktadır.

Aşağıda Tükürük + RIPA grubuna ait floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.9.)

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

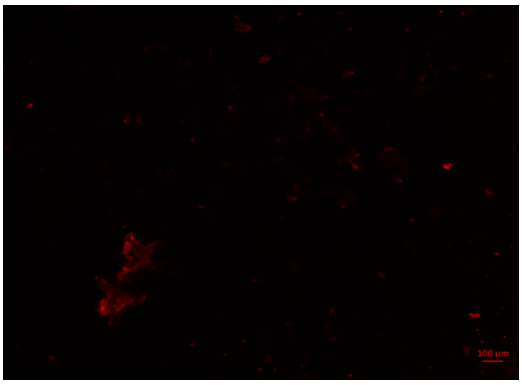
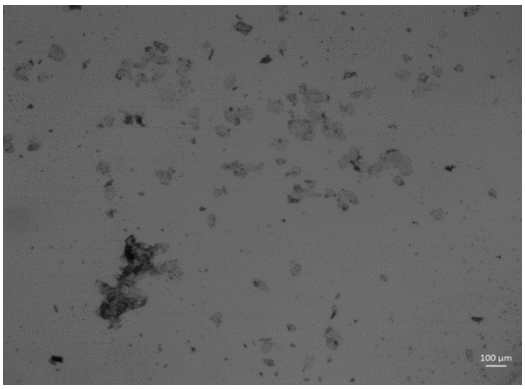
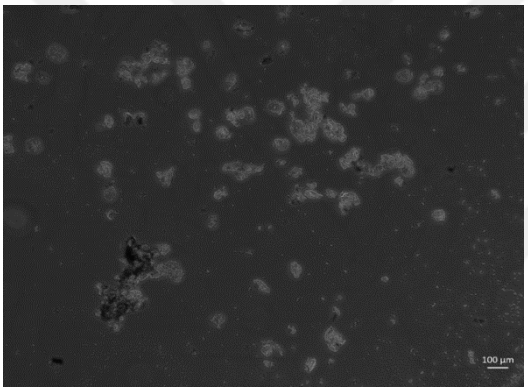
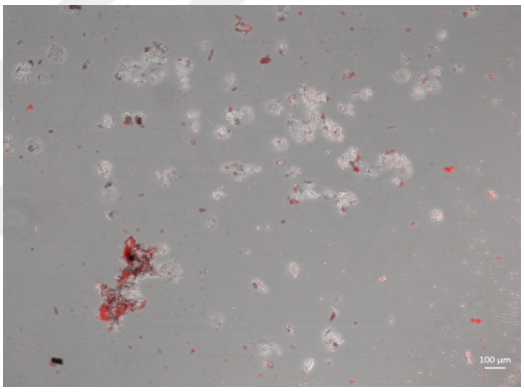
Şekil 4.9. Tükürük+RIPA grubu floresan mikroskobu görüntüleri

Texas Red filtresi altında yapılan floresan mikroskop incelemesinde belirgin bir ışıma izlenmemektedir. Görüntüde yalnızca arka plan düzeyinde zayıf sinyaller göze çarpmakta olup, bu sinyallerin mikroplastiklere özgü bir floresan emisyonu

temsil etmediği düşünülmektedir. Tükürük+RIPA örneklerinde mikroplastik partikül varlığını gösterecek karakteristik floresan pozitifliği saptanmamıştır. Bu bulgu, ön çalışma grubuna ait örneklerde beklenen şekilde mikroplastik kontaminasyonu olmadığını ve elde edilen sonuçların ön çalışma grubunu desteklediğini göstermektedir.

Parlak Alan filtresi kullanılarak elde edilen mikroskop görüntüsünde çeşitli küçük partiküller ve noktasal yapılar izlenmektedir. Ancak bu yapılar floresan mikroskobu Texas Red filtresinde herhangi bir ışıma göstermemiştir. Dolayısıyla gözlenen partiküllerin mikroplastik kaynaklı olmadığı, büyük olasılıkla biyolojik kalıntılar (ör. protein kümeleri, hücresel parçacıklar) veya çevresel toz/artefaktlar olabileceği değerlendirilmektedir. Görüntüdeki partikül yoğunluğu düşük seviyede olup homojen bir dağılım göstermektedir. Faz kontrast mikroskop görüntüsünde zemin üzerinde düşük yoğunlukta, küçük ve dağınık partiküller gözlenmektedir. Bu partiküller kontrast farkı nedeniyle belirginleşmiş olsa da Texas Red filtresinde herhangi bir floresan sinyali göstermemiştir. Bu nedenle mikroplastik partikül olarak değerlendirilemezler. Görüntüde izlenen yapılar, muhtemelen biyolojik kalıntılar veya tampon çözeltinin içeriğinden kaynaklanan artefaktlar olup, mikroplastik varlığına işaret eden kanıt bulunmamaktadır. Texas Red, Parlak Alan ve Faz kontrast filtrelerinin birleştirilmesiyle elde edilen görüntüde farklı boyutlarda, dağınık dağılım gösteren partiküller seçilmektedir. Ancak Texas Red filtresinde floresan pozitifliği saptanmadığı için bu partiküller mikroplastik olarak değerlendirilmemektedir.

Aşağıda Tükürük + mikroplastik grubuna ait floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.10.)

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.10. Tükürük+Mikroplastik grubu floresan mikroskobu görüntüleri

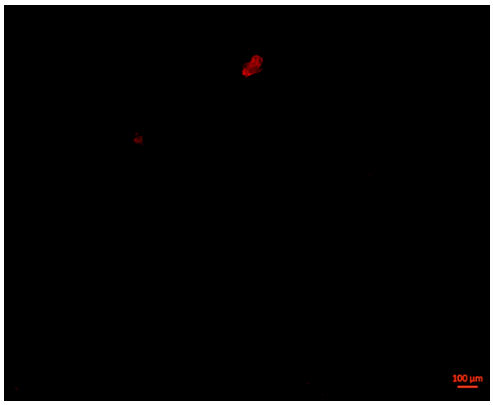
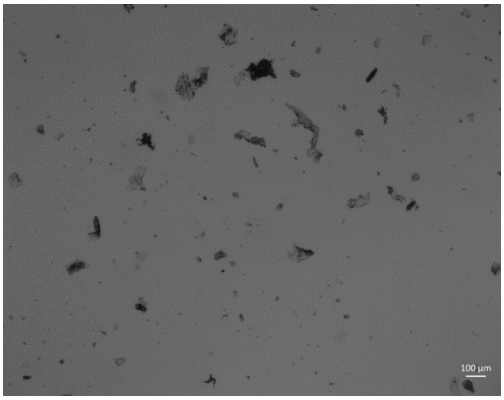
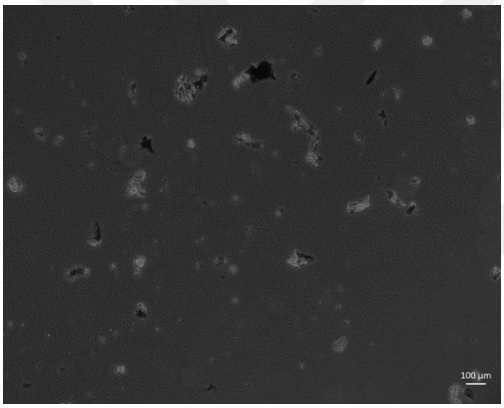
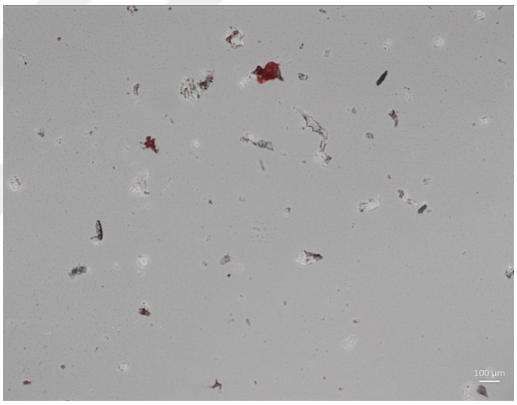
Texas Red filtresi altında yapılan floresan mikroskobu incelemesinde belirgin ve yoğun şekilde kırmızı floresan sinyalleri gözlenmektedir. Görüntüde hem dağınık halde küçük partiküller hem de kümelenmiş daha büyük ve değişen boyuttaki yapılar dikkat çekmektedir. Bu floresan pozitiflik, örnekte mikroplastik partiküllerin varlığını güçlü biçimde desteklemektedir. Ön çalışma grubunda gözlenmeyen bu sinyaller, deneysel olarak eklenen mikroplastiklerin floresan işaretleme ile net biçimde ayırt edilebildiğini göstermektedir.

Parlak Alan mikroskop görüntüsünde farklı boyut ve şekillerde, düzensiz morfolojiye sahip çok sayıda partikül izlenmektedir. Bu partiküller Texas Red filtresinde gözlenen floresan sinyalleriyle uyumlu bir dağılım göstermektedir. Görüntüde özellikle alt sol bölgede kümelenmiş daha büyük yapılar dikkat çekmektedir. Bu yapıların, eklenen mikroplastiklerin agregasyon eğiliminden kaynaklandığı düşünülebilir.

Faz kontrast görüntüsünde farklı boyutlarda çok sayıda partikül belirgin kontrast farklarıyla ortaya çıkmaktadır. Partiküllerin yüzey konturları ve yoğunlukları net biçimde seçilebilmekte, bu da morfolojik özelliklerinin ayırt edilmesine olanak tanımaktadır. Görüntüde özellikle kümelenmiş bölgelerde yoğun partikül birikimi dikkat çekmektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik gösteren bu partiküller, Faz kontrast altında da net olarak ayırt edilebilmekte ve mikroplastik varlığını doğrulamaktadır.

Üç filtrenin (Texas Red, Parlak Alan, Faz kontrast) birleştirilmesiyle elde edilen görüntüde, kırmızı floresan sinyali veren partiküller Parlak Alan ve Faz kontrast altında görülen düzensiz yapılarla örtüşmektedir. Çakıştırılmış görüntü, Texas Red filtresinde gözlenen floresan pozitifliğin gerçekten partikül yapılarıyla eşleştiğini göstermekte ve mikroplastik varlığını güçlü biçimde doğrulamaktadır.

Aşağıda Tükürük + RIPA+ mikroplastik grubuna ait floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.111.)

	
Ön çalışma grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.11. Tükürük+RIPA+Mikroplastik grubu floresan mikroskobu görüntüleri

Texas Red filtresi altında yapılan floresan mikroskop incelemesinde belirgin kırmızı floresan sinyali veren partiküller görülmektedir. Özellikle görüntünün üst bölgesinde daha yoğun ve iri boyutlu (yaklaşık 35 µm) bir partikül dikkati çekmektedir. Bu floresan pozitiflik, örneğe eklenen mikroplastiklerin RIPA tamponu varlığında da tespit edilebildiğini göstermektedir. Ön çalışma örneklerinden farklı olarak burada gözlenen sinyaller, mikroplastik varlığına özgüdür ve deneysel grubun beklenen bulgularıyla uyumludur.

Parlak Alan görüntüsünde çok sayıda farklı boyut ve şekillerde partikül izlenmektedir. Partiküllerin bir kısmı ince ve uzun formda, bir kısmı ise düzensiz ve amorf yapıda olup heterojen bir dağılım göstermektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik veren partiküllerle örtüşen bu yapılar, eklenen mikroplastiklerin ışık mikroskobu altında da ayırt edilebildiğini göstermektedir. RIPA tamponunun varlığı partiküllerin morfolojik görünümünü değiştirmemiş, ancak ortamda organik dokuların parçalanmasından kaynaklı daha fazla partikül gözlenmiştir.

Faz kontrast mikroskop görüntüsünde farklı morfolojilerde çok sayıda partikül net bir şekilde ayırt edilmektedir. Partiküllerin konturları belirginleşmiş, özellikle düzensiz ve yoğun yapılar açıkça ortaya çıkmıştır. Bu partiküllerin dağılımı, Parlak Alan görüntüsünde gözlenenlerle uyumludur. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik gösteren partiküllerle örtüşmesi, bu yapıları mikroplastik olarak doğrulamaktadır. RIPA varlığında partiküllerin kontrastı artmış ve gözlemleri daha kolay hale gelmiştir.

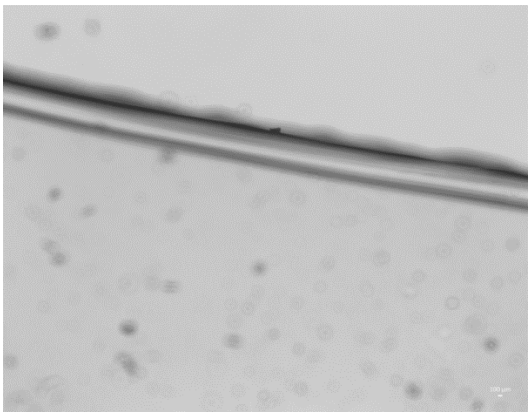
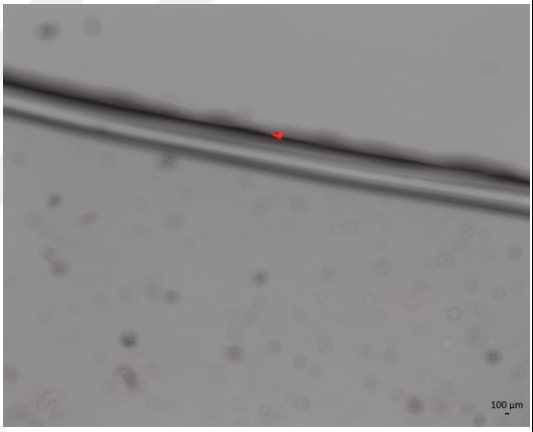
Texas Red, Parlak Alan ve Faz kontrast filtrelerinin birleştirilmesiyle elde edilen görüntüde, kırmızı floresan sinyali veren partiküller floresan mikroskobu altında görülen düzensiz yapılarla net biçimde örtüşmektedir. Özellikle iri ve amorf partiküller hem morfolojik görünümleriyle hem de floresan pozitiflikleriyle mikroplastik varlığını açıkça ortaya koymaktadır.

4.1.3. Deney Grubuna Ait Floresan Mikroskobu Görüntüleri

Deney grubunda beş ayrı diş fırçası grubuna dair elde edilen floresan mikroskobu görüntüleri Texas Red, Parlak Alan ve Faz Kontrast filtreleri kullanılarak elde edilmiş ve çakıştırılmış filtre görüntüsü eklenmiş olup Şekil 4.12., Şekil 4.13., Şekil 4.14., Şekil 4.15. ve Şekil 4.16.' da gösterilmiştir.

4.1.3.1. Oral-B Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü

Aşağıda Oral-B marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.12.)

	
Deney grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.12. Oral-B marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü

Oral-B diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsünde tek bir bölgede belirgin ve yaklaşık 15 µm kırmızı floresan sinyali gözlenmektedir. Bu ışıma, ön çalışma grubunda saptanmayan ve deney grubunda ortaya çıkan mikroplastik varlığına işaret etmektedir. Ancak bu alandaki floresan pozitifliğin sayıca sınırlı olduğu dikkati çekmektedir. Bu durum, fırça kullanımına bağlı olarak ağız ortamına sınırlı miktarda mikroplastik salınımı gerçekleştiğini düşündürmektedir.

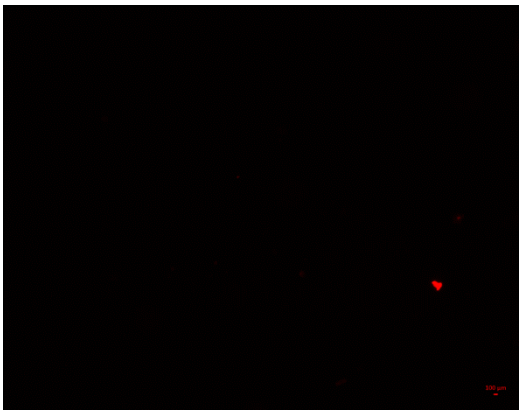
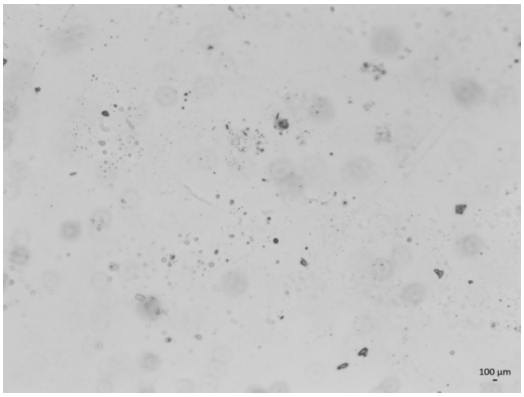
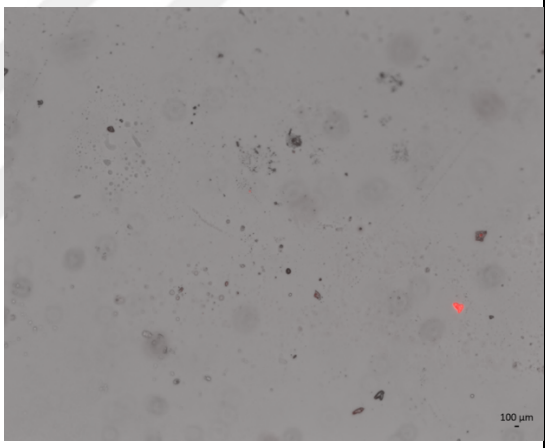
Parlak Alan görüntüsünde büyük ve lineer bir yapı (muhtemelen lam parçası ya da dış ortamdan bulaşmış lif benzeri bir yapı) net şekilde izlenmektedir. Bunun dışında dağılım gösteren küçük, yuvarlak yapılar da mevcuttur. Texas Red filtresinde gözlenen floresan pozitifliğin, bu büyük lineer yapının belirli bir bölgesiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Ancak küçük yuvarlak partiküllerde floresan pozitifliği gözlenmemiştir.

Faz kontrast görüntüsünde geniş, lineer bir yapı (muhtemelen lam parçası ya da dış ortamdan bulaşmış lif benzeri bir yapı) belirgin kontrastla seçilmektedir. Konturlar netleşmiş, yapının mikrometre boyutlarında olduğu anlaşılmaktadır. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik gözlenen bölgenin, bu lineer yapının sınırlı bir kısmına denk geldiği düşünülmektedir. Bu durum, fırça kılından kopan fragmanların mikroplastik özellik taşıyabileceğini göstermektedir.

Çakıştırılmış görüntüde Texas Red filtresinde gözlenen kırmızı floresan sinyali, Parlak Alan ve Faz kontrast altında izlenen lineer yapıyla örtüşmektedir. Özellikle lineer yapı üzerinde lokalize olmuş küçük bir bölgenin floresan pozitifliği, bu fragmanın mikroplastik karakter taşıdığını göstermektedir. ***Bu bulgu, diş fırçası kullanımına bağlı olarak ağız ortamına mikroplastik salınımının gerçekleşebileceğini desteklemektedir.***

4.1.3.2. Splat Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü

Aşağıda Splat marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.13.)

	
Deney grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.13. Splat marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü

Splat diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu Texas Red filtresi altında yapılan incelemede, görüntünün sağ alt bölgesinde belirgin ve yaklaşık 20 µm kırmızı floresan sinyali veren bir partikül göze çarpmaktadır. Bunun dışında arka planda dağınık ve zayıf sinyaller yer alsa da güçlü pozitiflik özellikle tekil bir partikülde yoğunlaşmıştır. Bu bulgu, Splat diş fırçası kullanımına bağlı olarak ağız ortamına mikroplastik salınımı gerçekleştiğini ve bu partiküllerin floresan pozitiflik ile tespit edilebildiğini göstermektedir.

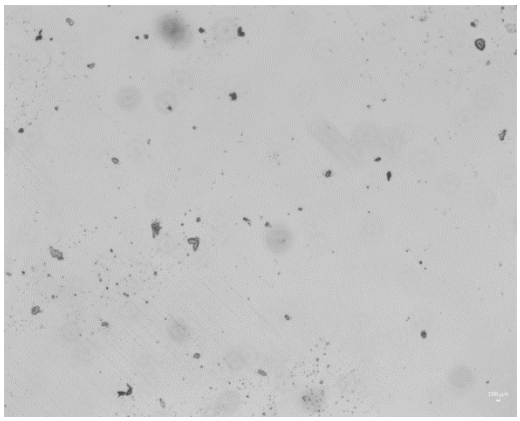
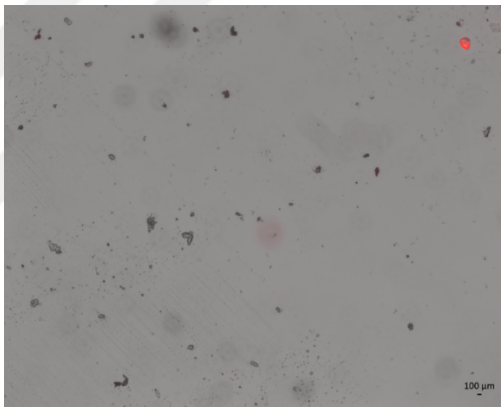
Parlak Alan görüntüsünde çok sayıda küçük ve düzensiz şekilli partikül dağınık biçimde izlenmektedir. Partiküllerin bir kısmı köşeli ve opak görünümlü iken, diğerleri daha küçük ve saydam yapılar olarak gözlenmektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitifliği veren partikülün, bu alanda görülen düzensiz yapılarla morfolojik olarak örtüşmesi beklenmektedir. ***Özellikle keskin kenarlı ve yoğun opak partiküller mikroplastik kaynaklı olma olasılığı taşımaktadır.***

Faz kontrast görüntüsünde çok sayıda küçük partikülün konturları daha net hale gelmiştir. Özellikle düzensiz şekilli ve yoğun kontrast veren partiküller dikkat çekmektedir. Bu yapılar, Parlak Alan görüntüsünde gözlenen partiküllerle uyumludur. Texas Red filtresinde floresan pozitifliği saptanan partikülün, bu kontrastlı yapılarla örtüştüğü düşünülmektedir. Bu durum, deney grubunda Splat fırçası kullanımına bağlı mikroplastik salınımının hem floresan işaretleme hem de morfolojik incelemelerle doğrulandığını göstermektedir.

Çakıştırılmış görüntüde Texas Red filtresinde saptanan kırmızı floresan sinyali, Parlak Alan ve Faz kontrast altında görülen düzensiz morfolojiye sahip partiküllerle net bir şekilde örtüşmektedir. Özellikle sağ alt bölgedeki keskin kenarlı partikülün floresan pozitifliği, onun mikroplastik karakterini güçlü biçimde ortaya koymaktadır. Diğer küçük partiküller arka planda gözlenmekte, ancak floresan sinyal ile eşleşmedikleri için mikroplastik olarak değerlendirilememektedir.

4.1.3.3. TePe Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü

Aşağıda TePe marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.14.)

	
Deney grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.14. TePe marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü

TePe diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu Texas Red filtresi altında görüntünün sağ üst köşesinde belirgin ve yaklaşık 20 µm kırmızı floresan sinyali veren bir partikül izlenmektedir. Bu pozitiflik, ön çalışma grubunda gözlenmeyen ve deney grubu örneklerinde belirginleşen mikroplastik varlığına işaret etmektedir. Görüntüde ayrıca daha düşük yoğunluklu arka plan sinyalleri de mevcuttur, ancak net ve güçlü floresan ışıma özellikle tekil bir

partikül üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu bulgu, TePe diş fırçası kullanımına bağlı olarak tükürükte mikroplastik salınımının gerçekleştiğini düşündürmektedir.

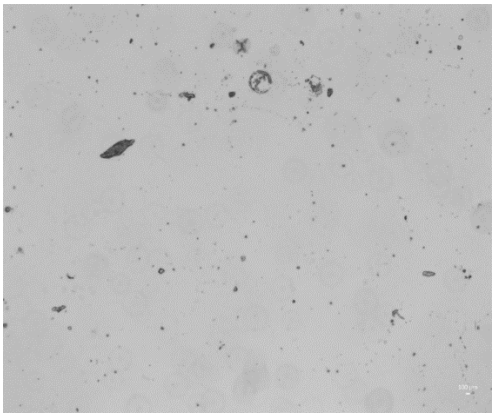
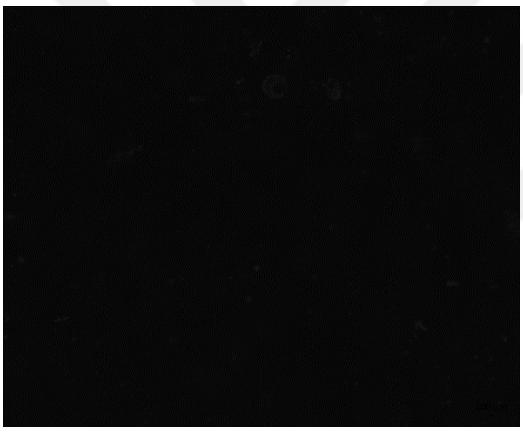
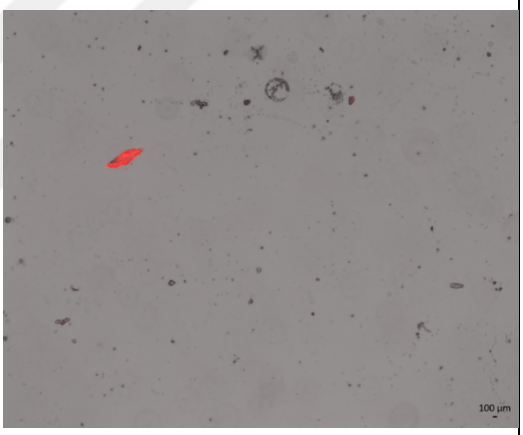
Parlak Alan görüntüsünde farklı boyutlarda ve düzensiz şekilli çok sayıda partikül izlenmektedir. Bazı partiküller opak ve yoğun yapılı, bazıları ise daha küçük ve saydam görünümdedir. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik veren partikülün, bu düzensiz yapılar içinde yer alan ve sağ üst köşeye yakın konumda görülen yoğun partiküllerle örtüştüğü düşünülmektedir. ***Morfolojik çeşitlilik dikkat çekici olup, eklenen mikroplastiklerin tükürük matriksi içinde heterojen bir dağılım gösterebildiğini düşündürmektedir.***

Faz kontrast görüntüsünde farklı boyutlarda partiküllerin konturları daha belirgin hale gelmiştir. Özellikle düzensiz şekilli ve yoğun kontrast oluşturan partiküller dikkat çekmektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik saptanan partikülün, bu kontrastlı yapılarla örtüştüğü düşünülmektedir. Görüntü genelinde dağınık şekilde bulunan küçük partiküller de seçilmektedir, ancak bunlar floresan sinyal göstermediğinden mikroplastik olarak değerlendirilemez.

Çakıştırılmış görüntüde Texas Red filtresinde gözlenen kırmızı floresan sinyali, Parlak Alan ve Faz kontrast altında görülen partiküllerle örtüşmektedir. Özellikle sağ üst köşede yoğun floresan pozitiflik gösteren partikül, morfolojik olarak da belirgin olup mikroplastik varlığını güçlü biçimde desteklemektedir. Diğer küçük partiküller ise arka planda seçilmekte ancak floresan sinyal göstermedikleri için mikroplastik olarak değerlendirilememektedir.

4.1.3.4. Curaprox Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü

Aşağıda Curaprox marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.15.)

	
Deney grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.15. Curaprox marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü

Curaprox diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu Texas Red filtresi altında görüntünün sol üst bölgesinde belirgin ve yaklaşık 50 µm kırmızı floresan sinyali veren büyük bir partikül izlenmektedir. Bu partikülün şekli uzamış ve düzensiz morfolojide olup, floresan pozitifliği mikroplastik varlığını güçlü biçimde desteklemektedir. Görüntü genelinde arka plan sinyalleri sınırlı düzeyde gözlenirken, bu tekil floresan pozitif partikül deney grubuna özgü belirgin bir bulgu sunmaktadır.

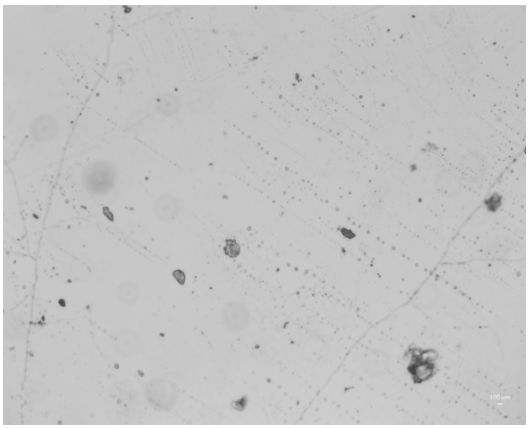
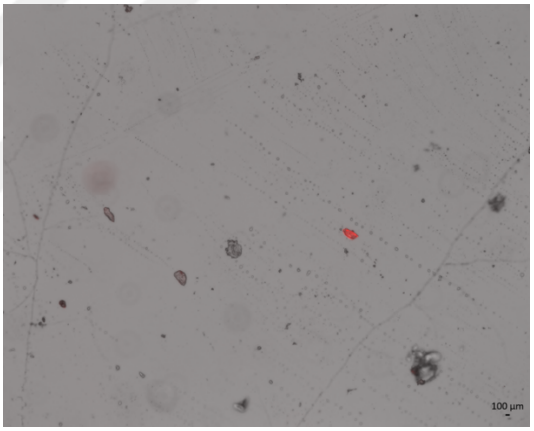
Parlak Alan görüntüsünde sol orta bölgede uzamış, yoğun ve opak görünümlü büyük bir partikül dikkat çekmektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitiflik gösteren yapının bu partikül ile örtüştüğü düşünülmektedir. Bunun dışında daha küçük ve düzensiz yapılar da görülmektedir, ancak bunlarda belirgin floresan sinyal kaydedilmemiştir. ***Büyük kırmızı ışıma veren partikülün keskin sınırlı yapısı, mikroplastik kaynaklı olabileceğini güçlü biçimde desteklemektedir.***

Faz kontrast görüntüsünde sol orta bölgede belirgin sınırlara sahip, uzamış ve opak görünümlü büyük bir partikül net olarak seçilmektedir. Bu partikül, Parlak Alan görüntüsünde gözlenen yapı ile uyumlu olup Texas Red filtresinde floresan pozitiflik göstermesi nedeniyle mikroplastik karakteri taşımaktadır. Görüntüde ayrıca daha küçük ve düşük kontrastlı yapılar da seçilmekte, ancak floresan sinyal göstermediklerinden mikroplastik olarak değerlendirilemezler.

Çakıştırılmış görüntüde sol orta bölgede parlak kırmızı floresan sinyali veren büyük partikül, Parlak Alan ve Faz kontrast altında gözlenen uzamış ve keskin sınırlı morfolojideki yapıyla net bir şekilde örtüşmektedir. Bu floresan pozitiflik, söz konusu partikülün mikroplastik karakterini güçlü biçimde doğrulamaktadır. Diğer küçük partiküller ise görüntüde dağınık biçimde seçilmekte, ancak floresan sinyal göstermedikleri için mikroplastik olarak değerlendirilememektedir.

4.1.3.5. Rocs Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneğinin Floresan Mikroskobu Görüntüsü

Aşağıda Rocs marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.16.)

	
Deney grubundan alınan örnekte Texas Red filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Parlak Alan filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü
	
Faz Kontrast filtresi kullanılarak 10x büyütme altında elde edilen floresan mikroskobu görüntüsü	Tükürük örneğinin 10x büyütme altında filtrelerle çakıştırılmış görüntüsü

Şekil 4.16. Rocs marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu görüntüsü

Rocs diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneğinin floresan mikroskobu Texas Red filtresi altında görüntünün sağ orta bölgesinde belirgin ve yaklaşık 20 µm kırmızı floresan sinyali veren bir partikül izlenmektedir. Bu pozitiflik, mikroplastik varlığını işaret eden karakteristik bir bulgudur. Arka planda düşük yoğunluklu sinyaller olsa da güçlü floresan ışımanın özellikle tekil partikülde yoğunlaşması dikkat çekmektedir. Bu durum, Rocs fırçası kullanımına bağlı olarak ağız ortamına mikroplastik partikül salınımının gerçekleştiğini düşündürmektedir.

Parlak Alan görüntüsünde çeşitli boyut ve morfolojilerde partiküller dağınık şekilde izlenmektedir. Partiküllerin bazıları köşeli ve yoğun yapıda, bazıları ise daha küçük ve saydam görünümdedir. Texas Red filtresinde floresan pozitifliği saptanan partikülün, burada sağ orta bölgede görülen opak yapılarla örtüştüğü düşünülmektedir. Ayrıca görüntüde çizgisel artefaktlar da dikkat çekmekte olup bunların mikroskop lamı ya da hazırlık sürecinden kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir.

Faz kontrast görüntüsünde farklı boyutlarda ve düzensiz şekilli partiküller seçilmektedir. Özellikle yoğun kontrast gösteren yapılar, Parlak Alan görüntüsünde gözlenen partiküllerle örtüşmektedir. Texas Red filtresinde floresan pozitifliği saptanan partikülün, bu kontrastlı yapılarla uyumlu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca lam yüzeyine ait olabilecek çizgisel artefaktlar da kontrast farkıyla belirgin hale gelmiştir. ***Bu bulgular, Rocs fırçası kullanımına bağlı olarak tükürükte mikroplastik salınımının gerçekleştiğini desteklemektedir.***

Çakıştırılmış görüntüde Texas Red filtresinde floresan pozitiflik gösteren kırmızı partikül, Parlak Alan ve Faz kontrast altında görülen düzensiz morfolojideki partiküle net şekilde örtüşmektedir. Bu eşleşme, partikülün mikroplastik karakterini doğrulamaktadır. Görüntüde ayrıca dağınık halde bulunan çok sayıda küçük partikül mevcuttur; ancak bunlar floresan sinyali göstermediğinden mikroplastik olarak değerlendirilememektedir.

Floresan mikroskobu incelemelerinde her gruptan seçilen birer örneğe ait üç filtreli (Texas Red, Parlak Alan, Faz kontrast) ve çakıştırılmış görüntüler bulgular kısmında temsili olarak sunulmuştur. Ancak toplamda beş farklı diş fırçası grubundan elde edilen yüz tükürük örneği ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan tüm incelemelerde benzer morfolojik özellikler ve benzer yoğunlukta mikroplastik partiküller gözlenmiştir. Texas Red filtresinde kaydedilen kırmızı floresan sinyalleri, Parlak Alan ve Faz kontrast görüntülerinde izlenen düzensiz, opak veya lifsi morfolojideki yapılarla eşleşmiş ve çakıştırılmış görüntülerde bu eşleşme net biçimde doğrulanmıştır. Partiküllerin yoğunluğu bireyler arasında değişkenlik göstermekle birlikte, incelenen tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret eden floresan pozitif partiküller tutarlı biçimde kaydedilmiştir. ***Bu bulgular, yalnızca sunulan temsili örneklerle sınırlı kalmayıp, tüm deney grubu örneklerinde mikroplastiklerin***

tekrarlayıcı şekilde ortaya çıktığını ve diş fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik partikül salınımının gerçekleştiğini göstermektedir.

Floresan mikroskobu incelemelerinde tüm görüntüler 100 µm ölçek barı referans alınarak değerlendirilmiştir. Buna göre gözlenen partiküller genel olarak mikrometre ölçeğinde değişkenlik göstermiştir. Bazı örneklerde birkaç mikrometre çapında küçük, yuvarlak yapılar belirlenirken; diğerlerinde 50–100 µm uzunluğa ulaşan düzensiz veya lifsi fragmanlar izlenmiştir. Texas Red filtresinde kırmızı floresan sinyali veren bu partiküller, Parlak Alan ve Faz kontrast altında morfolojik olarak belirlenen yapılarla eşleşmiş ve çakıştırılmış görüntülerde de bu örtüşme net biçimde doğrulanmıştır. Böylece yalnızca varlık değil, boyutsal çeşitlilik de ortaya konmuş; mikroplastik partiküllerin hem küçük tekil yapılar hem de daha büyük fragmanlar halinde salındığı gösterilmiştir.

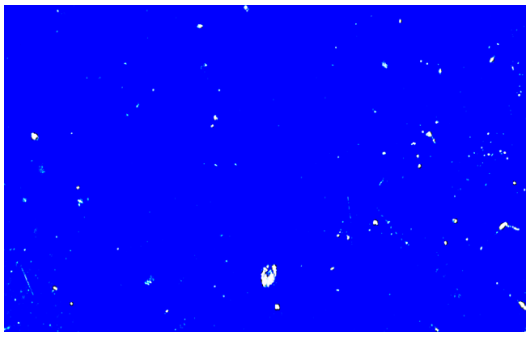
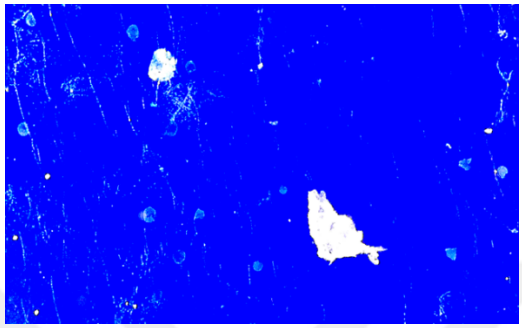
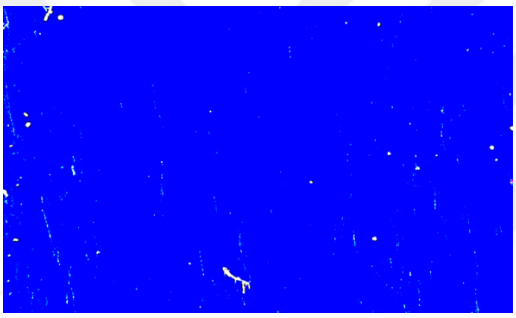
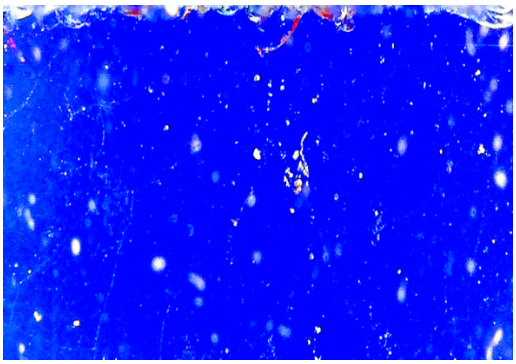
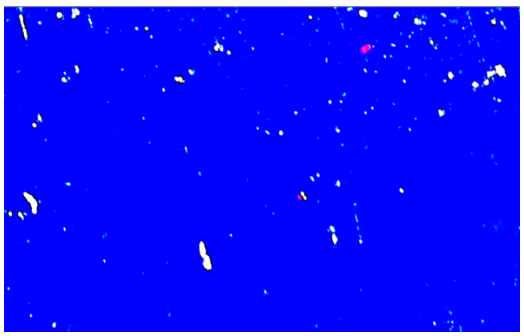
Deney grubunda floresan mikroskobundaki bulgular, diş fırçalarının kıl yapılarındaki polimerlerden tükürüğe geçebilecek mikroplastiklerin varlığına işaret etmekte olup, günlük ağız hijyeni ürünlerinin potansiyel bir maruziyet kaynağı olabileceğini göstermektedir.

4.2. DİJİTAL MİKROSKOP GÖRÜNTÜLERİ

Dijital mikroskopta da aynı floresan mikroskobunda olduğu gibi ön çalışma grubu ve deney grubu analizleri yapılmıştır.

4.2.1. Ön çalışma Grubu Dijital Mikroskop Görüntüleri

İlk iki görsel tükürüğün, devamında sırasıyla tükürük + RIPA, tükürük + mikroplastik ve tükürük+ RIPA+ mikroplastik ön çalışma gruplarının dijital mikroskop görüntüleri Şekil 4.17.'de gösterilmiştir.

	4x büyütme altında ön çalışma grubu tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında ön çalışma grubu tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında ön çalışma grubu tükürük+RIPA örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında ön çalışma grubu tükürük+mikroplastik örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında ön çalışma grubu tükürük+RIPA+mikroplastik örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

Şekil 4.17. Ön çalışma grubu örneklerinin dijital mikroskoptaki görüntüsü

Dijital mikroskop altında ön çalışma grubu tükürük örneğine bakıldığında, görüntüde mavi arka plan üzerinde dağınık halde çok sayıda küçük partikül izlenmektedir. Partiküllerin bazıları daha parlak ve yoğun ışık yansıması yaparken, diğerleri daha silik ve düzensiz yapıdadır. Ancak bu partiküllerde mikroplastiklere özgü boyanma ya da karakteristik sinyal gözlenmemektedir. Ortadaki daha büyük ve yuvarlak yapı da dahil olmak üzere gözlenen tüm oluşumlar, biyolojik kalıntılar veya çevresel toz partikülleri olarak değerlendirilmektedir. Mikroplastiğe işaret eden herhangi bir morfoloji ya da sinyal kaydedilmemiştir.

Ön çalışma grubuna ait tükürük + RIPA örneği dijital mikroskop altında incelendiğinde mavi arka plan üzerinde farklı yoğunluklarda ve düzensiz morfolojilere sahip partiküller belirlenmiştir. Bu partiküllerin bazıları küçük ve yuvarlak formda iken, özellikle alt orta bölgede yer alan daha büyük ve düzensiz şekilli partikül dikkat çekmiştir. Parlaklık ve ışık yansıması özellikleri, bu yapıların biyolojik kalıntılardan ayrıldığını ve mikroplastik karakteri taşımadığını göstermektedir. Ayrıca görüntüde lam yüzeyinden kaynaklanabilecek çizgisel artefaktlar bulunsa da bunlar partiküllerden ayırt edilmiştir. Bu bulgular, tükürük + RIPA örneğinde mikroplastik partiküllerin bulunmadığını göstermektedir.

Ön çalışma grubuna ait tükürük + mikroplastik örneği dijital mikroskop altında incelendiğinde mavi arka plan üzerinde yoğun şekilde dağılım gösteren çok sayıda partikül saptanmıştır. Görüntünün orta bölümünde kümelenmiş halde bulunan düzensiz ve parlak partiküller, morfolojik özellikleri ve ışığı güçlü yansıtmalarıyla mikroplastik karakterini ortaya koymaktadır. Ayrıca alanda hem küçük yuvarlak partiküller hem de daha büyük ve lifsi yapılar seçilmektedir. Üst kısımda lam kenarına yakın bölgelerde de heterojen dağılım gösteren yapılar dikkati çekmektedir. Gözlenen bu yoğun floresan benzeri parlaklık ve morfolojik çeşitlilik, tükürüğe eklenen mikroplastiklerin dijital mikroskop altında açık biçimde ayırt edilebildiğini göstermektedir.

Ön çalışma grubuna ait tükürük + mikroplastik + RIPA örneği dijital mikroskop altında incelendiğinde mavi arka plan üzerinde geniş dağılım gösteren çok sayıda partikül gözlenmiştir. Partiküller farklı boyutlarda olup hem küçük yuvarlak yapılar hem de daha büyük ve uzamış morfolojiler dikkati çekmektedir. Özellikle görüntünün orta ve üst bölgelerinde yer alan yoğun parlak partiküller ile bazı kırmızı

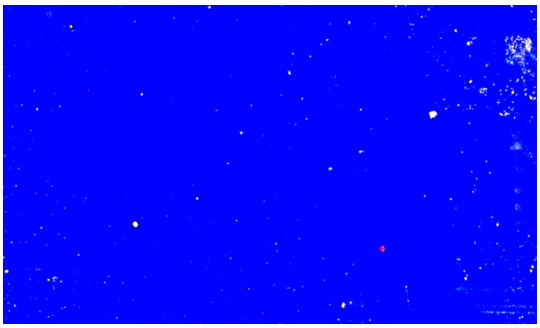
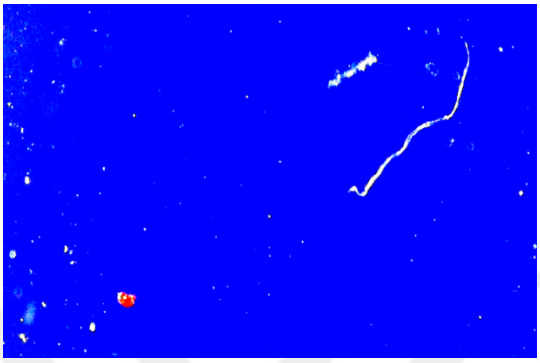
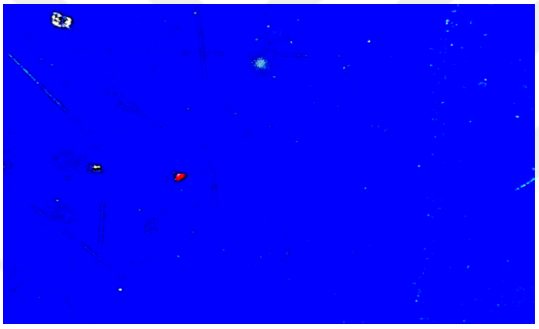
tonlu sinyaller, mikroplastik varlığını güçlü biçimde desteklemektedir. RIPA varlığında da partiküllerin morfolojik bütünlüğünü koruduğu ve optik özellikleriyle kolayca ayırt edilebildiği belirlenmiştir. Bu bulgular, mikroplastiklerin biyolojik matriks ve tampon çözeltiler varlığında dahi dijital mikroskop altında güvenilir şekilde saptanabildiğini göstermektedir.

4.2.2. Deney Grubu Dijital Mikroskop Görüntüleri

Deney grubunda dijital mikroskop altında aynı floresan mikroskobunda olduğu gibi mikroplastik partikülleri kırmızı ışıma yapmıştır. Her ayrı diş fırçasından elde edilen üçer görsel aşağıda Şekil 4.18., Şekil 4.19., Şekil 4.20., Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de gösterilmiştir.

4.2.2.1. Oral-B Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü

Aşağıda Oral-B marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan üç tükürük örneğinin dijital mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.18.)

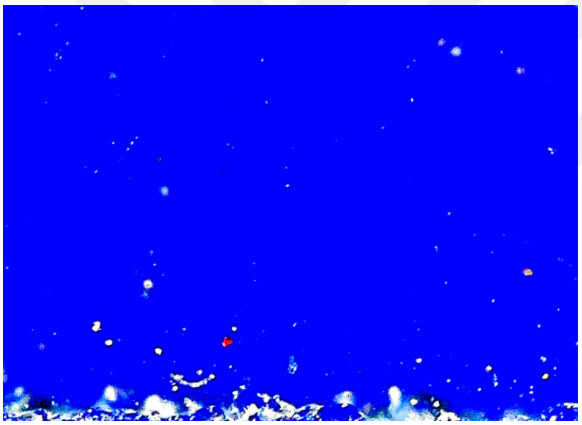
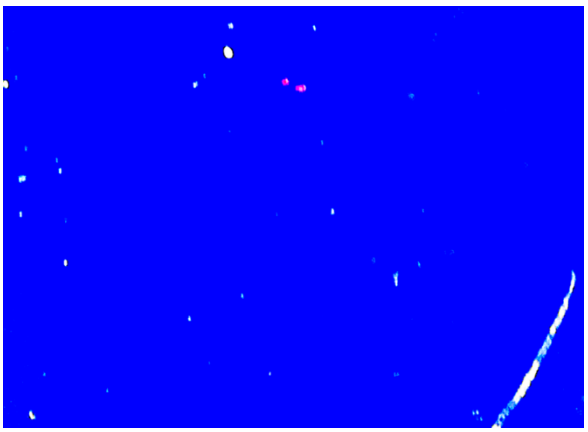
	4x büyütme altında Oral-B diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Oral-B diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Oral-B diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

Şekil 4.18. Oral-B diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü

Oral-B diş fırçası kullanan bireylerden elde edilen üç ayrı tükürük örneğinin dijital mikroskop altında değerlendirilmesi sonucunda tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret eden yapılar gözlenmiştir. İlk örnekte dağınık halde küçük ve yuvarlak partiküller ile kırmızı tonlu parlak bir sinyal dikkat çekmiştir. İkinci örnekte daha belirgin bir floresan pozitif partikülün yanı sıra uzun ve lifsi morfolojiye sahip bir yapı izlenmiş, bu yapı biyolojik dokuları düşündürmüştür. Üçüncü örnekte ise farklı morfolojilerde, parlak ışık yansımaları gösteren yapılar ile mikroplastiğe özgü kırmızı renklenme kaydedilmiştir. Genel olarak üç örnek bir arada değerlendirildiğinde, partikül yoğunluğunun bireyler arasında farklılık gösterdiği ancak tüm örneklerde hem tekil partiküller hem de düzensiz morfolojide yapılarla mikroplastik varlığının doğrulandığı belirlenmiştir. Bu bulgular, Oral-B markasına ait diş fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik salınımına yol açtığını ortaya koymaktadır.

4.2.2.2. Splat Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü

Aşağıda Splat marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan üç tükürük örneğinin dijital mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.19.)

	4x büyütme altında Splat diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Splat diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Splat diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

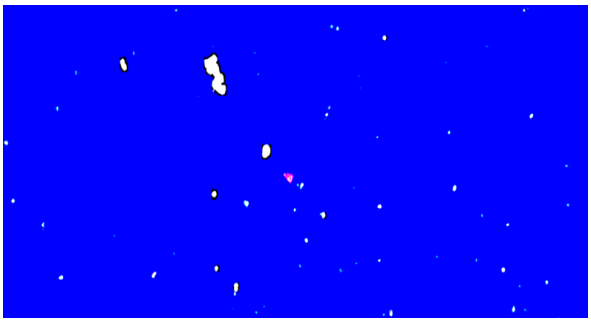
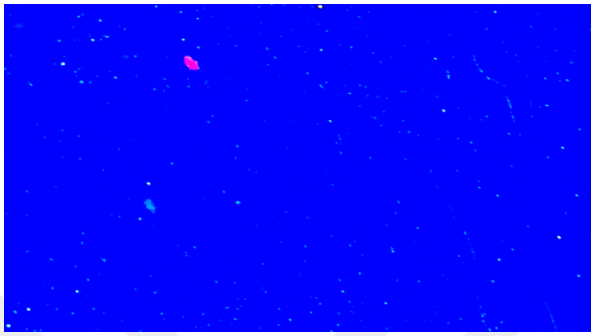
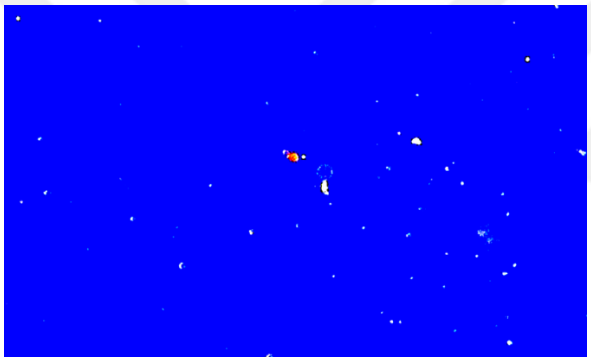
Şekil 4.19. Splat diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü

Splat diş fırçası kullanan bireylerden elde edilen üç ayrı tükürük örneği dijital mikroskop altında değerlendirildiğinde, tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret

eden bulgular saptanmıştır. İlk örnekte düzensiz ve uzamış morfolojiye sahip bir partikül ile (tükürükte yer alan organik doku parçası) kırmızı renkte parlak bir sinyal dikkat çekmiştir. İkinci örnekte alt bölgede kümelenmiş partiküller ve yoğun parlaklık gösteren kırmızı tonlu partikül izlenmiş, kırmızı boyalı yapı mikroplastiğe özgü sinyallerle uyumlu bulunmuştur. Üçüncü örnekte ise daha seyrek dağılım gösteren partiküller arasında kırmızı renkte belirgin sinyaller kaydedilmiş, ayrıca kenar bölgede lifsi bir yapı gözlenmiştir. Genel olarak üç örnek birlikte değerlendirildiğinde, partiküllerin morfolojik çeşitlilik gösterdiği, yoğunluk bakımından örnekler arasında farklılık olduğu, ancak her durumda mikroplastik varlığının tekrarlayıcı şekilde doğrulandığı belirlenmiştir. Bu sonuçlar, Splat fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik partiküllerin salındığını ve dijital mikroskop altında güvenilir biçimde tespit edilebildiğini göstermektedir.

4.2.2.3. TePe Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü

Aşağıda TePe marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan üç tükürük örneğinin dijital mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.20.)

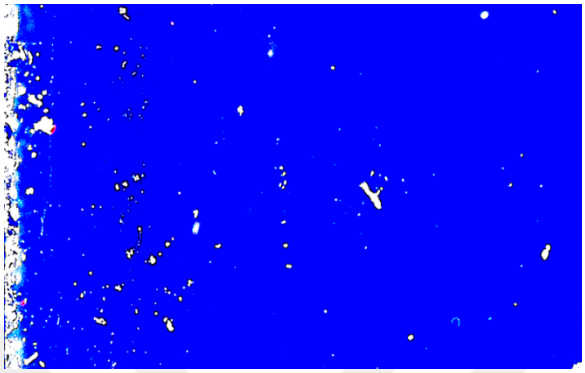
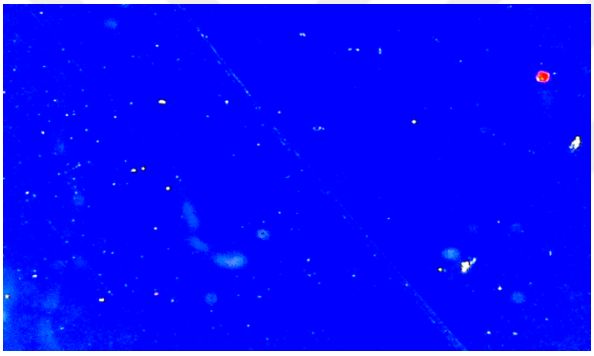
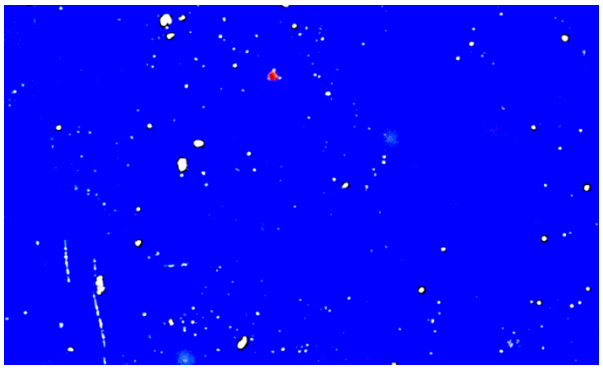
	4x büyütme altında TePe diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında TePe diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında TePe diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

Şekil 4.20. TePe diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü

TePe diş fırçası kullanan bireylerden elde edilen üç ayrı tükürük örneği dijital mikroskop altında incelendiğinde, tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret eden partiküller tespit edilmiştir. İlk örnekte büyük ve opak görünümlü partiküller ile kırmızı tonlu küçük bir floresan pozitif yapı gözlenmiştir. İkinci örnekte daha seyrek dağılım gösteren partiküller arasında belirgin bir kırmızı sinyal kaydedilmiş, bu yapı morfolojik özellikleriyle mikroplastik karakterini desteklemiştir. Üçüncü örnekte ise küçük partiküller arasında parlak kırmızı sinyal veren yapılar seçilmiş, ayrıca farklı yoğunluklarda opak partiküller gözlenmiştir. Genel olarak üç örnek bir arada değerlendirildiğinde, partikül yoğunluğunun örnekler arasında değişkenlik gösterdiği ancak tüm örneklerde floresan pozitiflik ile mikroplastik varlığının tekrarlandığı saptanmıştır. Bu bulgular, TePe fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik partiküllerin sistematik biçimde ortaya çıktığını göstermektedir.

4.2.2.4. Curaprox Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü

Aşağıda Curaprox marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan üç tükürük örneğinin dijital mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.21.)

	4x büyütme altında Curaprox diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Curaprox diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Curaprox diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

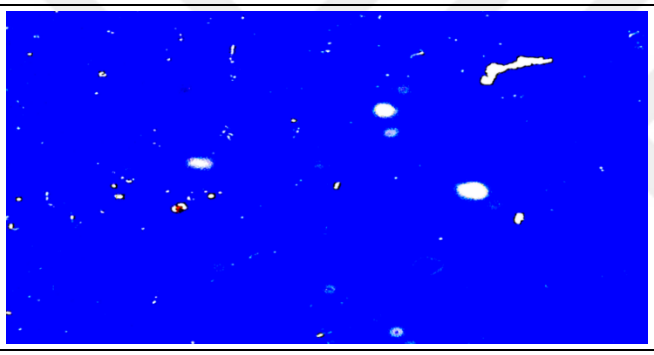
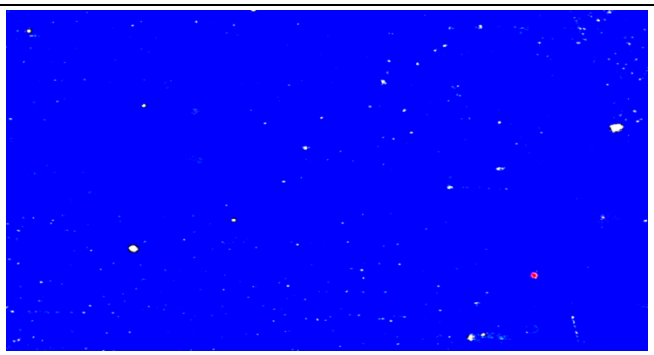
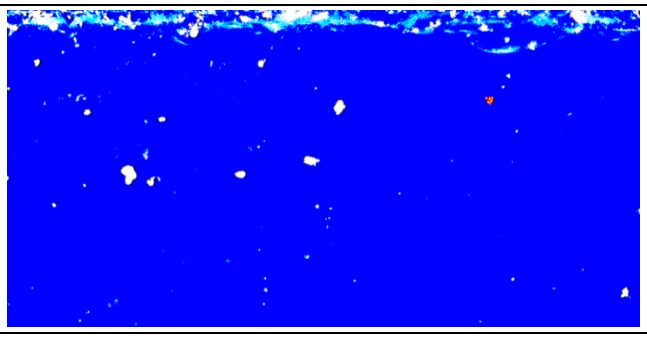
Şekil 4.21. Curaprox diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü

Curaprox diş fırçası kullanan bireylerden elde edilen üç ayrı tükürük örneğinin dijital mikroskop altında yapılan incelemesinde tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret eden bulgular kaydedilmiştir. İlk örnekte kenar bölgede yoğun şekilde kümelenmiş, opak ve düzensiz partiküller ve dokuyla iç içe olan kırmızı boyanan mikroplastik gözlenmiş, bunlar arasında lifsi yapı dikkat çekmiştir. İkinci örnekte daha

seyrek dağılım gösteren partiküller arasında kırmızı tonlu floresan pozitif bir yapı seçilmiş, bu sinyal mikroplastik karakterini desteklemiştir. Üçüncü örnekte ise çok sayıda küçük partikül ile kırmızı renkte parlak bir partikül saptanmıştır. Genel değerlendirmede, partikül yoğunluğunun örnekler arasında farklılık gösterdiği, morfolojilerin ise hem yuvarlak ve opak yapılar hem de lifsi fragmanları içerdiği belirlenmiştir. Tüm örneklerde floresan pozitif partiküllerin varlığı, Curaprox fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastiklerin saptanabildiğini ortaya koymuştur.

4.2.2.5. Rocs Diş Fırçası Kullanımı Sonrası Alınan Tükürük Örneklerinin Dijital Mikroskop Görüntüsü

Aşağıda Rocs marka diş fırçası kullanımı sonrası alınan üç tükürük örneğinin dijital mikroskop görüntüleri gösterilmiştir. (Şekil 4.22.)

	4x büyütme altında Rocs diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Rocs diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü
	4x büyütme altında Rocs diş fırçası kullanımından sonra alınan tükürük örneğinin Dijital mikroskop görüntüsü

Şekil 4.22. Rocs diş fırçası kullanımı sonrası alınan tükürük örneklerinin dijital mikroskop görüntüsü

Rocs diş fırçası kullanan bireylerden elde edilen üç ayrı tükürük örneğinin dijital mikroskop altında yapılan incelemesinde tümünde mikroplastik varlığına işaret eden bulgular saptanmıştır. İlk örnekte farklı boyutlarda çok sayıda partikül gözlenmiş, bunlar arasında opak, yuvarlak ve lifsi yapılar dikkat çekmiştir; ayrıca organik dokunun içindeki bir partikül kırmızı tonlu parlak sinyal vermiştir ki bu sinyal mikroplastik olduğunun göstergesidir. İkinci örnekte daha seyrek dağılım gösteren partiküller arasında küçük boyutlu yuvarlak yapılar ile kırmızı floresan pozitif bir partikül kaydedilmiştir. Üçüncü örnekte ise üst kenara yakın bölgelerde kümelenmiş, düzensiz ve opak partiküller izlenmiş, bunların arasında kırmızı renkte belirgin bir boyama mikroplastik karakterini desteklemiştir. Genel olarak üç örnek değerlendirildiğinde, partikül yoğunluğunun ve dağılım biçiminin örnekler arasında farklılık gösterdiği, ancak tüm örneklerde mikroplastik varlığının tutarlı şekilde gözlendiği belirlenmiştir. ***Bu bulgular, Rocs fırçası kullanımının ardından tükürükte yapılan analizler sonucunda mikroplastik partiküllerin ortaya çıktığını göstermektedir.***

Bu çalışmada her markaya ait üçer örnek temsili olarak bulgular kısmına dahil edilmiş olsa da toplamda beş farklı diş fırçası grubundan elde edilen yüz tükürük örneği dijital mikroskop altında ayrıntılı olarak değerlendirilmiştir. Yapılan tüm incelemelerde benzer morfolojik özellikler ve benzer yoğunlukta mikroplastik partiküller kaydedilmiştir. Partiküller, farklı örneklerde küçük yuvarlak yapılar, opak ve düzensiz formlar ile lifsi fragmanlar şeklinde çeşitlilik göstermiştir. Yoğunluk bireyler arasında değişkenlik gösterse de her örnekte mikroplastik varlığına işaret eden floresan pozitif partiküller saptanmıştır. Bu gözlemler, floresan mikroskobu ile elde edilen Texas Red filtresi bulgularıyla da uyumlu bulunmuş; floresan pozitiflik dijital mikroskop altında belirlenen morfolojik yapılarla örtüşerek mikroplastik varlığını güçlü biçimde doğrulamıştır. Böylece yalnızca seçilmiş örneklerde değil, incelenen tüm örneklerde tekrarlayıcı şekilde mikroplastiklerin varlığı ortaya konmuş ve diş fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik partikül salınımının olarak gerçekleştiği gösterilmiştir.

5. TARTIŞMA

Plastik üretimi ve kullanımı 20. yüzyıldan bu yana büyük ölçüde artmış, yüksek dayanıklılığı sayesinde günlük yaşamın ayrılmaz bir unsuru haline gelmiştir. Ancak plastik atıkların çevrede parçalanarak mikron ve nano boyutlara inmesiyle oluşan mikroplastikler artık sadece doğada değil, insan vücudunda da tespit edilmeye başlanmıştır (129). Mikroplastikler, üretim sırasında kullanılan plastikleştiriciler, kimyasal maddeler ve toksinleri yüzeylerinde taşıyabilir. Bu kimyasallar, mikroplastiklerin çevreye salındığında, su ekosistemlerinde birikmekte ve biyolojik organizmalar tarafından tüketilmektedir. Dışkı, kan, akciğer, karaciğer, mide, plasenta ve anne sütü gibi dokularda mikroplastik varlığı raporlanmıştır(129,158,159). Solunum yolu hastalığını sahip yirmi iki kişide yapılan bir çalışmada, mikroplastiklerin insan balgamından tespiti için Lazer kızılötesi görüntüleme spektrometresi ve Fourier dönüşümlü kızılötesi mikroskop yöntemleri kullanılmıştır. Boyutları 20-500 μm arasında değişen yirmi bir tip mikroplastiğin tanımlandığını ve balgam örneklerinde poliüretanın baskın olduğunu, bunu polyester ve klorlu polietilenin takip ettiğini bulmuşlardır (160) . İnsan otopsi örneklerinde yapılan bir çalışmada, yirmi altı kadavrada mide içeriğinden ortalama 9.4 ± 10.4 mikroplastik partikül elde edilmiş; bunun günlük yaklaşık 32.2 parçacık alımına karşılık geldiği hesaplanmıştır (161). Yapılan başka bir çalışmada, siroz hastalığı bulunan bireylerin karaciğer dokularında 4 ila 30 mikrometre arasında değişen altı farklı mikroplastik polimeri tespit edilmiştir. Bu polimerler arasında polistiren, polietilen tereftalat ve polipropilen gibi yaygın mikroplastik türleri yer almaktadır. Özellikle sirozlu karaciğer dokularında mikroplastik yoğunluğu, sağlıklı bireylerin karaciğer dokularına kıyasla anlamlı derecede daha yüksek bulunmasının yanı sıra gastrointestinal sistemde mikroplastik varlığı dikkat çekmektedir. Bu çalışmalarla aynı zamanda mikroplastiklerin vücutta birikerek çeşitli organlarda inflamasyonla hasara yol açabileceği, endokrin sistemi etkileyebileceği ve uzun vadede olumsuz sonuçlar yaratacağı düşünülmektedir (162).

Mikroplastik maruziyetinin beslenme ve hava yoluyla da olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Yapılan çalışmalardaki sonuçlar, mikroplastiklerin gastrointestinal sistemdeki varlığına dair kanıt sunarken, tükürük gibi ağız içi sıvı örneklerinin de değerlendirilmesi gerektiğini göstermektedir (161,163). Bu bağlamda,

ağız ve üst gastrointestinal sistemdeki maruziyetin araştırılması literatürde sınırlı kalmıştır. Özellikle tükürük gibi kolay erişilebilir biyolojik örneklerde mikroplastik varlığına dair yeterince çalışma bulunmamaktadır (129). Tükürük; enzimler, proteinler, elektrolitler, mukus ve hücresel bileşenler içeren kompleks bir biyolojik sıvıdır ve hem sistemik maruziyet göstergesi hem de lokal çevresel kontaminasyonu yansıtma potansiyeline sahiptir (164). Tükürükte mikroplastik varlığının belirlenmesi, yalnız maruziyetin tespiti açısından değil, ayrıca potansiyel toksikolojik ve immünolojik etkilerin anlaşılması bakımından da önemlidir. Literatürde mikroplastiklerin inflamasyon, oksidatif stres, hücre ölümüne neden olabilen mekanizmalar aracılığıyla biyolojik dokularda hasar oluşturabileceği gösterilmiştir. Özellikle 0.2–5 μm arası partiküller epitelyal bariyerleri geçebilme potansiyeline sahip olup sistemik dolaşıma katılabilirler (165,166). Yapılan çalışmalar mikroplastik partiküllerinin tükürük konsantrasyonu ile kan (plazma/serum) seviyeleri arasında önemli pozitif korelasyon göstermiştir. Bu nedenle, çeşitli organ ve vücut sistemleri hakkında bilgi veren tükürük, literatürde sıklıkla "vücudun aynası" olarak adlandırılmaktadır (158).

Günümüzde, kan ve idrar örneklerinin incelenmesi tıbbi bilimler, klinik, toksikolojik ve adli bilimler alanında altın standarttır (167). Mikroplastiklerin insan vücudunda çeşitli biyolojik örneklerde saptanmasına yönelik araştırmalar son yıllarda artış göstermektedir. Ancak kullanılan biyolojik sıvılar (kan ve idrar), analiz sürecinin zorluk derecesini doğrudan etkilemektedir. Örneğin kan ve idrar örnekleri, mikroplastiklerin biyodağılımını göstermesi açısından değerli olmakla birlikte, bu örneklerin incelenmesi oldukça zahmetli ve teknik açıdan güçtür. Kan plazması gibi kompleks biyolojik matrislerde partiküllerin ayrıştırılması ileri düzey hassasiyet gerektirirken, idrarda ise düşük partikül konsantrasyonları ve kontaminasyon riskleri araştırmayı zorlaştırmaktadır (168). Nitekim Pironti ve arkadaşlarının (169) insan idrarında mikroplastik tespitine ilişkin bulguları, metodolojik zorlukların altını çizerken; Lamoree ve arkadaşları (167) ise kanda mikroplastiklerin varlığını göstermek için yüksek duyarlılığa sahip tekniklerin kullanılmasının zorunluluğunu vurgulamıştır.

Buna karşın tükürük, analitik süreçler açısından çok daha avantajlı bir biyolojik sıvıdır. Girişimsel olmayan yöntemlerle kolayca elde edilebilmesi ve biyolojik matriks

açısından homojen yapısı sayesinde partikül analizi için uygun bir ortam sağlaması, bu sıvıyı özellikle çocuk popülasyonu dahil olmak üzere geniş kitlelerde kullanılabilir hale getirmektedir. Tanısal bir örnek olarak kan ve idrara göre çok sayıda belirgin avantajı vardır. İnsan tükürüğü, tıbbi personele enfeksiyon bulaştırma riski minimum olacak şekilde invaziv olmayan ve müdahalesiz bir şekilde toplanabilen, kolayca erişilebilir ve örnek toplarken özel bir ekipmana ihtiyaç duyulmadığı için bireyler tarafından kolay toplanabilen bir biyolojik sıvıdır (170). Basri ve arkadaşlarının sistematik derlemesinde (171) de vurgulandığı üzere, tükürük örnekleri mikroplastik maruziyetini değerlendirmede kolay uygulanabilirliği ve analiz sürecindeki pratikliği ile öne çıkan bir biyolojik sıvı olarak dikkat çekmektedir. Literatürde mikroplastik araştırmaları çoğunlukla kan, idrar, dışkı veya dokular üzerinde yürütülmüşken, tükürük örneklerinin bu amaçla kullanılması oldukça sınırlıdır (131,135,167,169) Bu çalışma mikroplastik maruziyetinin değerlendirilmesinde; özellikle tükürüğün, ağız hijyeni ürünleriyle doğrudan temas eden ilk biyolojik sıvı olması, örneklerin hızlı ve kolay toplanabilmesi nedeniyle, plastik parçacıklarının ağız ortamına taşınımını ve birikimini analiz için tasarlanmış ve tükürük örneklerinin tercih edilmesi metodolojik kolaylık sağlamış, aynı zamanda çalışmanın özgünlüğünü ve bilimsel değerini de artırmıştır.

Bu çalışma mikroplastik maruziyetinin çocuklarda tükürük örnekleri üzerinden incelenmesi amacıyla deneysel olarak planlanmıştır. Deneysel tasarım, bağımsız değişkenlerin (örneğin, mikroplastik maruziyeti) bağımlı değişkenler (örneğin, tükürük örneklerinde mikroplastik yoğunluğu) üzerindeki etkilerini nedensel bir ilişki çerçevesinde değerlendirmeye olanak tanır ve böylece elde edilen sonuçların güvenilirliğini artırır. Deneysel tasarımın en önemli unsurlarından biri, katılımcılara farklı markalardan (Oral-B, TePe, Splat, Curaprox, Rocs) diş fırçalarının dağıtılması ve belirlenen bir aylık kullanım süresinin ardından tükürük örneklerinin toplanmasıdır. Böylece, bireylerin günlük yaşamda maruz kaldığı koşullar kontrollü bir şekilde modellenmiş ve mikroplastiklerin biyolojik örneklere geçişi doğrudan gözlemlenebilmiştir.

Ön çalışma grubunda, herhangi bir fırça kullanımına maruz kalmamış tükürük örnekleri farklı koşullarda (tek başına, RIPA ile ve mikroplastik eklenerek) analiz edilerek deney grubuna sağlam bir karşılaştırma zemini oluşturulmuştur. Deney

grubunda ise bir aylık diş fırçası kullanımı sonrasında elde edilen tükürük örnekleri, mikroplastik varlığı açısından değerlendirilmiştir. Katılımcılara randomize bir şekilde diş fırçası dağıtılması ve ardından toplanan tükürük örneklerinin değerlendirilmesi; araştırmanın biyolojik süreçlerde yapılmasını sağlar. Bu aşama, diş fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik varlığını deneysel olarak göstermeye imkan tanımıştır. Çalışmada laboratuvar aşamasında numune hazırlama ve kullanılan floresan mikroskopi ve dijital mikroskop gibi çok yönlü analiz yöntemleri sayesinde mikroplastiklerin varlığı, dağılımı ve morfolojisi detaylı ve kontrollü şekilde değerlendirilebilmiştir. Böylelikle, diş fırçası kaynaklı mikroplastiklerin biyolojik matrikslerde saptanabileceği deneysel olarak gösterilmiş ve literatürde sınırlı olan bu konudaki verilere özgün katkılar sunulmuştur. Bu yöntemlerin birlikte kullanılması, elde edilen bulguların güvenilirliğini artırmış ve farklı açılardan doğrulanmasına olanak sağlamıştır. Böylelikle, diş fırçası kaynaklı mikroplastiklerin biyolojik matrikslerde saptanabileceği ilk kez deneysel düzeyde ortaya konulmuştur.

Çalışmaya 7–14 yaş aralığındaki katılımcıların dahil edilmesinin temel gerekçesi, bu yaş grubunda diş fırçalama alışkanlıklarının ve motor becerilerinin belirgin şekilde gelişmiş olmasıdır. Çocuklarda motor gelişim düzeyi, diş fırçalama etkinliğinin doğrudan belirleyicisi olup, yapılan çalışmalarda yaş ilerledikçe plak giderme başarısının anlamlı biçimde arttığı bildirilmiştir. Örneğin, 6–12 yaş aralığında gerçekleştirilen bir araştırmada, çocukların diş fırçalama becerileri yaşla birlikte artış göstermiş ve plak uzaklaştırma etkinliği 6 yaşında %57 iken 12 yaşında %82'ye ulaşmıştır (172). Benzer şekilde, motor gelişimle diş fırçalama etkinliği arasındaki ilişkinin incelendiği bir başka çalışmada, 6 yaş ve üzerindeki çocukların oral hijyen skorlarında anlamlı iyileşme sağladıkları, ayrıca ayakkabı bağlama veya yazı yazma gibi görsel-motor becerilerin gelişimiyle daha etkili fırçalama arasında yakın bir bağlantı olduğu gösterilmiştir (173). Bu bulgular, çocukların 7–14 yaş döneminde hem motor becerilerinin hem de ağız hijyeni alışkanlıklarının gelişmesi nedeniyle araştırma kapsamında ideal bir grup oluşturduğunu ve mikroplastik maruziyetinin bu yaş grubunda daha güvenilir biçimde değerlendirilebileceğini ortaya koymaktadır.

Diş fırçaları, günlük ağız hijyeninin sağlanmasında en yaygın kullanılan araçlardan biridir. Ancak, son yıllarda diş fırçalarının çevresel etkileri üzerine yapılan araştırmalar, bu ürünlerin mikroplastik salınımı konusunu gündeme getirmiştir.

Plastikler, diş fırçalarının başlıkları, kılları ve arayüz fırçalarında yaygın olarak kullanılmaktadır (174) . Mikroplastikler, diş fırçalama sırasında ağız yoluyla vücuda alınabilir ve bu maddelerin insan sağlığı üzerindeki uzun vadeli etkileri tam olarak bilinmemektedir. Diş fırçalarının üretimi, kullanımı ve atılması sırasında çevreye salınan mikroplastikler hem ekosistem hem de insan sağlığı üzerinde potansiyel riskler yaratmaktadır. Diş fırçalarının başlıklarında kullanılan naylon kıllar, en yaygın mikroplastik kaynaklarından biridir. Bu kıllar, fırçalamanın etkinliğini arttırmak için özel olarak tasarlanmış sentetik polimerlerden yapılır (129). Diş fırçalarının ömrü genellikle 2-3 ay arasında değişir, ancak bu süre sonunda fırçalar atılır ve mikroplastik içeriği çevreye salınır. Diş fırçalarının biyolojik olarak parçalanmayan sentetik malzemelerden yapılmış olması, atık yönetimi ve çevresel kirlenme açısından sorun teşkil edebilir çünkü doğada çözünmezler. Yapılan çalışmalar, diş fırçalarının ve bunlardaki plastik kılların, okyanuslar ve diğer sucul ekosistemler için önemli bir mikroplastik kaynağı olduğunu göstermektedir. Bu küçük plastik parçacıklarının sucul yaşamı tehdit ettiği, balıklar ve diğer deniz organizmalarının bu mikroplastikleri yuttuğu ve bu durumun besin zincirine kadar yayıldığı tespit edilmiştir (129,135,168,175). Örneğin Çin'de yapılan bir çalışmada, diş fırçalarının kullanımı sırasında yılda yaklaşık 2.33 milyon mikroplastik partikülünün salındığı belirtilmiştir. Bir diğer çalışmada ise, diş fırçalarının kıllarından salınan mikroplastiklerin sayısının 30 ile 120 arasında değiştiği ve bu partiküllerin çoğunun 0.1 mm'den küçük olduğu, yani nanoplastik boyutunda olduğu ifade edilmiştir. Ayrıca, diş fırçalarının üretiminde kullanılan plastiklerin türü ve kılların sertliği gibi faktörlerin mikroplastik salınımını etkileyebileceği vurgulanmıştır (176).

Bu çalışmanın özgünlüğü ve bilimsel değeri, farklı özelliklere sahip beş diş fırçası markasının (Oral-B, Rocs, Splat, Curaprox ve TePe) bir arada kullanılmasıyla artmaktadır. Literatürde diş fırçalarından mikroplastik salınımını inceleyen çalışmalar genellikle tek marka veya sınırlı sayıda fırçayla sınırlı kalmaktadır (125, 192, 196). Çalışmada kullanılan farklı diş fırçaları, mikroplastik salınımının çeşitliliğini değerlendirmeye olanak tanımaktadır. Farklı markaların ve modellerin kullanılması, çalışma bulgularının geçerliliğini ve güvenilirliğini artırır, elde edilen verilerin tek bir ürün için değil farklı diş fırçası markalarını da inceleme fırsatı ve ayrıca diş fırçalarının mikroplastik salınımı konusunda daha geniş bir perspektif sunar.

Diş fırçalarının yanı sıra, diş macunları ve ağız gargaraları gibi ağız bakım ürünlerinde kullanılan plastikler ve mikroplastikler, diş ve diş etleri üzerinde tahrişe yol açabilir. Diş fırçalarının kıllarında ve bazı ağız bakım ürünlerinde bulunan plastikler, zamanla ağız içi dokularda birikebilir ve bu birikintiler, diş etlerinde iltihaplanmaya ve periodontal hastalıklara neden olabilir. Yapılan bir çalışmada, ağız bakım ürünlerinde (diş tozu, diş fırçaları, ağız gargaralar, diş ipi, diş macunu ve ağız spreyleri) mikroplastik salınımı Raman spektroskopi ile incelenmiş ve mikroplastik parçacık sayısı analizi yapılmıştır (177). Hindistan'da yürütülen başka bir çalışmada ticari olarak satılan on farklı diş macunundan mikroplastikler Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopik (FTIR) analizlerle karakterize edilmiştir. Sonuçlar aralığı %32,7 ila %83,2 olan yaygın görülen mikroplastik türleri olduğunu ortaya koymuştur. Bu çalışmada kaydedilen mikroplastiklerin minimum boyutu 3,5 μm iken maksimum boyutu 400 μm'yi aşmıştır. Mevcut çalışmada, diş macunu örneklerinde selofan, polipropilen, polivinil klorür ve poliamid olmak üzere dört ana polimer türü kaydedilmiştir. (175).

Bu çalışmada deney grubuna ait tükürük örnekleri alınmadan önce katılımcılara diş macunu kullanmadan dişlerini fırçalatmak tercih edilmiştir. Bunun nedeni, literatürde pek çok diş macununun içeriğinde mikroplastik partiküllerin varlığının gösterilmiş olmasıdır (165,175,178,179). Bu nedenle, çalışmamızda macunsuz fırçalatma yöntemi uygulanarak olası mikroplastik kontaminasyonu en aza indirgenmiş, yalnızca fırça materyalinden kaynaklanabilecek salınımların değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Böylece elde edilen bulguların metodolojik doğruluğu artırılmış ve yorumlamada olası yanılgıların önüne geçilmiştir.

Bu çalışmada olası dış kontaminasyon kaynaklarını en aza indirebilmek amacıyla, deney grubunda yer alan katılımcılara tükürük örneklemesinden önce paketli gıdaların tüketimi kısıtlanmıştır. Literatürde, paketli ve işlenmiş gıdaların, üretim ve depolama süreçlerinde kullanılan plastik ambalaj materyallerinden mikroplastik kontaminasyonuna uğrayabileceği gösterilmiştir (180–182). Bu nedenle, çalışmamızda paketli gıda tüketiminin sınırlandırılması, tükürükte gözlenen mikroplastiklerin yalnızca diş fırçalarından kaynaklanıp kaynaklanmadığını değerlendirmede metodolojik bir güç sağlamıştır. Böylelikle, analiz edilen numunelerde gözlenen partiküllerin, diyetle alınabilecek ambalaj kökenli plastiklerden

bağımsız olarak yorumlanabilmesine olanak tanınmıştır. Bu çalışmada olası kontaminasyon kaynaklarını en aza indirebilmek amacıyla yalnızca diyet ve hijyen alışkanlıkları değil, aynı zamanda laboratuvar dışında maruziyeti etkileyebilecek çevresel faktörler de göz önünde bulundurulmuştur. Bu kapsamda katılımcılara, deney süresince tek kullanımlık plastik ürünlerin (örneğin plastik bardak, pipet, tabak ve çatal gibi) kullanımını kısıtlamaları önerilmiştir. Literatürde, tek kullanımlık plastiklerin günlük yaşamda önemli bir mikroplastik kaynağı oluşturduğu ve sıcaklık, sürtünme veya sıvı temasına bağlı olarak kolayca parçalanarak insan vücuduna geçebildiği gösterilmiştir. Özellikle yiyecek ve içeceklerle doğrudan temas eden bu ürünlerin, oral yolla mikroplastik maruziyetini artırabileceği vurgulanmaktadır (180,183).

Çalışmamızda metodolojik güvenilirliği artırmak amacıyla yalnızca beslenme ve hijyen alışkanlıkları değil, aynı zamanda çevresel kontaminasyon kaynakları da titizlikle kontrol edilmiştir. Literatürde, mikroplastiklerin yalnızca gıda ve içecekler yoluyla değil, aynı zamanda tekstil ürünlerinden, kişisel aksesuarlardan ve hava yoluyla da insan vücuduna geçebildiği bildirilmiştir. Özellikle sentetik tekstil liflerinin kıyafetlerden koparak ortama saçılması, tükürük veya solunum yoluyla maruziyeti artırabilecek potansiyel bir risk faktörüdür. Benzer şekilde, ortamdaki havadan kaynaklanan mikroplastik partiküller de numunelerin kontamine olmasına neden olabilir (183–185). Bu nedenle çalışmada, katılımcıların deney süresince sentetik tekstil ağırlıklı kıyafet ve aksesuar kullanımını sınırlandırmaları sağlanmış, ayrıca numune toplama işlemleri mümkün olduğunca kontrollü, kapalı ve eşit koşullar altında aynı ortamda gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşım, elde edilen tükürük örneklerindeki mikroplastiklerin olası çevresel veya diyet kaynaklı kontaminasyonunu en aza indirerek, diş fırçalarıyla ilişkili olma ihtimalini güçlendirmiştir. Böylelikle, çalışmamızın metodolojik güvenilirliği artırılmıştır.

Bu çalışmanın analiz aşamasında kullanılan laboratuvar tekniklerinde; numune hazırlanırken ve elde edilen bulgular değerlendirilirken; deneysel aşamalarda laboratuvar ortamında kullanılan ve plastik içerikli olan eppendorf tüpleri, pipet uçları, falkon tüpler gibi sarf malzemelerin de potansiyel bir mikroplastik kaynağı olabileceği göz önünde bulundurulmuştur. Literatürde, laboratuvar plastik sarf malzemelerinin mikroplastik kontaminasyonu açısından önemli bir risk oluşturabileceği ve özellikle biyolojik numune analizlerinde sonuçların yorumlanmasında dikkate alınması

gerektiği belirtilmiştir (186). Dolayısıyla, bu çalışmada tükürük numunelerinden elde edilen mikroplastik bulgularının yalnızca diş fırçası kullanımına değil, aynı zamanda laboratuvar ortamındaki olası plastik kaynaklı kontaminasyonlara da bağlı olabileceği ihtimali göz ardı edilmemelidir. Bu çalışmada kullanılan sarf malzemelerin büyük bir kısmı plastik bazlı olmasına rağmen, literatürde mikroplastik analizlerinde plastik kontaminasyonunun en aza indirgenmesi için cam esaslı laboratuvar ekipmanlarının (örneğin borosilikat cam santrifüj tüpleri ve cam pipetler) önerildiği bildirilmektedir. Cam malzemeler, yüksek ısıl ve kimyasal dirençleri, otoklavlama ve yeniden kullanım imkanı sayesinde mikroplastik araştırmalarında güvenilir alternatiflerdir ve plastik kaynaklı çapraz kontaminasyon riskini belirgin şekilde azaltmaktadır. Bu bağlamda, gelecekteki çalışmalarda cam bazlı malzemelerin tercih edilmesi, laboratuvar kaynaklı kontaminasyon ihtimalini daha da düşürecektir. Bununla birlikte, yapılan çalışmalarda gözlemlenen mikroplastiklerin yalnızca sarf malzeme kullanımına bağlanamayacağı, çünkü benzer bulguların daha önce farklı metodolojiler ve cam temelli ekipmanlarla yürütülen çalışmalarda da rapor edildiği gözlenmiştir (186,187).

Sonuç olarak, cam sarf malzemelerin kullanımı mikroplastik kontaminasyonunu azaltarak çalışmalarda metodolojik güvenilirliği güçlendirse de maliyet, erişilebilirlik ve pratiklik açısından bazı sınırlılıkları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle gelecekteki araştırmalarda cam ve plastik malzemelerin birlikte değerlendirildiği, kontaminasyon riskinin minimize edildiği hibrit yaklaşımlar tercih edilmesi uygun görünmektedir (186,188). Bu durum, çalışmamızın metodolojik sınırlılıklarından biri olarak değerlendirilmekte ve gelecekte yapılacak çalışmalarda cam bazlı malzemelerin tercih edilmesinin kontaminasyon riskini azaltabileceği düşünülmektedir. Ancak, çalışmanın ön çalışma gruplarında mikroplastik partiküllerinin gözlemlenmemesi, elde edilen mikroplastiklerin yalnızca laboratuvar kaynaklı olamayacağını, aksine diş fırçası kullanımı sonrasında ortaya çıktığını göstermektedir. Dolayısıyla, çalışmada gözlemlenen mikroplastik varlığı, kullanılan plastik sarf malzemelerle açıklanamayacağı kanaatindeyiz.

Bu çalışmada ön çalışma grubunda elde edilen örneklerin sayısının sınırlı olması da dikkate değer bir husustur. Çalışma kapsamında yalnızca on ön çalışma tükürük örneği ve deney grubunda da yüz örnek değerlendirilmiş olup, bu sayı metodolojik açıdan ilk değerlendirme için yeterli görülse de daha geniş bir örneklem

grubuyla yapılan analizlerde farklı sonuçların elde edilmesi olasıdır. Özellikle mikroplastik kontaminasyonunun bireyler arası farklılıklar, çevresel maruziyet koşulları ve yaşam tarzı faktörleri ile değişkenlik gösterebildiği dikkate alındığında, ön çalışma grubunun daha büyük bir örneklemle desteklenmesi, mikroplastik varlığının daha kesin bir şekilde ortaya konmasına katkı sağlayabilirdi. Dolayısıyla ön çalışma grubunda mikroplastik gözlenmemiş olması, tamamen yokluğuna işaret etmekten ziyade sınırlı örneklem büyüklüğünün bir sonucu olarak da değerlendirilebilir.

Mikroplastik tespit ve ayrıştırma yöntemleri son yıllarda büyük ilerlemeler kaydetmiş olsa da zorluklar hala mevcuttur. İlk olarak, mikroplastiklerin boyutları ve türleri arasındaki çeşitlilik, ayrıştırma işlemlerini daha karmaşık hale getirmektedir. Ayrıca, çevresel ve biyolojik örneklerdeki mikroplastiklerin organik ve inorganik partiküllerle birlikte olması sebebiyle heterojen yapısı, bu materyallerin izole edilmesi sırasında doğruluğu etkileyebilir. Çözünürlük, yoğunluk ve biyolojik aktiviteler gibi faktörler, mikroplastiklerin ayrıştırılmasında zorluk yaratmaktadır. Bu nedenle, mikroplastiklerin doğru tespiti ve analizi için birden fazla yöntemin bir arada kullanılması önerilmektedir (129,153,158,165).

Bu çalışmada mikroplastik tespit yöntemlerinden, mikroskopik yöntemler (Floresan mikroskobu, Dijital mikroskop) ve etiketleme yöntemi olarak da Nile Red ile boyama tercih edilirken; mikroplastik ayrıştırma yöntemlerinden, fiziksel yöntemlerden santrifüj ve kimyasal yöntemlerden, bazik bir çözelti olan RIPA ile organik dokuların çözülmesi yöntemi tercih edilmiştir.

Bu çalışmada tükürük örnekleri, analiz öncesinde santrifüj işlemine tabi tutulmuştur. Çalışmamızda özellikle pellet fraksiyonu üzerinde yoğunlaşılmıştır, çünkü mikroplastik partiküller daha yüksek yoğunluk özellikleri nedeniyle bu bölümde toplanmaktadır. Pellet ile çalışmak, floresan ve dijital mikroskop analizlerinde partiküllerin daha net ve güvenilir şekilde görüntülenmesine olanak tanımıştır (171). Literatürde de tükürük analizlerinde santrifüjün, örnek saflığını artırarak hedef bileşenlerin izolasyonunda önemli bir adım olduğu vurgulanmaktadır (189,190). Bu bağlamda, çalışmamızda kullanılan santrifüj ve pellet odaklı yaklaşım, mikroplastiklerin biyolojik örneklerdeki varlığını daha hassas biçimde ortaya koyma açısından metodolojik avantaj sağlamıştır. Yapılan bir çalışmada, ortodontik şeffaf

plakların mekanik sürtünme nedeniyle mikroplastik salınımı incelenmiş, şeffaf plaklar yapay tükürük içinde yedi gün boyunca mekanik sürtünmeye tabi tutulmuştur. Ardından, salınan mikroplastikler santrifüj yöntemiyle ayrılmış ve Raman spektroskopisi ile kimyasal bileşimi, SEM ile ise morfolojik özellikleri analiz edilmiştir. Sonuçlar, mekanik sürtünmenin şeffaf plaklardan mikroplastik salınımını artırdığını ve bu partiküllerin boyutlarının 5–20 μm arasında değiştiğini göstermiştir (189). Yine başka bir çalışmada, katılımcıların çiğnediği sakızlardan salınan mikroplastiklerin tükürük örneklerinde incelenmesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada, katılımcılar farklı sakızları çiğnedikten sonra tükürük örnekleri toplanmış ve bu örnekler santrifüj, filtreleme ve kimyasal sindirim işlemlerine tabi tutulmuştur. Sonrasında, örnekler mikroskop altında incelenerek mikroplastik partiküllerinin varlığı ve miktarı belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, her bir sakızın ortalama yüz mikroplastik partikülünü saldığı ve bazı sakızların altı yüze kadar mikroplastik partikülü salabildiğini göstermiştir. Bu çalışma, tükürük örneklerinde mikroplastiklerin varlığını ve bu partiküllerin analizinde santrifüj yönteminin etkinliğini ortaya koymaktadır (191).

Literatürde diş fırçalarından salınan mikroplastiklerin değerlendirilmesinde çoğunlukla Raman spektroskopisi ve FTIR analizleri gibi spektroskopik yöntemlerin tercih edildiği ve bu çalışmalarda da diş fırçalarının incelendiği görülmektedir (192,193). Araştırmacılar, Raman görüntüleme teknolojisini kullanarak mikroplastikleri tanımlamış ve hiper-spektrum analizine dayanan algoritmalarla görüntüleme sağlamışlardır. Bu sayede, küçük plastik parçaları ve partikülleri tespit etmede yüksek hassasiyet elde edilmiş; ışınlı analizlerle tükürük ortamında potansiyel olarak solunan veya yutulan mikroplastikler görüntülenmiştir. Raman görüntüleme analizine göre, diş fırçalarından günde binlerce mikroplastik parçacığı salınabildiğine dair güçlü kanıtlar elde edilmiştir. Benzer şekilde, başka çalışmada diş fırçası ve diğer ağız bakım ürünlerinden elde edilen partiküller mikroskopla ön incelemeden geçirildikten sonra FTIR ile doğrulanmıştır. Bu yöntemler, polimer türlerinin tanımlanmasında yüksek doğruluk sağlamasına rağmen, partiküllerin morfolojik özelliklerini ve kullanım sırasında meydana gelen yapısal değişikliklerini ayrıntılı biçimde ortaya koymakta sınırlı kalabilmektedir (118,141,192).

Diş fırçalarının kıllarındaki morfolojik değişiklikler üzerine yapılan çalışmalarda genellikle stereo mikroskop gibi düşük büyütme gücüne sahip optik sistemler kullanılmıştır (194). Hindistan'da yapılan bir çalışmada satılan ağız bakım ürünlerinde, özellikle diş fırçalarındaki mikroplastik partiküller, mikroskopik incelemeyle ve FTIR yöntemiyle tanımlanmıştır. Ancak bu mikroskopik inceleme daha çok örnek hazırlama sonrası partiküllerin sınıflandırılmasına yönelik olup, tükürük veya fırça sırasında meydana gelen salınımların görüntülenmesini sağlamamaktadır. Bugüne kadar yapılmış araştırmalar genellikle diş fırçası kıllarının yapısal özelliklerini incelemeye odaklanmış, ancak insan tükürüğünden diş fırçaları aracılığıyla mikroplastik salınımını doğrudan floresan ve dijital mikroskop ile görsel olarak belgeleyen spesifik bir çalışma bulunmamaktadır. Mevcut çalışmalar, genellikle farklı diş fırçası kıl uçlarının (doğal ya da naylon) SEM ile inceleyerek kullanım öncesi ve sonrası yüzey morfolojilerinin nasıl değiştiğini açıklamıştır (195,196).

İnsan tükürüğünde mikroplastiklerin varlığını incelemek amacıyla SEM kullanan bazı çalışmalar bulunmaktadır. Bu yöntem, mikroplastiklerin morfolojik özelliklerini detaylı bir şekilde gözlemlemek için etkili bir tekniktir. Yapılan bir çalışmada, ortodontik tedavi gören bireylerin kullandıkları şeffaf plakların tükürük örneklerinde mikroplastiklerin varlığı SEM kullanılarak incelenmiştir. Mikroplastikler, lifler ve filamentler düzensiz şekillerde tespit edilmiştir. Elemental analizler, mikroplastiklerin bileşenlerini ve potansiyel sağlık etkilerin anlaşılmasında yardımcı olmuştur (189). Başka bir çalışmada, insan tükürüğünde mikroplastiklerin varlığı SEM, FTIR ve Raman spektroskopisi gibi yöntemlerle incelenmiştir. Çalışma, tükürükte farklı türde mikroplastiklerin bulunduğunu ve bunların potansiyel sağlık risklerini ortaya koymuştur (131,163,197). SEM**,** mikroplastiklerin yüzey morfolojisini yüksek çözünürlükle gözlemleme imkanı sunar ve mikroplastiklerin şekil, büyüklük ve yüzey özelliklerini detaylı bir şekilde incelemek için önemlidir. Ancak, SEM'in bazı sınırlamaları da bulunmaktadır. Tükürük gibi biyolojik örneklerin SEM için uygun hale getirilmesi, örneğin kurutulması ve kaplama işlemleri, mikroplastiklerin özelliklerini değiştirebilir. Bunun yanı sıra SEM, mikroplastiklerin sayısal analizini yapmak için sınırlı bir kapasiteye sahiptir. FTIR veya Raman spektroskopisi ile desteklenmesi gerekebilir. Bu şekilde, mikroplastiklerin tükürükteki

varlığı ve potansiyel sağlık etkileri daha kapsamlı bir şekilde değerlendirilebilir (195,196).

Floresan mikroskopisi, mikroplastiklerin tespiti için hızlı ve etkili bir yöntem sunar. Nile Red gibi floresan boyalar, mikroplastiklerin belirginleşmesini sağlar. Ancak, bu yöntem bazı sınırlamalara sahiptir. Örneğin, organik maddelerin interferansı nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar elde edilebilir. Bu nedenle, doğru sonuçlar elde etmek için örneklerin dikkatlice hazırlanması ve uygun ön çalışma gruplarının kullanılması önemlidir (198–200). Bir çalışmada, diş fırçalama aktivitesinin, sıcaklık ve pH'nin plastik içerikli akrilik ve kompozitlerin mikroplastik salınımı üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, mikroplastik partiküller Nile Red floresan boyası ile boyanmış ve floresan mikroskopisi kullanılarak görselleştirilmiştir. Elde edilen görüntüler, mikroplastiklerin boyanabilirliğini ve floresan mikroskopisi ile tespit edilebilirliğini göstermiştir (198). İnsan tükürüğünü inceleyen bir çalışmada, çiğneme sırasında sakızın tükürüğe mikroplastik salınımı incelenmiştir. Bu çalışmada, mikroplastiklerin tespiti için Nile Red floresan boyası kullanılmış ve floresan mikroskopisi ile görselleştirilmiştir. Sonuçlar, çiğneme sırasında sakızın tükürüğe yüzlerce ila binlerce mikroplastik saldığına işaret etmektedir (191). Bir diğer çalışmada, floresan mikroskopisi ve floresan boyaların mikroplastiklerin tespitindeki etkinliği araştırılmış ve çalışmada floresan mikroskopisi kullanılarak mikroplastiklerin tespiti için uygun yöntemler tartışılmıştır (199).

Bu çalışmada tükürük örneklerinin içerindeki organik dokuların parçalanarak çözünmesi ve boyanın sadece mikroplastik partiküllerine bağlanabilmesi için RIPA çözeltisi kullanılmıştır. RIPA çözeltisi, hücrelerin ve dokuların lizisi için kullanılan güçlü bir tampon çözeltisidir. İçeriğinde sodyum dodesil sülfat (SDS**)** ve sodyum deoksikolat gibi iyonik deterjanlar bulunur ve örneklerdeki organik bileşenlerin uzaklaştırılmasında yüksek verimlilik sunmaktadır. Bu özellik, özellikle Western Blot ve benzeri protein analizlerinde RIPA'nın yaygın olarak tercih edilmesinin temel nedenlerinden biridir. Ayrıca literatürde de vurgulandığı üzere, RIPA tamponu NP-40 veya Triton X-100 gibi daha hafif deterjanlara kıyasla daha güçlü bir lizis kapasitesine sahiptir ve bu durum analizlerde sinyal-gürültü oranını iyileştirmektedir (201). Dolayısıyla, bu çalışmada RIPA'nın kullanımı, floresan mikroskopik incelemelerde

mikroplastiklerin daha güvenilir ve özgün bir şekilde görüntülenmesine olanak tanımıştır.

Floresan mikroskobunda mikroplastiklerin doğru şekilde görüntü elde edilmesinde yüksek özgüllük ve hassasiyet sunan bir etiketleme yöntemi olan Nile Red boyası kullanılmıştır. Bu çalışmada Nile Red boyasının seçiminde temel gerekçe, tükürük içindeki mikroplastik parçacıklarını lipofilik özellikleri sayesinde özgün olarak boyayabilme potansiyelidir. Nile Red, mikroplastik gibi ortamdaki hidrofobik partiküllerin tespiti için seçici bir floresan sinyal sağlar. Tükürük içindeki inorganik moleküller Nile Red ile boyanmaz, boyanmadığından dolayı floresan mikroskobu altında inorganik moleküller kaynaklı herhangi bir ışıma olmaktadır (4,200,202).

Lipofilik (yağ tutucu) ve solvatokromik (çözücü duyarlı) özellikleri sayesinde bu boya, mikroplastikleri çevreleyen organik ve polar bileşimlerden ayırt edecek şekilde etkili floresans göstermektedir. Bu nedenle mikroskopik analizlerde, özellikle mikroplastik parçacıkların hızlı ve net görselleştirilmesinde tercih edilmiştir. Nile Red, plastik partiküllerin lipofilik doğasıyla etkileşir ve kontaminant organik materyallerle karşılaştırıldığında daha özgün bir sinyal verir; bu da analizlerde yanlış pozitifliğin azaltılmasına yardımcı olur. Ancak, bu yöntemde bazı zorluklar da bulunmaktadır. Örneğin, bazı doğal polimerler de güçlü floresan sinyalleri gösterebilir, bu da yanlış pozitif sonuçlara yol açabilir. Ayrıca, bazı polimer türleri (polivinil klorür gibi) zayıf floresan sinyalleri gösterdiğinden, bu türlerin tespiti daha zor olabilir (200,203).

Ayrıca, Nile Red kullanılarak gerçekleştirilen floresan mikroskop teknikleri, mikroplastiklerin hem nitelendirilmesi hem de kimyasal tanımlamasına yönelik çalışmalar yapılmasına olanak tanımıştır. Yayımlanan bir çalışmada, Nile Red ile boyanmış mikroplastikler, otomatik veri analizi ve makine öğrenimi (Plastik Algılama ve Polimer Tanımlama Modeli) kombinasyonuyla yüksek doğrulukla (yaklaşık %95,8) tanımlanmıştır (204).

Bu bağlamda, tükürük örneklerindeki mikroplastik tespiti için Nile Red'in seçimi, bir yandan lipofilik boyanın sağladığı seçicilik ve floresan sinyal kalitesiyle güvenilir görüntü elde edilmesini sağlarken; diğer yandan yöntemsel verimlilik ve analiz doğruluğu bağlamında literatürde onaylı bir temele dayandırılabilir.

İnsan tükürüğünde mikroplastiklerin varlığını incelemek amacıyla dijital mikroskopi kullanımı özellikle düşük maliyetli, hızlı görüntüleme, dijital kayıt imkanı ve taşınabilirliği kolay olmasıyla öne çıkar. Ancak, dijital mikroskopların çözünürlük kapasitesi genellikle sınırlıdır ve bu nedenle mikroplastiklerin tespiti için daha yüksek çözünürlüklü teknikler tercih edilmektedir. Yine de dijital mikroskopi mikroplastiklerin varlığını göstermek için yeterli olabileceğini belirten çalışmalar vardır (205).

Yapılan bir çalışmada, mikroplastiklerin sindirim sistemi üzerindeki etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, mikroplastiklerin yüzey özellikleri ve morfolojisi, dijital mikroskopi kullanılarak analiz edilmiştir. Sonuçlar, mikroplastiklerin yüzey özelliklerinde değişiklikler olduğunu ve bu değişikliklerin metal iyonlarının adsorpsiyon kapasitesini etkileyebileceğini göstermektedir (206).

Bu bağlamda, mevcut çalışmada floresan mikroskopi kullanılarak mikroplastiklerin biyolojik örnekler içerisindeki varlığı doğrudan görselleştirilmiş, dijital mikroskopi ile partiküllerin genel morfolojisi kaydedilip incelenmiştir. Literatürde farklı diş fırçaları kullanımına bağlı olarak görülen mikroplastik maruziyeti konusunda bu iki tekniğin birlikte kullanıldığı başka bir çalışmaya rastlanmamış olması, araştırmanın bilimsel katkısını daha da güçlendirmektedir.

Son yıllarda plastiklerin çevresel etkilerini azaltmak için diş hekimliğinde kullanılan malzemelerin alternatiflerine yönelik çalışmalar da devam etmektedir. Çevresel sürdürülebilirlik ve mikroplastik maruziyetine dair bulgular doğrultusunda bitki bazlı (bambu ve buğday nişastası) saplara sahip diş fırçaları, biyolojik olarak bozunabilen veya doğadan elde edilen kıllara sahip (misvak) alternatif diş fırçaları geliştirilmiştir (207–209). Biyolojik olarak bozunabilen diş fırçaları, dental materyaller ve diğer ağız bakım ürünleri (örneğin ipek diş ipi, bitkisel özlü gargaralar gibi) plastik kirliliğini azaltmaya yönelik önemli adımlar olduğu belirtilmiştir (210,211). Örneğin, bambu fırçalar yenilenebilir kaynaklardan üretilebilmekte, biyolojik olarak parçalanabilmekte ve antibakteriyel özellikler gösterebilmektedir. Bununla birlikte, bu ürünlerin kıl materyalleri genellikle naylon esaslı olduğundan tamamen plastikten arındırılmış oldukları söylenemez; ancak bitki bazlı biyoplastiklerden üretilmiş veya doğal kıl kullanılan diş fırçaları da mevcuttur (210, 211).

Yapılan klinik çalışmalar, biyobozunur fırçaların plak giderim etkinliğinin plastik muadilleriyle benzer düzeyde olduğunu göstermektedir. Örneğin, çocuklarla yapılan randomize bir klinik çalışmada, bambu bazlı biyobozunur fırçaların plak temizleme etkinliği geleneksel plastik fırçalarla istatistiksel olarak eşdeğer bulunmuştur (207). Benzer şekilde, bambu ve neem diş fırçalarının kullanıldığı çalışmalarda da plak skorlarının plastik fırçalarla karşılaştırıldığında anlamlı bir fark göstermediği rapor edilmiştir (175).

Ayrıca, misvak (*Salvadora persica*) ve bambu fırçaların etkinliği, plastik fırçalarla karşılaştırıldığında benzer düzeyde bulunmuştur. Ancak misvak kullanım etkinliğinin her zaman standart ağız bakım ürünleri kadar güçlü olmayabileceği, bu nedenle kullanımının diş hekimi önerileriyle desteklenmesi gerektiği vurgulanmalıdır (212,213).

Bambu ve diğer biyolojik olarak çözünebilen malzemelerle üretilen diş fırçaları, çevreye mikroplastik salınımı, kullanıcıların mikroplastik maruziyetinden korunması ve doğada çözünebilirlik açısından değerlendirilebilirken aynı zamanda etkili bir fırçalama sağlamak için kullanılabilir (207). Plastik diş fırçaları, yüksek dayanıklılıkları, düşük maliyetleri, hijyenik yapıları ve yaygın erişilebilirlikleri sayesinde özellikle ağız sağlığında vazgeçilmez bir rol oynamaktadır. Bu özellikleri, plastik diş fırçalarını kullanıcılar için güvenilir ve pratik bir seçim haline getirmektedir (214).

Mikrobiyal kolonizasyon açısından değerlendirildiğinde, plastik dışı alternatiflerin belirli avantajları olduğu görülmektedir. Misvak, bambu ve plastik fırçaların karşılaştırıldığı bir çalışmada, her üç fırça da plak ve kanama skorlarını azaltmış, ancak plastik fırçaların mikrobiyal yükü bambu ve misvak fırçalara göre yaklaşık dört kat daha yüksek bulunmuştur (207). Bununla birlikte, kullanım süresi uzadıkça her tip fırçada bakteriyel kolonizasyonun arttığı, kılların materyalinden bağımsız olarak mikrobiyal yükte belirgin bir artış olduğu da gösterilmiştir (207). Özellikle plastik diş fırçalarındaki naylon kılların esnekliği ve uzun ömürlü kullanımı, biyoplastik kıllara kıyasla daha yüksek bir performans sunmaktadır (1). Ex-vivo koşullarda yapılan bir çalışmada, biyoplastik kılların yalnızca %30'unun 7 günlük kullanım sonunda kabul edilebilir morfolojide kaldığı, oysa naylon kıllarda bu oranın %90 olduğu rapor edilmiştir. Bu durum, plastik diş fırçalarının aşınma direncinin

biyoplastik alternatiflere göre çok daha yüksek olduğunu ve kullanıcılar açısından daha uzun süreli verim sağladığını göstermektedir (215).

Kullanıcı algısına yönelik yapılan niteliksel çalışmalarda ise bambu fırçaların ergonomisi, tutuş kolaylığı ve çevresel dostluğu öne çıkan olumlu özellikler olarak belirtilmiştir. Bununla birlikte, plastik diş fırçalarının farklı kıllanma tipleri (yumuşak, orta, sert), ergonomik tasarımları ve yenilikçi teknolojilerle (örneğin, elektrikli diş fırçaları) desteklenmesi, kullanıcıların daha geniş bir ürün yelpazesi içinden seçim yapmasına imkân tanımaktadır. Bu da plastik bazlı ürünlerin hâlen ağız bakım endüstrisinde baskın olmasının nedenlerinden biridir (1,181).

Tüm bu veriler birlikte değerlendirildiğinde, biyoplastik veya doğal materyallerden üretilmiş diş fırçaları**,** çevresel sürdürülebilirlik ve mikrobiyal yük açısından avantaj sağlamakla birlikte; plastik diş fırçaları dayanıklılık, performans ve erişilebilirlik açısından üstünlük taşımaktadır. Bu nedenle, gelecekteki araştırmaların hedefi yalnızca biyobozunur malzemelerin yaygınlaştırılması değil, aynı zamanda plastik fırçaların mikroplastik salınımını azaltacak üretim tekniklerinin geliştirilmesi de olmalıdır.

Ayrıca, plastik fırçaların aşınmasının mikroplastik salınımını artırdığı dikkate alındığında, fırçalamanın aşırı sert yapılmaması, uygun ve hekim önerileri doğrultusunda fırçalama tekniği kullanılmalı ve fırçaların düzenli aralıklarla yenilenmesi hem ağız sağlığı hem de çevresel yükün azaltılması açısından kritik görünmektedir. Uzun vadede ise plastiklerin dayanıklılığı ile biyobozunur materyallerin çevresel dostluğunu birleştiren dijital teknolojiler ve üretim tekniklerinin bir arada kullanıldığı hibrit çözümler, sürdürülebilir diş fırçası tasarımlarına yönelik önemli bir adım olacaktır (159,216).

Bu çalışmanın bazı sınırlılıkları bulunmaktadır. Örneklem sayısı belirli bir çocuk grubu ile sınırlı olduğundan, bulguların daha geniş popülasyonlarda yapılabilir. Mikroplastiklerin varlığı fluoresan boyama ve dijital mikroskopi yöntemleri ile doğrulanmış olsa da, kantitatif ölçümler ve polimer tiplerinin ileri spektroskopik tekniklerle (örn. Raman, FTIR) kesinleştirilmesi çalışmaya ek metodolojik güç katabilirdi. Ayrıca, tükürük matriksindeki diğer partiküllerin boyaya kısmi bağlanma olasılığı tamamen dışlanamamaktadır. Diş fırçalarının farklı kullanım süreleri,

fırçalama şiddeti ve bireysel ağız hijyeni alışkanlıkları da mikroplastik salınımını etkileyebilecek değişkenlerdir. Bu nedenle, elde edilen sonuçlar önemli bir ön bulgu niteliği taşımakla birlikte, daha geniş örneklemli, uzun dönemli ve çok merkezli çalışmalarla desteklenmesi gerekmektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Toplamda beş farklı diş fırçası grubundan elde edilen yüz tükürük örneği Floresan mikroskobu altında ayrıntılı olarak değerlendirilmiş, yapılan tüm incelemelerde benzer morfolojik özellikler ve yoğunlukta mikroplastik partiküller gözlenmiştir. Texas Red filtresinde kaydedilen kırmızı floresan sinyalleri, Parlak Alan ve Faz kontrast görüntülerinde izlenen düzensiz, opak veya lifsi morfolojideki yapılarla eşleşmiş ve çakıştırılmış görüntülerde bu eşleşme net biçimde doğrulanmıştır. Partiküllerin yoğunluğu bireyler arasında değişkenlik göstermekle birlikte, incelenen tüm örneklerde mikroplastik varlığına işaret eden floresan pozitif partiküller kaydedilmiştir. Bu bulgular, yalnızca sunulan temsili örneklerle sınırlı kalmayıp, tüm deney grubu örneklerinde diş fırçası kullanımının ardından tükürükte mikroplastik partikül salınımının gerçekleştiğini göstermektedir.

2. Toplamda beş farklı diş fırçası grubundan elde edilen yüz tükürük örneği dijital mikroskop altında ayrıntılı olarak değerlendirilmiş, yapılan tüm incelemelerde benzer morfolojik özellikler ve benzer yoğunlukta mikroplastik partiküller kaydedilmiştir. Partiküller, farklı örneklerde küçük yuvarlak yapılar, opak ve düzensiz formlar ile lifsi fragmanlar şeklinde çeşitlilik göstermiştir. Yoğunluk bireyler arasında değişkenlik gösterse de her örnekte mikroplastik varlığına işaret eden boyamaya bağlı olarak kırmızı renkte partiküller saptanmıştır. Bu gözlemler, floresan mikroskobu ile elde edilen Texas Red filtresi bulgularıyla da uyumlu bulunmuş; floresan pozitiflik dijital mikroskop altında belirlenen morfolojik yapılarla örtüşerek mikroplastik varlığını güçlü biçimde doğrulamıştır.

3. Bu çalışmada tükürük örneklerine yapılan floresan mikroskobu ve dijital mikroskop analizlerinde tespit edilen mikroplastik maruziyetinin büyük ölçüde diş fırçası kullanımına bağlı olduğu gözlemlenmiş ve günlük ağız hijyeni ürünlerinin potansiyel bir maruziyet kaynağı olabileceğini gösterilmiştir. Ayrıca bu çalışmada mikroplastiklerin yalnızca varlığı incelenmiş olup, partiküllerin spesifik polimer türleri (örneğin polietilen, polipropilen gibi) analiz edilmemiştir. Gelecek araştırmalarda, uygun laboratuvar koşulları altında bu tür polimer analizlerinin yapılması, mikroplastiklerin kaynağının daha kesin olarak belirlenmesine ve sonuçların güvenilirliğinin artırılmasına önemli katkı sağlayacaktır. Bu bütüncül yaklaşım hem metodolojik katkıları hem de bulguların yorumlanabilirliğini

güçlendirerek, biyolojik sıvılarda mikroplastik araştırmaları için bir referans niteliği taşımaktadır.

4. Plastik diş fırçaları, ağız hijyeninin sağlanmasında hâlen en yaygın ve işlevsel araçlardan biri olup dayanıklılık, hijyen ve erişilebilirlik açısından önemli avantajlara sahiptir. Bununla birlikte, çevresel sürdürülebilirlik ve olası mikroplastik salınımı bağlamında biyobozunur materyallerden üretilen alternatiflerin (örneğin bambu saplı fırçalar veya misvak) değerlendirilmesi ve yenilikçi üretim tekniklerinin kullanılması gelecekte önem arz etmektedir. Dolayısıyla, plastik fırçaların ağız sağlığı için sunduğu vazgeçilmez faydalar göz ardı edilmeden, alternatif materyallerin uzun dönemli etkinlik, dayanıklılık ve güvenlik profillerini inceleyen daha kapsamlı çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKLAR

1. Ong A, Teo JYQ, Watts DC, Silikas N, Lim JYC, Rosa V. The global burden of plastics in oral health: prospects for circularity, sustainable materials development and practice. RSC Sustain. 2024;2(4):881–902.
2. Huang CJ, Narasimha GV, Chen YC, Chen JK, Dong GC. Measurement of low concentration of micro-plastics by detection of bioaffinity-induced particle retention using surface plasmon resonance biosensors. Biosensors. 2021;11(7).
3. Daoutakou M, Kintzios S. Biosensors for Micro- and Nanoplastics Detection: A Review. Chemosensors 2025, Vol 13, Page 143 [Internet]. 2025 Apr 14 [cited 2025 Jul 11];13(4):143.
4. Hengstmann E, Fischer EK. Nile red staining in microplastic analysis—proposal for a reliable and fast identification approach for large microplastics. Environ Monit Assess. 2019;191(10):612.
5. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H. Oral biofilms: pathogens, matrix, and polymicrobial interactions in microenvironments. Trends Microbiol. 2018;26(3):229–42.
6. Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral biofilms: development, control, and analysis. High Throughput. 2018;7(3):24.
7. Johannsen A, Emilson CG, Johannsen G, Konradsson K, Lingström P, Ramberg P. Effects of stabilized stannous fluoride dentifrice on dental calculus, dental plaque, gingivitis, halitosis and stain: a systematic review. Heliyon. 2019;5(12): e02850.
8. Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B. Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease – connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. Front Microbiol. 2018;9.
9. van Houte J. Role of micro-organisms in caries etiology. J Dent Res. 1994;73(3):672–81.
10. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, et al. Oral microbial biofilms: an update. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2019;38(11):2005–19.
11. Marsh PD. In sickness and in health—what does the oral microbiome mean to us? An ecological perspective. In: Advances in Dental Research. SAGE Publications, 2018:60–5.
12. Samaranayake L, Matsubara VH. Normal oral flora and the oral ecosystem. Dent Clin North Am. 2017;61(2):199–215.
13. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, et al. Treatment of stage I–III periodontitis—the EFP S3 level clinical practice guideline. J Clin Periodontol. 2020;47(S22):4–60.
14. Türkmen B, Ayhan K, Altuntaş EG. Dental plak oluşumundan sorumlu mikroorganizmalar ve bunların tüketilen gıdalarla ilişkisi. Nevşehir Bilim ve Teknoloji Dergisi [Internet]. 2016 Apr 4 [cited 2025 Sep 8]; 5:51–61.

15. Pieren JA, Boyd MA. Dental hygiene: theory and practice. 5th ed. Elsevier, 2019.

16. Lang NP, Bartold PM. Periodontal health. J Periodontol. 2018;89(Suppl): S9–16.

17. Kotsakis GA, Lian QI, Amiri MB, Jeong MC, Hwang CH. Oral hygiene methods in the reduction of clinical indices of inflammation. J Periodontol. 2018; 89:558–70.

18. Serrano J, Escribano M, Roldán S, Martín C, Herrera D. Efficacy of adjunctive chemical plaque control in managing gingivitis: a systematic review and meta-analysis. J Clin Periodontol. 2015; 42:106–38.

19. Sağlık A, Üniversitesi B, Fakültesi H, Diş R, Ad T. Restoratif diş hekimliğinde çürük önleme ve tedavilerinde nanoteknoloji stratejileri. *Selcuk Dent J* [Internet]. 2023 Aug 21 [cited 2025 Sep 8];10(2):492–6.

20. Fardai O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. J Am Dent Assoc. 1986;112(6):863–9.

21. Axelsson P, Nystrom B, Lindhe J. The long-term effect of a plaque control program on tooth mortality, caries and periodontal disease in adults: results after 30 years of maintenance. J Clin Periodontol. 2004;31(9):749–57.

22. Sarembe S. Influence of the amount of toothpaste on cleaning efficacy: an in vitro study. Eur J Dent. 2023;17(4):497–503.

23. Jagtap AM, Kaulage SR, Kanse SS, Shelke VD, Gavade AS, Vambhurkar GB, et al. Preparation and evaluation of toothpaste. Asian J Pharm Anal. 2018;8(4):191.

24. Ercan Devrimci E, Türkün LŞ. How to choose a toothpaste? Türkiye Klinikleri. 2020; 1:23–30.

25. Mason S, Al-Mulla YS. Stain control with two experimental dentin hypersensitivity toothpastes containing spherical silica: a randomised, early-phase development study. BDJ Open. 2019; 5:8.

26. Marinho VCC. Cochrane reviews of randomized trials of fluoride therapies for preventing dental caries. Eur Arch Paediatr Dent. 2009;10(3):183–91.

27. Lindhe J, Rosling B, Socransky SS, Volpe AR. The effect of a triclosan-containing dentifrice on established plaque and gingivitis. J Clin Periodontol. 1993;20(5):327–34.

28. Singh M, Sharma D, Kumar D, Singh G, Swami G, Rathore MS. Formulation, development, and evaluation of herbal effervescent mouthwash tablet containing Azadirachta indica (Neem) and curcumin for the maintenance of oral hygiene. Recent Pat Drug Deliv Formul. 2020;14(2):145–61.

29. McGrath C, Clarkson J, Glenny AM, Walsh LJ, Hua F. Effectiveness of mouthwashes in managing oral diseases and conditions: do they have a role? Int Dent J. 2023;73(Suppl 2): S69.

30. Yıldırım BG, Mimaroğlu M, Beklen A. Kişisel plak kontrolü: plak kontrolünde kullanılan araçlar, teknikler, motivasyon. Türkiye Klinikleri. 2019; 1:1–7.

31. Spets-Happonen S, Markkanen H, Pöllänen L, Kauppinen T, Luoma H. Salivary Streptococcus mutans count and gingivitis in children after rinsing with a chlorhexidine-fluoride solution with and without strontium. Eur J Oral Sci. 1985;93(4):329–35.

32. Worthington HV, MacDonald L, Poklepovic Pericic T, Sambunjak D, Johnson TM, Imai P, et al. Home use of interdental cleaning devices, in addition to toothbrushing, for preventing and controlling periodontal diseases and dental caries. Cochrane Database Syst Rev. 2020;4.

33. Lee JH, Song YJ, Jung LH, Kim HD. Association of toothbrushing and proximal cleaning with periodontal health among Korean adults: results from Korea National Health and Nutrition Examination Survey in year 2010 and 2012. J Clin Periodontol. 2018; 45:322–35.

34. Lyle DM, Crouse GR, Green QJ, Reynolds S. Comparison of water flosser and interdental brush on plaque removal: a single-use pilot study. J Clin Dent. 2016; 27:23–6.

35. Bourgeois D, Saliasi I, Dussart C, Llodra JC, Tardivo D, Laforest L, et al. Educational outcomes of a new curriculum on interproximal oral prophylaxis for dental students. PLoS One. 2018;13(10): e0204564.https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0204564

36. Chapple IL, Van der Weijden F, Doerfer C, Herrera D, Shapira L, Polak D, et al. Primary prevention of periodontitis: managing gingivitis. J Clin Periodontol. 2015;42(Suppl 16):71–6.

37. Slot DE, Dörfer CE, Van der Weijden GA. The efficacy of interdental brushes on plaque and parameters of periodontal inflammation: a systematic review. Int J Dent Hyg. 2008; 6:253–64.

38. Marchesan JT, Morelli T, Moss K, Preisser JS, Zandona AF, Offenbacher S. Interdental cleaning is associated with decreased oral disease prevalence. J Dent Res. 2018; 97:773–8.

39. Berberoğlu A. Periodontal hastalarda plak kontrolü. 2020.

40. Luz M, Klingbeil MFG, Henriques PSG, Lewgoy HR. Comparison between interdental brush and dental floss controlling interproximal biofilm in teeth and implants. Dent Health Curr Res. 2016;2.

41. Sälzer S, Slot DE, Van der Weijden FA, Dörfer CE. Efficacy of inter-dental mechanical plaque control in managing gingivitis: a meta-review. J Clin Periodontol. 2015;42(S16): S92–105.

42. Christou V, Timmerman MF, Van der Velden U, Van der Weijden GA. Comparison of different approaches of interdental oral hygiene: interdental brushes versus dental floss. J Periodontol. 1998; 69:759–64.

43. Imai PH, Hatzimanolakis PC. Interdental brush in type I embrasures: examiner-blinded randomised clinical trial of bleeding and plaque efficacy. J Dent Hyg. 2011; 45:13–20.

44. Noorlin I, Watts TL. A comparison of the efficacy and ease of use of dental floss and interproximal brushes in a randomised split-mouth trial incorporating an assessment of subgingival plaque. Oral Health Prev Dent. 2007; 5:13–8.

45. Ciancio SG. The dental water jet: a product ahead of its time. Compend Contin Educ Dent. 2009;30(14):7–13.

46. Frascella JA, Fernandez P, Gilbert RD, Cugini MA. A randomized, clinical evaluation of the safety and efficacy of a novel oral irrigator. Am J Dent. 2020; 13:55–8.

47. Therapy Committee of the American Academy of Periodontology. Treatment of plaque-induced gingivitis, chronic periodontitis, and other clinical conditions. J Periodontol. 2001; 72:1790–800.

48. Dil temizleme yöntemleri: bir inceleme. [Internet]. Erişim tarihi: 13.05.2025. Erişim: https://www.researchgate.net/publication/303859687_Tongue_cleaning_methods_A_Review

49. Choi HN, Cho YS, Koo JW. The effect of mechanical tongue cleaning on oral malodor and tongue coating. Int J Environ Res Public Health. 2022;19(1).

50. Mosaico G, Pinna M, Grassi R, Orrù G, Scribante A, Maiorani C, et al. Oral health and caries prevention: how tongue hygiene helps maintain balance of microbiota and overall health in pediatric patients. Children. 2024;11(7).

51. Soni S, Sidhu M, Grover S. Comparative evaluation of orthodontic toothbrush and water jet device in the reduction of dental plaque and gingival bleeding in patients with fixed orthodontic appliances. J Pierre Fauchard Acad. 2012;26(4):147–51.

52. Preshaw PM, Ide M, Bissett SM, Holliday R, Lansdowne N, Pickering K, et al. No benefit of an adjunctive phototherapy protocol in treatment of periodontitis: a split-mouth randomized controlled trial. J Clin Periodontol. 2021;48(8):1093–102.

53. Sawan N, Ben Gassem A, Alkhayyal F, Albakri A, Al-Muhareb N, Alsagob E. Effectiveness of Super Floss and Water Flosser in plaque removal for patients undergoing orthodontic treatment: a randomized controlled trial. Int J Dent. 2022; 2022:1–7.

54. Al Hariri MH, Karkoutly M, Al Kurdi S, Alkassar M, Bshara N. The efficacy of the dental water jet, orthodontic, and conventional toothbrushes in plaque removal around orthodontic braces in adolescents: a randomized controlled trial. Clin Exp Dent Res. 2023;9(3):606–13.

55. Lyle DM. Relevance of the water flosser: 50 years of data. Compend Contin Educ Dent. 2012;33(3):146–53.

56. Jahn CA. The dental water jet: a historical review of the literature. J Dent Hyg. 2010;84(3):114–20.

57. Barnes CM, Russell CM, Reinhardt RA, Payne JB, Lyle DM. Comparison of irrigation to floss as an adjunct to tooth brushing: effect on bleeding, gingivitis, and supragingival plaque. J Clin Dent. 2005;16(3):71–7.

58. Tyler D, Kang J, Goh HH. Effectiveness of Waterpik® for oral hygiene maintenance in orthodontic fixed appliance patients: a randomised controlled trial. J Orthod. 2023;50(2):105–12.

59. Chang YS, Park EJ, Kim HJ. Correlation coefficient between toothbrushing frequency or caries activity and dental caries or periodontal state. Int J Clin Prev Dent. 2013;9(4):225–30.

60. Gilmore EL, Bhaskar SN. Effect of tongue brushing on bacteria and plaque formed in vitro. J Periodontol. 1972;43(7):418–22.

61. Gluch JI. As an adjunct to tooth brushing, interdental brushes are more effective in removing plaque than brushing alone or the combination of tooth brushing and dental floss. J Evid Based Dent Pract. 2012;12(2):81–3.

62. Winnier JJ, Rupesh S, Nayak UA, Reddy V, Rao AP. Comparative evaluation of the effects of tongue cleaning on existing plaque levels in children. Int J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2013 Sep [cited 2025 May 13];6(3):188–92.

63. De Paiva Buischi Y De Campos Kajimoto N, Funari SL, Kimathi M, Loomer PM. Improving oral health of adolescent girls in Kenya through education: an observational study. Int J Dent Hyg. 2023;21(3):575–81.

64. Kolawole KA, Oziegbe EO, Bamise CT. Oral hygiene measures and the periodontal status of schoolchildren. Int J Dent Hyg. 2011;9(2):143–8.

65. Thomassen TMJA, Van der Weijden FGA, Slot DE. The efficacy of powered toothbrushes: a systematic review and network meta-analysis. Int J Dent Hyg [Internet]. 2021 [cited 2025 May 13];20(1):3–14.

66. Claydon NC. Current concepts in toothbrushing and interdental cleaning. Periodontol 2000. 2008; 48:10–22.

67. Jepsen S, Lang NP, Attström R, Löe H. The role of manual toothbrushes in effective plaque control. In: Lang NP, Attström R, Löe H, editors. Proceedings of the European Workshop on Mechanical Plaque Control. Berlin: Quintessenz Verlag; 1998. p.121–37.

68. American Dental Association (ADA). Acceptance Program Guidelines for Toothbrushes [Internet]. Chicago: ADA; 2022 [cited 2025 May 13].

69. Güney Yılmaz H. Mechanical plaque control techniques. ADO Klin Bilim Derg. 2011;5(1):791–7.

70. Hennequin-Hoenderdos NL, Slot DE, Van der Sluijs E, Adam R, Grender JM, Van der Weijden GA. Effects of different levels of brush end rounding on gingival abrasion: a double-blind randomized clinical trial. Int J Dent Hyg. 2017;15(4):335–44.

71. Brooks JK, Bashirelahi N, Hsia RC, Reynolds MA. Charcoal-based mouthwashes: a literature review. Br Dent J. 2020;228(4):290–4.

72. Yin IX, Zhang J, Zhao IS, Mei ML, Li Q, Chu CH. The antibacterial mechanism of silver nanoparticles and its application in dentistry. Int J Nanomedicine. 2020; 15:2555–62.

73. Espinosa-Cristóbal LF, López-Ruiz N, Cabada-Tarín D, Reyes-López SY, Zaragoza-Contreras A, Constandse-Cortéz D. Antiadherence and antimicrobial properties of silver nanoparticles against *Streptococcus mutans* on brackets and wires used for orthodontic treatments. J Nanomater. 2018; 2018:1–12.

74. Butrón-Téllez Girón C, Hernández-Sierra JF, Dealba-Montero I, Urbano-Peña MA, Ruiz F. Therapeutic use of silver nanoparticles in the prevention and arrest of dental caries. Bioinorg Chem Appl. 2020; 2020:1–7.

75. Patel RM, Malaki Z. Effect of a mouthrinse containing essential oils on dental plaque and gingivitis. Evid Based Dent. 2008;9(1):18–9.

76. Paik DI, Kim HD, Jin BH, Park YD, Shin SC, Cho JW. Clinical preventive dentistry. 5th ed. Seoul: Komoonsa; 2011. p.43–644.

77. Grover D, Malhotra R, Kaushal SJ. Toothbrush: a key to mechanical plaque control. Indian J Oral Sci. 2012;3(2):62–8.

78. Dörter C, Ulu O, Can Yaman B, Güray Efes B, Gömeç Y, Çilingir A, et al. Mikro titreşimli diş fırçasının plak kaldırma etkinliğinin in vivo değerlendirilmesi. *J Istanbul Univ Fac Dent* [Internet]. 2011 [cited 2025 Sep 8]; 44:81–7.

79. Özgöçmen E, Yiğit T, Kutlu HH. Presence of candida in the dental plaque and saliva of patients with severe early childhood caries and early childhood caries: a pilot study. *Eur Oral Res* [Internet]. 2024 May 8 [cited 2025 Sep 8];58(2):102–7.

80. Rajwani AR, Hawes SND, To A, Quaranta A, Aguilar JCR. Effectiveness of manual toothbrushing techniques on plaque and gingivitis: a systematic review. Oral Health Prev Dent [Internet]. 2020 [cited 2025 May 13];18(4): a45354.

81. Janakiram C, Varghese N, Venkitachalam R, Joseph J, Vineetha K. Comparison of modified Bass, Fones and normal toothbrushing techniques for the efficacy of plaque control in young adults: a randomized clinical trial. J Clin Exp Dent [Internet]. 2020 [cited 2025 May 13];12(2): e123–9.

82. Nassar PO, Bombardelli CG, Walker CS, Neves KV, Tonet K, Nishi RN, et al. Periodontal evaluation of different toothbrushing techniques in patients with fixed orthodontic appliances. Dent Press J Orthod [Internet]. 2013 [cited 2025 May 13];18(1):76–80.

83. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. Newman and Carranza's clinical periodontology. 13th ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. p.1–913.

84. De Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAN, De Lima AAS, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. J Contemp Dent Pract. 2008;9(3):72–80.

85. Roi A, Rusu LC, Roi CI, Luca RE, Boia S, Munteanu RI. A new approach for the diagnosis of systemic and oral diseases based on salivary biomolecules. Dis Markers. 2019; 2019:1–11.

86. Gallardo E, Queiroz JA. The role of alternative specimens in toxicological analysis. Biomed Chromatogr. 2008;22(8):795–821.

87. Elmongy H, Abdel-Rehim M. Saliva as an alternative specimen to plasma for drug bioanalysis: a review. TrAC Trends Anal Chem. 2016; 83:70–9.

88. Ngamchuea K, Chaisiwamongkhol K, Batchelor-McAuley C, Compton RG. Chemical analysis in saliva and the search for salivary biomarkers: a tutorial review. Analyst. 2018;143(1):81–99.

89. Kaczor-Urbanowicz KE, Wei F, Rao SL, Kim J, Shin H, Cheng J, et al. Clinical validity of saliva and novel technology for cancer detection. Biochim Biophys Acta Rev Cancer. 2019;1872(1):49–59.

90. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: normal composition, flow, and function. J Prosthet Dent. 2001;85(2):162–9.

91. Viswanath B, Choi CS, Lee K, Kim S. Recent trends in the development of diagnostic tools for diabetes mellitus using patient saliva. TrAC Trends Anal Chem. 2017; 89:60–7.

92. Lim Y, Totsika M, Morrison M, Punyadeera C. Oral microbiome: a new biomarker reservoir for oral and oropharyngeal cancers. Theranostics. 2017;7(17):4313–21.

93. Moynihan P. Foods and factors that protect against dental caries. British Nutrition Foundation Nutrition Bulletin. 2000; 25:281–6.

94. Koçdor H, Yıldırım A. Kanserde tükürük biyobelirteçleri. *Turkiye Klin Med Oncol Spec Top* [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 8];16(1):68–78.

95. Chibly AM, Aure MH, Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland function, development, and regeneration. Physiol Rev. 2022;102(3):1495–552.

96. Pedersen A, Sørensen C, Proctor G, Carpenter G. Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. Oral Dis. 2018;24(8):1399–416.

97. Pedersen AML, Sørensen CE, Proctor GB, Carpenter GH, Ekström J. Salivary secretion in health and disease. J Oral Rehabil. 2018;45(9):730–46.

98. Flink H, Bergdahl M, Tegelberg Å, Rosenblad A, Lagerlöf F. Prevalence of hyposalivation in relation to general health, body mass index and remaining teeth in different age groups of adults. Community Dent Oral Epidemiol. 2008;36(6):523–31.

99. Møller PR, Kærsgaard ML, Grydehøj J, Ovesen T. Normal salivary production using a swab method in clinical settings. Clin Otolaryngol. 2022;47(5):583–8.

100. Lukacs JR, Largaespada LL. Explaining sex differences in dental caries prevalence: saliva, hormones, and life history etiologies. Am J Hum Biol. 2006;18(4):540–55.

101. Azuma N, Katada Y, Sano H. Deterioration in saliva quality in patients with Sjögren's syndrome: impact of decreased salivary epidermal growth factor on the severity of intraoral manifestations. Inflamm Regen. 2018;38(1):6.

102. Macpherson P. The role of saliva in oral health and disease. Dent Nurs. 2013;9(10):604–8.

103. Fitzgerald RJ. The role of salivary enzymes in digestion and health. J Oral Biol. 2015;9(2):43–56.

104. Moss SJ. Clinical implications of recent advances in salivary research. J Esthet Restor Dent [Internet]. 1995 [cited 2025 May 14];7(5):197–203.

105. Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, et al. Current developments in salivary diagnostics. Biomark Med [Internet]. 2010 [cited 2025 May 14];4(1):171–89.

106. Diab R, Choufani A, Dagher J, Chahine N. Influence of circadian rhythm on the antioxidant capacity of saliva in periodontal diseases. Cureus. 2024;16(3): e58472.

107. Hall HD. Protective and maintenance functions of human saliva. Quintessence Int. 1993;24(11):813–6.

108. Aktaş A, Gbag A. Tükürük (salya); özellikleri ve görevleri tanı açısından değeri. ADO Klin Bilim Derg. 2009;3(2):361–7.

109. Lee YH, Wong DT. Saliva: an emerging biofluid for early detection of diseases. Am J Dent. 2009;22(4):241–8.

110. Teanpaisan R, Thitasomakul S, Piwat S, Thearmontree A, Pithpornchaiyakul W, Chankanka O. Longitudinal study of the presence of mutans streptococci and lactobacilli in relation to dental caries development in 3–24-month-old Thai children. Int Dent J [Internet]. 2007 [cited 2025 May 14];57(6):445–51.

111. Ong G. Periodontal disease and tooth loss. Int Dent J [Internet]. 1998 [cited 2025 May 14];48(Suppl 3):233–8.

112. Patton LL, Epstein JB, Kerr AR. Adjunctive techniques for oral cancer examination and lesion diagnosis: a systematic review of the literature. J Am Dent Assoc. 2008;139(7):896–905.

113. Speight PM, Palmer S, Moles DR. The cost-effectiveness of screening for oral cancer in primary care. Health Technol Assess. 2006;10(14):1–144.

114. Kallings LO. The first postmodern pandemic: 25 years of HIV/AIDS. J Intern Med [Internet]. 2008 [cited 2025 May 14];263(3):218–43.

115. Border MB, Schwartz S, Carlson J, Dibble CF, Kohltfarber H, Offenbacher S, et al. Exploring salivary proteomes in edentulous patients with type 2 diabetes. Mol Biosyst [Internet]. 2012 [cited 2025 May 14];8(4):1304–10.

116. Azeez RA, Sood LI, Diajil AR. Salivary α-amylase level in relation to oral health parameters among children in Baghdad City. J Baghdad Coll Dent [Internet]. 2016 [cited 2025 May 14];28(2):40–6.

117. Slavkin HC. Toward molecularly based diagnostics for the oral cavity. J Am Dent Assoc. 1998;129(8):1138–43.

118. Cincinelli A, Scopetani C, Chelazzi D, Lombardini E, Martellini T, Katsoyiannis A, et al. Microplastic in the surface waters of the Ross Sea (Antarctica): occurrence, distribution and characterization by FTIR. Chemosphere. 2017; 175:391–400.

119. Javaid MA, Ahmed AS, Durand R, Tran SD. Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. J Oral Biol Craniofac Res [Internet]. 2016 [cited 2025 May 14];6(1):67–76.

120. Rokaya D, Srimaneepong V, Sapkota J, Qin J, Siraleartmukul K, Siriwongrungson V. Polymeric materials and films in dentistry: an overview. J Adv Res [Internet]. 2018 [cited 2025 May 14]; 14:25–34.

121. Xu X, He L, Zhu B, Li J, Li J. Advances in polymeric materials for dental applications. Polym Chem [Internet]. 2017 [cited 2025 May 14];8(5):807–23.

122. Spalding MA, Chatterjee AM. Handbook of industrial polyethylene and technology. 1st ed. Hoboken: Wiley; 2017.

123. Colgate-Palmolive. Colgate® launches its groundbreaking recyclable toothpaste tube with “Recycle Me!” packaging in the U.S. [Internet]. 2023 [cited 2025 May 14].

124. Jedeon K, De La Dure-Molla M, Brookes SJ, Loiodice S, Marciano C, Kirkham J, et al. Enamel defects reflect perinatal exposure to bisphenol A. Am J Pathol [Internet]. 2013 [cited 2025 May 14];183(1):108–18.

125. Borunda A. How your toothbrush became a part of the plastic crisis. National Geographic [Internet]. 2023 [cited 2025 May 14]. Available from: https://www.nationalgeographic.com/environment/article/story-of-plastic-toothbrushes

126. Lambert S, Wagner M. Characterisation of nanoplastics during the degradation of polystyrene. Chemosphere [Internet]. 2016 [cited 2025 May 14]; 145:265–8.

127. Silva JDB, Barletta M, Lima ARA, Ferreira GVB. Use of resources and microplastic contamination throughout the life cycle of grunts (Haemulidae) in a tropical estuary. Environ Pollut [Internet]. 2018 [cited 2025 May 14]; 242:1010–21.

128. Tallec K, Huvet A, Di Poi C, González-Fernández C, Lambert C, Petton B, et al. Nanoplastics impair oyster free-living stages, gametes and embryos. Environ Pollut [Internet]. 2018 [cited 2025 May 14]; 242:1226–35.

129. Barceló D, Picó Y, Alfarhan AH. Microplastics: detection in human samples, cell line studies, and health impacts. Environ Toxicol Pharmacol [Internet]. 2023 [cited 2025 May 14]; 101:107110.

130. Schirinzi GF, Llorca M, Seró R, Moyano E, Barceló D, Abad E, et al. Trace analysis of polystyrene microplastics in natural waters. Chemosphere [Internet]. 2019 [cited 2025 May 14]; 236:124321.

131. Leonard VL, Liddle CR, Atherall CA, Chapman E, Watkins M, Calaminus DJ, et al. Microplastics in human blood: polymer types, concentrations and characterisation using μFTIR. Environ Int [Internet]. 2024 [cited 2025 May 14]; 188:108751.

132. Dalili A, Samiei E, Hoorfar M. A review of sorting, separation and isolation of cells and microbeads for biomedical applications: microfluidic approaches. Analyst [Internet]. 2019 [cited 2025 May 14];144(1):87–113.

133. Deconinck S, De Wilde B. Benefits and challenges of bio- and oxo-degradable plastics: a comparative literature study. Brussels: PlasticsEurope; 2013.

134. Guerranti C, Martellini T, Perra G, Scopetani C, Cincinelli A. Microplastics in cosmetics: environmental issues and needs for global bans. Environ Toxicol Pharmacol [Internet]. 2019 [cited 2025 May 14]; 68:75–9.

135. Baruah A, Sharma A, Sharma S, Nagraik R. An insight into different microplastic detection methods. Environ Sci Pollut Res. 2022;29(19):5721–30.

136. Song YK, Hong SH, Jang M, Han GM, Rani M, Lee J, et al. Comparison of microscopic and spectroscopic identification methods for analysis of microplastics in environmental samples. Mar Pollut Bull. 2015;93(1–2):202–9.

137. Hidalgo-Ruz V, Gutow L, Thompson RC, Thiel M. Microplastics in the marine environment: a review of the methods used for identification and quantification. Environ Sci Technol. 2012;46(6):3060–75.

138. Din KS, Khokhar MF, Amjad H. Tracking microplastics in the air: cutting-edge methods for indoor and outdoor environments. Aerosol Air Qual Res [Internet]. 2024 [cited 2025 Sep 1];24(12):240073.

139. Hidalgo-Ruz V, Thiel M. Distribution and abundance of small plastic debris on beaches in the SE Pacific (Chile): a study supported by a citizen science project. Mar Environ Res. 2013;87–88:12–8.

140. Wagner J, Wang ZM, Ghosal S. Novel method for the extraction and identification of microplastics in ocean trawl and fish gut. Anal Methods. 2017;9(9):1479–90.

141. Zada L, Leslie HA, Vethaak AD. Fast microplastics identification with stimulated Raman scattering microscopy. J Raman Spectrosc. 2018;49(1):36–44.

142. Kniggendorf AK, Wetzel C, Roth B. Microplastics detection in streaming tap water with Raman spectroscopy. Sensors (Basel). 2019;19(8):1839.

143. Majewsky M, Bitter H, Eiche E. Determination of microplastic polyethylene (PE) and polypropylene (PP) in environmental samples using thermal analysis (TGA–DSC). Sci Total Environ. 2016;568–569:507–11.

144. Baek SH, Kim HH, Doh YS, Kim KW. Estimation of high-temperature properties of rubberized asphalt using chromatograph. KSCE J Civ Eng [Internet]. 2009 [cited 2025 Jul 11];13(3):161–7.

145. Barth HG, Boyes BE. Size exclusion chromatography. Anal Chem [Internet]. 1990 [cited 2025 Jul 11];62(12):268–303.

146. Mefford OT. Biomedical applications of magnetic particles. Boca Raton: CRC Press; 2020.

147. Yazıcı M, Yardımcı RE. Akım sitometri ve su ürünleri uygulamaları. J Aquac Eng Fish Res. 2016;2(4):159–75.

148. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential – what they are and what they are not? J Control Release [Internet]. 2016 [cited 2025 Jul 16]; 235:337–51. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365916303832

149. Nagraik R, Kaushal A, Gupta S, Sethi S, Sharma A, Kumar D. Nanofabricated versatile electrochemical sensor for *Leptospira interrogans* detection. J Biosci Bioeng. 2020;129(4):441–6.

150. Prata JC, Costa JPD, Duarte AC. Methods for sampling and detection of microplastics in water and sediment: a critical review. TrAC Trends Anal Chem. 2019; 110:150–9.

151. Bannick CG, Szewzyk R, Ricking M. Development and testing of a fractionated filtration for sampling of microplastics in water. Water Res. 2018; 149:650–8.

152. Nakajima R, Lindsay DJ, Tsuchiya M, Matsui R, Kitahashi T, Fujikura K, et al. A small stainless-steel sieve optimized for laboratory beaker-based extraction of microplastics from environmental samples. MethodsX. 2019; 6:1677–82.

153. Monteiro SS, Rocha-Santos T, Prata JC, Duarte AC, Girão AV, Lopes P, et al. A straightforward method for microplastic extraction from organic-rich freshwater samples. Sci Total Environ [Internet]. 2022 [cited 2025 May 14]; 815:152941.

154. Claessens M, Van Cauwenberghe L, Vandegehuchte MB, Janssen CR. New techniques for the detection of microplastics in sediments and field-collected organisms. Mar Pollut Bull. 2013;70(1–2):227–33.

155. Merdy P, Delpy F, Bonneau A, Villain S, Iordachescu L, Vollertsen J, et al. Nanoplastic production procedure for scientific purposes: PP, PVC, PE-LD, PE-HD, and PS. Heliyon [Internet]. 2023 [cited 2025 May 14];9(8): e18387.

156. Chen Y, Chen Q, Zhang Q, Zuo C, Shi H. An overview of chemical additives on (micro)plastic fibers: occurrence, release, and health risks. Rev Environ Contam Toxicol [Internet]. 2022 [cited 2025 May 14];260(1):22.

157. Huang L, He W, Zhang Y, Wang X, Wu K, Yang Z, et al. Chitosan enhances polyaluminum chloride flocculation system removal of microplastics: effective, stable, and pollution-free. J Water Process Eng [Internet]. 2023 [cited 2025 May 14]; 54:103929.

158. Vethaak AD, Legler J. Microplastics and human health: knowledge gaps should be addressed to ascertain the health risks of microplastics. Science [Internet]. 2021 [cited 2025 Aug 16];371(6530):672–4.

159. Amobonye A, Bhagwat P, Singh S, Pillai S. Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. Science of The Total Environment [Internet]. 2021 Mar 10 [cited 2025 Aug 16]; 759:143536.

160. Huang S, Huang X, Bi R, Guo Q, Yu X, Zeng Q, et al. Detection and analysis of microplastics in human sputum. Environ Sci Technol [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 19];56(4):2476–86.

161. Özsoy S, Gündogdu S, Sezigen S, Tasalp E, Ikiz DA Kideys AE. Presence of microplastics in human stomachs. Forensic Sci Int [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Aug 19];364.

162. Horvatits T, Tamminga M, Liu B, Sebode M, Carambia A, Fischer L, et al. Microplastics detected in cirrhotic liver tissue. EBioMedicine [Internet]. 2022 Aug 1 [cited 2025 Aug 19]; 82:104147.

163. Roslan NS, Lee YY, Ibrahim YS, Anuar ST, Yusof KMKK, Lai LA, et al. Detection of microplastics in human tissues and organs: a scoping review. J Glob Health. 2024; 14:1—10.

164. Valstar MH, de Bakker BS, Steenbakkers RJHM, de Jong KH, Smit LA, Klein Nulent TJW, et al. The tubarial salivary glands: a potential new organ at risk for radiotherapy. *Radiother Oncol*. 2021 Jan 1; 154:292–8.

165. Przekop R, Michalczuk U, Penconek A, Moskal A. Effect of microplastic particles on the rheological properties of human saliva and mucus. Int J Environ Res Public Health [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 16];20(22):7037.

166. Smith M, Love DC, Rochman CM, Neff RA. Microplastics in seafood and the implications for human health. Curr Environ Health Rep [Internet]. 2018 [cited 2025 Aug 16];5(3):375.

167. Lamoree MH, Nl ML, Brits M, Van Velzen MJM, Sefiloglu FÖ, Scibetta L, et al. Quantitation of micro- and nanoplastics in human blood by pyrolysis–gas chromatography–mass spectrometry. Microplast Nanoplast [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 19];4(1):1–12.

168. Lee DW, Jung J, Park SA, Lee Y, Kim J, Han C, et al. Microplastic particles in human blood and their association with coagulation markers. Sci Rep [Internet]. 2024 [cited 2025 Aug 19];14(1):1–10.

169. Pironti C, Notarstefano V, Ricciardi M, Motta O, Giorgini E, Montano L. First evidence of microplastics in human urine: a preliminary study of intake in the human body. Toxics. 2023;11(1):4—15.

170. Piechocka J, Wrońska M, Głowacki R. Chromatographic strategies for the determination of aminothiols in human saliva. TrAC Trends Anal Chem [Internet]. 2020 [cited 2025 Aug 16]; 126:115866.

171. Basri KS, Daud A, Astuti RDP, Basri K. Detection of exposure to microplastics in humans: a systematic review. Open Access Maced J Med Sci. 2021; 9:275–80.

172. Pujar P, Subbareddy VV. Evaluation of toothbrushing skills in children aged 6–12 years. Eur Arch Paediatr Dent [Internet]. 2013 [cited 2025 Aug 19];14(4):213–9.

173. Chua DR, Hu S, Sim YF, Lim W, Lai BWP, Hong CHL. At what age do children have the motor development to adequately brush their teeth? Int J Paediatr Dent [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Aug 19];32(4):598–606.

174. Addy M, Hunter ML. Can toothbrushing damage your health? Effects on oral and dental tissues. Int Dent J. 2003; 53:177–86.

175. Chengappa SK, Rao A, KSA, Jodalli PS, Shenoy Kudpi R. Microplastic content of over-the-counter toothpastes: a systematic review. F1000Res [Internet]. 2023 [cited 2025 Aug 19];12:5-7.

176. Protyusha GB, B K, Robin RS, A N, Ineyathendral TR, Shivani SS, et al. Microplastics in oral healthcare products (OHPs) and their environmental health risks and mitigation measures. Environmental Pollution [Internet]. 2024 Feb 15 [cited 2025 Sep 1];343.

177. Madhumitha CT, Karmegam N, Biruntha M, Arun A, Al Kheraif AA, Kim W, et al. Extraction, identification, and environmental risk assessment of microplastics in commercial toothpaste. Chemosphere [Internet]. 2022 [cited 2025 Aug 19];296: 1-3.

178. Praveena SM, Shaifuddin SNM, Akizuki S. Exploration of microplastics from personal care and cosmetic products and its estimated emissions to the marine environment: evidence from Malaysia. Mar Pollut Bull [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 1]; 136:135–40.

179. Sarı Gençağ B. Mikroplastik kirliliği: sağlık riskleri ve sürdürülebilir çözüm önerileri. *Bilecik Şeyh Edebali Univ Fen Bilim Derg*. 2025 May 30;12(1):333–43.

180. Zimmermann L, Geueke B, Parkinson LV, Schür C, Wagner M, Muncke J. Food contact articles as a source of micro- and nanoplastics: a systematic evidence map. NPJ Sci Food [Internet]. 2025 [cited 2025 Sep 1];9(1):4-9.

181. Siddiqui SA, Bahmid NA, Salman SHM, Nawaz A, Walayat N, Shekhawat GK, et al. Migration of microplastics from plastic packaging into foods and its potential threats to human health. Adv Food Nutr Res [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 1]; 103:313–59.

182. Lin Q, Zhao S, Pang L, Sun C, Chen L, Li F. Potential risk of microplastics in processed foods: preliminary risk assessment concerning polymer types, abundance, and human exposure of microplastics. Ecotoxicol Environ Saf [Internet]. 2022 [cited 2025 Sep 1]; 247:60-70.

183. Prata JC. Airborne microplastics: consequences to human health? Environ Pollut [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 1]; 234:115–26.

184. Henry B, Laitala K, Klepp IG. Microfibres from apparel and home textiles: prospects for including microplastics in environmental sustainability assessment. Sci Total Environ [Internet]. 2019 [cited 2025 Sep 1]; 652:483–94.

185. Gasperi J, Wright SL, Dris R, Collard F, Mandin C, Guerrouache M, et al. Microplastics in air: are we breathing it in? Curr Opin Environ Sci Health [Internet]. 2018 [cited 2025 Sep 1]; 1:1–5.

186. Jones NR, De Jersey AM, Lavers JL, Rodemann T, Rivers-Auty J. Identifying laboratory sources of microplastic and nanoplastic contamination from the air, water, and consumables. J Hazard Mater [Internet]. 2024 [cited 2025 Sep 7]; 465:1-5.

187. Cherian AG, Liu Z, McKie MJ, Almuhtaram H, Andrews RC. Microplastic removal from drinking water using point-of-use devices. Polymers (Basel) [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 7];15(6):1331.

188. Trusler EC, Davies M, Spurrier B, Gould SJ. Reusable glassware for routine cell culture—a sterile, sustainable and affordable alternative to single-use plastics. Front Sustain. 2024; 5:1447236.

189. Quinzi V, Orilisi G, Vitiello F, Notarstefano V, Marzo G, Orsini G. A spectroscopic study on orthodontic aligners: first evidence of secondary microplastic detachment after seven days of artificial saliva exposure. Sci Total Environ [Internet]. 2023 [cited 2025 Sep 1]; 866:70.

190. Spielmann N, Wong D. Saliva: diagnostics and therapeutic perspectives. Oral Dis [Internet]. 2011 [cited 2025 Sep 1];17(4):345–54.

191. Study: Gum may release thousands of microplastics in your mouth. [Internet]. [cited 2025 Sep 1].

192. Fang C, Gopalan S, Zhang X, Xu L, Niu J, Naidu R. Raman imaging to identify microplastics released from toothbrushes: algorithms and particle analysis. Environ Pollut [Internet]. 2023 Nov 15 [cited 2025 Sep 1];337.

193. Soysal M. Mikroplastik tespitinde güncel stratejiler: Türkiye örneği. *J Environ Nat Stud* [Internet]. 2024 Aug 24 [cited 2025 Sep 8];6(2):107–16.

194. Yıldız Telatar G. Farklı diş fırçalarına ait kıl ucu morfolojisinin stereomikroskop ile analizi: in vitro çalışma. *Curr Res Dent Sci* [Internet]. 2022 Feb 15 [cited 2025 Aug 19];32(1):44–8.

195. Massassati A, Frank RM. Scanning electron microscopy of unused and used manual toothbrushes. J Clin Periodontol [Internet]. 1982 [cited 2025 Sep 1];9(2):148–61.

196. Lee HS, Jung HI, Kang SM, Kim HE, Kim BI. Evaluation of the bristle end-rounding patterns of children's toothbrushes using scanning electron microscopy and stereomicroscopy. Int J Dent Hyg. 2017 May 1;15(2):120–7.

197. Nawab A, Ahmad M, Khan MT, Nafees M, Khan I, Ihsanullah I. Human exposure to microplastics: a review on exposure routes and public health impacts. J Hazard Mater Adv [Internet]. 2024 Nov 1 [cited 2025 Sep 1]; 16:100487.

198. Jackson D, Kusnoto J, Tjandrawinata R, Amtha R. The effect of tooth-brushing activity, temperature, and pH to acrylic and composite resin microplastic release. J Int Dent Med Res. 2021;14(4):1394–400.

199. Fang C, Luo Y, Naidu R. Microplastics and nanoplastics analysis: options, imaging, advancements and challenges. TrAC Trends Anal Chem. 2023 Sep 1;166.

200. Shim WJ, Song YK, Hong SH, Jang M. Identification and quantification of microplastics using Nile Red staining. Mar Pollut Bull. 2016 Dec 15;113(1–2):469–76.

201. Rani M, Ducoli S, Depero LE, Prica M, Tubić A, Ademovic Z, et al. A complete guide to extraction methods of microplastics from complex environmental matrices. Molecules [Internet]. 2023 Aug 1 [cited 2025 Sep 1];28(15):5710.

202. Sturm MT, Myers E, Schober D, Korzin A, Schuhen K, Schober D. Development of an inexpensive and comparable microplastic detection method using fluorescent staining with novel Nile Red derivatives. Analytica [Internet]. 2023 Mar 1 [cited 2025 Sep 1];4(1):27–44.

203. Shruti VC, Pérez-Guevara F, Roy PD, Kutralam-Muniasamy G. Analyzing microplastics with Nile Red: emerging trends, challenges, and prospects. J Hazard Mater [Internet]. 2022 Feb 5 [cited 2025 Sep 1];423(Pt B).

204. Meyers N, Catarino AI, Declercq AM, Brenan A, Devriese L, Vandegehuchte M, et al. Microplastic detection and identification by Nile Red staining: towards a semi-automated, cost- and time-effective technique. Sci Total Environ [Internet]. 2022 Jun 1 [cited 2025 Sep 1];823.

205. Aydın S, Ulvi A, Bedük F, Aydın ME. Konya ili tarım topraklarında mikroplastik kirlilik yükünün araştırılması. *Niğde Ömer Halisdemir Univ J Eng Sci* [Internet]. 2025 Jan 15 [cited 2025 Sep 8];14(1):218–33.

206. Godoy V, Martínez-Férez A, Martín-Lara MÁ, Vellido-Pérez JA, Calero M, Blázquez G. Microplastics as vectors of chromium and lead during dynamic simulation of the human gastrointestinal tract. Sustainability [Internet]. 2020 Jun 11 [cited 2025 Sep 1];12(11):4792.

207. Agarwal S, Chakraborty R, Modak J, Manohar B, Panigrahi K, Bhuvaneshwari S. Microbial contamination of toothbrush heads: a comparative study between conventional plastic and bamboo toothbrush – an in vitro pilot study. Adv Hum Biol [Internet]. 2024 Apr [cited 2025 Sep 2];14(2):102–6. Available from: https://www.researchgate.net/publication/378849961_Microbial_Conta

mination_of_Toothbrush_Heads_A_Comparative_Study_between_Conventio nal_Plastic_and_Bamboo_Toothbrush_-_An_In_vitro_Pilot_Study

208. Fageeh HN, Mansoor MA, Fageeh HI, Abdul HN, Mawkili LK, Faris SM, et al. Plaque removal and gingival bleeding using biodegradable toothbrushes: Salvadora persica, bamboo, and nylon: a comparative study. Med Sci Monit [Internet]. 2024 [cited 2025 Sep 2];30: e944469.

209. Van Leeuwen MPC, Van der Weijden FA, Slot DE, Rosema MAM. Toothbrush wear in relation to toothbrushing effectiveness. Int J Dent Hyg [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2025 Sep 2];17(1):77.

210. Ranwa S, Manohar B, Patel R, Shekhawat D. A comparative study on the efficacy of plaque removal using conventional toothbrushes, bamboo toothbrushes, and neem toothbrushes among school-going children. *Int J Clin Pediatr Dent* [Internet]. 2025 Apr 1 [cited 2025 Sep 8];18(4):420–4.

211. Bacterial contamination of the toothbrushes. [Internet]. [cited 2025 Sep 2].

212. Haque MM, Alsareii SA. A review of the therapeutic effects of using miswak (Salvadora persica) on oral health. Saudi Med J. 2015 May;36(5):530–43.

213. Rifaey N, AlAdwani M, Karched M, Baskaradoss JK. A clinical investigation into the efficacy of miswak chewing sticks as an oral hygiene aid: a crossover randomized trial. Int J Dent Hyg. 2021 May 20;19(2):223–30.

214. Bakıcı A, Balcı N, Dönmez MF. Is it possible to avoid microplastics in dentistry? *Turkiye Klin Periodontol Spec Top* [Internet]. 2024 [cited 2025 Sep 8];10(1):45–50.

215. Manohar R, Venkatesan K, Raja S, Ganesh A, Kanakasabapathy BS. Assessment of microbial contamination of a toothbrush head with and without a protective cover: an ex vivo study. Int J Clin Pediatr Dent [Internet]. 2022 Jul 1 [cited 2025 Sep 2];15(4):455.

216. Glass RT. Toothbrush types and retention of microorganisms: how to choose a biologically sound toothbrush. J Okla Dent Assoc. 1992;82(3):26–8.

EKLER

EK-1 ETİK KURUL ONAYI

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
MÜDAHALE OLMAYAN BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Tarihi	07.06.2024	Toplantı Numarası	2024/4	Toplantı Saati	09:30

182- Dr. Öğr. Üyesi Özgür DOĞAN'ın sorumluluğunda yürütülecek olan **"Farklı Tipte Diş Fırçalarının Kullanımına Bağlı Olarak Görülen Mikroplastik Salınımının Değerlendirilmesi: Bir Deneysel Çalışma"** konulu **Müdahale Olmayan** Bilimsel Araştırmalar için başvuru dosyası incelendi. Araştırma protokolüne uyularak, Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Müdahale Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu Yönergesinde belirtilen hususlar yerine getirilmek ve sorumluluk araştırmacılara ait olmak üzere araştırmanın yapılmasında etik sakınca olmadığına toplantıya katılan üyelerin **oy birliği** ile karar verildi.

EK 2 – BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

T.C. AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN
"EBEVEYN" BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Değerli anne ve babalar;

Çocuğunuzun, kliniğimizde yapılması planlanan **"Farklı Tipte Diş Fırçalarının Kullanımına Bağlı Olarak Görülen Mikroplastik Salınımının Değerlendirilmesi: Bir Deneysel Çalışma"** isimli bir çalışmada yer alabilmesi için sizden izin istiyoruz. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır. Çocuğunuzun çalışmaya katılması konusunda karar vermeden önce araştırmanın neden ve nasıl yapıldığını, çocuğunuzla ilgili bilgilerin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neler içerdiğini, olası yararlarını, risklerini ve rahatsızlıklarını bilmeniz önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırın ve bu bilgileri ailenizle, çocuğunuzla ve/veya doktorunuzla tartışın. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma hakkında çocuğunuza da bilgi vereceğiz ve ondan da bu çalışmaya katılımı için izin isteyeceğiz.

Çalışmanın amaçları ve dayanağı nelerdir, çocuğumdan başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

Diş hekimliği alanında görülen bilimsel gelişmeler ışığında yapmış olduğumuz tez çalışmasında çeşitli anti bakteriyel diş fırçalarının kullanımına bağlı olarak bir ay süre sonunda tükürük örnekleri üzerinden ne kadar mikroplastik salınacağına bakılacaktır.
Bu konuyla ilgili daha önceden yapılmış çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaya sizinle 99 kişi daha katılacaktır.

Çocuğum bu çalışmaya katılmalı mı?

Çocuğunuzun bu çalışmada yer alıp almaması tamamen size ve çocuğunuza bağlıdır. Eğer katılmasına izin verirseniz bu yazılı bilgilendirilmiş olur formu imzalanmak için size verilecektir. Şu anda bu formu imzalasanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda çocuğunuzu çalışmadan çekebilirsiniz. Eğer katılmasını istemezseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından çocuğunuz için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çocuğunuzun çalışmaya devam etmesinin yararlı olmayacağına karar verebilir ve onu çalışma dışı bırakabilir.

Çocuğum bu çalışmaya katılırsa onu neler bekliyor?

Çocuğunuza çalışma esnasında 1 aylık kullanım için beş farklı diş fırçasından biri verilecek. Çalışma sonunda tükürük örnekleri toplanacaktır. Tükürük toplama amacımız fırça kullanımına bağlı olarak görülen mikroplastik salınımının tespit edilmesidir. Tükürük örnekleri üzerinde gerekli testler yapıldıktan sonra hangi diş fırçası kullanımından sonra ne kadar mikroplastik salınımı oluyor ona bakılacak.

Çocuğumun ne yapması gerekiyor?

Araştırma ile ilgili olarak çalışma doktorunuzun size söylemiş olduğu vizit tarihlerine/kurallara uymaya istekli olmalısınız.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları nelerdir, çocuğumun görebileceği olası bir zarar durumunda ne yapılacak?

Çalışma boyunca herhangi bir problem olmasını beklememekteyiz. Oral hijyen eğitimi ilk seansta anlatılacak olup tüm sorularınızı bu seansta hekiminize sorabilirsiniz. Ayrıca uygulama süresi boyunca, araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklarınız için Dt. Gözde ÜLKER'e başvurabilirsiniz.

Çalışma hakkında yeni bilgiler elde edilirse ne olacak?

Araştırmaya katılmaya devam etme isteğinizi etkileyebilecek, araştırma konusuyla ilgili yeni bilgiler elde edildiğinde zamanında bilgilendirileceksiniz.

Araştırmadan kendi isteğimiz dışında çıkmamız gerekebilir mi?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada araştırmadan ayrılabilirsiniz; reddetme veya vazgeçme durumunda bile sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır. Araştırıcı, uygulanan tedavi şemasının gereklerini yerine getirmemeniz, çalışma programını aksatmanız veya tedavinin etkinliğini artırmak vb. nedenlerle isteğiniz dışında ancak bilginiz dahilinde sizi araştırmadan çıkarabilir. Bu durumda da sonraki bakımınız garanti altına alınacaktır.

Çocuğumun bu çalışmaya katılmasının maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Çocuğumun kişisel bilgileri nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorunuz çocuğunuz ile ilgili kişisel bilgileri, araştırmayı ve istatiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır. Çalışmanın sonunda, bu bilgiler hakkında bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak çocuğunuzun kimliği açıklanmayacaktır. İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri orijinal tıbbi kayıtlarınıza doğrudan erişebilir. Bu yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunu imzalayarak yalnızca adı geçen kişi ve kurumlara erişim izni vermiş olacaksınız. Ancak kimlik bilgileri gizli tutulacak, kamuoyuna açıklanamayacak; araştırma sonuçlarının yayımlanması halinde dahi kimlik gizli kalacaktır.

Daha fazla bilgi, yardım ve iletişim için kime başvurabilirim?

Çalışma ilacı ile ilgili bir sorununuz olduğunda ya da çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğunuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çocuk Diş hekimliği Anabilim dalında, Dt. Gözde ÜLKER tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum.

Çocuğumun araştırmaya katılması konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer çocuğumun çalışmaya katılmasını reddedersem, bu durumun çocuğumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkime herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden çocuğumu araştırmadan çekebilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorununun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla, çocuğumun söz konusu klinik araştırmaya katılmasını gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Aşağıdaki boşluğa el yazısıyla **'OKUDUM, ANLADIM VE KABUL EDİYORUM'** yazınız.

……

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Tarih:
Velisinin adı- soyadı:
Velisinin imzası:

T.C. AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ÇOCUK HASTALARDA YAPILACAK KLİNİK ARAŞTIRMALAR İÇİN
"HASTA" BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sevgili tatlı hastam,

Benim adım Dt. Gözde ÜLKER. Dişlerinin sağlığı için en güzel diş fırçasını bulmaya çalışıyoruz. Amacımız senin tükürüğünde ne kadar mikrop olup olmadığına bakmaktır. Bize yardımcı olursan bu araştırma ile yeni bilgiler öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmanı öneriyoruz.

Araştırmayı ben ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan sana yeni bir diş fırçası vereceğiz. Senden istediğimiz düzenli dişlerini fırçalaman.
Bu araştırmanın sonuçları senin gibi dişindeki mikropları temizletmeye gelen diğer çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsin, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:
Çocuğun imzası:
Tarih:

Velisinin adı, soyadı:
Velisinin imzası:
Tarih: