



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**PİCEA ORİENTALİS ÖZÜTÜNÜN KAVİTE
DEZENFEKTANİ OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ: İN VİTRO ÇALIŞMA**

Özge MİMİR

UZMANLIK TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SERİN KALAY

TRABZON-2022



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

RESTORATİF DİŞ TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**PİCEA ORİENTALİS ÖZÜTÜNÜN KAVİTE
DEZENFEKTANİ OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ: İN VİTRO ÇALIŞMA**

Özge MİMİR
ORCID:0000-0002-3657-057X

UZMANLIK TEZİ

Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SERİN KALAY
ORCID: 0000-0003-1197-4858

TRABZON-2022

BEYAN

Bu tez çalışmasının Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Hazırlama ve Yazım Kılavuzu standartlarına uygun olarak hazırlanarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kullanılan kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, tezimin Karadeniz Teknik Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TDH-2021-9394 proje kodu ile desteklendiğini beyan ederim.

2022

Özge MİMİR

(İmza)

İthaf

Bu uzmanlık tezimi, benim bu günlere gelmem için hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan ve her zaman yanımda olan sevgili aileme ithaf ediyorum.



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam boyunca mesleki bilgi ve tecrübesiyle her zaman yanımda olan, desteğini ve yardımını esirgemeyen, tez danışmanım değerli hocam Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SERİN KALAY'a ve tez çalışmamda önemli katkıları olan, bilgisini, desteğini ve yardımını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Sevgi KOLAYLI'ya

Uzmanlık eğitimim boyunca üzerimde emeği geçen Doç. Dr. Güneş BULUT EYÜBOĞLU, Dr. Öğr. Üyesi Kıvanç DÜLGER'e

KTÜ Metalurji ve Malzeme Mühendisliği, KTÜ Tıbbi Mikrobiyoloji ve KTÜ Kimya Bölümleri'ne ve desteklerinden dolayı KTÜ Merkezi Araştırma Laboratuvarı, KTÜ Bilimsel Araştırma Projeler Birimi ve Selçuk Üniversitesi Araştırma Laboratuvarı'na

Bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek, tez çalışmamı geliştirecek önemli katkılarda bulunan ve bana alanları ile ilgili her konuda destek olan Ülkü Zeynep ÜREYEN ESERTAŞ, Yakup KARA ve Serhatcan Berk AKÇAY'a

Uzmanlık eğitimim boyunca yanımda olan ve desteklerini hissettiğim başta eşkıdemlilerim Zuhul ATA, İrem Nur ÇAKMAK, İrem GÜRSES ve Leyla DEVLETLİ olmak üzere bölüm arkadaşlarım Pınar NAİBOĞLU, Hatice ERYUVA, Beyza ZAİM, Esmahan OKUR, Fatih YAVUZ, Pelin TÜRKYILMAZ, Ayşenur YAVUZ ve Elif KARAPIÇAK'a

Konya'daki deneylerimde bana destek olan ve kendi tez çalışması kadar ilgilenen sevgili meslektaşım Elif ALTUN'a

Bölüm sekreterlerimiz Nahide KUVVET ve Yeşim YILMAZ AYDIN'a, bölüm personellerimiz Serhat ŞAHİN, Züleyha AKPINAR ve Burak YAZICI'ya

Beni bugünlere getiren ve varlıklarıyla bana güç veren annem Fatma MİMİR, babam Oğuz MİMİR'e

Trabzon'daki hayatımın bana verdiği en güzel hediye olan, sevgisi ve desteği ile her anımı paylaştığım, yol arkadaşım Yasin ÖZGENÇ'e

Teşekkürlerimi sunarım.

Özge MİMİR

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇ KAPAK SAYFASI	
ONAY	
BEYAN	
İthaf	
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER	viii
TABLolar DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xii
RESİMLER DİZİNİ	xiii
KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ	xiv
ÖZET	xv
ABSTRACT	xvii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Diş Çürüğünün Tanımı	3
2.2. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Temel Faktörler	4
2.2.1. Konağa Ait Faktörler	4
2.2.1.1. Diş Yüzeyi ile İlgili Faktörler	4
2.2.1.2. Tükürük ile İlgili Faktörler	5
2.2.2. Beslenmeye Ait Faktörler	6
2.2.3. Mikrobiyal Ekolojiye Ait Faktörler	7
2.2.3.1. Oral Mikrobiyota ve Dental Biyofilmin Tanımı	7
2.2.3.2. Dental Biyofilm Oluşumu	8
2.2.3.3. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Dental Biyofilm Elemanları	9
2.2.3.3.1. Streptokoklar	11
2.2.3.3.1.1. <i>S. mutans</i>	12
2.2.3.3.2. Laktobasiller	13
2.2.3.3.3. Enterokoklar	14
2.2.3.3.3.1. <i>E. faecalis</i>	14

2.2.3.3.4. Stafilokokklar	15
2.2.3.3.4.1. <i>S. aureus</i>	15
2.2.3.3.5. Pseudomonaslar	17
2.2.3.3.5.1. <i>P. auerginosa</i>	17
2.2.3.3.6. Mantarlar	18
2.2.3.3.6.1. <i>C. albicans</i>	18
2.2.4. Zamana Ait Faktörler	18
2.3. Diş Çürüğü Oluşum Mekanizması	19
2.4. Dentine Adezyon ve Adeziv Sistemler	20
2.4.1. Dentinin Yapısal Özellikleri	20
2.4.2. Dentinin Yapısal Özelliklerinin Adezyona Etkisi	21
2.4.3. Smear Tabakasının Adezyona Etkisi	21
2.4.4. Dentin Adeziv Sistemler	22
2.4.4.1. Total Etch Adezivler	23
2.4.4.2. Self Etch Adezivler	25
2.4.4.3. Universal Adezivler	26
2.5. Kavite Dezenfektanları	27
2.5.1. Klorheksidin Glukonat	28
2.5.2. Sodyum Hipoklorit	30
2.5.3. Hidrojen Peroksit	31
2.5.4. Benzalkonyum Klorür	31
2.5.5. İyodin Solüsyonları	32
2.5.6. Fosforik Asit	32
2.5.7. Antibakteriyel Bondingler	33
2.5.8. Ozon	33
2.5.9. Lazerler	34
2.5.10. Doğal Kaynaklı Dezenfektanlar	34
2.5.10.1. <i>Picea Orientalis</i> (Doğu Ladini)	35
2.6. Sekonder Metabolitler	37
2.6.1. Fenoller ve Polifenoller	38
2.6.2. Fenolik Bileşikler İçin Ekstraksiyon Yöntemleri	39
2.6.3. Fenolik Bileşikler İçin Analiz Yöntemleri	41
2.6.3.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	42

2.7. Bitki Ekstraktlarında Antimikrobiyal Etkinlik Test Yöntemleri	43
2.7.1. Dilüsyon Testleri	43
2.7.2. Difüzyon Testleri	44
2.8. Bağlanma Dayanımı Test Yöntemleri	45
2.8.1. Makaslama Bağlanma Dayanımı Testi	46
2.9. Uzun Vadede Bağlanma Dayanımının Değerlendirilmesi	46
2.9.1. Termal Siklus ile Yaşlandırma	47
3. GEREÇ ve YÖNTEM	49
3.1. <i>Picea orientalis</i> Reçine Örnekleri	51
3.1.1. <i>Picea orientalis</i> Reçine Özütlerinin Hazırlanması	51
3.1.2. <i>Picea orientalis</i> Reçine Özütlerinin Analiz Edilmesi	52
3.1.3. <i>Picea orientalis</i> Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti	54
3.1.3.1. Minimum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) ve Minimum Bakterisit Konsantrasyonlarının (MBK) Belirlenmesi	55
3.2. Makaslama Bağlanma Dayanım Testi	55
3.2.1. Dişlerin Seçilmesi ve Hazırlanması	55
3.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması	58
3.2.3. Termal Siklus ile Yaşlandırma İşlemi	62
3.2.4. Makaslama Bağlanma Dayanım Testinin Uygulanması	63
3.2.5. Stero Mikroskop ile Kırılma Yüzeylerinin İncelenmesi	65
3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme	67
4. BULGULAR	68
4.1. <i>Picea orientalis</i> Reçine Özütlerine ait HPLC-DAD Bulguları	68
4.3. <i>Picea orientalis</i> Reçine Özütlerine Ait Agar Difüzyon Test Bulguları	71
4.3. Makaslama Bağlanma Dayanımı Testine Ait Bulgular	75
4.4. Kırılma Tiplerine Ait Bulgular	79
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKLAR	104
EKLER	
EK 1. Etik Kurul Onay Belgesi	
ÖZGEÇMİŞ	

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No		Sayfa
Tablo 1.	Diş çürüğü oluşumunda etkili temel bakteri ve maya türleri alt grupları	10
Tablo 2.	Çalışmada kullanılan materyallerin adı, tipi, kimyasal bileşimi, üretici firması ve seri numaraları	50
Tablo 3.	Restorasyon öncesi kullanılacak kavite dezenfektanına ve uygulanacak yüzey işlemlerine göre çalışma gruplarının oluşturulması ve numaralandırılması	59
Tablo 4	Kırılma tiplerinin belirlenmesinde kullanılan kriterler	66
Tablo 5	<i>Picea orientalis</i> reçine özütlerinin karakteristik özellikleri	70
Tablo 6	Test edilen antimikrobiyal ajanların (50 µl) <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>S. mutans</i> , <i>C. albicans</i> ve <i>C. parapsilosis</i> üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm) ve MİK MBK değerleri	74
Tablo 7	Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama yöntemi ve yaşlandırmanın bağlanma dayanımı üzerindeki ortak etkisinin değerlendirilmesi	76
Tablo 8	Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama yöntemi ve yaşlandırmaya göre bağlanma dayanımının değerlendirilmesi	78
Tablo 9	Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama yöntemi ve yaşlandırmaya göre bağlanma dayanımının değerlendirilmesi	79
Tablo 10	Yaşlandırma ve yüzey hazırlama yöntemlerinin kavite dezenfektanlarına göre kırılma tiplerinin yüzdesel dağılımı	80

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil No		Sayfa
Şekil 1.	Keyes-Jordan Diyagramı	3
Şekil 2.	Artvin <i>Picea orientalis</i> reçine özütü fenolik içerik kromatogramı	69
Şekil 3.	Borçka <i>Picea orientalis</i> reçine özütünün fenolik içerik kromatogramı	69
Şekil 4.	Çaykara <i>Picea orientalis</i> reçine özütünün fenolik içerik kromatogramı	70
Şekil 5.	Yüzey hazırlama yöntemine göre kavite dezenfektanlarının bağlanma dayanım değerleri	78
Şekil 6.	Yaşlandırma ve yüzey hazırlama yöntemlerinin kavite dezenfektanlarına göre kırılma tiplerinin değerlendirilmesi	80

RESİMLER DİZİNİ

Resim No		Sayfa
Resim 1.	%37'lik Fosforik asit jel	49
Resim 2.	Nanohibrit Kompozit Rezin	49
Resim 3.	Dentin bağlayıcı ajan	50
Resim 4.	Klorheksidin solüsyonu	50
Resim 5.	Artvin reçine örnekleri	51
Resim 6.	Borçka reçine örnekleri	51
Resim 7.	Çaykara reçine örnekleri	51
Resim 8.	Reçine özütlerinin son hali	52
Resim 9.	HPLC-DAD Cihazı	54
Resim 10.	Düşük hızlı hassas kesme cihazı	56
Resim 11.	Dişlerin elmas separe ile bukkolingual yönde kesilmesi	56
Resim 12.	Dentin örneğinin elde edilmesi	56
Resim 13.	Plastik kalıp	57
Resim 14.	Akrilik rezine gömülen dentin örneği	57
Resim 15.	180 adet dentin örneği	57
Resim 16.	Plastik kalıp	58
Resim 17.	Restore edilmiş dentin örneği	58
Resim 18.	Örneklere termal yaşlandırma uygulanması	62
Resim 19.	Örneklere termal yaşlandırma uygulanması	62
Resim 20.	Termal yaşlandırma işleminin tamamlanması	62
Resim 21.	Yaşlandırma işlemi sonrası dentin örnekleri	63
Resim 22.	Universal test sistemi	64
Resim 23.	Hazırlanan metal kalıp ve metal uç	64
Resim 24.	Test cihazına yerleştirilen bir örneğin önden ve yandan görünüşü	65
Resim 25.	Test cihazına yerleştirilen bir örneğin önden ve yandan görünüşü	65
Resim 26.	Stereo mikroskop	66
Resim 27.	<i>S. aureus</i> üzerinde inhibisyon zon çaplarına bağlı antibakteriyel etki	75

KISALTMALAR, SİMGELER ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

µm	Mikrometre
mm	Milimetre
nm	Nanometre
MPa	Megapakal
Bis-GMA	Bisfenol A Glisidil Dimetakrilat
UDMA	Uretan Dimetakrilat
HEMA	Hidroksi Etil Metakrilat
Bis-EMA	Etoksilat Bisfenol A Dimetrakrilat
TEGDMA	Trietilen Glikol Dimetakrilat
ISO	Uluslararası Standardizasyon Orgütü
ark.	Arkadaşları
MMP	Matriks Metalloproteinaz
dk	Dakika
<	Küçük
>	Büyük
°C	Santigrat Derece
mm²	Milimetre Kare
pH	Hidrojen gücü
S. mutans	Streptococcus mutans
E. faecalis	Enterococcus faecalis
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
S. aureus	Staphylococcus aureus
P. orientalis	Picea orientalis
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
NaOCl	Sodyum hipoklorit
H₂O₂	Hidrojen peroksit
MDPB	12-methacryloyloxylododecylpyridiniumbromide
LED	Light Emitting Diode
DMADDM	Dimetilaminododesil metakrilat

ppm	Milyonda bir (Parts per million)
ml	Mililitre
lt	Litre
sn	Saniye
p	İstatistiksel anlamlılık
HPLC	High-performance liquid chromatography
DAD	Diode array detector
OH⁻	Hidroksil iyonu
F⁻	Flor iyonu
PO₄⁻³	Fosfat iyonu
CO₃⁻²	Karbonat iyonu
IgA	İmmünoglobulin A
%	Yüzde
DNA	Deoksiribo nükleik asit
MS	Mitis Salivarius Agar
TYC	Triptikaz Maya Sistin Agar
MRS	Man-Ragosa-Sharp agarı
L. acidophilus	Lactobacillus acidophilus
L. casei	Lactobacillus casei
E. faecium	Enterococcus faecium
HIV	Human Immunodeficiency Virus
P. maltophilia	Pseudomonas maltophilia
KOAH	Kronik obstrüktif akciğer hastalığı
EPS	Hücre dışı polimerik madde
C. albicans	Candida albicans
C. parapsilosis	Candida parapsilosis
Ca	Kalsiyum
SEM	Scanning electron microscope
10-MDP	10-Metakriloiloksidesil dihidrojen fosfat
5-NMSA	N-metakriloil 5-aminosalisilik asit
O₃	Ozon
CO₂	Karbondioksit
ER:YAG	Erbiyum: yitriyum alüminyum garnet

S. sobrinus	Streptococcus sobrinus
TLC	Taban kromatografisi
GC	Gaz kromatografisi
4-AAP	4-aminoantipirin
UV	Ultraviyole
MS	Kütle spektrometrisi
FLD	Floresans
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CFU	Colony-forming unit
MIK	Minimal inhibisyon konsantrasyonu
MBK	Mimal bakterisidal konsantrasyon
HCl	Hidroklorik asit
TP	Toplam fenolik içerik
TF	Toplam flavonoid içerik
FRAP	Demir (III) indirgeme-antioksidan güç
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
mg	Miligram
QE	Kuarsetin eşdeğeri
GAE	Gallik asit eşdeğeri
mM	Milimolar
MHA	Müeller Hinton Agar
PDA	Potato Dextrose agar
PBS	Phosphate buffered saline
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
nm	Nanometre

ÖZET

***Picea orientalis* Özütünün Kavite Dezenfektanı Olarak Değerlendirilmesi: In Vitro Çalışma**

Amaç: Bu çalışmada *Picea orientalis* reçine özütünün kimyasal analizinin yapılması, sahip olduğu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi ve dentine bağlanma dayanımının tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

Gereç ve Yöntem: *Picea orientalis* reçineleri etanol ile çözelti haline getirildi ve HPLC-DAD metodu ile kimyasal analizi yapıldı. Sonrasında seçilen oral bakteriler üzerinde agar difüzyon test metodu ile antimikrobiyal aktivitesi tespit edildi. Bağlanma dayanım testi için hazırlanan 180 dentin örneği, bir tanesi kontrol grubu olmak üzere, kullanılacak farklı kavite dezenfektanlarına [Klorheksidin glukonat (Ceraxidin-C, Imicryl) ve *Picea orientalis* reçine özütü] göre rastgele 3 gruba ayrıldı. Her grup için atanan dentin örnekleri aynı universal adeziv sistem (Single Bond Universal, 3M ESPE) farklı yüzey hazırlama yöntemlerine uygun olarak kullanılacak şekilde (self etch/etch&rinse) 2 alt gruba daha ayrıldı. Tüm gruplar aynı kompozit sistem ile (Estelite Sigma Quick, Tokuyama Dental), çapı 3 mm yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp kullanılarak restore edildi. Daha sonra grupların yarısı; kısa ve uzun süreli bağlanma dayanımının incelenmesi için yaşlandırma işlemine tabi tutuldu.

Bulgular: Reçine özütlerinin kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asit içeriği yüksek bulundu. Özütler *S. aureus* üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite gösterdi. Tüm deney gruplarında yaşlandırılmamış örneklerin bağlanma dayanımı, yaşlandırılmış örneklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p:0.000$; $p>0.05$). Yaşlandırılmamış örneklerde kontrol grubunun bağlanma dayanımı, klorheksidin ($p:0.000$) ve *Picea orientalis* reçine özütü ($p:0.000$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunarak ($p<0.05$) en yüksek bağlanma değeri elde edildi. Tüm deney gruplarında klorheksidin ve *Picea orientalis* reçine özütü arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı ($p>0.05$).

Sonuç: Reçine özütleri zengin fenolik yüksek antioksidan kapasiteye sahiptir ve en yüksek antimikrobiyal aktivite *S. aureus* üzerinde bulunmaktadır. Reçine özütlerinin dezenfektan olarak kullanılması bağlanma değerlerini olumsuz etkilememektedir. Yaşlandırma işlemi bağlanma değerlerini düşürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Antimikrobiyal, bağlanma dayanımı, fenolik asit, flavonoid, *Picea orientalis*, reçine, yaşlandırma

ABSTRACT

Evaluation of *Picea orientalis* Extract as a Cavity Disinfectant: In Vitro Study

Objective: In this study, it is aimed to make chemical analysis of *Picea orientalis* resin extract, to determine its antimicrobial activity and to determine its bond strength to dentin.

Materials and Methods: *Picea orientalis* resins were dissolved with ethanol and their chemical analysis was done by HPLC-DAD method. Afterwards, antimicrobial activity was determined on selected oral bacteria by agar diffusion test method. 180 dentin samples prepared for bond strength test were randomly divided into 3 groups, one of which was the control group, according to the different cavity disinfectants [Chlorhexidine gluconate (Ceraxidin-C, Imicryl) and *Picea orientalis* resin extract] to be used. The dentin samples assigned to each group were divided into 2 more subgroups, using the same universal adhesive system (Single Bond Universal, 3M ESPE) in accordance with different surface preparation methods (self etch/etch&rinse). All groups were restored with the same composite system (Estelite Sigma Quick, Tokuyama Dental) using a clear plastic mold with a diameter of 3 mm and a height of 4 mm. Then half of the groups; It was subjected to aging process to examine the short and long term bond strength.

Results: Caffeic acid, ferulic acid and t-cinnamic acid contents of resin extracts were found to be high. The extracts showed high antimicrobial activity on *S. aureus*. Bond strength of unaged samples was statistically significantly higher than aged samples in all experimental groups ($p:0.000$; $p>0.05$). In the unaged samples, the bond strength of the control group was found to be significantly higher than that of the chlorhexidine ($p:0.000$) and *Picea orientalis* resin extract ($p:0.000$) groups, and the highest binding value was obtained ($p<0.05$). There was no significant difference between Chlorhexidine and *Picea orientalis* resin extract in all experimental groups ($p>0.05$).

Conclusion: Resin extracts have rich phenolic and high antioxidant capacity and the highest antimicrobial activity is found on *S. aureus*. The use of resin extracts as a disinfectant does not adversely affect the binding values. The aging process decreases the binding values.

Keywords: Aging, antimicrobial, bond strength, flavonoid, phenolic acid, *Picea orientalis*, resin

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Bir dental restorasyonun başarısı preparasyondan sonra smear tabakasında, kavite duvarlarında, dentin kanallarında kalan mikroorganizmaların ve toksinlerinin; pulpa inflamasyonuna ve sekonder çürüğe yol açmamasına bağlıdır. Bu nedenle, kavitenin dezenfeksiyonu için antimikrobiyal ajanların kullanılması önerilmektedir.

Klorheksidin geniş spektrumlu antibakteriyel etkisi ile oral florada dezenfektan olarak kullanımda altın standarttır. Fakat mevcut kavite dezenfektanlarının yan etkileri ve antimikrobiallere karşı gelişen direnç mekanizmaları nedeniyle doğal ürünlere karşı ilgi her geçen gün artmaktadır. Bu amaçla bitkisel ürünler mikrobiyolojik ve farmakolojik yönlerden çok yönlü araştırılmaktadır.

Karadeniz Bölgesi'nde yaygın bulunan *Picea orientalis* kozalağı ve kabuklarından elde edilen ekstratlarla, yapraklarından ve dallarından elde edilen uçucu yağlarla yapılmış olan birçok çalışmada; antimikrobiyal, antioksidan, antiradikal özellikler tespit edilmiştir. Bu özellikler düşünüldüğünde, halk tıbbında oral sağlık, iltihap ve yara iyileşmesi, mide rahatsızlıkları ve ülser tedavisinde kullanılan reçinesinden elde edilebilecek bir özütün alternatif bir kavite dezenfektanı olabileceği fikri ortaya çıkmaktadır. *Picea orientalis* üzerinde az sayıda biyolojik aktivite ve fitokimyasal araştırma olmasıyla birlikte, reçinesinden elde edilen bir özütün dental patojen bakteriler üzerindeki etkisini inceleyen çalışma sayısı yok denecek kadar azdır.

Doğal bir ürünün sağladığı faydaların ortaya çıkarılabilmesi için fitobileşenlerinin incelenmesi gerekmektedir. Reçine gibi katı halde incelenemeyecek materyallerde ekstraksiyon yöntemleriyle inceleme yapılabilmesi için özüt hazırlanması gerekmektedir. Çeşitli kromatografi yöntemleri kullanılarak reçineler içerisinde sekonder metabolitler olarak ifade edilen fenolik bileşikler, flavonoidler, terpenler, alkaloidler, reçine asitleri ve lignan bileşikler tespit edilebilmektedir. Tespit edilen içeriğin antimikrobiyal aktivitesinin belirlenmesi kavite dezenfektanı olarak kullanımını belirleyebilecek en önemli parametredir. Oral mukoza ve çürük patojenleri üzerinde etkili olması beklenen antimikrobiyal dezenfektan adayı ajanın dilüsyon ve difüzyon testlerine tabi tutularak aktivite gösterdiği bakteriyel suşların tespiti mümkündür.

Dental restorasyonların öncesinde kullanılacak antimikrobiyal bir materyalin, adeziv hibrit tabakasında degradasyonu tetiklememesi ve bağlanma dayanım değerlerinde negatif etki yaratmaması beklenmektedir. Ağız ortamının nemli bir yapıya sahip olması sebebiyle, kompozit rezinlerin bağlanma dayanımında meydana gelebilecek değişimlerin yaşlandırma işlemi ile değerlendirilmesi uygun bir yoldur. İn vitro deneylerde restorasyonların yaşlandırılması işlemi, ağız koşullarını laboratuvar ortamına yansıtan ve intraoral koşulların materyallerde uzun dönemde oluşturduğu değişiklikleri taklit ederek bağlanma dayanımı hakkında bilgi verebilen önemli bir yöntemdir.

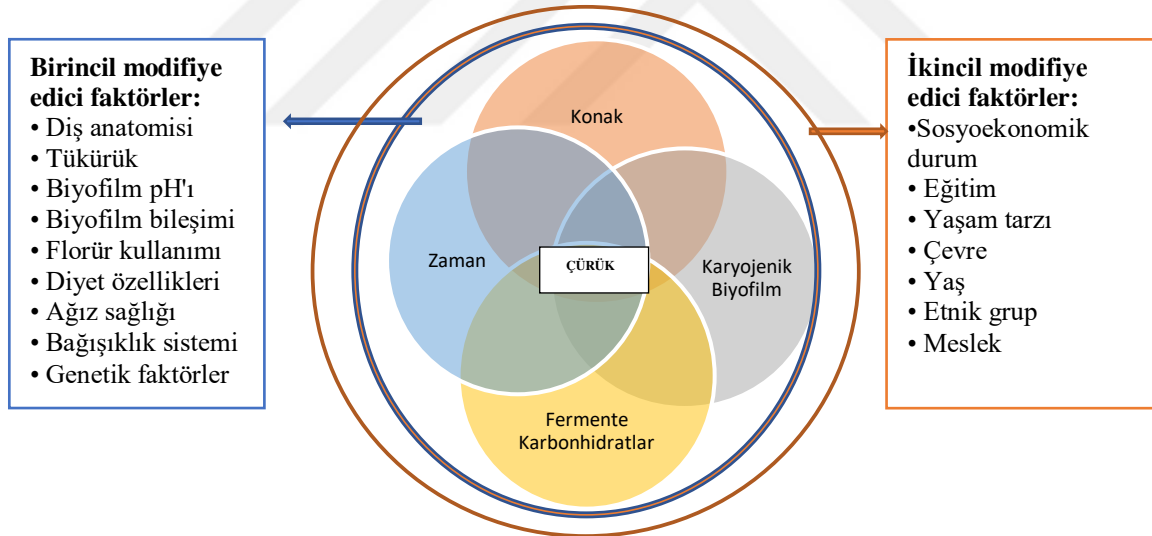
Bu çalışmanın amacı daha önce oral patojenler üzerinde test edilmemiş *Picea orientalis* reçinesinin yapılan kimyasal analiz yöntemleri ile sekonder metabolit içeriğinin ortaya konması, sahip olduğu antimikrobiyal aktivitenin ve etkili olduğu oral patojenlerin tespit edilmesi ve dental restorasyonlar öncesi kullanımında bağlantı dayanımında yaratacağı sonuçların belirlenmesidir. Bu çalışmadan sonra elde edilen bulgulara göre *Picea orientalis* reçinesine ait kimyasal içerik ve antimikrobiyal aktivitenin rapor edilmesine ilaveten restorasyonlardaki başarının anahtarı olan bağlanma dayanım etkisinin de ortaya konması ile dental literatüre katkıda bulunulması hedeflenmektedir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Diş Çürüğünün Tanımı

Diş çürüğü, diyetle alınan karbonhidratların bakteriyel fermantasyonu sonucu oluşan asidik yan ürünlerinin yarattığı uzun süreli düşük pH periyotları ile tetiklenen ve mikrobiyal dengenin asidofolik bakterilere kaymasıyla diş sert dokularında lokalize mineral kaybına sebep olan enfeksiyöz bir hastalıktır (1).

Diş çürüğünün etiyolojisinde rol oynayan birçok faktör bulunmaktadır. Bu faktörler içerisinde konak, fermente edilen karbonhidratlar, karyojenik biyofilm ve zaman temel unsurlardır ve herhangi birinin eksikliğinde çürük oluşmamaktadır. Temel faktörlerin mevcut olduğu durumlarda dahi, çürük oluşum sürecini çeşitli modifiye edici risk faktörleri ve koruyucu faktörler belirlemektedir. Bu faktörlerin etkileşimi, klasik Keyes-Jordan diyagramı ile gösterilmiştir (Şekil 1) (2).



Şekil 1. Keyes-Jordan Diyagramı (Keyes'den, (2))

2.2. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Temel Faktörler

2.2.1. Konağa Ait Faktörler

2.2.1.1. Diş Yüzeyi İle İlgili Faktörler

Bir dişin tüm yüzeylerini incelediğimizde pit ve fissürler, fasiyal ve lingual yüzdeki proksimal temas noktaları, klinik kronun diş eti üçte birlik kısmındaki pürüzsüz mine yüzeyleri, servikal çizgiye yakın kök yüzeyleri ve subgingival alanlar zor morfolojileri sebebiyle çürük oluşumun en çok görüldüğü yerler olarak karşımıza çıkmaktadır. Dişin boyutu, tüberkül eğimi, defektler, opasiteler ve mine yüzeyinin pürüzlülüğü çürük oluşumunu kolaylaştıran bir diğer fiziksel özelliklerdendir. Bahsedilen bu bölgelerde karyojenik diyet, zayıf ağız hijyeni gibi patojenik biyofilmi barındırmak için elverişli koşullar da oluştuğunda tükürükten gelecek koruyucu faktörlerin ulaşımı sınırlanmakta ve diş çürüğü oluşumu kaçınılmaz hale gelmektedir (3).

Yeni süren dişlerin mineralizasyonunu henüz tamamlamadığından geçirgenlik özelliği fazladır. Sürmeyi takip eden iki yıl içerisinde diş olgunlaşması tamamlanır ve geçirgenlik azalır. Bu dönemde yeni sürmüş dişler çürüğe karşı daha korunmasızdır. Mine gelişim döneminde mineralizasyonunun az olması sebebiyle meydana gelen lokal hipoplazili turner dişler pürüzlü bir yüzeye sahip olduğundan plak retansiyonunu kolaylaştırmakta ve çürük oluşumunu hızlandırmaktadır (4).

Mine tabakasını oluşturan hidroksiapatit kristallerinin yapısı, biçimi ve konumu çürük oluşumunu belirleyen inorganik faktörlerdendir. Ağız koşullarında herhangi bir yapıya bağlı olmadan var olan negatif yüklü iyonlardan flor ve karbonat, hidroksiapatit kristallerinin yapısına katılarak minenin asit ortamdaki çözünürlüğünü etkilemektedir. Apatit formülasyonuna ait hidroksil iyonlarının (OH^-) ait olduğu bölgeye flor iyonlarının (F^-) gelmesiyle beraber meydana gelen florapatit yapısının pH değerinin düşük olduğu koşullarda çözünmeye karşı direnci hidroksiapatitten fazladır. Fakat apatit formülasyonunda bulunan fosfat iyonlarının (PO_4^{3-}) ait olduğu bölgeye karbonat iyonlarının (CO_3^{2-}) gelmesi sonucu oluşan karbonatlı apatit yapısının çözünmeye karşı direnci hidroksiapatitten azdır. Fluorozise bağlı lekeli mine ise genellikle çürüğe dirençli olarak bilinse de yüzey pürüzlülüğünün şiddeti fazlaysa bakteri tutulumunu kolaylaştıracaktır (5).

Ortodontik apareyler, protezler ve hatalı restorasyonlar da mikroorganizma tutulumunu teşvik ederek belirli diş bölgelerinde çürük duyarlılığını artırabilmektedir (6).

2.2.1.2. Tükürük İle İlgili Faktörler

Tükürük sıvısı; %90'ı sublingual, submandibular ve parotis olmak üzere büyük tükürük bezlerinin ve %10'u oral mukozadaki küçük tükürük bezlerinin salgıladığı ve gingival oluk sıvısının da dahil olduğu kompleks bir sekresyondur. Tükürüğün %99'u su, %1'den azı elektrolit ve proteinler gibi bileşimleri içerir (7).

Tükürüğün görevleri göz önüne alındığında; biriken debris ve şekerin yıkayıcı etki ile temizlenmesi, mikroorganizmaların toplanması ve ortadan kaldırılması, antimikrobiyal savunmada rol oynaması, asidin tamponlama kapasitesi ile nötralize edilmesi, diş mineraline göre aşırı doygunluğun sürdürülmesi, deminerilizasyon sırasında asit ataklarını yavaşlatan mine pelikülünün yapısını oluşturması gibi çeşitli mekanizmaları sayesinde dişleri çürük oluşumuna karşı korumaktadır (8). Her görev birkaç tükürük bileşenini içermekte ve bazı tükürük bileşenleri birden fazla göreve katkıda bulunmaktadır. Görevlere göre tükürük bileşenleri incelendiğinde; lizozim, laktoperoksidaz, laktoferrin, musin, sistatin, histatin, aglutinin, immünoglobulinler (IgA) antimikrobiyal mekanizmadan sorumludur. Mukozanın devamlılığını sağlamakta su, musin ve elektrolitler görevli iken kayganlaşma ve viskoelastisite görevinde musin, glikoproteinler ve su bulunmaktadır. Tamponlama kapasitesi ve remineralizasyondan bikarbonat, fosfat, kalsiyum ve floritler sorumludur (9).

Tükürüğün mikrobiyal bileşimi, çeşitli oral nişlerden dökülen mikroorganizmaları içerir. Bu nedenle tükürük, oral mikrobiyotanın bir rezervuarı ve ayrıca tüm oral mikrobiyotanın parmak izi olarak kabul edilir. Bu sebeple çeşitli kaynaklarca ağız mikrobiyomunun temsilcisi olan tükürük, oral biyofilm tarafından bir dağıtım sistemi olarak kullanılmaktadır. Tükürük sıvısı; mikroorganizmaların aktivitesi için gerekli olan diyetdeki peptit ve karbonhidrat oranına göre oral mikrobiyotanın kalitesini ve miktarını büyük ölçüde belirleyen bileşiklerin tümünü içermesi ile çürük sürecinde yer alan diğer temel üç faktörün (mikroorganizmalar, diyet ve konak duyarlılığı) izlenmesi için benzersiz bir ortam görevini üstlenmektedir (10).

Diş çürüğü oluşum süreci incelendiğinde, en önemli parametrelerden birinin tükürük akış hızı olduğu görülmektedir. Tamponlama ve temizleme gibi tükürük fonksiyonlarının karyostatik aktivite üzerindeki etkinliği tükürük akış hızına bağlıdır (11).

Tükürük tampon sistemi, uygun asit-baz dengesini sağlamakla görevlidir. Tükürük tampon sistemi, diş plağının düşük pH'ını tersine çevirebilmekte ve çürük oluşumunu başlatan mine demineralizasyonunu önleyebilmektedir. Tamponlama kapasitesi sayesinde

tükürük; demineralizasyonu kontrol altına alarak, mine remineralizasyonunu teşvik etmekte ve diş erozyonuna karşı ana korumayı sağlayarak diş bütünlüğünü korumaktadır. Tükürük, tüm bu faktörlere bakılarak karyojenik yolun hızını ve yönünü kontrol etmesi sebebiyle en önemli konak faktörlerinden biridir (9).

2.2.2. Beslenmeye Ait Faktörler

Gıdalar yağlar, proteinler ve karbonhidratlar olarak temelde üç ana grupta toplanmaktadır. Yağ grubu, besin maddelerine kayganlık kazandırarak diş yüzeyine olan tutulumunu azaltmakta, bu da onları çürüğe doğrudan etkili bir faktör olmaktan uzaklaştırmaktadır. Protein grubu ise son ürününün bazik olması sebebiyle asit ortamı nötr hale getirmekte ve çürük önleyici bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır. Dolayısıyla bu iki grup çürük oluşumunu önleyici yönleri sayesinde, kariyostatik yani çürük oluşumunu durduran şeklinde tanımlanmaktadır. Diş çürüğünün, ağırlıklı olarak fermente olabilen karbonhidrat tüketimi ve mikroorganizmaların asit üretmesi sonucu tetiklendiği görülmüştür. (12).

Karbonhidrat grubu; glikoz, fruktoz, galaktoz üçlüsünden oluşan monosakkaritler, sükroz, laktoz, maltoz üçlüsünden oluşan disakkaritler ve polisakkaritlerden oluşmaktadır. Monosakkarit ve disakkarit grubu küçük molekül yapısı sayesinde dental plak içerisine girebilmekte ve fermente edilerek organik asit oluşumuna sebep olmaktadır. Bunların içerisinde sofraya şekeri olarak bilinen sükroz ise beslenme ile alınan şekerin temelini oluşturmaktadır (6). Sükroz gibi fermente olabilen karbonhidratlara sıklıkla maruz kalma patojenik biyofilm gelişiminde öncü bir rol oynamakta ve dental biyofilmin sağlıklı ekolojisinin bozularak dengenin asidojenik bakteriler yönünde kaymasına sebep olmaktadır. Bunun sebebi sükrozun biyofilmi viskoz ve yapışkan hale getirmesi ile hücre dışı polisakkaritlerin oluşumuna yol açmasıdır.

Asidin tükürük bileşenleri tarafından tamponlanamadığı, kritik pH değerini 5,5'in altına düşüren yiyecekler karyojenik olarak adlandırılmakta ve karyojenik diyetin nihai metabolik ürünü asit olduğundan, sükroz gibi asit üretimine sebep olabilecek tüm alımların beslenme faktöründe rol oynayabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (3).

Karbonhidrat alımının miktarından ziyade türü, fiziksel özellikleri ve en önemlisi sıklığının çürük oluşum riski yarattığına dair deneysel kanıtlar bulunmaktadır. Plağa ait pH değeri normal koşullarda nötr olarak tanımlanmaktadır. Alınan karbonhidrat fermente olabiliyorsa pH kritik seviyenin altında bir değere, yaklaşık 5.0 civarında bir düşüş

göstererek 20 dakika bu seviyede kalmakta ve aşamalı bir şekilde eski seviyesine dönmektedir. Karbonhidrat alım sıklığının artması, plak pH değerinde tekrarlayan bu düşüşleri yaratmaktadır. Bu olayları takiben diş ve plak arasında fazlaca asit atağı meydana gelmekte, diş yüzeyinde mineral kaybı oluşmaktadır (13).

2.2.3. Mikrobiyal Ekolojiye Ait Faktörler

Ağızdaki sert (mine ve diş kökü) ve yumuşak (mukozal, dil dorsumu) doku yüzeyleri, belirgin şekilde farklı yapısal ve çevresel parametrelere göre mikroorganizmalar için çeşitli mikro yaşam alanlarını yani habitatları oluşturmaktadır. Mikrobiyal ekoloji kavramı farklı habitatlara göre değişen oral mikroorganizma topluluklarının biyolojisini içermekte ve çürük oluşum sürecindeki etkilerini açıklamaktadır (14).

2.2.3.1. Oral Mikrobiyota ve Dental Biyofilmin Tanımı

Oral mikrobiyom, ağız ortamındaki tüm mikroorganizmaların ve genomlarının toplamını ifade eden geniş bir tanımlamadır. Oral mikrobiyota ise bakteri, arke, mantar, mikoplazma, protozoa ve viral floranın da dahil olduğu mikroorganizmalar ve bunların yaşadığı diş, diş eti, dil, yanak, sert ve yumuşak damak gibi çeşitli habitatlar ve çevresel ilişkilerine odaklanan bir kavramdır. Bakteriler bu oral mikrobiyota içerisinde açık ara farkla en baskın olarak bulunan organizma grubudur (15).

Bir kişinin yaşamı boyunca tükürük düzenleyici mekanizmaları aracılığıyla konak ve oral mikrobiyal topluluk arasında homeostatik denge korunmaktadır. Bununla birlikte, çürük, periodontal hastalık ve oral kandidiyazis gibi başlıca oral enfeksiyon hastalıkları, oral mikrobiyotanın disbiyozu tarafından indüklenmektedir (16).

Dental biyofilmler, birçok ağız hastalığı ile ilişkilendirilen, çeşitli oral mikroorganizmaların bulunduğu karmaşık ekolojik ortamlardır. Dental plak, bakteri popülasyonlarının fizyolojik olarak farklı ortamlarda ayrı mikro koloniler olarak var olduğu çok yönlü bir biyofilm topluluğu olarak tanımlanan ilk biyofilm örneklerindendir. İnsan ağız boşluğundan 700'den fazla bakteri türü izole edilmiştir ve bunların çoğu dental biyofilm ile ilişkilidir (1).

2.2.3.2. Dental Biyofilm Oluşumu

Dental biyofilm oluşum adımları incelendiğinde, kısaca altı aşamada ifade edilmektedir. Bu aşamalar:

1. Asosiasyon: Dental pelikül ile birlikte bakteriler için tutunacak bir yüzey alanı oluşturulması
2. Adezyon: Saatler içerisinde erken kolonize olan bakterilerin pelikula gevşek bir şekilde bağlanması
3. Proliferasyon: Bakterilerin ağız ortamına yayılması ve çoğalması
4. Mikrokoloni oluşumu: Erken kolonize olan streptokoklar tarafından geç kolonize olacak bakterilerin tutunabilmesi için slime tabaka salgılanması
5. Biyofilm: Metabolik avantajlara sahip karmaşık gruplardan mikrokolonilerin bir araya gelmesi
6. Olgunlaşma: Biyofilm ilkel bir dolaşım sistemi geliştirmesidir (14).

Bahsedilen aşamalar detaylı bir şekilde incelendiğinde, biyofilm oluşumunun mikroorganizmaların tutunabilmeleri için tükürük proteinlerinin dış yüzeyine yerleşmesi ve pelikül adı verilen proteinsel örtü tabakasını oluşturması ile başladığı görülmektedir. Bu örtü bağlanma yüzeyi sağlayarak bakteri kolonizasyonunda önemli bir rolü üstlenmektedir. (17). *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis* ve *Streptococcus sanguinis* gibi erken kolonize olan bakteriler; yüzey adhezinleri aracılığıyla tamamlayıcı tükürük reseptörlerine spesifik olarak bağlanmaktadır (18). Bu sayede hücre dışı polisakkaritler, yapısal proteinler, hücre fragmanları ve nükleik asitler daha sonra hücre dışı polimerik madde (EPS) oluşumu sağlanmaktadır. Sonuç olarak, gıda ve tükürükteki çeşitli mikroorganizmalar, EPS, proteinler ve lipidlerin yanı sıra kanal sistemlerinden oluşan üç boyutlu bir ekosistem olan dental biyofilm oluşmaya başlamaktadır (19). Bu erken kolonize bakteriler çoğalmakta ve yerel çevre koşullarını değiştirerek bölgeyi zorunlu anaeroblar gibi daha zor türlerin kolonizasyonu için uygun hale getirmektedir. Bu durum karmaşık dental plak biyofilmin temel katmanlarını oluşturmaktadır (20).

Güçlü ve kapsamlı yapışma kabiliyeti nedeniyle, *Fusobacterium nucleatum* oral mikrobiyotanın diğer üyeleriyle karşılıklı bağımlı ilişkiler kurarak erken ve geç dönem bakteri kolonizatörleri arasında köprü rolü oynamaktadır. *Fusobacterium nucleatum* yüzey dışı zar proteinlerine sahiptir. Bu proteinler sayesinde *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus gordonii* ve *Streptococcus mutans* ve hatta *Candida albicans* gibi Gram

pozitif bakteriler tarafından kolonizasyona aracılık edebilmektedir. Aynı zamanda sahip olduğu farklı yapıdaki yüzey dışı proteinleri sayesinde oral streptokoklar ve ilgili Gram pozitif türler ile etkileşimlerine de katılmaktadır (21). *Fusobacterium nucleatum* bu sayede farklı oral mikroorganizmalar arasındaki etkileşimi ve ayrıca oral biyofilm oluşumunu da etkilemektedir. *Corynebacterium* ve *Veillonella*'nın ayrıca oral biyofilm gelişiminde köprü rolü oynadığı doğrulanmıştır (22).

Biyofilm olgunlaşmasında, ana bakteriler erken aşamada *Streptococcus* yerine *Capnocytophaga*, *Fusobacterium*, *Porphyromonas* ve *Prevotella* ve özellikle *Actinomyces* gibi anaeroblara doğru değişmektedir (23). Olgun biyofilm döneminde, bakteri sayısında önemli bir değişiklik olmasa da yavaş yavaş, mikrobiyotanın bu üyeleri en iyi biyokimyasal koşulları sağlayan mısır koçanları, çitler ve test tüpleri gibi karmaşık çok türlü yapıları oluşturmaktadır (24).

2.2.3.3. Diş Çürüğü Oluşumunda Etkili Dental Biyofilm Elemanları

Dental biyofilmin bileşimi fakültatif veya zorunlu anaerob olan bir dizi Gram pozitif ve Gram negatif bakteri içermektedir (9). Çürük oluşumunda etkili olan temel bakteri ve maya türleri alt gruplarıyla birlikte Tablo 1’de gösterilmektedir (14).

Tablo 1: Diş çürüğü oluşumunda etkili temel bakteri ve maya türleri alt grupları [Yadav ve ark. (14)]

Gram pozitif koklar	<i>Streptococcus mutans</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>S. intermedius</i> , <i>S. vestibularis</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Atopobium</i> spp <i>Peptostreptococcus</i> spp <i>Enterococcus faecalis</i>
Gram pozitif çubuklar	<i>Actinomyces odontolyticus</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>A. viscosus</i> , <i>A. israelii</i> <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>L. acidophilus</i> <i>Bifidobacterium dentium</i> <i>Propionibacterium</i> spp
Gram negatif koklar	<i>Veillonella parvula</i> <i>Neisseria</i> spp
Gram negatif çubuklar	<i>Bacteriodes denticola</i> , <i>B. melaninogenicus</i> <i>Fusobacterium necrophorum</i> , <i>F. mortiferum</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Klebsiella pneumonia</i> <i>Enterobacter aerogens</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Pseudomonas</i> spp <i>Haemophilus</i> spp <i>Prevotella</i> spp <i>Leptotrichia</i> spp
Mantarlar	<i>Candida albicans</i> , <i>C. tropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> .

Mutans streptococci grubuna ait iki türden olan *Streptococcus mutans* ve *Streptococcus sobrinus*, mine çürüklerinin başlıca bakterileridir. *Lactobacillus* derin dentin çürüklerinde *Actinomyces* ise kök yüzeyi çürüklerinde sıklıkla izole edilmektedir. Mantarların asit üretimi özellikleri göz önünde bulundurulduğunda çürük oluşum sürecinde önemli bir rol oynayabileceği düşünülmektedir. Çürük lezyonunda saptanan diğer önemli türler arasında, insanlarda beyaz nokta lezyonlarından izole edilmiş bir grup düşük pH'lı asidik izolat olan *Streptococcus mitis*, *Bifidobacterium* ve *Actinomyces* de bulunmaktadır (25).

2.2.3.3.1. Streptokoklar

Bu bakteri grubunun keşfi Billroth tarafından 1874’de, iltihap örneklerinde zincir yapan kokların tespit edilerek *Streptococcus* olarak isimlendirilmesi ile başlamaktadır. Clark 1924 yılında diş çürük dokusundan *S. mutans* elde ederek bu bakterinin önemini vurgulamıştır.

Streptokoklar oval-yuvarlak şekilli, kısa veya uzun zincirler oluşturarak üreyen gram pozitif, katalaz negatif aerob ve fakültatif anaerob mikroorganizmalardır. Streptokok zincirlerinin 2-12 veya daha fazla koktan meydana geldiği görülmektedir (17). Streptokok türleri genellikle hareketsiz, yüzey fibrillerine sahip bakterilerdir. Bazı türlerinde kapsüle de rastlanmaktadır. Spor oluşturmeyen bu bakteriler anilin boyaları ile kolay boyanmaktadır (15).

Streptokoklar koyun veya at kanı, serum ve glikozla zenginleştirilmiş besiyerinde kolaylıkla üreyebilmektedir. Katı besiyerinde üremede ise mat, mükoid veya parlak koloniler oluşturmaktadırlar. Bu bakterilerin optimal üreme ısısı 35-37° C ve uygun pH değeri 7.4-7.6 olarak belirtilmektedir. Streptokoklar, genellikle ısıya dirençsiz olan mikroorganizmalardır ve 30 dakikada 56° C’de ölmektedir. Ayrıca dezenfektan ve antiseptikler karşısında dirençsiz bakterilerdendir (17).

Oral streptokoklar, esas olarak dil kökü, yumuşak damak, bademcik ve yutak bölgelerinin birleşimi olarak adlandırılan orofarenkste bulunsa da ana yerleşim bölgesi ağızdır. Diyet ve plak oluşum aşamalarından bağımsız dental mikrofloradaki en baskın mikroorganizmalardır. Yeni oluşan plakta toplam kolonilerin % 50’sinin streptokoklardan oluştuğu görülmüştür (26).

Biyokimyasal özellikler, seroloji ve genetik analiz, streptokokların türler halinde gruplanmasını sağlamaktadır. Tür düzeyinde tanımlama; birçok oral streptokokun doğal olarak dönüştürülebilir olması ve birbirleriyle kolayca DNA alışverişi yapması nedeniyle karmaşıktır. Kapsamlı rekombinasyonlar, gen analizinden doğru bir şekilde tanımlanması zor olan bulanık türlere yol açabilmektedir. Bahsedilen tekniğin sınırlamalarının üstesinden gelmek için, streptokoklara özel çok bölgeli dizi analiz şeması geliştirilmiştir. Bu yöntem kullanılarak oral streptokoklar dört grup (*mitis*, *anginosus*, *salivarius* ve *mutans*) içerisinde toplanmaktadır (27).

2.2.3.3.1.1. *S. mutans*

Dış çürüğü etiolojisinde öne çıkan rolleriyle *S. mutans*, hücrelerin kokkal morfolojilerini kaybetmeleri ile genellikle kısa çubuk veya kokobasil görünümüne ulaşmalarına dayanılarak adlandırılmıştır (28).

Genellikle alfa veya gama hemolitik olsalar da bazı beta hemolitik suşları da bulunmaktadır. Kanlı agarda, anaerobik koşullarda, 48 saat süresince beyaz veya gri renkte, bazen oldukça sert ve besiyeri üzerinde yapışan koloniler oluşturmaktadırlar. Katı besiyerinde 1,5-3.0 µm boyunda kısa çomaklar şeklinde üredikleri görülmüştür. Optimum üreme ısı 37 °C , öldürücü pH ise 4.0-4.3 olarak belirtilmiştir (29).

S. mutans üzerinde genellikle kullanılan iki seçici besiyeri de süktroz içermektedir. Bu iki besiyeri Mitis Salivarius Agar (MS) ve Triptikaz Maya Özütü Sistin Agar (TYC)'dir. Basitrasin ilavesi ile elde edilen hallerinde TYCSB agar, %15-20 süktroz, MSB agar ise %20 süktroz ve her ikisi de 0.2 U/ml basitrasin içermektedir. *S. mutans* MSB agar üzerinde konveks koloniler oluşturmaktadır. Bu koloniler opak ve yüzeyi buzlu cam görüntüsüne benzemektedir. Bu besiyeri, mikroorganizmalar arasında az bulunan *S. mutans* dahi izolasyonunu sağlayabilmektedir (30).

S. mutans, dental plak olgunlaşması ve karyojenite ile direkt ilişkilendirilen süktrozdan hücre dışı çözünür ve çözünmez polisakkaritler olan; glukana, mutan ve fruktan üretmektedir. Glukana ve fruktanlar sırasıyla bu bakterilerin sahip olduğu glukoziltransferaz ve fruktosiltransferaz enzimleri ile elde edilmektedir. Mutan ise yalnızca *S. mutans* tarafından üretilen, yüksek oranda çözünmeyen bir glukandır. Bu polimerlerden suda çözünmeyen glukana ve mutan, dental plak oluşumu ve mine yüzeyine yapışmayı sağlamaktadır. Ayrıca bu polimerler, süktroz içeren agar plakalar üzerinde büyürken *S. mutans* karakteristik kolonyal morfolojisine de katkıda bulunmaktadır. Bahsedilen karbonhidrat polimerleri hızlı bir şekilde asidik fermentasyon ürünlerine (esas olarak laktat) dönüştürülmekte ve çürük oluşum süreci başlamaktadır (28).

S. mutans, karbonhidrat oranı arttığında hücre içi polisakkaritler de sentezleyebilmekte ve bunlar karbonhidrat rezerv görevi üstlenerek diyet ile alınan karbonhidratlarının sınırlı olduğu dönemlerde bile aside dönüştürülmektedir. Belirgin bir şekilde, *S. mutans*, spesifik moleküler stres tepkilerinin indüklenmesiyle oluşturdukları asidik koşullar altında büyümekte ve hayatta kalmaktadır. Buradan yola çıkarak *S. mutans*, fazla miktarda asit açığa çıkaran; yani, asidojenik ve aynı zamanda asit ortamında da

varlığını sürdürebilen; yani, asidürik bakterilerden olması nedeniyle çürük etiolojisinde kilit bir rol oynadığı belirtilmektedir (28, 31).

S. mutans dişler veya protezler gibi ağızdaki sert yüzeylerden elde edilmekte ve enfektif endokardit vakalarından izole edildiğinde fırsatçı patojenler olarak işlev görebilmektedir. *S. mutans*, çürük bölgedeki diş plağından düzenli olarak izole edilse de sağlam diş minesinde bulunma prevalansları düşüktür (28).

2.2.3.3.2. Laktobasiller

Süt içerisinde disakkarit grubundan laktoz fermentasyonu özelliği, bu bakterinin laktobasil ismini almasını sağlamıştır. Laktobasiller gram pozitif, çoğunlukla basiller olmak üzere kokobasiller forma sahip, alfa veya hemolitik olmayan, fakültatif anaerob bakterilerdir. Hareketsiz, sporsuz ve kapsülsüz olarak bilinirler (17).

Kültür özelliklerine bakıldığında; en iyi üreme pH'ı 6, optimal üreme ısı 37° C olmak üzere 5-53° C'ler arasında da çoğalabildikleri görülmüştür. Özel seçici besiyeri olan ve domatesli besiyeri olarak bilinen asidik pH'a sahip Man-Ragosa-Sharp agarı (MRS agar) daha kolay üremelerini sağlamaktadır (17).

Laktobasiller metabolik son ürünlerine göre glikoz fermentasyonundan esas olarak laktik asit üreten homofermenterler (örneğin *L. casei*) ve laktik asidin yanı sıra asetat, etanol ve karbondioksit üreten heterofermenterler (örneğin *L. fermentum*) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Asidürik ve asidofilik bakterilerdendir. Üredikleri ortamın pH değerini 4'ün altına düşürebildikleri görülmüştür. Sükrozdan; hücre dışı polimer olan ve dişe adezyonda önem oluşturan dekstranı sentezlemektedirler. Bakterilerin gram boyamadaki tipik morfolojileri, katalaz testinin negatif oluşu, gaz kromatografisinde yüksek oranda laktik asit saptanması ayırt edici özellikleridir (17).

Laktobasiller genellikle ağız boşluğundan, özellikle diş plağı ve dilden, ayrıca yumuşak dokuların mekanik sürtünme etkisinden uzakta olan diş arayüzleri ve fissür tabanlarından izole edilmekte, ancak ağızdaki toplam mikrofloranın %1'inden azını oluşturmaktadır. Hem mine hem de kök yüzeyinin ilerlemiş çürük lezyonlarında oran ve prevalanslarının arttığı görülmektedir (28).

Laktobasiller ve streptokoklar, ortamdaki asit miktarını arttırmaları dolayısıyla diş çürük oluşumu olgusunda akla gelen ilk iki bakteridir (17). Ağız boşluğunda ve çürük lezyonunda rastlanılan laktobasil türleri; *salivarius*, *casei*, *fermentum*, *acidophilus* ve

viridescens'dir. Bunlardan *L. acidophilus* ve *L. casei*, karyojenik özellikleri nedeniyle çürük etiyojisi açısından önem taşımaktadır (26).

2.2.3.3.3. Enterokoklar

İnsanlarda fırsatçı enfeksiyonlarla ilişkilendirilen enterokoklar; tek veya çift halinde kısa zincirler halinde bulunan gram pozitif, fakültatif anaerop koklardır. Optimum üreme ısı 35 °C ve pH değeri 9.6 olarak bilinmektedir. Suşları, %6.5 sodyum hipoklorit içeren sıvı besiyerinde üreyebilmekte ve % 40 safra tuzu varlığında, eskülin hidrolizi yapabilmektedir. Katalaz testleri negatiftir. Amonyak oluşturabilir fakat glikoz ve diğer şekerlerden gaz üretmemektedir (17).

2.2.3.3.3.1. *E. faecalis*

Uygun seçici besiyeri kullanılarak oral bölgeden elde edilen enterokoklar arasında en sık elde edilen tür *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)'tir. Normal oral mikrofloranın bir üyesi olan *E. faecalis* diş çürüğü oluşumundan sorumlu mikrobiyal organizmalar arasında önemli bir etken olarak belirtilmektedir (14, 32). Oral enterokokların, agregasyon maddeleri, yüzey adezinleri, litik enzimler ve hemolizinler dahil olmak üzere ürettikleri virülans faktörler sayesinde ağız boşluğunda kalarak dental biyofilm oluşumuna katılmaktadır. Birçok çalışma, çeşitli klinik kökenlerden türetilen enterokokların biyofilm oluşturma yeteneğini bildirmiştir (33).

E. faecalis, dentin kollajenine yapışmaları ve kanal tedavisine dirençleri nedeniyle endodontik enfeksiyonlardan sorumlu tutulmaktadır (34). Enterokoklar, kan dolaşımı enfeksiyonlarından izole edilen en yaygın üçüncü patojen ve kanal tedavisinden sonra kalıcı enfeksiyonlu dişlerde en sık izole edilen türdür (35). Farklı bakteriyolojik çalışmalar, periapikal lezyonlu kök dolgulu dişlerin %29-46'sında *E. faecalis*'in bulunduğunu değerlendirmiştir (36).

Enterokoklar, immün ve tıbbi açıdan zayıf hastaların ağzından izole edilmekte ve tedaviye yanıt vermeyen periodontal ceplerden sorumlu tutulmaktadır. Onkolojik tedaviler oral mikroflorada değişiklikler yaratmakta ve *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *S. mutans* ve *Candida albicans*'ın yanı sıra *Enterococcus* sayısında da radyoterapi sonrası artış görüldüğü bildirilmiştir (37). Ağız zemininin selülitisi olarak bilinen Ludwig anjini hastalığında spiroketler başta olmak üzere anaeroblar ve enterokoklar da izole edilebilmektedir (38). Bunun yanı sıra diş hekimliğinde riskli hastalıklardan kabul edilen subakut enfektif

endokarditte, *viridans streptococci*, *Staphylococcus epidermidis* ve *E. faecalis* bakterilerini sebep olarak gösterilmektedir (30). Son zamanlarda, *E. faecalis* ve *E. faecium*'daki ilaç direnci ve bunların yatay gen transferine olası katkıları, ağız boşluğunda enterokoklara artan ilginin altını çizmektedir (39).

2.2.3.3.4. Stafilocoklar

Stafilocoklar da gram pozitif koklardır, ancak streptokok zincirlerinin aksine, karakteristik üzüm benzeri kümeler halinde düzenlenmektedir (15). Stafilocoklar %7.5-10 sodyum hipoklorit bulunan klasik besiyerlerinde, 18-45 °C'de üremektedir. Optimal üreme ısısı ise 30-37 °C ve pH değeri 7-7.5'tir. Kanlı agarda yuvarlak, düzgün kenarlı, hafif konveks, opak, 1- 4 mm çaplı koloniler oluşturmaktadırlar (17). Stafilocoklar 15'ten fazla farklı tür içermekte ve bu türlerin arasından *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) için ağız ve perioral bölge rezervuar görevi görmektedir (40).

2.2.3.3.4.1. *S. aureus*

S. aureus için bildirilen oral izolasyon oranları, çalışılan popülasyona göre değişiklik göstermektedir. Sağlıklı yetişkin dişlenmeye sahip ağız boşluklarında insidans incelendiğinde %24-84 arasında ve takma diş kullanan nüfusta ise %48 taşıma oranları tespit edilmiştir. Bunun yanı sıra, sağlıklı yetişkinlerden alınan plak örneklerinden belirlenen oral prevalans, %0 ila %7 arasında değişirken periodontal hastalığı olan hastalardan alınan örnekler, %50'ye varan yaygınlık oranları vermektedir (41).

Sağlıklı yetişkinlerin %10-35'i kalıcı taşıyıcılar olarak sınıflandırılarak ön burun delikleri *S. aureus* için birincil ekolojik niş olarak kabul edilmektedir. Burun deliklerinde bu patojenin taşınmasının cerrahi, hemodiyaliz, sürekli ayaktan periton diyalizi ve HIV'li hastalarda enfeksiyon için bir risk faktörü olduğunun gösterilmesi (42) çalışmaların çoğunun *S. aureus* taşıyıcılığını ortadan kaldırmayı amaçlayan tedavilerin araştırılması ve esas olarak bu vücut bölgesine odaklanılmasına sebep olmuştur (43). Fakat çeşitli çalışmalarda zorunlu olarak aynı bireyin burun deliklerinde bulunmadan da *S. aureus*'un ağız boşluğunda (44, 45) ve orofarinkste yaşayabileceğinin gösterilmesi *S. aureus* rezervuarı olan bu bölgelerin daha detaylı incelenmesini zorunlu kılmıştır (46).

Tükürükte *S. aureus* varlığının aspirasyon pnömonisi için önemli bir risk faktörü olduğunu öne sürülmesi, pnömonisi olan yaşlı ve yoğun bakım hastalarında oral ve bronkoscopi örneklerinden elde edilen genetik özdeş *S. aureus* izolatlarının

gösterilmesiyle desteklenmiştir. Oral *S. aureus*, sağlık personelinin yanı sıra diğer hastalarla da çapraz enfeksiyon için bir rezervuar görevi görebilmesi risk faktörü oluşturmaktadır (47).

S. aureus'un; angular cheilis, parotitis ve stafilokokal mukozit gibi bir dizi farklı oral enfeksiyona sebep olduğu bilinmektedir (48–50). Daha yakın zamanlarda, *S. aureus*'un dental implant başarısızlığında rolü olabileceği de öne sürülmüştür (51). *S. aureus*'un diğer vücut bölgelerinin sebep olduğu enfeksiyonlara paralel olarak, bir dizi oral stafilokok enfeksiyonunun muhtemelen çeşitli kaynaklardan çapraz enfeksiyon sonucu olması beklenen bir durumdur. Alternatif olarak, *S. aureus* bakteri tiplerinin ürettiği eksotoksinlere bağlı olarak eritem ve yanan ağız sendromu gibi mukozal hastalıklar ile ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur. Bu faktörler göz önüne alındığında, diş muayenesi ve tedavisi gören tüm hastalar için standart enfeksiyon kontrol önlemlerinin önemi pekişmektedir (50).

S. aureus, bakteriyemi, sepsisemi veya endokardit gibi toplum kökenli yüzeyel deri ve yumuşak doku enfeksiyonlarının başlıca etiyolojik ajanıdır. Ek olarak, hastane kaynaklı kan dolaşımı, solunum yolu ve ameliyat sonrası yara enfeksiyonlarının da bilinen bir nedenidir (52). Buna ilaveten romatoid artritli hastalarda (53), kistik fibrozlu çocuklarda (54), Sjögren sendromlu hastalarda sağlıklı kontrol gruplarına göre oral *S. aureus* taşıyıcılığının artmış seviyeleri de bildirilmiştir (55).

S. aureus, streptokok veya laktobasillerin öne çıktığı çürük patogeneğinde, dental plaktaki varlığı ile önemli bir rol üstlenmektedir (56). *S. aureus*'un diş çürümesinde en yaygın organizma olduğu ve bunu *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerinin izlediğine yönelik bir çalışma da bulunmaktadır (57). Buna ilaveten *S. aureus*'un çürük ile ilişkili ikinci en yaygın Gram pozitif bakteri olduğu sonucuna varılan farklı bir kaynak da bulunmaktadır (25). *S. aureus*, çeşitli enfeksiyonları indükleyen adezinler, toksinler gibi çoklu virülans faktörlerini eksprese edebilen bir patojendir. Bu faktörleri sayesinde biyofilm yapısına katılmakta ve diş çürük lezyonlarından izole edilmektedir (58, 59).

2.2.3.3.5. Pseudomonaslar

Gram negatif, nonfermentatif aerobik basil özelliği olan *Pseudomonas* cinsi, 140 türden daha fazladır ve çoğu saprofitiktir. Yaklaşık 25 tür ise insanlar ile ilişkilidir. İnsanlarda hastalık sebebi olarak bilinen pseudomonasların çoğu fırsatçı enfeksiyonlarla sebep olmaktadır. Klinik örneklerden üreyen bu pseudomonasların %80'i *P. aeruginosa* ve *P. maltophilia*'dır (17).

2.2.3.3.5.1. *P. aeruginosa*

P. aeruginosa suşları karakteristik olarak aminoasitofenin üzüm benzeri kokusu, koloni morfolojisi, 42° C’de üreme ve piyosiyanın üretimi, suda eriyebilen mavi, floresan vermeyen, fenazin pigmenti sentezleme özellikleri ile tanımlanmaktadır (17).

P. aeruginosa hastane enfeksiyonlarının ana etmenlerinden biridir. Özellikle ileri safha kanser, nötropeni, diabetes mellitus veya yanık tedavisi nedeniyle hastanede yatan hastalar risk grubundadır. Bu suş kaynaklı enfeksiyonlarla birlikte gözüken yüksek mortalite, ekstrasellüler bakteriyel enzim ve toksinlerin üretimi, antibiyotiklere direnç ve konak savunmasını zayıflaması ile ilişkilendirilmektedir. *P. aeruginosa*, *S. aureus* gibi mikroorganizmalar, diş hekimliği muayenahanelerinde ultrasonik yıkama solüsyonlarını kontamine etmekte ve enfeksiyon kaynağı olabilmektedir (17).

P. aeruginosa immün direnci düşük hastalarda ve orofaringeal bölgedeki açık yaralı mukoza membranlarda izole edilebilmektedir. Bunun yanı sıra oral mukoza kaynaklı *P. aeruginosa* enfeksiyonları daha sonradan kistik fibrozisli hastalarda alt solunum yolu enfeksiyonlarına ve hastane kaynaklı pnömoniye ve kronik obstrüktif akciğer hastalığının (KOAH) alevlenmelerine neden olmaktadır (60). Bu nedenle olduğu düşünülen enfeksiyonlar *P. aeruginosa*’nın orofarinksini ilk olarak kolonize ettiğini, ardından alt hava yoluna aspire edildiğini düşündürmektedir. Solunum yolu enfeksiyonlarının kötü ağız sağlığı ile ilişkilendirilmesi bu görüşü destekleyerek *P. aeruginosa*’nın oral mukozada bulunmasının tehlikelerini ortaya koymaktadır (61).

Biyofilmin ana bileşeni olan hücre dışı polimerik maddenin (EPS), çürük dokusundan alınan *P. aeruginosa* tarafından önemli ölçüde sentezlenebildiği görülmüştür. Pek çok hücre dışı DNA ve ekzopolisakarit sayesinde *P. aeruginosa*’nın dental biyofilminin yapısında yer alabildiği tespit edilmiştir. Bu durum *P. aeruginosa*’nın çürük dokulardan izole edilebilmesinin bir sebebi olarak gösterilmektedir (62).

2.2.3.3.6. Mantarlar

Mantarlar, prokaryot bakterilerin aksine ökaryot olan yaygın ve fırsatçı patojenlerdir. Doğada, çeşitli kaynaklara göre, 250.000-1.500.000 tür mantar bulunmasına karşılık 150-300 türü insanda patojendir. Kültür ve genomik temelli çalışmalarda oral mikoflorada *Candida albicans* (*C. albicans*) türünün baskın olduğu bulunmuştur (17).

2.2.3.3.6.1. *C. albicans*

C. albicans konağa girmeden önceki maya fazında tipik olarak $3-5 \times 5-10 \mu\text{m}$ boyutlarında, küresel ve oval tomurcuklanan hücreler şeklinde üremektedir. Uç uca eklenen filamentli hücreler olan psödohif oluştuğunda hastalık fazı başlamaktadır (15). İçerisinde antifungal bulunmayan neredeyse her besiyerinde üreyebilmektedirler. Sabouraud's agarda, mısır unlu agarda, patatesli nişastalı dekstrozu agarda en kolay üreme sağlanmaktadır. Kolonileri düzgün, grimsi beyaz, nemli görünüşlü ve yumuşaktır (17).

C. albicans, diğer oral mikroorganizmalarla güçlü bir etkileşime girerek polimikrobiyal biyofilmlerin virülansı üzerinde önemli bir etki yaratabilmektedir. *C. albicans* ile *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Fusobacterium* türleri arasındaki mikrobiyal etkileşimi, oral enfeksiyon hastalıklarının patogenezi ile yakından ilişkili bulunmuştur (63). *C. albicans*'ın asidürik ve asidojenik özellikte olmasının yanı sıra süktroz, glikoz ve laktozu parçalayabilme yeteneği çürük etiyojisi açısından dikkat çekmektedir (64). *C. albicans* dentin tübüllerini istila edebilmekte, denatüre kollajene bağlanabilmekte ve diş sert dokularının demineralizasyonu ve çözünmesine sebep olan aspartil proteazları salgılayabilmektedir. *S. mutans* ile karşılaştırıldığında, hidroksiapatiti çözme konusunda daha büyük bir yeteneğe sahip oldukları da görülmüştür (65).

2.2.4 Zamana Ait Faktörler

Çürük oluşumu kronik bir hastalık olarak kabul edildiğinden, substratın (diyet ile alınan karbonhidratların) dişte sert doku kaybına sebep olabilmesi için yeterli bir süre gerekmemekte ve bu durum zaman faktörünü oluşturmaktadır. Bir çürük lezyonunun yüzey bütünlüğünde belirgin bir süreksizlik geliştirmesi veya kavitasyon oluşumu ile sonuçlanan geri dönüşümsüz sürece girmesi bahsedilen faktörlere bağlı olarak yıllar alabilmektedir. Bu durum potansiyel olarak diş hekimine ve hastaya önleyici tedavi stratejileri için yeterli zamanı sağlamaktadır (66).

2.3. Diş Çürüğü Oluşum Mekanizması

Diş çürüğü, dinamik bir demineralizasyon-remineralizasyon süreci ile kendini gösteren bir hastalıktır. Demineralizasyon; hidroksiapatit kristallerinin çözünmesi ve diş dokusundan kalsiyum (Ca), fosfat (PO_4^{3-}) ve diğer iyonların kaybıyla sonuçlanan, patolojik ve koruyucu faktörler arasındaki sürekli bir dengesizliktir (67). Diş plağı tarafından üretilen asit, hidroksiapatit kristalleri arasından su ile aynı yoldan diş sert dokusuna difüze

olmaktadır. Ca ve PO_4^{-3} , kristallerin arasını çevreleyen bu sulu fazda çözünerek atomik düzeyde demineralizasyon sürecini başlatmakta ve kaviteye gidecek yolu açmaktadır.

Ağız sıvıları, minenin mineral bileşimine göre aşırı doymuş konsantrasyonlarda Ca ve PO_4^{-3} içermektedir. Nötr pH değerindeki fizyolojik koşullarda, diş sert dokularını dengede tutmak için düşük iyon konsantrasyonu bulunması yeterlidir. Üretilen asit nedeniyle pH değeri düştüğünde ise, diş sert dokusunun çözünmesini önlemek için daha yüksek iyon konsantrasyonları gerekmektedir. Ca ve PO_4^{-3} iyonları, normal mine yüzeyinde sürekli, çözünen mine yüzeyinde ise yeniden birikmektedir. Yaklaşık bir değer olan 5.5 pH'da , düşük doygunluk başlamakta, plak sıvısındaki Ca ve PO_4^{-3} iyon konsantrasyonu mineyi stabil dengede tutmak için yeterli gelmemekte ve mine çözünmeye başlamaktadır (20).

Remineralizasyon terimi ise, tam tersine mineral kazanımını tanımlamak için kullanılmaktadır. Remineralizasyon, diş yüzeyinin altında bulunan kavitesiz çürük lezyonları için vücudun doğal onarım sürecini temsil etmektedir. Remineralizasyon sürecinde, demineralize mine içindeki kristaller arası boşluklara mineral kazanımı sağlanması için, diş dışı kaynaklardan Ca ve PO_4^{-3} iyon birikimi teşvik edilmektedir. Karyojenik bakteriler, fermente olabilen karbonhidratlar ve tükürük gibi faktörler olduğu sürece ağızda demineralizasyon-remineralizasyon döngüsü devam etmektedir. Patolojik ve koruyucu faktörler arasındaki bu denge, herhangi bir zamanda demineralizasyon veya remineralizasyon olup olmadığını belirleyen göstergedir (68).

Mine yüzeyi, bahsedilen bu dinamik denge içinde zamanla sayısız pH dalgalanmalarının kümülatif sonucu olarak klinikte görülebilecek kadar gözenekli hale geldiğinde ve buna bağlı minenin yarı saydamlığını azaltacak kadar Ca ve PO_4^{-3} kaybı olduğunda, beyaz nokta lezyonu (white spot lezyonu, başlangıç lezyonu) olarak teşhis edilmektedir (69).

Mine lezyonunu ilerleyerek mine-dentin birleşimine ulaştığında yüzey hala sağlam ve kavitesizdir. Ancak lezyonun boyutu nedeniyle, bu bölgedeki mine kalınlığının geçirgenliği artmakta ve diş yüzeyinden asit, enzimler ve diğer kimyasal uyaranlar diş dentine ulaşmakta ve bu durum pulpadentin ünitesinin yanıt vermesi ile sonuçlanmaktadır (70).

2.4. Dentine Adezyon ve Adeziv Sistemler

2.4.1. Dentinin Yapısal Özellikleri

Dentin, dişin en hacimli mineralize bağ dokusudur. Mine, dişin kron kısmında, sement ise kök kısmında bulunan dentini kaplamaktadır. Kronal yapıların sağlamlığı ve dayanıklılığı dentin bütünlüğüne bağlıdır. Dentin mineye rengini verirken elastik bir temel de sağlamaktadır. Damar beslenmesi veya innervasyonu olmayan bir doku olmasına rağmen termal, kimyasal veya mekanik uyaranlara cevap verebilmektedir (66).

Dentin kimyasal ağırlıkça, %70 inorganik hidroksiapatit kristalleri, %20 organik madde ve %10 su içeriğiyle, mineden daha esnek bir yapıdadır. Hacim olarak ise % 50 karbonattan zengin, kalsiyumdan yoksun apatitten; % 30 büyük ölçüde tip I kolajen olan organik maddeden ve % 20 plazma benzeri sıvıdan oluşmaktadır.

Dentinin belirgin ve önemli bir özelliği olan tübüller yapı, odontoblastik hücreleri izleyen mine-dentin sınırı veya sementten pulpa odasına doğru dentin yapısını delen tüneller şeklinde görünmektedir. Tübüller boyunca kanalikül veya mikrotübül olarak adlandırılan yan dallar bulunmaktadır. Tübül sayısı ve yoğunluğu, mine-dentin sınırında en düşük ve odontoblastik hücre gövdelerinin yer aldığı pulpa odası ile birleşme noktası olan preentin yüzeyinde ise en yüksektir (71).

Tübül lümeni, yaklaşık 0,5-1 µm kalınlığında oldukça mineralize bir yapı olan peritübüler dentin ile kaplıdır. Tübüller, apatit ile güçlendirilmiş tip I kollajen matrisinden oluşan intertübüler dentin ile ayrılmaktadır. Apatit kristalleri, minede bulunandan çok daha küçüktür ve yaklaşık %5 karbonat içermektedir (71).

2.4.2. Dentinin Yapısal Özelliklerinin Adezyona Etkisi

Adezyon terimi, tutunulacak veya bağlanılacak bir yüzey (aderent, substrat) ile yapıştırıcı bir ajan (adeziv) arasında materyalleri birleştirecek bir bağlanma bölgesinin oluşturulması ile moleküler etkileşimlerin kurulmasını ifade etmektedir. Diş dokuları ile adezivler arasındaki adezyon (bağlanma), restorasyonun uzun ömürlü olabilmesi konusunda büyük önem taşımaktadır (71).

Diş sert dokuları kıyaslandığında; mineye adezyon, daha az karmaşık yapısı ve morfolojisi nedeniyle dentine adezyondan daha öngörülebilir bulunmaktadır. Bu farklılığın nedeni birkaç faktöre bağlıdır. Mine, çoğunluğunu oluşturan hidroksiapatit yapısıyla yüksek oranda mineralize bir dokuyken, dentin sahip olduğu büyük oranda su ve organik maddesi

ile daha heterojen bir bileşimi temsil etmektedir (72). Bu bileşim yaş ve çürük oluşumuyla farklılaşmakta ve adezivlerin bağlanma performansını değiştirmektedir. Ayrıca mineden farklı olarak dentin, hidroksiapatit kristalleri ile korunan ve erişilemeyen bir kollajen ile çevrili dentin tübüllerinin varlığı ile karakterize edilen intrinsik bir morfoloji göstermektedir. Dentinin bu karmaşık yapısı dikkate alındığında, dentine adezyon bugün bile zor ve tartışılan bir kavramdır (73).

Lokal anesteziklerde pulpa basıncını düşüren ve tübüllerdeki sıvıyı azaltan vazokonstriktörlerin yanı sıra; tübüllerin uzunluğu ve yarıçapı, dentin sıvısının viskozitesi ve içinde çözünen maddelerin moleküler boyutu, pulpadaki kan damarların maddeleri uzaklaştırma hızı dentin geçirgenliğinin belirlenmesi açısından önemlidir. Bunun sebebi bahsedilen değişkenlerin, dentinin dinamik yapısını oluşturması ve onu adezyon için zor bir substrat haline getirmesidir (74).

2.4.3. Smear Tabakasının Adezyona Etkisi

Diş yapısı; frez gibi dental aletlerle prepare edildiğinde, açığa çıkan artık organik ve inorganik bileşenler yüzeyde smear tabakası olarak adlandırılan yapıyı oluşturmaktadır. Smear tabakası dentin tübüllerinin üzerini örterek smear tıkaçlarını oluşturmakta ve dentin geçirgenliğini in vitro olarak yaklaşık %90 azaltmaktadır. Smear tabakasının bileşimi temel olarak hidroksiapatit ve yapısı bozulmuş denatüre kollajendir (75).

Smear tabakasının adezyona sağlayacağı avantajlar ve dezavantajlar, onlarca yıldır kapsamlı bir şekilde tartışılmaktadır. Geçirgenliği azaltarak adezyon için daha kuru bir alan sağlaması ve zararlı maddelerin dentin tübüllerine ve pulpaya geçişini azaltması olumlu özelliklerindendir. Bununla birlikte, adezyon prosedürlerine engel olduğu ve bu nedenle asit uygulaması ile tamamen kaldırılması veya modifiye edilmesi gerektiği de kabul edilen bir diğer yaklaşımdır (71). Fakat asit uygulaması ile smear tabakasının ve smear tıkaçlarının çıkarılmasının, açığa çıkan dentin yüzeyine düşen sıvının artmasına neden olacağı ve dentin tübüllerine rezin uzantılar oluşturulsa bile hidrofobik yapıdaki rezin adezivin, hidrofilik bir substrat olan dentine yeterli adezyonu sağlayamayacağı düşünülmektedir (76).

Dentine asit uygulanması birkaç ardışık olayı başlatmaktadır. Öncelikle artık dokular, tükürük ve bakterilerle dolu olan dentinin yüzey tabakası, yani smear tabakası, çıkartılmakta veya modifiye edilmektedir. Bunu takiben tübüllerin tamamen veya kısmen açılması ile peritübüler ve intertübüler dentinin yüzeyel mineral içeriği çözünmekte ve kollajen fibriller açığa çıkmaktadır. Bu nedenle, dentine adezyon, kollajen fibrillerinin adeziv

rezin içinde tutulmasına ve monomerlerin tübüllerin içine sızmasına bağlıdır. Adeziv sistem ve kollajen fibriller arasında uygun mekanik kilitlenmenin meydana gelmesi, dentine adezyonda yer alan ana mekanizmadır (77).

2.4.4. Adeziv Sistemler

Adeziv diş hekimliğinde ilk önemli adım; 1955'te Dr. Michael Buonocore'un mineye asit uygulanmasının resin restorasyonlarının retansiyon süresini uzattığını keşfetmesi ve bir ön yüzey işlemi olarak kullanılabilirliğinin sorgulanmasıyla atılmıştır (78). Sonraki süreçte; taramalı elektron mikroskobu (SEM) analizlerine dayanılarak asitle aşındırma sonrasında mine yüzeyinde mikro gözenek oluşumunun tespit edilmesi ve adeziv uygulanmasıyla içinde resin uzantılar (resin tag) oluşturulması, resin ve diş dokusu arasında mikromekanik bağlanma kavramını açığa çıkarmış ve konservatif tedavi yaklaşımları geliştirilebilmiştir (77).

Dentine bağlanma kavramı ise 1982'de Dr. Nobuo Nakabayashi'nin SEM tekniğini kullanarak hibrit tabaka oluşum mekanizmasını açıklamasıyla anlaşılmıştır. Asitle aşındırılmış bir dentinin yüzeyel mineral tabakasının resin monomerleri ile değiştirilmesi ve bu monomerlerin polimerizasyonu ile bir hibrit tabakanın, yani restoratif materyal ve diş substratını birbirine bağlayan bir ara yüzün, oluşumuyla sonuçlanmıştır. Hibrit tabaka hem tübüller içinde resin uzantıların oluşumunu sağlamakta; hem de resin monomerlerinin, dentinin asitle aşındırılması ile açığa çıkan kolajen fibrillerinin arasına sızmasına izin vermekte ve böylece resin ile kolajen arasında kimyasal ve mikromekanik kilitlenmeyi oluşturmaktadır (79).

Dental substratlarla adezyon oluşturmak için kullanılan maddelerin kombinasyonu adeziv sistem olarak adlandırılmakta ve bu sistem genel olarak asit, primer ve adeziv resin olmak üzere üç bileşeni içermektedir. Asit uygulaması ile smear tabakasını kaldırarak substratın yüzey enerjisini ve ıslanabilirliğini arttırmanın yanı sıra mikro gözenekler oluşturarak resin monomer infiltrasyonu için uygun bir yüzey meydana getirilmektedir.

Asit uygulamasının ardından, resin infiltrasyonu gerekmektedir. Ancak dentinin mineden daha hidrofilik olması nedenle istenilen monomer adaptasyonu için hidrofobik bir adeziv rezinden önce hidrofilik resin monomerleri ve çözücülerden oluşan bir primer solüsyonunun uygulanması gerekmektedir. Buna karşılık, mineye bağlanmada yalnızca hidrofobik bir adeziv uygulanması yeterlidir (71).

Dentin adeziv sistemler ile ilgili yapılan ilk sınıflandırma sistemi, gelişim basamaklarına göre yapılan olsa da şimdiki zamanda klinikte uygulanma biçimlerine göre etch&rinse, self etch ve universal adezivler olmak üzere üç grupta incelenmektedir (80).

2.4.4.1 Etch&Rinse Adezivler

Fusayama, hem mine hem de dentinin aynı anda fosforik asit ile aşındırılması anlamına gelen etch&rinse tekniğini öneren ilk kişi olarak bilinmektedir. Fusayama'nın çalışmasına göre; fosforik asit molekülleri vital dentine sadece 10 µm veya daha az nüfuz etmekte ve hava-su spreyi ile yıkandığında tamamen uzaklaştırılarak zarar vermemektedir (81). Etch&rinse tekniği, Amerikan ve Avrupa diş hekimliği topluluklarında başta dirençle karşılaşsa da, günümüzde dünya çapında önem ve kabul edilebilirlik kazanmıştır (82).

Etch&rinse sistemi, ayrı bir klinik adım olarak asit uygulanmasını, ardından asidin suyla durulanmasını, primer ve adeziv uygulamasından önce ise substratın kurutulmasını içermektedir. Asit uygulamasında genellikle ağırlıkça %37 fosforik asit içeren jel, mine ve dentin üzerine sırasıyla 30 ve 15 saniye süreyle uygulanmaktadır. Minenin aşındırılma süresi, fazla mineralize içeriği nedeniyle dentinden daha uzundur (82).

Mineye bağlanmada; fotopolimerize olabilen hidroforik adezyon materyalinin asitle aşındırma sonucu oluşan çukurlara kılcal çekim yoluyla çekilmesine izin vermek ve rezin uzantıları oluşturmak için tamamen havayla kurutulmuş bir yüzey gerekmektedir (83). Daha hidrofilik olan dentinde ise, kolajen fibrillerini genişletilmiş formda tutmak için asit uygulaması, suyla durulama ve orta derecede kurutma gerekmektedir. Dentin aşırı hava ile kurutulduğunda, fibriller çökmekte, rezin-monomer infiltrasyonu ve hibrit tabaka oluşumu tehlikeye girmektedir (77).

Piyasada iki aşamalı ve üç aşamalı olmak üzere iki tip etch&rinse sistemi bulunmaktadır. Üç aşamalı adezivler sırasıyla, asit ile aşındırma, primer ve adeziv rezini ayrı bileşenler olarak uygulamaktadır (79). Bu sistemlerde primer; açığa çıkan kollajen fibrillerin ıslanmasını sağlamalı, kalan yüzey nemini uzaklaştırmalı, hidrofilik doku durumunu hidroforik hale dönüştürmeli ve monomerleri interfibriller kanallara yeterince taşımalıdır. Adeziv rezin ise; kollajen fibriller arasında kalan gözenekleri doldurmalı, açılan dentin tübüllerini kapatan rezin uzantılar oluşturmalı, polimerizasyon reaksiyonunu başlatıp iletmeli, oluşan hibrit tabakayı ve rezin uzantıları stabilize etmeli ve içeriğindeki üretan dimetakrilat (UDMA), trietilen glikoldimetakrilat (TEGDMA) ve bisfenol-A-glisidil

dimetakrilat (Bis-GMA), ile kopolimerizasyon için yeterli metakrilat çift bağlarını sağlamalıdır (84).

Ayrı bir adım olarak asit ile aşındırmanın ardından hem primer hem de adeziv rezini tek şişede birleştiren iki aşamalı etch&rinse adeziv sistemlerinde ise yüksek teknik hassasiyet gerektiği bilinmektedir. Bu son bileşim, primerdeki hidrofilik monomerler ve adeziv rezindeki hidrofobik monomerlerin birlikte karıştırılmasını sağlamak için yüksek solvent içeriği ile daha hidrofiliktir. Bağlanma dayanımı açısından, altın standart olarak üç aşamalı etch&rinse adeziv sistemleri önerilmektedir (79).

Dentine adezyonun altında yatan mekanizma, üç ve iki aşamalı etch&rinse adezivler için aynıdır. Kavite hazırlığı sırasında üretilen dentin smear tabakası, asit ile aşındırma ve durulama fazı ile kaldırılmakta ve dentin yüzeyinin 3-5 µm derinliğinde demineralize olmaktadır. Bunun sonucunda normalde hidroksiapatit ile örtülü olan kollajen fibriller; monomerlerin mikro-mekanik olarak birbirine kenetlenmesi için uygun mikro-retantif alanın oluşmasıyla hibrit tabakayı meydana getirmek için hazır olmaktadır. Hibridizasyonla eşzamanlı olarak, rezin uzantılar tıkalı olmayan dentin tübüllerini kapatmakta ve tübül ağzı duvarının hibridizasyonu yoluyla da ek tutunma sağlanmaktadır (85). Son zamanlarda adeziv tekniklerle ilgili araştırmaların çoğu esas olarak dentine adezyona odaklanmış olup, yeni adeziv sistemler geliştirilse de mineye bağlanma; klinik olarak elde edilebilecek en iyi bağ olmaya devam etmektedir (80).

2.2.4.2. Self Etch Adezivler

Self etch adeziv yaklaşımı; aynı anda dentini aşındıran ve primerleyen asidik monomerlerin kullanımına dayanmaktadır. Bu sistemde asitle aşındırma ayrı bir klinik adım olarak gerçekleşmemektedir. Bu durumda smear tabakası tamamen kaldırılmak yerine hibrit tabakaya dahil edilmektedir. Etch&rinse yaklaşımına kıyasla bazı bileşimsel farklılıklara rağmen, self etch adezivler durulama aşamasını ortadan kaldırarak substratın ideal nem durumuyla ilgili teknik duyarlılığı veya adeziv uygulaması sırasında hata yapma riskini azaltmaktadır (79). Self etch adezivler; fonksiyonel asidik monomerlerin, etch&rinse adezivlerinin formülasyonu için yaygın olarak kullanılan metakrilat ve dimetakrilat bazlı monomerlerle karıştırılmasıyla formüle edilmektedir. İyonlaştırıcı ortam olarak su esastır; aksi takdirde, fonksiyonel monomer asidik doğasını gösterememekte ve bağlanma etkinliğinden ödün vermektedir (86).

Adezive kendi kendine aşındırma yeteneği kazandırabilen birkaç fonksiyonel monomer vardır. Bunlar genellikle; 4-metakriloksietil trimellitik anhidrit (4-META), 2-metakriloksietil fenil hidrojen fosfat (Fenil-P), 10-metakriloksidetil dihidrojen fosfat (10-MDP) ve polipropilen glikol fosfat metakrilat (Poly-P) dahil ancak bunlarla sınırlı olmayan karboksil veya fosfat grupları olan metakrilat monomerleridir (87). Eklenen fonksiyonel monomerin tipine ve konsantrasyonuna bağlı olarak, self etch adezivler, smear tabakası ile etkileşim şeklini doğrudan etkileyecek olan farklı başlangıç pH değerleri sunabilmektedir. Güçlü asiditedeki self-etch adezivler düşük pH (≤ 1) değeri sayesinde etch&rinse yaklaşımına yakın bir pürüzlendirme sağlamakta ve adeziv ile substrat arasında birkaç mikrometreye kadar etkileşim görülmektedir. Orta derecede güçlü self etch adezivler, 1 ile 2 arasında değişen pH değeri ile substrata belli mikrometrelerde etkileşim sağlanmasına izin vermektedir. Zayıf asiditedeki self-etch adezivlerin pH'ı ise 2'dir. Bu durum yaklaşık 1 μm 'lık bir etkileşime izin vermekte ve smear tabakasının kısmen çözülmesiyle önemli sayıda hidroksiapatit kristalinin hibrit tabaka içinde kalmasına sebep olmaktadır (79). Ultra-zayıf asiditedeki self-etch adezivlerde pH ≥ 2.5 olarak kabul edilmekte ve sadece birkaç yüz nanometrelik bir etkileşim derinliğine izin vermesiyle nano-etkileşim olarak adlandırılan bağlanmayı sağlamaktadır (88).

Tek aşamalı ve iki aşamalı olmak üzere iki tip self etch adeziv sistem bulunmaktadır. Üç aşamalı etch&rinse sistemi ile aynı olarak, iki aşamalı sistemlerinde de primer ve adeziv rezin ayrı aşamalarda uygulansa da, self etch sisteme ait primer asit özelliği sayesinde aşındırma yeteneğini bünyesinde barındırması ile farklıdır (88). Tek aşamalı self-etch adeziv sistemlerde; tek seferde bağlanma yüzeyinin pürüzlendirilmesi (asitleme), yüzeyin hazır hale getirilmesi (primerleme) ve bağlanma aşamasının (adeziv rezin) sağlanmasıyla bugün piyasadaki en basit adezivler olarak tanıtılmaktadır. Uygulanmaları daha kolay olsa da, diğer sistemlere kıyasla bağlanma kuvvetinde azalma görülme ihtimalinin daha muhtemel olduğu iddia edilmektedir (79, 89).

2.4.4.3. Universal Adezivler

Tek aşamalı self-etch adezivlerle aynı konsepti takip ederek yakın zamanda piyasaya sürülen universal veya multi-mode olarak bilinen bu adezivler, tüm adeziv bileşenlerini tek bir şişede içermektedir. Universal adezivlerin ortaya çıkmasıyla, her klinik duruma göre self-etch, etch&rinse veya selektif mine asitlenmesi gibi farklı adezyon stratejileri için aynı dentin adezivi kullanılabilmektedir (90).

Universal adezivler, substratın nem durumundan bağımsız olarak, tatmin edici bir adezyon sağlamasıyla iyi bir seçenektir. Ayrıca bu sistemler monomer içeriklerine göre farklılık göstermektedir. Monomerlerden bazıları self-etch özellikleri ile dentin ve mineye kimyasal bağlantıyı bazıları da adezivin asiditesini sağlamaktadır. Geleneksel tek aşamalı self etch adezivlerden en büyük farkı, çoğunlukla nanotabakalama yoluyla hidroksiapatite iyonik olarak bağlanabilen 10-MDP ve benzeri monomerleri içermesidir. Ayrıca, bileşimlerinde silan gibi başka kimyasallar bulunması, hem uygulanabilirliğini hem de cam seramiklere veya rezin kompozitlere bağlanma sağlayarak klinik endikasyonlarını arttırmaktadır. Tüm bu monomerler, mine ve dentin arasındaki kimyasal bağlanmanın daha stabil ve uzun ömürlü olmasında önemli bir rol oynamaktadır (91).

Yakın zamanda yapılan bir sistematik inceleme ve meta-analizde, universal adezivlerin etch&rinse ve self-etch yaklaşımlarının karşılaştırıldığında, pH değerine göre zayıf adezivler kullanıldığında rezin-dentin bağlantısı benzer bulunurken, ultra zayıf adezivlerde istatistiksel olarak fark görülmüştür. Resin-mine bağlantısı incelendiğinde ise universal adeziv uygulamasından önce fosforik asit ile selektif olarak minenin aşındırılması, bağlanmayı optimize edebilen bir strateji olarak görülmüştür (92).

2.5. Kavite Dezenfektanları

Enfekte dentinin uzaklaştırılması amacıyla hazırlanan bir kavitede, çürükten etkilenmiş diş dokusunun gerektiği kadar uzaklaştırılması sonucu kavitede kalan bakteri oranı restoratif açıdan dikkat edilmesi gereken bir konudur. Histolojik ve bakteriyolojik çalışmalar, az sayıda dişin kavite hazırlığının ardından steril olduğunu göstermektedir (93). Çürük lezyonlarıyla ilişkili bir preparasyonun tam anlamıyla bakteriyel sterilizasyonunun değerlendirilmesi, genellikle bunu desteklemek için kabul edilmiş hiçbir objektif test olmaksızın sadece subjektif araçlara dayanmaktadır (94).

Kavite hazırlığı sonrasında dentinde kalan bakterilerin aktivitelerini uzun süre koruyabildiği görülmüştür. Bu bakterilerin, ağız boşluğundan iyi bir sızdırmazlık sağlandığında dahi smear tabakasında çoğalabileceği belirtilmektedir. Çürük sürecinin devam etmesine, hatta tekrar ederek ikincil (sekonder) çürük oluşmasına neden olan bu durumun sebebi; bakteriyel toksin kaynaklarının derin dentin ve pulpa dokularına difüzyonuna bağlanmaktadır. (95).

Günümüzde, bakteri aktivitesine bağlı potansiyel riskleri ortadan kaldırmak için kavite hazırlığı sonrası ve restorasyon öncesi dezenfektanların uygulanması daha fazla kabul

gören bir yaklaşımdır (96, 97). Bununla birlikte, hidrofilik rezinin dentini örtüleme yeteneğini değiştirebileceğinden, kavite dezenfektanlarının dentin adeziv ajanlarla birlikte kullanılması konusunda endişeler bulunmaktadır (97, 98). Bu endişelerin aksine, kavite dezenfektanlarının, nemli diş yapısına bağlanabilen bir dentin adeziv ajanının yerleştirilmesinden önce yeniden nemlendirme etkisi yaratarak; sızdırmazlık kabiliyetini iyileştirebileceği, daha iyi bir adezyon sağlayabileceği ve postoperatif hassasiyeti önleyebileceği de öne sürülmüştür (99).

Kavite dezenfektanı kullanımı ile elde edilmek istenen; restorasyona başlamadan diş duvarlarında, mine-dentin sınırında, smear tabakasında ve dentin tübüllerinde bulunabilecek bakterileri antibakteriyel özellikleri sayesinde ortadan kaldırmaktır (100). Yıkama aşaması olmayan ve antibakteriyel monomer bulundurmeyen self etch primerlerin kullanılmasından sonra arta kalabilen bakteriler, özellikle de bu sistemler tercih edildiğinde kavite dezenfektan kullanımını gerektirdiği iddia edilmektedir (101).

Önceki zamanlarda piyasada bulunan gümüş nitrat, fenol, timol gibi kimyasal materyaller pulpa dokusunda hasar yaratması sebebiyle, günümüzde sıklıkla adı duyulan klorheksidin glukonat, sodyum hipoklorit (NaOCl), hidrojen peroksit (H₂O₂), benzalkonyum klorür, iyodin solüsyonları, fosforik asit, antibakteriyel bondingler, ozon gazı ve lazerler gibi materyaller tercih edilmektedir (102).

2.5.1. Klorheksidin Glukonat

1940'lı yıllarda keşfedilen ve sentetik bir kemoterapötik ajan olan klorheksidin, tıp alanında sıklıkla tercih edilmektedir. Diş hekimliğinde ise son 30 yılda ön plana çıkan klorheksidin, dental plağın kimyasal kontrolünde ve çürük oluşumunun önüne geçilmesi konusunda faydalı görülmektedir. Diş hekimliğinde tercih edilen formu klorheksidin diglukonattır (100).

Klorheksidin glukonat, ağız sağlığında yaygın olarak var olan antimikrobiyal ajanlardan olmakla beraber oral antiseptiklerin altın standardı olarak kabul edilmektedir (103). Klorheksidinin farklı konsantrasyonları ve biçimleri mevcuttur. Bu konsantrasyonlar %0,12 ila 0,2 ağız gargaralarında, %2 kavite dezenfektanı olarak ve %0,5 ila 1 jel formatında bulunmaktadır. Klinik diş hekimliği ve diş araştırmalarında yaygın olarak kullanılan, hem biyolojik hem de toksikolojik olarak uygun klorheksidin formunun % 2'lik solüsyonu olduğu bildirilmiştir (104).

Klorheksidin güçlü antibakteriyel etkinliği, çürük temizlenmesinin ardından, kavite dezenfeksiyonu amacıyla kullanılma fikrini ortaya çıkarmıştır. Klorheksidin diglukonat esaslı solüsyonların, çeşitli mikroorganizmalar kullanılarak yapılan çalışmalarda antibakteriyel etkinliği gösterilmiş ve preparasyonun ardından hala var olan mikroorganizmaların elimine edilmesinde tercih edilebileceği öne sürölmüştür (100, 105).

Klorheksidin glukonat; kuvvetli bazik özellikte ve bipolar kuaterner amonyum moleküler yapısı olan bir bis-biguanid bileşimidir. Pozitif yükü nedeniyle katyonik özellikte olması bakterinin hücre duvarı, ekstrasellüler polisakkaritler, hidroksiapatit, pelikül, tükürük münleri ve oral mukoza gibi negatif yüklü yüzeylere afinite göstermesini sağlamaktadır (106).

Klorheksidin glukonat, geniş spektrumlu bir antibakteriyel ajandır. Antibakteriyel etkinliği, bakteriler tarafından adsorbsiyonu ile sağlanmaktadır. Nötral pH'da pozitif yüklü klorheksidin molekölü, negatif yüklü bakteri hücre duvarına adsorbe olabilmektedir. Asidik pH değesinde ise adsorbsiyon azalmaktadır. Düşük konsantrasyonlarında, küçük moleküler ağırlıklı maddelerin sızmasıyla, sitoplazma membranının disorganizasyonuna bağlı olarak geçirgenlik artmakta ve metabolik olayların inhibisyonu sonucu bakteriyostatik etki göstermektedir. Bakteriyostatik etkileri geri dönüşümlüdür ve fazla klorheksidinin uzaklaştırılması, bakteri hücresinin eski haline dönmesini sağlamaktadır. Daha yüksek konsantrasyonlarda ise, protein yapıyla kurulan çapraz bağlanmanın neden olduğu sitoplazma çökmesine veya pıhtılaşmasına bağlı olarak bakterisit etki ortaya çıkmaktadır. Dokuya bağlanan klorheksidin molekölü, konsantrasyon azaldıkça 24 saate kadar yavaş salınabildiğinden bakteriyostatik etkisinin daha önemli olduğu düşünölmektedir (107).

Dentin, kollajen bazlı dokuların fizyolojik ve patolojik mekanizmasını düzenleyen, hücre dışı matris bileşenlerini parçalayan, çinko ve kalsiyuma bağlı enzimlerin bir grubu olan matris metalloproteinazları (MMP'ler) içermektedir (108). Dentinde hibrit tabaka oluştuğunda, adezivin arayüz kararlılığı, kompakt ve homojen bir tabaka oluşturulmasına bağlıdır. Bu bağlanma MMP'lerin hidrolizi ve proteolitik etkisi nedeniyle zamanla bozulmaktadır. Yapılan çalışmalar, bu bağ dayanımını arttırmak için, katyonik ajanlar, çapraz bağlama ajanları, polifenoller veya bazı rezin monomerleri dahil ancak bunlarla sınırlı olmamak üzere sentetik MMP inhibitörlerinin kullanılmasını önermektedir. Klorheksidin, MMP inhibitörü olarak en sık kullanılan antimikrobiyal ajanlardan biridir (109–111).

İn vivo ve in vitro çalışmalarda, fosforik asit uygulamasından sonra ve adeziv uygulamasından önce dentin yüzeyinde klorheksidin diglukonat kullanımının dentin kollajen fibril yıkımını önlediği görülmüştür (112, 113). Klorheksidin diglukonat çözeltileri, %0.03 kadar küçük konsantrasyonlarda bile MMP-2 ve MMP-9 aktivitesini tamamen inhibe edebilmektedir (114). Klorheksidin diglukonatın mineralize dentine en az 12 hafta, demineralize dentine daha da uzun bir süre bağlanacak kalıcılığa sahip olduğu ve daha stabil, uzun vadeli adeziv arayüzleri elde edilmesini sağlayabildiği bildirilmiştir (115).

Uzun sürelerde kullanıldığında metalik tat, tat alma duyusunda bozulma, eritem, ürtiker, bronkospazm, dil ve dişte renklenme, nasal konjesyon, öksürük gibi aşırı duyarlılık semptomları, glosit, stomatit, konjiktiva ve muköz membran iritasyonları bildirilen yan etkileridir. Yüksek konsantrasyonlarda (%18) bahsedilen toksik etkilerin görülmesi muhtemeldir. Bununla birlikte, %10 konsantrasyonlara kadar doku ile teması uygun görülmektedir (116).

2.5.2. Sodyum Hipoklorit

Sodyum hipoklorit (NaOCl), endodontide antimikrobiyal irrigant olarak 1920 yılında ilk kez kullanıldıktan sonra dezenfektan maddesi olarak yaygın kullanımına başlanmış bir organik çözücüdür. NaOCl oldukça etkili bir doku çözme gücüne ve kavitede kalan bakteriler üzerinde güçlü antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Antimikrobiyal aktivitesinin solüsyonun konsantrasyonundan etkilendiği, düşük konsantrasyonlarda bile bakterisid etki gösterebildiği belirtilmiştir (117).

NaOCl'ye su eklenmesiyle hazırlanan hipokloroz asit (HClO), aktif klor içeren güçlü bir okside edici ajandır. Ortaya çıkan aktif klor, bakteri hücreesindeki önemli enzimlerin sülfidril gruplarında oksidasyon reaksiyonu başlatarak hücrenin metabolik fonksiyon işlevlerini ortadan kaldırmaktadır. Antibakteriyel etkisi aktif klor ve oksijen salınımına bağlı olmakla beraber yüksek konsantrasyonda kullanım da önemli rol oynamaktadır. Bunun yanı sıra organik substratla temas edildiğinde aktif klor harcanmakta ve antimikrobiyal aktivite düşmektedir (118).

Yüksek pH (11.8) kavite asiditesini nötr hale yaklaştırmakta ve bakteri üremesini engellemektedir. Güçlü bir antibakteriyel ajan olsa da artan konsantrasyonlarda oldukça fazla toksik reaksiyon geliştirebildiği tespit edilmiştir. Endotel hücre hasarı, submukozal hemorajiler, fibroblastlara ve lenfositlere karşı toksik reaksiyonlar, kollojende bazofilik dejenerasyonlar bu toksik etkilerden bazılarıdır (119).

NaOCl'nin kavite dezenfektanı olarak tercih edilmesi dentindeki kollajeni uzaklaştırması ve adeziv sistemlerle oluşturulan hibridizasyona engel olması gibi sebeplerden dolayı tartışmalı bir konudur (120). Bir diğer konu da NaOCl parçalanmasıyla oluşan oksijenin, rezin bazlı materyallerin polimerizasyonunu inhibe ettiğinin ileri sürülmesidir (121).

2.5.3. Hidrojen Peroksit

Hidrojen peroksit (H_2O_2); başta gram pozitifler olmak üzere bakterilere ve virüslere karşı etkili bir antimikrobiyaldir. Peroksidaz aktivitesi bulunan katalaz benzeri mikroorganizmalar düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 'e direnebilirken, yüksek konsantrasyonlardaki H_2O_2 bu savunma mekanizmasına engel olabilmektedir.

Katalaz aktivitesi olmayan bakteriler peroksidi çözemediği için H_2O_2 'e duyarlıdır. Antibakteriyel etkisini, oksidasyon ve köpürme etkisi sayesinde açığa çıkan serbest hidroksil radikalleri sebebiyle bakterilerin DNA, protein, lipit gibi hücresel komponentlerinde hasar yaratarak göstermektedir (122). H_2O_2 'in *S. mutans* üzerinde antibakteriyel etki gösterebilmektedir. Özellikle çukur agar metodunda *L. acidophilus* ve *S. aureus* üzerinde klorheksidin glukonattan daha fazla antibakteriyel etkinlik sergilediği de varılan sonuçlar arasındadır (105, 123).

Kavite dezenfeksiyonunda %2-3'lük H_2O_2 'in pamuk pelet ile kaviteye uygulanması uygun bulunmuştur. Oksijenin, rezin bazlı materyallerin polimerizasyonuna engel olması ve H_2O_2 'in de oksijen oluşumundan sorumlu olması bağlanma konusunda dezavantaj ortaya koymaktadır (105).

2.5.4. Benzalkonyum Klorür

Benzalkonyum klorür, alkilbenzildimetil amonyum klorürlerin bir karışımı olarak antimikrobiyal aktiviteye sahip, cilt ve mukoz membranlarda antiseptik olarak kullanılan yüzey aktif bir maddedir. Bu kuaterner amonyum bileşiğinin antimikrobiyal etkisi; hücre zarı geçirgenliğinin değiştirilmesine ve sitoplazmik bileşenlerin sızmasına yol açacak şekilde bakteriyel ölümle sonuçlanacak zar yük dağılımının bozulmasına dayanmaktadır (124).

Antimikrobiyal aktivitesi, çözünme kapasitesi ve restoratif materyallerinin dentine bağlanma gücü üzerindeki etkilerini değerlendirmek için irrigasyon solüsyonlarına %0,008 ile %0,1 arasındaki konsantrasyonlarda eklenerek çeşitli çalışmalarda değerlendirilmiştir

(125, 126). Ayrıca adezivler, cam iyonmer simanlar ve rezin kompozitler gibi farklı dental restoratif materyallere %5'e kadar konsantrasyonlarda dahil edilmesinin; proteazları inhibe etme kapasitesinden dolayı faydalı antibakteriyel özellikler ve uzun süreli etkiler sağlayabileceği düşünülmüştür (77). *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus*, *Actinomyces viscosus*, ve *Staphylococcus aureus* gibi mikroorganizmalara karşı etkili bir antibakteriyel ajan olarak tanımlanmış olsa da aktivitesi klorheksidinden az bulunmuştur (127).

Bir kavite dezenfektanı olarak benzalkonyum klorürün; pulpa ile uyumlu olduğu rapor edilmiş ve restorasyon kavitede kalan mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için %0.4-1.6'lık konsantrasyonlarının uygun olacağı belirtilmiştir (128). Klorheksidinde olduğu gibi, rezin restorasyonunun dentine adeziv bağını koruyabilen etkili bir MMP inhibitörü olduğu da belgelenmiştir (129).

2.5.5. İyodin Solüsyonları

İyot bazlı dezenfektanlar, geniş spektrumlu ve yüksek etkili kararsız solüsyonlardır. Bakteriler üzerinde etki daha fazla iken virüsler, mantarlar ve sporlu bakterilere karşı daha düşük etkilidir. Etkinliği belirleyen faktörler pH, ısı, uygulanma süresi ve konsantrasyon olarak sıralanmaktadır. Hücre duvarına etki ederek; oksidatif yolla bakterilerin elektron akışını değiştirerek antibakteriyel etkisini göstermektedir. Moleküler iyodin asıl antibakteriyel etkiyi sağlamaktadır. Bu nedenle iyodin taşıyıcı ya da iyodin salan ajanlar (iyodofor) araştırılmıştır. İyodoforlar iyodin ve aktif serbest iyodin deposu olarak rol oynayan taşıyıcı ya da çözücü ajan karışımından meydana gelmektedir (100, 105, 119, 130). İyodinin de *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus mutans* ve *Staphylococcus aureus* üzerinde antibakteriyel etkinliği belirtilmiştir (105).

Klinik diş hekimliğinde dezenfeksiyon amacıyla farklı iyot solüsyonları kullanılmaktadır. Bunlara iyot potasyum iyodür, potasyum iyodür/bakır sülfat, iyot açığa çıkaran dezenfeksiyon solüsyonu ve providon-iyodin örnek verilebilmektedir (131).

2.5.6. Fosforik Asit

Çürük dokunun temizlenmesi esnasında dentinde meydana gelen smear tabakası mikroorganizmalar için uygun bir ortam yaratmaktadır. Bu sebeple smear tabakasının uzaklaştırılarak asit kullanımının kaviteyi dezenfekte edeceği görüşünü benimseyen araştırmacılar bulunmaktadır (132).

Asitle aşındırma işleminin mine üzerindeki etkilerini birçok faktör etkilemektedir. Asit çözeltisinin tipi, konsantrasyonu, kullanılan teknik, fiziksel durum ve uygulama süresi en fazla araştırmaya konu olan parametrelerdir. Son zamanlarda fosforik asit (%30 ile %50 arasındaki çözeltileri), floridlenmiş fosforik asit, piruvik asit, sitrik asit, maleik asit, oksalik asit, tannik asit, etilendiamintetraasetik asit, triklorasetik asit ve poliakrilik asit gibi farklı aşındırma çözeltileri test edilmiştir (133).

2.5.7. Antibakteriyel Bondingler

Kavite dezenfektanlarının kullanılması kompozit materyallerin bağlanma dayanımına negatif yönde etki oluşturabilmektedir. Bu nedenle antibakteriyel etki göstermesi amaçlanan adezivler piyasaya sürülmüş ve kavitede kalan bakterilerin eliminasyonu hedeflenmiştir (105). Adezivin antibakteriyel potansiyeli, özellikle derin kavitelerde kontaminasyon kontrolüne izin verebilmektedir. Antibakteriyel aktivite, adezivin bileşimi ve asiditesi dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. N-metakriloil 5-aminosalisilik asit (5-NMSA) ve Fenil-P (MDP) gibi bağlanmayı teşvik eden asidik monomerler ve özellikle gluteraldehit moleküllerindeki gibi fosforik, karboksilik veya akrilik kısımları olan bileşimler, primerlerin veya adeziv solüsyonların antibakteriyel etkisinden sorumlu tutulmaktadır (134). MDPB monomeri, bir metakriloil grubu ile antibakteriyel özellikler ve bakteri üremesine ve plak birikimine karşı engelleyici bir etki sağlayan bir kuaterner amonyumun birleştirilmesiyle sentezlenmektedir (135). Kuaterner amonyum monomeri olan DMADDM (dimetilaminododesil metakrilat) ise, *Streptococcus mutans* biyofilm büyümesini, laktik asit üretimini ve ekzopolisakkarit metabolizmasını inhibe edebilmektedir (136).

2.5.8. Ozon

Ozon (O_3), oksijenin aktifleştirilmiş oksijen atomlarına fotoayrışmasıyla doğal olarak üretilen ve başka oksijen molekülleri ile de reaksiyona giren soluk, kararsız bir gazdır. Ozonun güçlü bir oksitleyici olduğu bilinmektedir. Bu nedenle bakterilerin hücre duvarını ve sitoplazmik membranını bozarak antibakteriyel aktivitesini göstermektedir. Dental uygulamalarda ozon, gaz, su ve yağ olmak üzere üç formda kullanılabilir. Sıvı ya da gaz formdaki ozon, geniş spektrumlu bir oksidandır (137). *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* ve *Streptococcus mutans* sayısında, 10 veya 20 saniye ozon uygulaması ardından %99 azalma gözlenmiştir (138). Ayrıca 10 ve 30 saniye ozon uygulamasının *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus casei* sayılarını düşürmese de, süre 60 sn olduğunda

tükürük protein yapısını değiştirerek mikroorganizmaların azaltılmasında etkinlik görülen bir çalışma da bulunmaktadır (139). Ozon gazı ile dezenfeksiyon ardından herhangi bir artık veya kalıntı kalmaması da bu yöntemin avantajlarından (138).

2.5.9. Lazerler

Lazerler, farklı dalga boylarında ışın yayan cihazlardır. Lazer kelimesi, uyarılmış radyasyon emisyonu ile ışık amplifikasyonunun kısaltmasıdır. Bir lazer cihazında, aktif ortam, stimülasyon üzerine ışınları oluşturmaktan sorumludur. Işınları oluşturan farklı aktif ortamlarla farklı türde lazerler üretilmiştir. Bu ortamlar, erbiyum katkılı itriyum, alüminyum ve granat lazerlerde (Er:YAG) olduğu gibi katı halde; karbondioksit (CO₂) lazerlerinde olduğu gibi gaz halde; veya diyot lazerlerde olduğu gibi yarı iletken olabilmektedir (140).

Lazer ışınması, bakteriler üzerinde termal ve foto-bozucu etkilere sahiptir, bu da hücre büyümesinin bozulmasına ve lizisine yol açmaktadır (141). Lazer sistemleri; lazer enerjisi, hücrenin su içeriği ve hacmi, hücre duvarının sağlamlığı, absorpsiyon özellikleri, bakterilerin dentin tübüllerindeki hareketi gibi etmenlere bağlı olarak antibakteriyel etki göstermektedir (142). Yapılan bir çalışmada, düşük seviyeli bir lazerle antimikrobiyal fotodinamik tedavinin, *Streptococcus mutans* üzerinde etkili olduğu görülmüştür (143). Başka bir çalışmada da farklı dezenfektanların (diyet lazer dahil) antimikrobiyal aktiviteleri karşılaştırılmış ve kontrol grubuna kıyasla diyet lazer grubu ile *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus* sayılarında önemli düşüşler görülmüştür (141). Bu antimikrobiyal aktivite, %2 klorheksidin ile elde edilenden önemli ölçüde farklı bulunmamıştır (144).

Lazerlerin, smear tabakasını uzaklaştırmasıyla, kalan bakterileri de uzaklaştıracağı ve kavite dezenfeksiyonunda öne çıkacağı düşünülmektedir. Bu konuda Er:YAG lazerlerin smear tabakası kaldırabilmedeki etkinliği belgelenmiştir (144).

2.5.10. Doğal Kaynaklı Dezenfektanlar

Son yıllarda diş hekimliği uygulamalarında geleneksel tıbbın tamamlayıcısı olarak doğal terapötiklerin kullanımına olan ilginin arttığı bildirilmiştir. Bu yönelimin birçok sebebi bulunmaktadır. Bugüne kadar kullanılan ve anlatılan çeşitli kavite dezenfektanları arasındaki kimyasallardan birkaçının pulpa ile biyolojik olarak uyumlu olmadığı bilinmektedir (145). Ayrıca, mevcut kavite dezenfektanlarının kullanımının restoratif materyallerin adezyonu üzerindeki etkisi hakkında endişeler bulunmaktadır (146). Klorheksidin; kavite dezenfektanları üzerine gelecekteki çalışmalar için pozitif bir kontrol

olarak kabul edilse de mevcut dental literatür, kavite dezenfeksiyonunun klorheksidin ile ilişkisini ve adeziv sistemin bağlanmasına olan etkisini tartışmalı bir konu olarak yansıtmaktadır (147, 148). Bir diğer konu da antimikrobiyallerin gelişigüzel kullanımının; daha fazla patojeni dirençli hale getirerek, başarılı tedavi sağlamada engel oluşturabilmesidir (149). Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için güvenli, etkili ve ekonomik olarak alternatif bir kavite dezenfektanına ihtiyaç duyulmasıyla fitoterapötikler alanında önemli bir ilgi ve artan bir eğilim ortaya çıkmıştır.

Fitoterapi, bitki özlerinin tıbbi kullanımı olarak tanımlanmaktadır. Doğal olarak türetilen farklı dezenfektanlar, antimikrobiyal aktiviteleri ve restoratif prosedürler üzerindeki etkileri için kullanılmış ve test edilmiştir. Doğal kaynaklı kavite dezenfektanı arayışında pek çok kaynak tarafından test edilen sarımsak özü, tarçın yağı, kekik yağı, çay ağacı yağı, hint dutu, misvak ağacı, aloe vera gibi birçok doğal ürünün antimikrobiyal özellikler gösterdiği tespit edilmiştir (130). Lapuşa, pancar, pazı ve roka gibi bitki ekstrelerinin antibakteriyel özelliklerini ve kavite dezenfeksiyonu için kullanılabilirliğini araştıran başka bir çalışmada bu bitkiler sekonder metabolitler olarak da bilinen alkaloidler, terpenoidler ve polifenolik içeriklerine dayanılarak seçilmiştir (150). Bu doğal ürünler arasında en çok dikkat çeken ve dental literatürde çeşitli yönleri ve etkileri araştırılan doğal kaynaklı ürün propolistir (130, 151, 152).

Propolis, çeşitli ağaç gövdesinden sızan reçine özünden elde edilen ham bir ekstrattır. Kimyasal bileşimi sekonder metabolitlerden terpenoidlerin yanı sıra flavonoidler, fenolik asitler ve esterler açısından da zengindir. Flavonoid grubu propolisin reçine içerikli kısmının büyük bir bölümünü oluşturmakla beraber onun aktif bileşenidir. Propolisin antioksidatif, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikaryojenik ve antiinflamatuvar özelliklerinin çoğundan da flavonoidler sorumludur (153). Antibakteriyel aktivitesi özellikle *S. aureus* gibi Gram-pozitif bakterilere (154) karşı yüksek bulunmuştur. Bunun yanı sıra *S. mutans* ve *S. sobrinus* gibi dental çürük patogenezinde ana rolü oynayan bakterilerin glikosiltransferaz enzim aktivitesinin inhibisyonunu sağlayan propolisin etkinliği in vivo ve in vitro olarak doğrulanmıştır (155). Bahsedilen yönleri ile beklentileri karşılayan propolis, başka reçine içerikli materyallerin dental alanda araştırılması için referans olabilmektedir.

2.5.10.1. *Picea orientalis* (Doğu Ladini)

Ülkemizde “doğu ladini”, İngilizce’de “*Caucasian spruce* veya *oriental spruce*” olarak isimlendirilen ve Pinaceae yani kozalaklı ağaç türlerini içeren bitki familyasına ait *Picea orientalis* (*P. orientalis*), ekonomik açıdan önde gelen ağaç türlerinden biridir. Fransız botanikçi Joseph Pitton de Tournefort (1656- 1708) tarafından ilk kez Kuzey Anadolu dağlarında bulunarak tanıtılmıştır (156).

P. orientalis antioksidan bir bileşik olan lignin ve türevleri açısından zengin bir kimyasal içeriğe sahip olması sebebiyle sıklıkla araştırılmaktadır. Endüstriyel anlamda odun hamuru yapımında ve kâğıt ile mobilya endüstrisinde kullanılmakta, taşıdığı uçucu yağı ve reçinesiyle ise halk sağlığında fitoterapötik bir bitki olarak dikkat çekmektedir (157, 158). Ayrıca aktif bileşeni olan lignin sayesinde kompozit yapımı ile biyofuel elde edilmesinde bir kaynak olabileceği belirtilmiştir (159). Bunun yanı sıra, *P. orientalis* ormancılık sektöründe birçok araştırmanın konusu olmuştur. Fakat hakkında yapılan az sayıda fitokimyasal ve biyolojik aktivite çalışması bulunmaktadır.

P. orientalis yaklaşık 35-50 metreye kadar yükselebilen, uç kısmı piramit biçiminde ve dallanması yoğun, yaprak dökmeyen, monoik bir ağaçtır. Genç filizleri salgılı ve yumuşak tüysüdür. Gövdesinin kabuk kısmı gri, düz ve çatlak haldedir. Ağacında uzun sürgünler barındırmasının yanı sıra, iğne şekilli yaprakları 1 mm eni, 7-8 mm boyu ile, küt, koyu yeşil, tepesi sivri, dört köşeli, ve sürgüne yatık olup, üstte 1-2, altta ise 3-4 mum çizgi barındırması, yaprağı kopartıldığında tırnak izi görülmesi ile bilinmektedir (160). Yeni süren kozalak kısmı menekşe-mor rengindedir. Olgun kozalakları ise elipsoit, 5-8 cm uzunluğunda, aşağı sarkıktır ve olgunlaşsa bile açılmadan düşebilmektedir. Kozalak pul rengi kahverengidir. Tohumları ise koyu renkli ve ters yumurtamsı bir biçimdedir.

P. orientalis doğal yaşam alanına bakıldığında ülkemizde Doğu Karadeniz bölgesi ve Kafkaslar ile Amerika Birleşik Devletleri’nin Rocky Dağları civarında yerel bir yayılım göstermektedir (161). Orman içerisinde baskın bir ağaç türü olup, Türkiye’de Ordu, Giresun, Trabzon, Artvin ve Rize başta olmak üzere Doğu Karadeniz bölgesinde bulunmaktadır (160).

P. orientalis bitkisinin etnobotanik kullanımı incelendiğinde; Rize’de halk tıbbında reçinesinin iltihaplı yaralar üzerinde kullanıldığı görülmektedir. Ağacın reçine ve kabuk bölgesinden elde edilen dekoksilyonun mide ülser tedavisinde kullanıldığı da bilinmektedir (162). *P. orientalis* Trabzon’da doruk veya çam ağacı olarak tanınmakta; yara, deri

rahatsızlıkları, diyabet ve ülser rahatsızlıklarının giderilmesinde tercih edilmektedir (163). Giresun'da ise ağaç reçinesinin kas ve mide ağrısının yanı sıra akciğer rahatsızlıkları ve iltihaplara karşı önerildiği bilinmektedir (164). Türkiye'de açık tohumlu türlerin etnobotanik incelemesinde, parazitik hastalıklar, peptik ülser, tüberküloz, akciğer yetmezliği, zatürre, yanık ve egzama tedavisinde önerildiği görülmüştür (165). Gürcistan'da ağacın polen ve reçinesinin bronşit ile yara tedavisinde kullanımı kayıtlı bulunmaktadır (166). İran'da halk arasında senobar adı ile *P. orientalis*'in gövdesinden alınan külün ve dumanının insektisit olarak kullanımının olduğu bildirilmiştir (167).

P. orientalis te de olduğu gibi çoğu iğne yapraklı ağaçta reçine kanal sistemi mevcuttur. Reçineler; reçine asitleri, reçine alkolleri, reçine fenoller ve bunların esterlerinin karmaşık karışımlarıdır (168, 169). Bitki sapının yaralanması ile reçine hızla dışarı çıkarak, ağacı dehidrasyondan ve mikrobiyal saldırıdan koruyan ince bir su geçirmez kaplama oluşturmaktadır. Yaralı bir ağaç gövdesi, ilk reçine yoğunluğu azaldıktan sonra kademeli olarak daha kalıcı bir reçine kaplaması üretmektedir. Büyüme mevsimi boyunca, ağaç, ilk yaralanmadan 3-4 hafta sonra reçineyi salmaya başlayan eksenel travmatik reçine kanallarının oluşumunu başlatmaktadır. Bu sayede ağaç yıllık büyüme ile yarayı kalıcı olarak kapatırken yaranın yüzeyi korunmaktadır. Her iki reçine de, sentezlerinin normal reçine kanallarında oluşup oluşmadığına veya travmatik reçine kanallarının oluşumunun bir sonucu olup olmadığına bakılmaksızın benzer bir bileşime sahiptir ve yaygın olarak oleorezinler olarak adlandırılmaktadır (170).

Bu yolla üretilen doğal reçineler, uygarlığın eski zamanlarından beri antiseptik ve antibakteriyel etkileriyle bilinmektedir. Bununla birlikte, antibakteriyel aktivite için reçineler ve reçine içeren bitkiler hakkında az sayıda rapor mevcuttur. Son zamanlarda, reçine ekstraktlarının antibakteriyel aktivitesi, toplam fenolik içeriğinin ve flavonoidler gibi sekonder metabolitlerin belirlenmesine dayanılarak değerlendirilmektedir (168, 169).

2.6. Sekonder Metabolitler

Bitkiler, gelişme ve büyümesinde yer almayan bazı yararlı biyolojik aktif kimyasal maddeler olan sekonder metabolitleri salgılamaktadır. Bu sekonder metabolitler yaklaşık 12.000 bileşik olan kükürt içeren bileşikler ve alkaloitler; yaklaşık 8000 bileşik olan fenolik ve polifenolik bileşikler; ve yaklaşık 25.000 bileşik olan terpenoidler olmak üzere üç ana grupta incelenmektedir. Sekonder metabolitler; buhar, solvent (organik/inorganik) ve süper kritik ekstraksiyon gibi geleneksel ekstraksiyon yöntemleriyle bitkilerin çeşitli

bölümlerinden elde edilebileceği gibi başka modern ekstraksiyon yöntemler de mevcuttur (171).

2.6.1. Fenoller ve Polifenoller

Polifenoller bitkilerde yaygın olarak bulunan maddelerdir ve diyetin temel unsurlarına aittir. En ünlü polifenol gruplarından biri flavonoidlerdir. Flavonoidler antimikrobiyal özellikleri için kapsamlı bir şekilde çalışılan başlıca fitokimyasal gruplardan biridir (172).

Flavonoidler, bir C₆-C₃-C₆ karbon iskelet (fenil benzopiran) içeren bir doğal fenolik bileşikler sınıfıdır. Temel flavonoid yapısı, heterosiklik bir piran veya piron C halkası ile bağlanan iki benzen A ve B halkalarından oluşan bir 2-fenil-benzo-γ-piran çekirdeğinden oluşmaktadır. Flavonoidler, doymamışlık ve oksidasyon düzeyine bağlı olarak çeşitli alt sınıflarda gruplandırılmaktadır. Bunlardan temel olarak flavonlar (kristin, apigenin, luteolin), izoflavonlar (genistein, daidzein), flavonoller (quersetin, mirisetin, kamferol), flavanoller (kateşinler), flavanonlar (naringenin, hesperetin), flavanonoller, kalkonlar ve dihidrokalkonlar, auronlar ve antosiyanidinler (siyanidin, pelargonidin) antimikrobiyal aktiviteleri ile ön plandadır (173).

Flavonoidler; antioksidan, antienflamatuar, antialerjik, antikanser, antiviral ve antifungal özellikleriyle bilinmektedir (174). Flavonoidler için yapılan birçok çalışmanın sonuçları yüksek antioksidan aktiviteye işaret etmektedir. Polifenollerin in vitro antioksidan özellikleri de iyi bir şekilde belgelenmiştir. Bununla birlikte, bitkiler mikrobiyal enfeksiyona yanıt olarak flavonoidleri sentezlediğinden; flavonoidlerin antibakteriyel özellikleri ve bunların insan hastalıklarının tedavisindeki uygulamaları hakkında artan bir ilgi vardır (175). Flavonoidler antibakteriyel özelliklerini; membran bütünlüğünün bozulmasına neden olmak, nükleik asit sentezini engellemek, bakteriyel virülansı ve biyofilm oluşturmayı sağlayan quorum sensing mekanizmasını inhibe ederek göstermektedir. Aynı zamanda bu antimikrobiyal etkiyi, yağ asidi sentaz aktivitesini ve peptidoglikan sentezini gerektiren hücre zarf sentezinin inhibisyonu yoluyla da yürütülebilmektedir. Flavonoidler, akış pompalarını engelleyerek, antimikrobiyal direncin tersine çevrilmesine yol açabilmektedir. (176).

Bir diğer polifenol alt grubu olan fenolik asitler; bir karboksilik asit grubu olan fenolik bileşikler tanımlamaktadır. Nadiren serbest halde bulunmaktadırlar. Fenolik asitler

hidroksibenzoik ve hidroksisinamik asit olmak üzere temel olarak iki alt gruba ayrılmaktadır (177). Sinamik asitten türetilen hidroksisinamik asitler, gıdalarda genellikle kinik asit veya glikoz ile basit esterler halinde bulunmaktadır. Mevcut en bol çözünür bağlı hidroksisinamik asit, kafeik ve kinik asitlerin bir birleşiminden oluşan klorojenik asittir. En yaygın dört hidroksisinamik asit; ferulik, kafeik, p-kumarik ve sinapik asitlerdir. Öte yandan, hidroksibenzoik asitler ortak bir C₆-C₁ yapısına sahiptir ve benzoik asitten türetilmişlerdir. Yaygın olarak bulunan dört hidroksibenzoik asit; p-hidroksibenzoik, protokateşik, vanillik ve siringik asitler olarak bilinmektedir (178).

Fenolik asitler; bitki antimikrobiyal mekanizmasının bir parçası olarak mikroorganizmaları öldüren veya bakterilerin büyümesini engelleyen bitkilerin ikincil metabolitleridir. Fenolik asitlerin bakteri büyümesi üzerindeki inhibe edici mekanizmaları geniş kapsamlıdır ve bakteri sitoplazmik membranını destabilize etmeyi, bakteri plazma membranının geçirgenliğini değiştirmeyi, hücre dışı mikrobiyal enzimleri inhibe etmeyi, doğrudan mikrobiyal metabolizmayı değiştirmeyi ve mikroorganizmaları büyüme için gerekli substratlardan yoksun bırakmayı içermektedir (179).

2.6.2. Fenolik Bileşikler İçin Ekstraksiyon Yöntemleri

Ham hali ile bitkiler, doğrudan analiz veya tedavilerde kullanılamamaktadır. Bu yüzden ekstraksiyon olarak bilinen çözelti ya da süspansiyon içindeki inorganik veya organik maddelerin başka bir çözücü yardımıyla ayrılma işlemi ile bitkilerin fitoterapötik kullanımını sağlayan alkaloidler, fenolikler, flavonoidler, glikozitler gibi sekonder metabolitler elde edilebilmektedir.

Bitki materyallerinden bu anlamda yararlanabilmek için çok adımlı bir prosedür gerekmektedir. Bunlar; numune alma, numunenin ön işleme tabi tutulması, ilgili bileşiklerin ekstraksiyonu, elde edilen ekstraktın daha fazla olası konsantrasyonu veya temizlenmesi ve hem bitki materyalini doğrulamak hem de yeni bileşikleri tanımlamak için kullanılmadan önce nihai ürün kalitesininin sağlandığı ekstrakttaki bileşiklerin son analizidir.

Ekstraksiyonun temel prensibi, bir bileşiğin birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılımını ifade etmek ve bunların daha fazla ayrılmasını ve ekstrakte edilen bileşiğin geri kazanılmasını sağlamaktır. Genel olarak ilgilenilen bileşiklere çözünenler veya analitler denilmekte; ilgi göstermeyen diğer bileşikler, enterferanslar olarak adlandırılmaktadır. Ekstrakte edilecek bileşiği içeren ilk bitki materyali, numune veya numune matrisi; karışmayan faza ise özütleyici veya özütleme çözücüsü denilmektedir. Ekstraksiyon adımı

gerçekleştirildikten sonra, numune, ekstrakte edilmiş çözünen (ekstre) içeren ekstraksiyon çözücüsünden atılmakta; kalan numune matrisi genellikle kalıntı olarak adlandırılmaktadır. Bazı durumlarda, bu kalıntı, birinci aşamada ekstrakte edilmeyen çözünen maddenin bir kısmını geri kazanmak için bir veya daha fazla ardışık ekstraksiyona tabi tutulabilmektedir.

Ekstraksiyon adımının ana zorluğu, analitleri seçici olarak (yani, müdahale eden bileşikler olmadan) ve muhtemelen niceliksel olarak (yani, numunedeki tüm analit moleküllerini) çıkarmaktır. Bu amaca ulaşmak için numune ile özütleyici arasında etkin bir temas gerekmektedir (180).

Çözücü seçimi, ekstraksiyon için hazırlık aşamalarından biridir. Farklı bitkilerden polifenollerin ekstraksiyonu için etanol, metanol, su, heksan, aseton, diklorometan ve kloroform gibi çeşitli çözücüler kullanılmaktadır (181). Bir bitki materyalinden hedef bileşiği çıkarmak için çözücünün seçiciliği, iki materyalin polarite uyumluluğu ile ilgilidir. Metanol ve etanol, aromatik bitkilerden polifenollerin kantitatif ekstraksiyonu için en yaygın kullanılan çözücülerdir. Etanol; tıbbi amaçlar için kullanılacak doğal maddelerde güvenli bir çözücü olarak görülmektedir. Mutlak etanol ve sulu etanol, iyi sonuçlarla doğal bileşenlerden fenolik türevleri ve antioksidan bileşikleri açığa çıkarmak için başarıyla kullanılmaktadır (182).

Fenolikler taze, dondurulmuş veya kurutulmuş bitki örneklerinden ekstrakte edilebilmektedir. Ekstraksiyondan önce malzeme öğütme, kurutma ve homojenleştirme gibi ön işlemlere tabi tutulmaktadır. İlk adımda, uygun ekstraksiyon prosedürü dikkate alınmalıdır. Kullanılacak ekstraksiyon yöntemine ilişkin karar, maddenin kimyasal yapısından, numune partikül boyutundan ve ayrıca enterferans yapan maddelerin varlığından etkilenmektedir. Ekstraksiyon süresi, sıcaklık, çözücü-besleme oranı, numunenin tekrarlanan ekstraksiyon sayısı ve çözücü seçimi ekstraksiyon verimini etkileyen çok önemli parametrelerdir. Çözünürlük; hem ekstraksiyon süresinden hem de sıcaklıktan etkilenmektedir (183). Mumlar, yağlar, terpenler ve klorofiller gibi istenmeyen bileşiklerin ortadan kaldırılması için ek adımlar da prosedüre eklenebilmektedir (184).

Uzun yıllardır, geleneksel tekniklerden olan sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyonu, temel olarak kullanım kolaylıkları, etkinlikleri ve kapsamlı uygulanabilirlikleri nedeniyle geniş çapta kabul görmekte ve sıklıkla kullanılmaktadır. Ek olarak, tipik ve yaygın olarak kullanılan geleneksel ekstraksiyon yöntemlerinden maserasyon ve Soxhlet ekstraksiyonu,

organik çözücülere olan yüksek talep nedeniyle düşük verimlilikleri ve potansiyel çevresel tehlikeleri ile de bilinmektedir (185).

Konvansiyonel ekstraksiyon prosedürlerinde yüksek proses sıcaklıkları ve uzun proses süreleri ile bağlantılı problemler nedeniyle, fenolik bileşikler için alternatif ekstraksiyon tekniklerinin geliştirilmesi ve uygulanmasının teşvik edilmesi için temel bir ihtiyaç ortaya çıkmıştır. Olası alternatifler, basitlikleri, daha kısa ekstraksiyon süreleri ve azaltılmış organik çözücü tüketimi nedeniyle son zamanlarda yüksek ilgi kazanan ultrason destekli ekstraksiyon, mikrodalga destekli ekstraksiyon, ultrason-mikrodalga destekli ekstraksiyon, süper kritik sıvı ekstraksiyonu ve kritik altı su ekstraksiyonunu gibi modern yöntemlerdir (186).

2.6.3. Fenolik Bileşikler İçin Analiz Yöntemleri

Doğada fenolik bileşiklerin ve flavonoidlerin bitkisel kaynakları ve insan sağlığındaki rolü kadar önemli olan bir diğer konu, çeşitli matrislerdeki analizlerinde kullanılan farklı metodolojiler ve tekniklerdir. Numune işleme sürecindeki son adım olan fenoliklerin miktar tayini, yani analizi, için kromatografik ve daha az yaygın spektrofotometrik teknikler kullanılmaktadır (187). Kromatografi; diğer metotlarla tekil hali elde edilemeyen, fiziksel ve kimyasal özellikleri yakın maddelerin veya karışımların tamamen, kolayca ve kısa sürede ayrılarak analiz edilebildiği çeşitli yöntemleri ifade etmektedir. Bu teknikte, bir karışımda bulunan ve aynı olmayan moleküller, hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinde, değişik hızlarla sürüklenmesi prensibine dayanılarak ayrılmakta ve saflaştırılmaktadır. Kromatografik yöntemler uygulama biçimine göre; kağıt kromatografisi ile ince tabaka kromatografisi (TLC) olarak bilinen düzlemsel kromatografiler ve gaz kromatografisi (GC) ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak bilinen kolon kromatografileri olmak üzere temelde iki gruba ayrılmaktadır (188).

Analitik biliminin gelişmesi ile birçok farklı fenolik bileşik analiz yöntemi araştırılmış ve geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan analitik yöntemler, fenollerin 4-aminoantipirin (4-AAP) ile oksidatif bağlanmasına dayanan spektrofotometrik yöntemlerdir. Düşük konsantrasyon seviyelerine ek olarak, tüm fenolik bileşiklerin reaktivite ve özelliklerindeki benzerlik, ayrılmayı zorlaştırmaktadır. Bu nedenle, gaz kromatografisi (GC), genellikle bir türevlendirme ve ön konsantrasyon aşaması ile fenollerin analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, türevlendirme, numune hazırlama süresini

arttırmakta ve olası bir hata kaynağı oluşturmaktadır. Alternatif olarak fenoller; ultraviyole (UV), fotodiyot (DAD), kütle spektrometrisi (MS) ve floresans (FLD) gibi farklı dedektör sistemlerinin kullanılabildiği yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile de belirlenebilmektedir. Kılcal elektroforez ve yakın kızılötesi spektroskopi dahil olmak üzere fenolik bileşikler ölçmek için bazı gelişmiş teknikler de uygulanmaktadır (189).

2.6.3.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Hidrofobik flavonoid aglikonların ve hidrofilik flavonoid glikozitlerin ve fenolik asitlerin nispeten yüksek moleküler kütlesi ve içsel özelliği, araştırmacıları deneyleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisine (HPLC) yönlendirmektedir (190). Standart bir HPLC cihazı pompa, enjektör, kolon (sabit faz) ve detektördür olmak üzere dört temel bileşenden oluşmaktadır. Kolon tipleri, uygulanan dedektörler, hareketli faz ve test edilen bileşiklerin özellikleri gibi bazı faktörler fenolik bileşiklerin HPLC analizini etkilemektedir (191).

HPLC cihazının çalışma basamakları incelendiğinde; ilk adım test edilecek biyomolekülün uygun bir çözücüde özüt haline getirilmesidir. Daha sonra örnek içeriğinin ayrımı, sabit faz olarak nitelendirilen kolonda gerçekleştirilmektedir. Çözünen karışım kolona gelmekte ve bu karışımın ve mobil fazdan oluşan sıvının hareketi için basınç yaratılmaktadır. Bu basıncın etkisi farklı bileşenlerin, kolonda aynı olmayan hızlarda ilerlemesini sağlamaktadır. Böylece bileşenlerin çıkışa ulaşma zamanları değişmektedir. Kolondan ayrılan bileşenleri görülmesini, bunların miktar ve ayrımlarının belirlenmesini sağlayan dedektörlerden geçen maddeler, bir kaydedici aracılığıyla kayıt altına alınarak, zamana karşı dedektör cevabını gösteren bir grafik oluşturmakta ve bu grafik kromatogram olarak adlandırılmaktadır. Detektörden aracılığıyla elde edilen kromatogramlar bugün birçok bilgisayar programı sayesinde ulaşılabilir hale gelmiştir.

HPLC incelemelerinde sistemle beraber tercih edilen en yaygın dedektörler; UV, DAD ve MS'dir. DAD ile birleştirilmiş HPLC; bitkilerdeki fenolik bileşikler analiz etmekte sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Genel olarak, DAD ve UV'nin altında yatan prensipler aynı olsa da bazı farklılıklar mevcuttur. DAD'ler çok kanallı absorpsiyon dalga boylarını aynı anda ölçmek için kullanılırken, UV'ler bilinen numunelerde tek absorpsiyon dalga boyunu ölçmek için kullanılmaktadır (192, 193).

Çok yaygın kullanım alanı bulunan HPLC tekniği ile yapılan analizler genel olarak; ilaç, biyokimyasal, gıda, adli tıp ve toksikoloji, klinik biyokimya, çevre kirleticileri ve endüstriyel analizleri kapsamaktadır (192).

2.7. Bitki Ekstraktlarında Antimikrobiyal Etkinlik Test Yöntemleri

Bitki ekstraktlarının test edildiği çalışmalarda onaylanmış ve standartlaştırılmış tek bir yöntem bulunmamakta ve genel olarak, antibakteriyel aktivitenin in vitro testi için kullanılan yöntemler, geleneksel farmasötik testlerden uyarlanmaktadır. Antibakteriyel duyarlılık çalışmalarında “Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI)” standartları referans alınmaktadır. Buna göre antibakteriyel duyarlılık testleri, bir antibakteriyel materyalin araştırılan bakteri türlerine karşı in vitro aktivitesini belirlemek için yapılan testlerdir. Bitki ekstraktları için kullanılan en yaygın in vitro testler, dilüsyon ve difüzyon olmak üzere iki yönetime dayanmaktadır (194).

2.7.1. Dilüsyon Test Metodu

Dilüsyon testleri, bir antimikrobiyal materyalin bir mikroorganizmanın çoğalmasını engellemek veya ortadan kaldırmak için gereken en az konsantrasyonunu tespit etmek amacıyla kullanılmaktadır. Bu testler agar ve tüp dilüsyon olarak bilinen iki yöntemi içermektedir.

Tüp dilüsyon mikro ve makro olmak üzere iki yöntemle uygulanmaktadır. Her iki yöntem de prensipte benzerdir. Mikrodilüsyonda ise "U" ya da "V" tabanlı "mikroplate"ler, makrodilüsyonda ise test tüpleri, kullanılmaktadır. Tüp dilüsyonda besiyeri amaçlı Mueller-Hinton buyyon kullanılmaktadır. Bu yöntemde etkinliği araştırılacak antibiyotikler belirli çözücüler içinde hazır hale getirilir ve bu sıvı besiyerinde iki kat azalan sulandırımıları uygulanır. Mikroorganizmanın standart bir inokulumu (1×10^6 CFU / ml), antimikrobiyal materyalin birçok dilüsyonu olan tüplere aynı miktarlarda ilave edilir. Bunun yanı sıra antibiyotik bulunmayan, çoğalmayı belirten kontrol tüpüne de ekleme yapılır. Bakteri inokülasyonu yapılmamış, sadece besiyeri hazırlanmış bir tüp veya çukur da besiyeri kontrolü olmak üzere seçilir (195). Besiyerleri 35°C'de bir gece inkübe edilme işleminden sonra bakteri çoğalmasını belirten bulanıklık açısından araştırılır. Bakterinin çoğalmasını engelleyen, belirgin bir bulanıklık meydana gelmeyen en düşük ilaç konsantrasyonu, minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) olarak tespit edilir.

Agar dilüsyon metodunda uygulama adımları tüp dilüsyon metoduyla benzerdir. Farklı olan taraf, agar dilüsyon metodunda antibiyotik sulandırımının agar içerisine eklenmesi ve petri plaklarına dökülmesidir. Bu yolla her plakta antibiyotiğin aynı olmayan konsantrasyonları elde edilmektedir (196).

2.7.2. Difüzyon Testleri

Antibiyotik duyarlılığının saptanmasında sıklıkla tercih edilen laboratuvar yöntemlerinden biri de disk difüzyon testleridir. Bu metot, kağıt disklere emdirilmiş antibiyotiğin, duyarlılığı incelenen mikroorganizmanın bulunduğu besiyerine difüze olması mantığı ile uygulanmaktadır. Bu nedenle; tespit edilen oranlarda antibiyotik emdirilmiş kağıt diskler, teste tabi tutulacak olan mikroorganizmanın yoğun bulunduğu katı besiyerlerine ilave edilir. Diskler belli bir zamanın ardından çözünerek agara difüze olurken, mevcut mikroorganizmada da çoğalma süreci başlar. Belirli bir süre sonra ajanın inhibitör konsantrasyonlarının olduğu diskin etrafında çoğalma meydana gelmez. Mikroorganizma ajana ne kadar duyarlı ise, diskin çevresinde görülen inhibisyon zonunun o kadar geniş olması beklenir. İnhibisyon zonunun çapı mm olarak ölçülerek, standart zon tablolarına göre incelenir ve mikroorganizmanın tercih edilen antimikrobiyal materyallere karşı duyarlılığı saptanır (197).

Agar difüzyon metodunda tercih edilen bir diğer yolda, kültür içeren besiyeri içerisine belirli çapta kuyucuklar hazırlanmakta ve bu kuyucukların içerisine homojen olarak çözölmüş ekstrakt eklenmesinin ardından petriler inkübe edilmektedir. İnkübasyon zamanı tamamlandıktan sonra tercih edilen ajanın aktivitesi, kuyucuk çevresinde meydana gelen inhibisyon zonları ile belirlenmektedir. Bitkisel ekstraktın antimikrobiyal etkisi, disk difüzyon metodu ile aynı yol ile uygulanmakta, antimikrobiyal etki, meydana gelen inhibisyon zonunun çapı ile doğru orantılı olarak artmaktadır.

Agar difüzyon tekniklerinde, araştırılan materyallerin antibakteriyel aktivitesi, seçilmiş mikroorganizmanın inoküle edildiği sabit kalınlıktaki agar üzerinde yarattığı bakteriyel inhibisyon zon çapının ölçülmesiyle tespit edilmektedir. Agar difüzyon tekniği; enfekte agarla, araştırılacak materyallerin direk ya da indirek temasıyla sağlanmaktadır. Direk yöntemde petri kutularındaki enfekte agar üzerinde zımba deliği şeklinde çukurcuklar açılarak test edilecek materyaller bu çukurcuklara yerleştirilmektedir. İndirek yöntemde ise etkisi araştırılacak olan materyaller kağıt ya da mine- dentin disklerine emdirilerek agar üzerinde oluşturulan kuyucuklara yerleştirilir ve disk etrafında oluşturulan inhibisyon

apının büyüklüğüne göre etkinliği saptanır. Bu yöntemde disklerden salınan miktar kadar materyal agar içine difüze olmaktadır. Bu salınım miktarı da kağıt diskler ve mine- dentin diskleri için farklılık göstermektedir. Aynı zamanda disk difüzyon yönteminde, dentinin ve kullanılan dentin disklerinin kalınlıklarının, antibakteriyel ajanların bu aktivitelerini etkileyebildiği belirtilmiştir (196).

2.8. Bağlanma Dayanımı Test Yöntemleri

Günümüzde dental adeziv teknolojisinde yaşanılan hızlı gelişmeler sayesinde oldukça başarılı sonuçların elde edildiği bir noktaya ulaşılmıştır. Dental adezivlerinin bu noktaya gelmesinin nedenlerinden biri de, farklı adeziv sistemleri ve tekniklerinin in vitro (laboratuvar) koşullarda test edilebilmesidir. Bağlanma dayanımı testleri, nispeten kolay ve pahalı ekipmanlar olmadan yapılabilme özellikleri ile de öne çıkararak, farklı adeziv sistemlerin diş yapısına bağlanma etkinliğini değerlendirme konusunda dünya çapında kullanılmakta ve restorasyonlarının ömrünün güvenilir bir göstergesi olarak kabul edilmektedir.

Bağlanma dayanımı, kırılma yükünün (newton cinsinden) toplam bağlı alana (mm^2 cinsinden) bölünmesi olan nominal stres değeri (MPa cinsinden) olarak rapor edilmektedir. Belirli bir malzeme için bağlanma dayanımı değerleri; bağlanma yüzeyinde, örnek hazırlamada, saklama koşullarında ve yükleme yönteminde mevcut farklılıklar nedeniyle önemli ölçüde değişebilmektedir. Bir dizi önemli öneride bulunulmasına rağmen, dental adezivlerin klinik performansını tahmin etmeye yönelik bağlanma dayanım testleri standartlaştırılamamıştır (198).

Bağlanma dayanımı, laboratuvar yöntemleriyle veya bağ dayanıklılığı ve klinik performansın değerlendirilmesiyle ölçülebilmektedir. Laboratuvar bağlanma dayanımı test metotları dinamik ve statik testler olarak ikiye ayrılmaktadır. Statik test metodunda örnek sabit iken y k uygulanmakta, dinamik metotta ise örnek dinamik durumda bulunmaktadır. Statik testler, bağlanma alanının genişliğine göre mikro ve makro testler olarak ikiye ayrılmaktadır. Bağlanma alanı 3 mm^2 ' den büyük olan makro bağ gücü testi, makaslama (shear), gerilim (tensile) veya push-out protokolü kullanılarak ölçülebilirken; mikro bağ testinde teste tabi tutulan bağlanma alanı yaklaşık 1 mm^2 veya daha az olmak üzere çok daha küçüktür (199).

2.8.1. Makaslama Bağlanma Dayanımı Testi

Makaslama bağlanma dayanım testi; yeni adeziv formölasyonlarını etkinliklerine göre taramak için en çok tercih edilen testtir. Bowen ilk olarak 1965 yılında bu test metodunu tanımlanmıştır. Genel anlamıyla bir malzemenin kesme yükleme modunda kırılmadan önce dayanabileceği maksimum stres olarak tanımlanmaktadır. Makaslama bağlanma dayanımı testinde; restoratif materyalden oluşan kompozit bir silindir, adeziv uygulamasından sonra düz bir mine veya dentin yüzeyine sabitlenmektedir. Daha sonra bağlantı kopana kadar dış yüzeyine paralel kuvvet uygulanmaktadır (201). Yükl uygulamasında halkalar, keskiler veya bıçak kenarları kullanılmaktadır. Test düzeneğinin gerilim dağılımı üzerinde büyük etkisi vardır ve makaslama bağlanma dayanımı ölçümünde önemli bir değişkenlik kaynağıdır. Adezyon prosedüründen sonra başka örnek işlemleri gerektirmediğinden kolay ve hızlı bir yöntem olarak görölmüş ve araştırma enstitülerinde yüksek popölarite kazanmıştır (202).

2.9. Uzun Vadede Bağlanma Dayanımının Değerlendirilmesi

Birden fazla faktörün rol aldığı karmaşık ağız ortamında bağlanma dayanımının klinik olarak değerlendirilmesi şiddetle tavsiye edilmektedir. Zamanla bağlanmanın bozulmasına neden olan belirli faktörleri açıklamak için in vitro testler gerekmektedir. İn vivo ve in vitro koşullar arasındaki farkları en aza indirmek için, klinik olarak daha ilgili koşullar altında veya örneklerin yaşılandırılması üzerine adeziv ara yüzeyinin sorgulanması sağlanmalıdır (203). Güncel adezivlerin hızlı bağlanma etkinliği, kullanılan yaklaşımdan bağımsız olarak geçerli sonuçlar sergilemektedir. Uzun vadede, bazı adezivlerin bağlanma etkinliği önemli ölçüde düşerken, diğer adezivlerin bağlanma güçleri daha karardır. Bir diğer önemli konu da, dental adeziv uygulamasından önce kavite dezenfektanı kullanımındaki potansiyel bir problem olan kompozit rezinlerin bağlanma dayanımı üzerinde olumsuz bir etki olasılığıdır. Bu durumlar göz önüne alındığında bağlanma gücünü araştıran birçok araştırmada, çalışma metodolojisine bir tür yaşılanma faktörü de eklenmektedir (199). Suda bekletme ve termal siklus en yaygın yaşılandırma yöntemleridir, ancak literatürde mekanik yükleme, pulpa basıncı kullanımı ve enzimlerle bozunma gibi diğer yöntemler kullanılmıştır (205).

2.9.1. Termal Siklus ile Yaşılandırma

Termal siklus; soğutulmuş, restore edilmiş dişlerin, ısıtıldığında restorasyon kenarlarından bir eksuda ürettiğinin gözlemlendiği 1952'den beri dental araştırmalarda yaygın olarak kullanılan ve sıklıkla tercih edilen yapay yaşılandırma yöntemlerinden biridir. Dental

restorasyonlarda termal siklus kullanımı, değişen ağız içi sıcaklık koşullarını taklit etmek için laboratuvar çalışmalarında sıklıkla tercih edilmektedir (207). Termal siklus yönteminde; sudaki koşulların uzun vadeli marjinal adaptasyon veya bağlanma dayanımının stabilitesi üzerindeki etkisini değerlendirmek için, genellikle döngüsel termal dalgalanmalar (ısı döngüsü) içeren bir stres testi yapılmaktadır.

Termal siklusun amacı, alternatif ısıtma ve soğutma ile farklı alt katmanların farklı katsayılarla genleşme ve büzülme göstermesini sağlayarak malzeme arayüzünde mekanik gerilimler yaratmaktır. Kompozitin (80 ila 120 ppm) ve diş alt tabakasının (8 ila 12 ppm) termal genleşme katsayılarındaki bu fark nedeniyle, termal stres adeziv arayüzünde en yüksek değeri göstermektedir (208). Termal döngü, kompozit ile diş alt tabakası arasındaki bu bağı zorlamakta ve kullanılan adeziv sisteme göre bağlanma dayanımını etkileyebilmektedir. Termal siklus metodu ile yapılan yapay yaşlandırmanın bir diğer özelliği de sıcak suyun kollajenlerin hidrolizini hızlandırmasıyla yetersiz polimerize olan rezin oligomerlerini açığa çıkarmasıdır.

Alınan gıda ve sıvılarla ağız içi sıcaklığın 0-70°C arasında, restorasyonların iç yüzey sıcaklığının ise 9-52°C arasında değişmekte olduğu bilinmektedir (207). Bununla beraber ağız içinde sıklıkla oluşan sıcaklık değişiminin 5-55°C arasında olduğu bildirilmiştir. Termal siklus cihazında; örnekler 5°C ile 55-60°C arasında ayarlanmış su banyoları arasında 0,5 ila 3 dakikalık bekleme süreleri ile değiştirilerek test edilmektedir. Ağız içi sıcaklığın en düşük ve en yüksek olarak tespit edildiği değerlere bir gün içerisinde 20 ila 50 kez ulaşıldığı ve bu sebeple de 10000 siklusun bir yıllık oral fonksiyona denk geldiği bildirilmiştir (208).

Picea orientalis reçine özütünün kimyasal analizinin yapılması, sahip olduğu antimikrobiyal aktivitenin belirlenmesi ve dentine bağlanma dayanımının tespit edilmesi amaçlanan bu çalışmanın başlangıç hipotezlerine bakıldığında;

1. Kavite dezenfektanlarının yaşlandırma sonrasında dentin bağlanma dayanım değerleri arasında fark yoktur.
2. Kavite dezenfektanlarının antimikrobiyal aktivileri arasında fark yoktur.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu tez çalışmasında Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan 2020-339 protokol numarası ile etik kurul onayı alınmıştır (EK 1).

Çalışmada kullanılan reçine örneklerinin özüt haline getirilmesi ve analiz işlemleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Fakültesi Kimya Bölümü'nde, antimikrobiyal aktivite incelemeleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Bölümü'nde, dentin örneklerinin hazırlanması Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında, termal siklus test yöntemi Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarında, makaslama bağlanma dayanımı deneyleri ve stereo mikroskopta yüzey incelenmesi Karadeniz Teknik Üniversitesi Metalurji Malzeme Mühendisliği Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada alternatif bir kavite dezenfektanı olarak düşünülen ve Karadeniz Bölgesi'nde farklı 3 ilçeden toplanan *Picea orientalis* reçinelerinin özüt haline getirilmesi ve analiz edilmesinin ardından; altın standart olan klorheksidin glukonat ile antimikrobiyal aktivitesi ve dentine bağlanma dayanımı, kısa ve uzun dönemde karşılaştırılmıştır. Çalışmada kullanılan materyaller Resim 1, 2, 3, 4'te; kimyasal bileşimleri, üretici firması ve seri numaraları Tablo 2'de gösterilmektedir.



Resim 1. %37'lik Fosforik asit jel



Resim 2. Nanohibrit Kompozit Rezin



Resim 3. Dentin bağlayıcı ajan



Resim 4. Klorheksidin solüsyonu

Tablo 2. Çalışmada kullanılan materyallerin adı, tipi, kimyasal bileşimi, üretici firması ve seri numaraları

Materyal Adı	Tipi	Kimyasal Bileşimi	Üretici Firma	Seri No
Condac 37	Asit	37% fosforik asit jel, deiyonize su, boya, kıvamlaştırıcı	FGM, Joinville, Brezilya	CH20201799
Single Bond Universal Adhesive	Dentin bağlayıcı ajan	MDP fosfat monomer, dimetakrilat, HEMA, Vitrebond kopolimer, etanol, su, başlatıcılar, silan	3M ESPE, Almanya	01023C
Estelite Sigma Quick	Nanohibrit kompozit	Bis-GMA, Trietilen glikol dimetakrilat, silika-zirkonyum Doldurucu yüzdesi: ağırlıkça %78 (hacimce %69) Ortalama parçacık boyutu: 0,2 µm	Tokuyama Dental Tokyo, Japonya	167E09
Ceraxidin-C	Kavite dezenfektanı	%2 klorheksidin, distile su	İmicryl, Konya, Türkiye	20104
<i>Picea orientalis</i> reçine özütları	Kavite dezenfektanı	%70 etanol özütü		

3.1. *Picea orientalis* Reçine Örnekleri

Bu çalışmada Karadeniz Bölgesi'ne ait Artvin, Çaykara ve Borçka ilçe sınırları içerisindeki *Picea orientalis* ağaç gövdelerinden toplanmış 3 farklı reçine örneği temin edildi ve -20 °C'de muhafaza edildi. Reçine örnekleri Resim 5,6 ve 7'de gösterilmektedir.



Resim 5. Artvin reçine örnekleri



Resim 6. Borçka reçine örnekleri



Resim 7. Çaykara reçine örnekleri

3.1.1. *Picea orientalis* Reçine Özütlerinin Hazırlanması

-20°C'de muhafaza edilen *Picea orientalis* reçine örnekleri porselen havanda toz hale getirildi. Toz reçineden 3.5 g tartılıp üzerine 35 ml %70'lik etanol eklenerek 24 saat oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalandı. 24 saat sonunda karışımlar önce adi süzgeç kağıdından ardından mavi bant süzgeç kağıdından süzüldü. Antioksidan testler ve fenolik içerik analizi için özütün bir kısmı ayrıldı. Kalan kısım mikrobiyoloji ve makaslama testleri için +4 °C'de muhafaza edildi.

Antioksidan ve fenolik analiz için ayrılan kısımdan 10 ml ekstrakt evapore edildikten sonra pH'sı 2'ye HCl ile ayarlanmış saf suda çözüldü. Sonrasında sırasıyla 3 defa 5 ml dietileter, 3 defa 5 ml etilasetat ile sıvı-sıvı ekstraksiyon işlemi yapıldı (15 dk, 200 rpm, oda sıcaklığı). Toplanan organik fazın çözücüsü evapore edildikten sonra kalıntı 2 ml metanolde çözülerek 0,45 mikronluk filtreden geçirildi. Kara ve ark. tarafından geliştirilen metot ile fenolik içerik analizi yapıldı (210).

Mikrobiyoloji ve makaslama testleri öncesi etanolik ekstrakt 5 defa 5 ml hekzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutularak (15 dk, 200 rpm, oda sıcaklığı), etanolik ekstrakt içinde bulunan reçine ve mumlardan arındırma işlemi yapıldı. Daha sonra ekstraktın derişimini arttırmak için evapore işlemi yapıp tekrar çözücüsünde çözülerek mikrobiyolojik analize hazır duruma getirildi (211). Elde edilen 3 reçine özütünün son hali Resim 8'de gösterilmektedir.



Resim 8. Reçine özütlerinin son hali

3.1.2. *Picea orientalis* Reçine Özütlerinin Analiz Edilmesi

Picea orientalis reçine özütlerine ait fenolik profil analizi ile antioksidan kapasite ve antioksidan aktivitesinin belirlenmesi için toplam fenolik içerik (TP), toplam flavonoid içerik (TF), demir (III) indirgeme-antioksidan güç (FRAP) ve 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) temizleme aktivite testleri yapıldı.

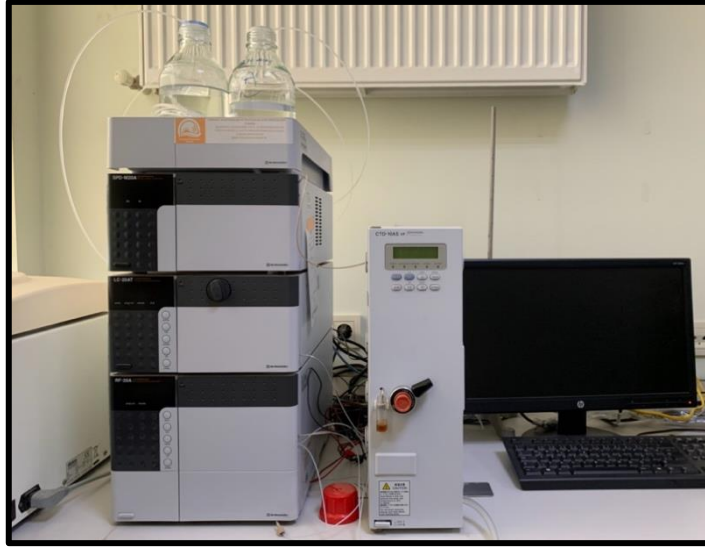
Toplam fenolik içerik, Folin-Ciocalteu'nun tahlili ile tespit edildi (212). Oksitleyici ajan görevi gören Folin-Ciocalteu reaktifi ile fenolikler arasındaki redoks reaksiyonu Slinkard vd. tarafından belirtilen yöntemin esasını oluşturmaktadır (213, 214). Fenolik madde tayininde standart olarak gallik asit kullanıldı ve sonuçlar gram örnek başına mg gallik asit eşdeğeri (mg GAE/g) olarak değerlendirildi.

Toplam flavonoid madde miktarının tayini için Fukumoto ve Mazza tarafından belirtilen metot kullanıldı (215). Bu metoda göre toplam flavonoid miktarı kuersetin standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar gram örnek başına mg Kuersetin eşdeğeri (mg QE/g) olarak verildi.

DPPH• (2,2- difenil-1-pikrilhidrazil) sentetik olarak üretilen bir radikal olup; özütte bulunan bileşenlerin radikal temizleme aktivitesini belirlemek için 0.1 mM metanolik çözeltisi kullanıldı. Sonuçlar ortamda bulunan radikal konsantrasyonunu yarıya indirmek için gerekli olan antioksidan madde miktarını temsil eden SC₅₀ değeri olarak verildi (216). Elde edilen sonuçların karşılaştırılması için standart olarak Troloks'un DPPH• radikalini temizleme gücü kullanılarak SC₅₀ değeri mg/ml olarak hesaplandı.

FRAP metodu ile Fe(III)-TPTZ- 2,4,6-tris (2-pyridlyl)-S-triazin kompleksinin antioksidan varlığında indirgenmesi ile mevcut antioksidan güç ölçülmüştür (217). Sonuçlar gram numune başına µmol Fe₂SO₄.7H₂O eşdeğeri olarak hesaplandı.

Reçine özütünün fenolik profil analizi Kara ve ark. tarafından belirtilen yöntemle göre (218), RP-HPLC-DAD sistemi ile yapıldı (219, 220). Sonuçlar gram numune başına µg fenolik bileşen olarak verildi. Kullanılan HPLC-DAD cihazı Resim 9'da gösterilmektedir.



Resim 9. HPLC-DAD Cihazı

3.1.3. *Picea orientalis* Reçine Özütlerinin Antimikrobiyal Aktivitesinin Tespiti

Picea orientalis reçine özütlerinin antimikrobiyal aktivitesi agar difüzyon yöntemi ile değerlendirildi (221). Antimikrobiyal aktivite için standart bakteri türlerinden *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Streptococcus mutans* RSKK07038 türleri kullanıldı. Çalışmada -80°C’de stoklanan mikroorganizmalar için Müeller Hinton Agar (MHA) besiyerlerine ekimler yapılarak 18-24 saat 37°C’de inkübasyonla taze kültürleri hazırlandı. Mantar türlerinden ise *Candida albicans* ATCC 10231 ve *Candida parapsilosis* ATCC 22019 kültürleri Potato Dextrose agar (PDA) besiyerinde hazırlandı.

Deney öncesi logaritmik üreme fazındaki saf bakteri kolonilerinden 0.5 McFarland yoğunluğunda olacak şekilde “phosphate buffered saline” (PBS)’te süspansiyonları hazırlandı. Suspanse edilen mikroorganizmalar ilgili agarlara standart protokoller kullanılarak (222) pamuklu eküvyon ile yayma ekim yapıldıktan sonra, agar yüzeyinde 6 mm çapında kuyucuklar açıldı. *Candida* türleri 1 McFarland yoğunluğa ayarlanarak %2’lik glikoz+metilen blue (CLSI, 2009) MHA (Glikoz filtreden geçirilerek besiyerine otoklav sonrası eklendi) besiyerlerine ekildi ve kuyucuklar açıldı.

Daha sonra her bir kuyucuğa test edilecek bileşiklerden 50 µL eklendi. Pozitif kontrol olarak ticari antibiyotiklerden Gram pozitif bakteriler için; Ampisilin, Gram negatif

bakteriler için; Gentamisin uygun kuyucuklara 50 µL eklendi. Candida türleri için kontrol olarak Amfoterisin B kullanıldı.

Aktivite kuyucuklar etrafında üremenin olmadığı berrak zonların (inhibisyon zonu) ölçülerek belirlendi. Her test üç kopya halinde gerçekleştirildi. Sonuçlar zonların çapına göre; <6 mm inaktif, 7-9 mm çok düşük aktivite, 9-11 mm düşük aktivite, 12-14 mm ortalama aktivite ve >15 mm yüksek aktivite olarak değerlendirildi.

3.1.3.1. Minumum İnhibisyon Konsantrasyonlarının (MİK) ve Minumum Bakterisit Konsantrasyonlarının (MBK) Belirlenmesi

Agar kuyucuk yöntemi ile antimikrobiyal aktivite saptanmış bileşiklerin etkin oldukları konsantrasyonlar belirlendi. Bu amaçla, 96 kuyucuklu U tabanlı mikropatlelerin her bir kuyucuğuna öncelikle mikroorganizmalar için 100 µL MHB-II (223, 224) besiyeri eklendi, daha sonra ilk kuyucuklara bileşiklerden 100 µL eklendi. Her bir pozitif kontrol kuyucuğuna 200 µg/mL konsantrasyondaki antibiyotiklerden 100 µL eklenerek ilk kuyucuktan itibaren ½ oranında seri dilüsyonlar yapıldı. Bunu takiben, test edilecek mikroorganizmalar ilgili kuyucuklara 5×10^5 CFU/mL konsantrasyonda eklendi. Mikroorganizma üremesi olmayan kuyucuktaki madde konsantrasyonu MİK değeri olarak belirlendi. MİK değeri olarak belirlenen konsantrasyon ve bir önceki konsantrasyonda madde içeren kuyucuklardan 50 µL örnek alınarak agar yüzeyine ekim yapıldı. Agarlardaki üremeler kontrol edilerek üremenin olmadığı kuyucuktaki konsantrasyon MBK olarak belirlendi (225).

3.2. Makaslama Bağlanma Dayanım Testi

3.2.1. Dişlerin Seçilmesi ve Hazırlanması

Çalışmada son 6 ay içerisinde ortodontik, cerrahi ya da oral sebeplerle çekilmiş 180 adet çürüksüz, gömülü üçüncü büyük azı dişi kullanıldı. Dişlerin seçiminde çatlak ve çekim travması olmamasına dikkat edildi. Çekimi takiben dişler üzerindeki yumuşak doku artıkları ve kemik parçacıkları periodontal bir küret yardımıyla temizlendikten sonra +4°C’de %0.1 timol solüsyonu içerisinde bir hafta süreyle, daha sonra +4°C’de distile suda bekletildi. Distile su haftada bir periyodik olarak değiştirildi.

Her bir diş kök bölgesinin 1/3’ü açıkta kalacak şekilde 4 mm x 4 mm x 4 mm boyutlarında silikon kalıplar kullanılarak akrilik bloğa gömüldü. Çalışmada dişlerin orta koronal düz dentin yüzeylerini açığa çıkartmak için mine dokusu kaldırıldı. Oklüzal yüze

paralel olacak dentin kesitlerini elde etmek için örnekler; düşük hızda çalışan hassas kesme cihazında (Micra Cut 125, düşük hızlı hassas kesme cihazı, Metkon, Bursa) soğutma sıvısı (Finocool Cutting Fluids, Metkon, Bursa) ve 0.5 mm kalınlığında elmas separe (DIMOS Ø150 mm, Metkon, Bursa) kullanılarak kesildi (Resim 10,11,12).



Resim 10. Düşük hızlı hassas kesme cihazı



Resim 11. Dişlerin elmas separe ile bukkolingual yönde kesilmesi



Resim 12. Dentin örneğinin elde edilmesi

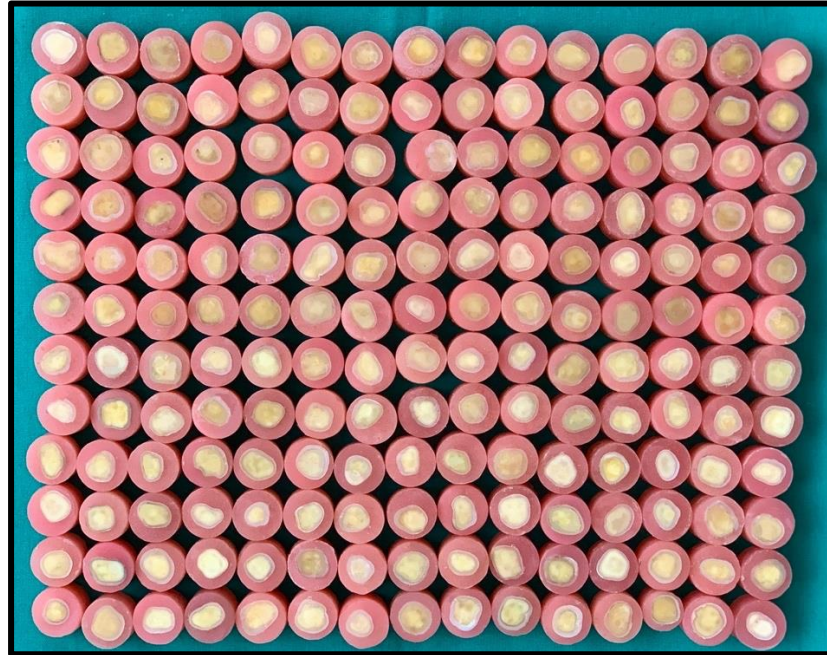
Hazırlanan örneklerin tümü deneyin gerçekleştirildiği test cihazına uygun olarak 15 mm çapında ve 8 mm yüksekliğinde plastik kalıplar içerisine yerleştirildi (Resim 13) ve kalıbın içine pembe otopolimerizan akrilik rezin (Imicryl, SC, Konya, Türkiye) dökülerek deneylerde kullanılacak örnekler elde edildi (Resim 14, 15).



Resim 13. Plastik kalıp



Resim 14. Akrilik rezine gömülü dentin örneği

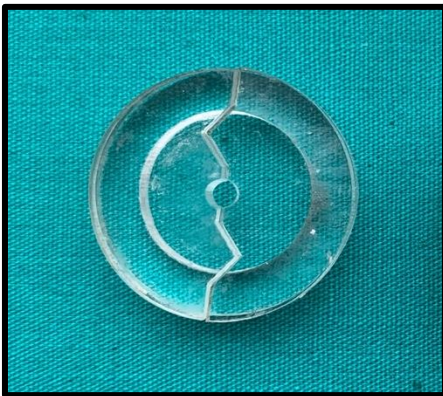


Resim 15. 180 adet dentin örneği

Açığa çıkan dentin yüzeyleri 60 saniye boyunca tek yönlü akan su altında 600 grit zımpara kağıdı (Rhynowet Red Line, Portekiz) ile standart bir smear tabakası ve düz bir dentin yüzeyi elde etmek için zımparalandı (226). Zımpara kâğıdı her on dişte bir değiştirilerek süre sabit tutuldu.

3.2.2. Çalışma Gruplarının Oluşturulması

Hazırlanan 180 dentin örneği, bir tanesi kontrol grubu olmak üzere, kullanılacak farklı kavite dezenfektanlarına [Klorheksidin glukonat (Ceraxidin-C, Imicryl) ve antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre en yüksek etkiyi gösteren Artvin *Picea orientalis* reçine özütü] göre rastgele 3 gruba ayrıldı. Her grup için atanan dentin örnekleri aynı universal adeziv sistem (Single Bond Universal, 3M ESPE) farklı yüzey hazırlama yöntemlerine uygun olarak kullanılacak şekilde (self etch/etch&rinse) 2 alt gruba daha ayrıldı. Bu gruplardan etch and rinse işlemi yapılacaklara diğer gruplardan farklı olarak ilk aşamada 15 saniye boyunca %37 fosforik asit (Condac 37, FGM) uygulandı. Tüm gruplar aynı kompozit sistem ile (Estelite Sigma Quick, Tokuyama Dental), çapı 3 mm yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp kullanılarak restore edildi (Resim 16, 17). Adeziv sistem ve kompozit sistemin polimerizasyonunda LED (Light Emitting Diode-Elipar Freelight, 3M ESPE) ışık kaynağı kullanıldı. Daha sonra oluşturulan gruplar; kısa ve uzun süreli bağlanma dayanımının incelenmesi amacıyla bir grup yaşlandırma işlemi görecektir ve her bir grupta 15 dentin örneği olacak şekilde kendi içinde 2 alt gruba daha ayrıldı. Çalışma grupları ve numaralandırılmaları Tablo 3'te gösterilmektedir.



Resim 16: Plastik kalıp



Resim 17: Restore edilmiş dentin örneği

Tablo 3. Restorasyon öncesi kullanılacak kavite dezenfektanına ve uygulanacak yüzey işlemlerine göre çalışma gruplarının oluşturulması ve numaralandırılması

Gruplar (n=180)	Yüzey Hazırlama Yöntemi	Termal Döngü
Grup 1 Kontrol Grubu (n=60)	a.Self Etch (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)
	b.Etch&rinse (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)
Grup 2 <i>Picea orientalis</i> reçine özütü (n=60)	a.Self Etch (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)
	b.Etch&rinse (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)
Grup 3 Klorheksidin (n=60)	a.Self Etch (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)
	b.Etch&rinse (n=30)	Yok (n=15)
		Var (n=15)

Grup 1a:

(Kontrol grubu = Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeylerine herhangi bir dezenfeksiyon işlemi uygulanmadı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda universal adeziv sistem (Single Bond Universal, 3M ESPE) tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm, yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED (Light Emitting Diode-Elipar Freelight, 3M ESPE) ışık kaynağı ile polimerize edildi.

Grup 1b:

(Kontrol grubu = Asit + Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeyi %37' lik fosforik asit jel ile 15 saniye pürüzlendirildi. Bol su ile 15 saniye yıkandı ve hava spreyi ile kurutuldu. Dentin yüzeylerine herhangi bir dezenfeksiyon işlemi uygulanmadı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda universal adeziv sistem tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm, yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED ışık kaynağı ile polimerize edildi.

Grup 2a: (*Picea orientalis* Reçine Özütü + Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeylerine tek kullanımlık aplikatör ile *Picea orientalis* reçine özütü uygulandı. Etki etmesi için 60 saniye beklendi ve artan dezenfektan solüsyonu kuru bir pamuk peletle uzaklaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda dezenfektan uygulanan dentin yüzeyine universal adeziv sistem, tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm, yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED ışık kaynağı ile polimerize edildi.

Grup 2b: (Asit + *Picea orientalis* Reçine Özütü + Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeyi %37' lik fosforik asit jel ile 15 saniye pürüzlendirildi. Bol su ile 15 saniye yıkandı ve hava spreyi ile kurutuldu. Hazırlanan dentin yüzeylerine tek kullanımlık aplikatör ile *Picea orientalis* reçine özütü uygulandı. Etki etmesi için 60 saniye beklendi ve artan dezenfektan solüsyonu kuru bir pamuk peletle uzaklaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda dezenfektan uygulanan dentin yüzeyine universal adeziv sistem, tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm,

yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED ışık kaynağı ile polimerize edildi.

Grup 3a: (Klorheksidin Glukonat + Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeylerine tek kullanımlık aplikatör ile klorheksidin solüsyonu uygulandı. Etki etmesi için 60 saniye beklendi ve artan dezenfektan solüsyonu kuru bir pamuk peletle uzaklaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda dezenfektan uygulanan dentin yüzeyine universal adeziv sistem, tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm, yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED ışık kaynağı ile polimerize edildi.

Grup 3b: (Asit + Klorheksidin Glukonat + Universal Adeziv + Kompozit Restorasyon)

Hazırlanan dentin yüzeyi %37' lik fosforik asit jel ile 15 saniye pürüzlendirildi. Bol su ile 15 saniye yıkandı ve hava spreyi ile kurutuldu. Dentin yüzeylerine tek kullanımlık aplikatör ile klorheksidin solüsyonu uygulandı. Etki etmesi için 60 saniye beklendi ve artan dezenfektan solüsyonu kuru bir pamuk peletle uzaklaştırıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda dezenfektan uygulanan dentin yüzeyine universal adeziv sistem, tek kullanımlık aplikatör yardımıyla 20 saniye aktif bir şekilde uygulandı. Ardından 5 saniye boyunca hava akımı ile yayılarak homojen bir tabaka oluşturuldu. LED ışık kaynağı ile 10 saniye polimerize edildi. Adeziv sistem uygulanan dentin yüzeylerine çapı 3 mm, yüksekliği 4 mm olan şeffaf plastik kalıp içerisine 2 mm'lik tabakalar halinde kompozit sistem siman fulvarı yardımıyla dentine uygulandı. Her tabaka 20 saniye LED ışık kaynağı ile polimerize edildi.

3.2.3. Termal Siklus ile Yaşlandırma İşlemi

Restorasyonların tamamlanmasının ardından yaşlandırma işlemi için ayrılan örneklere; ağızdaki ısı değişikliklerini taklit etmek amacıyla 5 ile 55°C’larda (± 2) toplam 5000 defa termal siklus (ısısal çevrim) işlemi uygulandı (Resim 18,19,20). Termal siklus cihazının (Nova, Konya, Türkiye) banyosunda örneklerin bekleme süresi 30 saniye olup, bir banyodan diğer banyoya geçiş süresi 2 saniyedir. 5000 devirlik termal yaşlandırma prosedürü yaklaşık olarak altı aylık klinik kullanımı yansıtmaktadır (208). Yaşlandırma işleminin ardından dentin örnekleri Resim 21’de gösterilmektedir. Termal siklus test yöntemi; Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi.



Resim 18 ve 19: Örneklere termal yaşlandırma uygulanması



Resim 20: Termal yaşlandırma işleminin tamamlanması



Resim 21: Yaşlandırma işlemi sonrası dentin örnekleri

3.2.4. Makaslama Bağlanma Dayanım Testinin Uygulanması

Hazırlanan dentin örneklerinden termal yaşlandırma işlemine tabii tutulmayanlar; 37°C’de 24 saat %100 bağıl nem altında bekletildikten sonra, yaşlandırma işlemine tabii tutulan örnekler ise termal döngünün tamamlanmasının ardından makaslama bağlanma dayanımı değerlerinin ölçülmesi için Universal Test Sistemi (MTS Criterion, Minneapolis, ABD) cihazına yerleştirildi (Resim 22). Çalışmamızda hazırlanan örneklere yapılan makaslama bağlanma dayanımı testleri Karadeniz Teknik Üniversitesi Metalurji Malzeme Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi.



Resim 22: Universal test sistemi

Bağlantı testi sırasında örneklerin sabitlenmesi için metal bir kalıp ve uç hazırlandı (Resim 23). Metal kalıp içerisinde sabitlenen örnekler, resimdeki düzenek yardımıyla test cihazının bir ucuna yerleştirildi. Test cihazının diğer ucuna da bıçak sırtı şeklinde sonlanan bir uç yerleştirildi (Resim 24,25).



Resim 23: Hazırlanan metal kalıp ve metal uç



Resim 24 ve 25: Test cihazına yerleştirilen bir örneğin önden ve yandan görünüşü

Başlık hızı 0.5 mm/dk olacak şekilde, kompozit ve diş yüzeyi arasındaki bağlantı ara yüzeyine 90°'lik bir açı ile kuvvet uygulandı. Kırılma meydana geldiği anda cihaz üzerinde okunan yük değeri Newton (N) cinsinden kaydedildi. N değerlerinin rezin blok taban alanına bölünmesiyle elde edilen megapaskal (MPa) değerleri analiz edildi ($\text{MPa} = \text{N}/\text{mm}^2$).

3.2.5. Stereo Mikroskop ile Kırılma Yüzeylerinin İncelenmesi

Makaslama bağlanma dayanımı testi sonucunda başarısızlık tipinin tespiti amacıyla kırılma yüzeyleri, Karadeniz Teknik Üniversitesi Metalurji Malzeme Mühendisliği Bölümü Araştırma Laboratuvarında bulunan stereo mikroskopta (Leica, Almanya) x 40 büyütme altında incelendi (Resim 26). Kırılma tipleri Tablo 5’te gösterildiği gibi adeziv, koheziv, karışık başarısızlık olarak sınıflandırıldı (227).



Resim 26: Stereo mikroskop

Tablo 4: Kırılma tiplerinin belirlenmesinde kullanılan kriterler

Başarısızlık Tipi	Açıklama
Adeziv Başarısızlık	Kompozit ve dentin dokusunun tamamen ayrılması şeklinde olan kopma
Koheziv Başarısızlık	Kompozit veya dentin dokusu içerisinde meydana gelen kopma
Karışık Başarısızlık	Adeziv ve koheziv başarısızlığın birlikte görülmesi

Çalışmada görülen kırılma tipleri aşağıda verilen maddelere göre sınıflandırıldı.

1. Sadece adeziv ara yüzeyinde meydana gelen adeziv başarısızlık
2. Dentin içerisinde meydana gelen koheziv dentin başarısızlığı
3. Kompozit içerisinde meydana gelen koheziv kompozit başarısızlığı
4. Parsiyel adeziv kırılma ve adeziv kırılma ile birlikte dentin veya kompozit içerisinde koheziv kırılma ile meydana gelen karışık tipteki başarısızlık

3.2.6. İstatistiksel Değerlendirme

Makaslama bağlanma dayanımı testi ile elde edilen verilerin, grup içi ve gruplar arası farklılıklarını tespit etmek amacıyla istatistiksel analiz yapıldı. İstatistiksel analizler için IBM SPSS Statistics 22 programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov ve Shapiro Wilks testleri ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım gösterdiği saptanmıştır. Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama yöntemi ve yaşlandırma işleminin bağlanma dayanımı üzerindeki ortak etkisinin değerlendirilmesinde üç yönlü ANOVA testi, post hoc olarak da Tukey HSD test kullanıldı. Kırılma tiplerinin değerlendirilmesinde Ki-kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4.BULGULAR

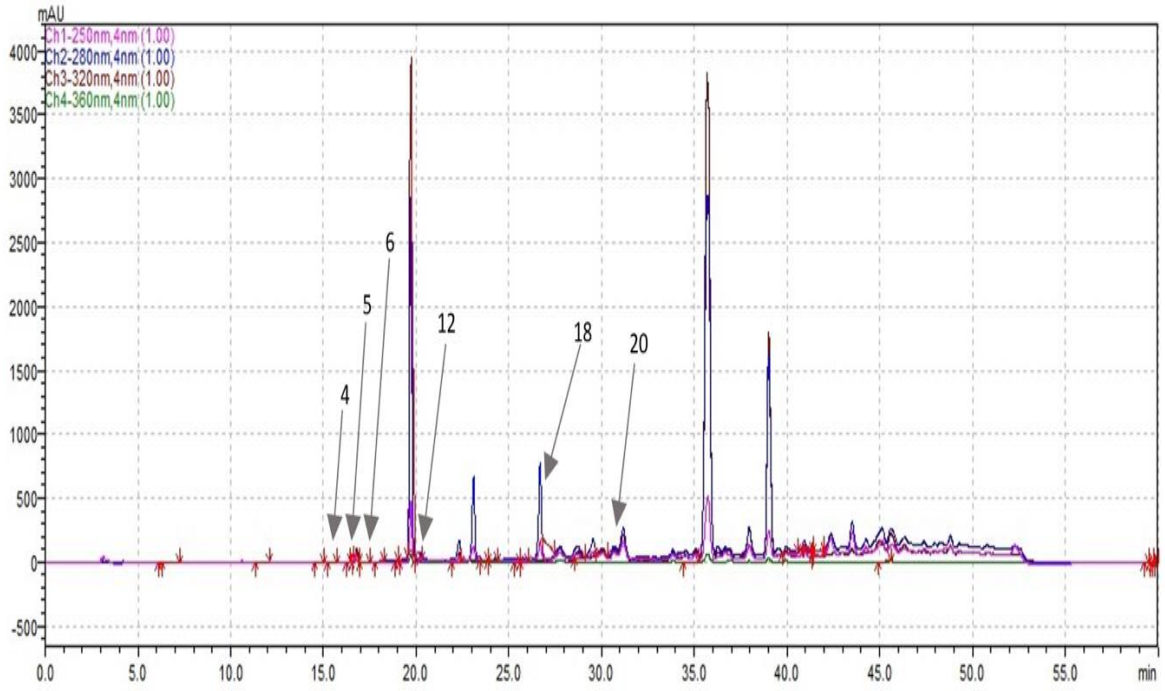
4.1. *Picea orientalis* Reçine Özütlerine ait HPLC-DAD Bulguları

Picea orientalis reçine özütlerinin element analizi, toplam fenolik ve flavonoid analizi, antioksidan aktivite tayini ve fenolik bileşik analizleri yapılmıştır. Bu analiz sonuçlarına göre *Picea orientalis* reçine özütlerinin kromatogramları Şekil 2,3 ve 4'te ve fenolik bileşikler analizinin kantitatif analizleri Tablo 5'te gösterilmektedir.

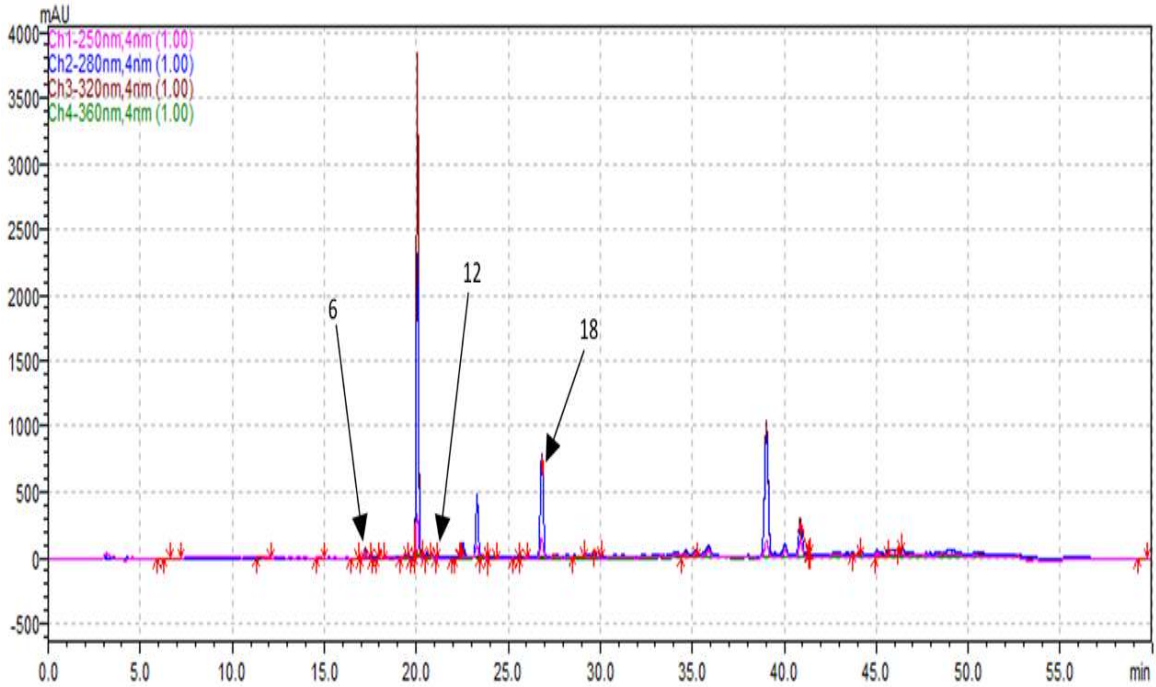
Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde toplam fenolik bileşikler 389.47 mg GAE/g ve toplam flavonoid bileşik 2.97 mg QUE/g olarak bulunmuştur. Artvin *Picea orientalis* reçine özütünün yüksek fenolik ve flavonoid içeriği olduğu görülmektedir. Özütün antioksidan aktivite tayininde DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılmış ve DPPH değeri 0.0386 ± 0.001 mg/ml ve FRAP aktivitesi 3312.69 ± 32.32 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ olarak bulunmuştur. İncelenen 25 standarda göre Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde baskın olarak bulunan flavonoidlerin; hesperetin ve epikateşin olduğu görülmektedir. Fenolik asitlerden ise kafeik asit ve ferulik asit özütte daha yüksek oranda bulunmuştur.

Borçka *Picea orientalis* reçine özütüne ait toplam fenolik bileşikler 387.664 mg GAE/g ve toplam flavonoid bileşik 0.85 mg QUE/g olarak bulunmuştur. Borçka *Picea orientalis* reçine özütünün yüksek fenolik ve flavonoid içeriği olduğu görülmektedir. Özütün antioksidan aktivite tayininde DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılmış ve DPPH değeri 0.023 ± 0.001 mg/ml ve FRAP aktivitesi 3646.689 ± 16.031 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ olarak bulunmuştur. İncelenen 25 standarda göre Borçka *Picea orientalis* reçine özütünde baskın olarak bulunan flavonoidin ise epikateşin olduğu görülmektedir. Fenolik asitlerden ise kafeik asit ve ferulik asit özütte daha yüksek oranda bulunmuştur.

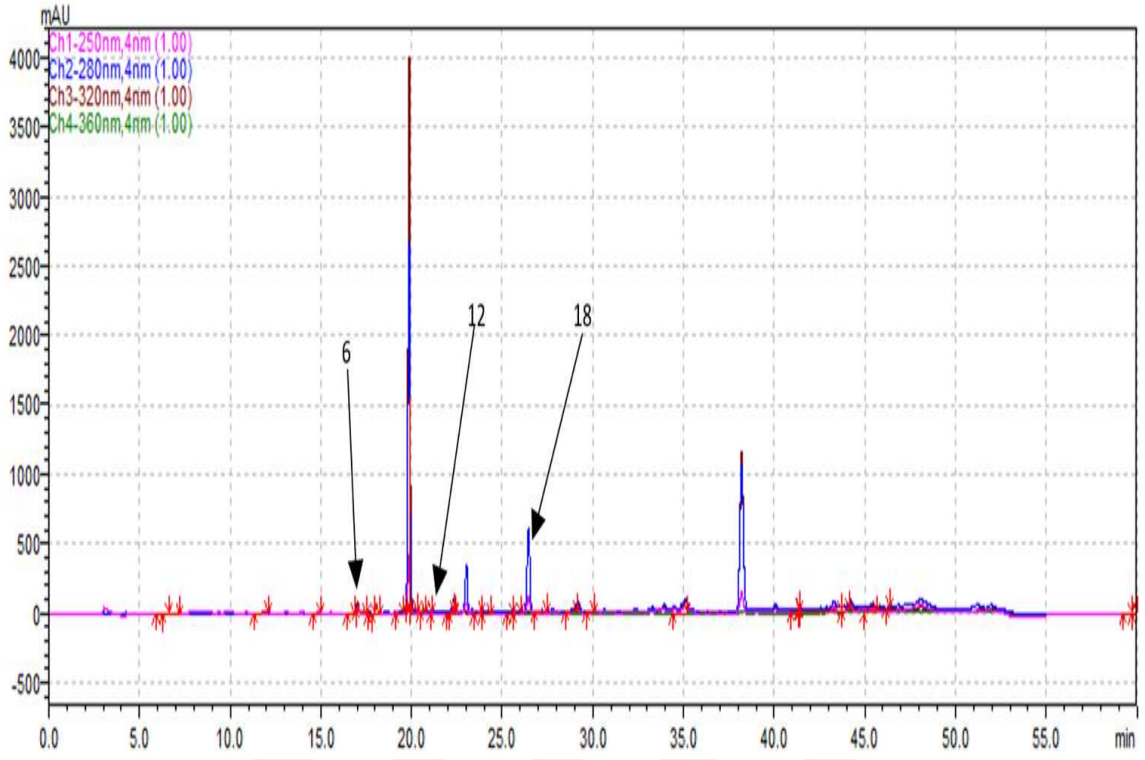
Çaykara *Picea orientalis* reçine özütüne ait toplam fenolik bileşikler 378.286 mg GAE/g ve toplam flavonoid bileşik 0.112 mg QUE/g olarak bulunmuştur. Çaykara *Picea orientalis* reçine özütünün yüksek fenolik ve flavonoid içeriği olduğu görülmektedir. Özütün antioksidan aktivite tayininde DPPH ve FRAP yöntemleri kullanılmış ve DPPH değeri 0.026 ± 0.001 mg/ml ve FRAP aktivitesi 2955.522 ± 12.013 $\mu\text{mol Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{ml}$ olarak bulunmuştur. İncelenen 25 standarda göre Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde baskın olarak bulunan flavonoidin ise epikateşin olduğu görülmektedir. Fenolik asitlerden ise kafeik asit ve ferulik asit özütte daha yüksek oranda bulunmuştur.



Şekil 2. Artvin *Picea orientalis* reçine özütü fenolik içerik kromatogramı , (4)p-OH benzoik asit, (5)Epikateşin, (6)Kafeik Asit, (12)Ferulik Asit, (18)t-Sinnamik asit, (20)Hesperetin



Şekil 3. Borçka *Picea orientalis* reçine özütünün fenolik içerik kromatogramı, (6)Kafeik Asit, (12)Ferulik Asit, (18)t-Sinnamik asit



Şekil 4. Çaykara *Picea orientalis* reçine özütünün fenolik içerik kromatogramı, (6)Kafeik Asit, (12)Ferulik Asit, (18)t-Sinnamik asit

Tablo 5. *Picea orientalis* reçine özütlerinin karakteristik özellikleri

Testler		Artvin <i>Picea orientalis</i> reçine özütü	Borçka <i>Picea orientalis</i> reçine özütü	Çaykara <i>Picea orientalis</i> reçine özütü
Toplam Polifenol İçeriği (mg GAE/g numune)		389.47±5.64	387.664±5.167	378.286±5.871
Toplam Flavonoid İçeriği (mg QUE/g numune)		2.97±0.07	0.085±0.007	0.112±0.005
FRAP Aktivitesi (µmoL Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O/g numune)		3312.69±32.32	3646.689±16.031	2955.522±12.013
DPPH SC ₅₀ (mg/ml)		0,0386±0,001	0.023±0.001	0.026±0.001
Fenolik Bileşim (HPLC-DAD analizi) (µg/g)				
Fenolik Asitler	Gallik Asit	-	-	-
	Protokatekuik Asit	-	-	-
	Klorojenik Asit	-	-	-
	<i>p</i> -OH Benzoik Asit	18.056	-	-
	Kafeik Asit	1664.259	1255.842	1354.072
	Şiringik Asit	-	-	-
	<i>m</i> -OH Benzoik Asit	-	-	-
	Ellagik Asit	-	-	-
	<i>p</i> -Kumarik Asit	-	-	-
	Ferulik Asit	347.963	300.299	360.654
	<i>t</i> -Sinnamik Asit	5948.389	7451.049	5753.248
	Epikateşin	118.685	-	-
Flavonoidler	Rutin	-	-	-
	Mirisetin	-	-	-
	Resveratrol	-	-	-
	Daidzein	-	-	-
	Luteolin	-	-	-
	Kuersetin	-	-	-
	Apigenin	-	-	-
	Hesperetin	874.259	-	-
	Ramnetin	-	-	-
	Krisin	-	-	-
	Pinosembrin	-	-	-
	CAPE	-	-	-
	Curcumin	-	-	-

4.2. *Picea orientalis* Reçine Özütlerine ait Agar Difüzyon Test Bulguları

Tez kapsamında Karadeniz bölgesinde Artvin, Çaykara ve Borçka olmak üzere 3 farklı ilçeden elde edilen ve etanolik özütleri hazırlanan 3 farklı *Picea orientalis* reçine örneği agar difüzyon yöntemi ile antimikrobiyal aktivite yönünden test edildi. Tablo 6’da *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), *Streptococcus mutans* (*S. mutans*), *Candida albicans* (*C. albicans*) ve *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*) suşları olmak üzere seçilen oral bakteri ve mantar türleri karşısında test edilen 3 farklı reçine özütünün, antibakteriyel ajanlar arasında altın standart olarak kabul edilen klorheksidinin, Gram pozitif bakteriler için Ampisilin, Gram negatif bakteriler için Gentamisin ve mantar türleri için Amfoterisin B olmak üzere referans ilaçların oluşturduğu kontrol grubunun inhibisyon zon çapları gösterilmektedir. Bunun yanı sıra 3 farklı reçine özütünde fenolik analiz sonuçlarına göre baskın olan fenolik bileşiklerden kafeik asit, CAPE, ferulik asit, krisin ve t-sinamik asit standardı antimikrobiyal aktivite testine dahil edilmiştir. En yüksek antimikrobiyal etkinin saptandığı *S. aureus* suşu üzerinde oluşan inhibisyon zon çapları Resim 27’de gösterilmektedir. Antimikrobiyal aktivite test sonuçlarına göre kavite dezenfektan adaylarının antimikrobiyal aktivileri arasında fark olmadığına dair kurulan hipotez reddedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre klorheksidin test edilen mikroorganizmalar üzerinde daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Çalışmada test edilen 3 farklı reçine özütü değerlendirildiğinde *S. aureus* suşu üzerinde Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde 18.33 mm, Çaykara *Picea orientalis* reçine özütünde 16 mm ve Borçka *Picea orientalis* reçine özütünde 18.66 mm inhibisyon zon çapları tespit edilmiştir. Buna dayanılarak *S. aureus* suşu üzerinde araştırılan 3 farklı reçine özütünde yüksek antibakteriyel aktivite (>15 mm) tespit edilmiştir. *S. mutans* suşunda ise Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde 8 mm, Çaykara *Picea orientalis* reçine özütünde 10 mm ve Borçka *Picea orientalis* reçine özütünde 7.66 mm inhibisyon zon çapları tespit edilmiştir. Buna dayanılarak *S. mutans* suşu üzerinde düşük antibakteriyel aktivite (7-10 mm) belirlenmiştir. *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* suşları üzerinde ise antimikrobiyal aktiviteyi gösteren inhibisyon zon çapları tespit edilememiştir.

İnhibisyon değerlerine göre incelendiğinde kontrol grupları ve klorheksidin tüm bakteri suşlarına (>15 mm) karşı yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Kontrol grupları *S. mutans* hariç tüm suşlarda daha yüksek antimikrobiyal aktivite göstermiştir.

Klorheksidin *S. mutans*'a karşı diğer ajanlara göre gösterdiği yüksek antibakteriyel etki ile daha etkili olduğunu göstermiştir. *S. aureus* üzerinde Borçka *Picea orientalis* reçine özütü en yüksek antibakteriyel aktiviteyi göstermiştir. *S. mutans* suşu üzerinde en yüksek antibakteriyel aktivite ise Çaykara *Picea orientalis* reçine özütünde tespit edilmiştir.

Standartlar incelendiğinde ise sadece kafeik asitte antibakteriyel aktivite tespit edilmiştir. Kafeik asit ise *S. aureus* suşunda yüksek antibakteriyel aktivite (>15 mm) gösterirken; *E. faecalis*, *P. aeruginosa* ve *S. mutans* suşları üzerinde ise orta seviyede (11-14 mm) antibakteriyel aktivite göstermiştir. *C. albicans* ve *C. parapsilosis* üzerinde ise antimikrobiyal etki tespit edilememiştir.

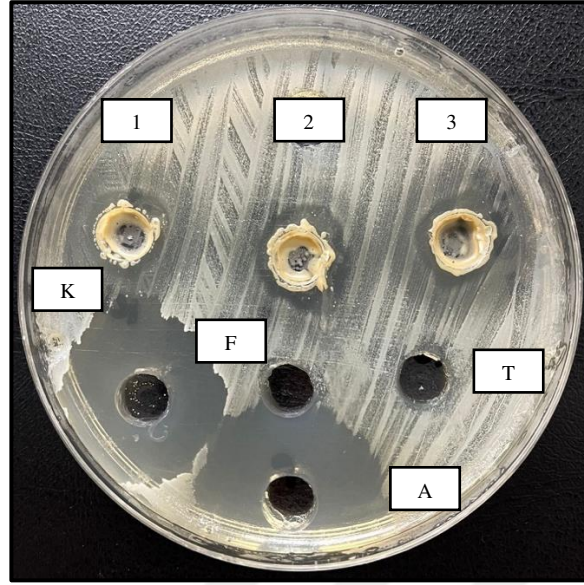
Tablo 6'da *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* suşları olmak üzere seçilen oral bakteri ve mantar türleri için antimikrobiyal ajanların MİK ve MBK değerleri gösterilmektedir. Buna göre test edilen reçine özütlerinden antibakteriyel etki görülen *S. aureus* suşu üzerinde Artvin *Picea orientalis* reçine özütünün 125 µg/mL, Çaykara ve Borçka *Picea orientalis* reçine özütünün ise 250µg/mL MİK değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu değerler kafeik asitte 62.5µg/mL, klorheksidinde 15.6 µg/mL ve kontrol grubunda 7.81µg/mL olarak bulunmuştur. *Picea orientalis* reçine özütlerine kıyasla kontrol grubu MİK değerini daha düşük konsantrasyonda belirlemiş ve *S. aureus* üzerinde etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür. *Picea orientalis* reçine özütleri arasında ise Artvin *Picea orientalis* reçine özütü 125 µg/mL MİK değerini daha düşük konsantrasyonda belirleyerek *S. aureus* suşu üzerinde daha etkili ekstrakt olarak tespit edilmiştir.

S. mutans suşu incelendiğinde ise Artvin, Çaykara ve Borçka *Picea orientalis* reçine özütlerinin 500µg/mL olmak üzere aynı MİK değerlerine sahip olduğu görüldü. Bu değerler kafeik asitte 500 µg/mL, klorheksidinde 7.81µg/mL ve kontrol grubunda 15.6 µg/mL arasında değişmektedir. *Picea orientalis* reçine özütlerine kıyasla klorheksidin MİK değerini daha düşük konsantrasyonda belirlemiş ve *S. mutans* üzerinde etkisinin daha fazla olduğu görülmüştür.

Picea orientalis reçine özütlerinde *S. aureus* ve *S. mutans* üzerinde görülen antimikrobiyal etkinin sonucunda MİK ve MBK değerleri elde edilebilirken *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* suşları üzerinde antimikrobiyal etki tespit edilememesi dolayısıyla MİK ve MBK değerleri elde edilememiştir.

Tablo 6. Test edilen antimikrobiyal ajanların (50 µl) *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *S. mutans*, *C. albicans* ve *C. parapsilosis* üzerinde oluşturduğu zon çapları (mm) ve MİK MBK değerleri

Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları																			
		<i>S. aureus</i>			<i>E. faecalis</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. mutans</i>			<i>C. albicans</i>			<i>C. parapsilosis</i>		
		Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)	Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)	Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)	Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)	Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)	Zone (mm)	MİK (µg/m)	MBK (µg/m)
Artvin	<i>Picea</i>	18.33	125	250	-	-	-	-	-	-	8.00	500	1000	-	-	-	-	-	-
<i>orientalis</i>	reçine	±0.57									±0.00								
özütü																			
Çaykara	<i>Picea</i>	16.00	250	500	-	-	-	-	-	-	10.00	500	1000	-	-	-	-	-	-
<i>orientalis</i>	reçine	±0.00									±0.00								
özütü																			
Borçka	<i>Picea</i>	18.66	250	500	-	-	-	-	-	-	7.66	500	1000	-	-	-	-	-	-
<i>orientalis</i>	reçine	±0.57									±0.57								
özütü																			
Kafeik asit		22.00	62.5	125	12.00	500	1000	14.00	500	1000	11.33	500	1000	-	-	-	-	-	-
		±0.00			±0.00			±0.00			±0.57								
Ferulik Asit		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
t-Sinamik Asit		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kloroheksidin		26.00	15.6	31.25	23.6	62.5	125	22.00	62.5	125	35.00	7.81	15.6	25.00	15.6	31.25	22.33	15.6	31.35
		±1.00			±2.08			±0.00			±0.00			±0.00			±0.57		
Ampisilin		33.00	7.81	15.6	27.33	31.25	62.5	-	-	-	30.00	15.6	31.25	-	-	-	-	-	-
		±0.00			±0.57						±0.00								
Gentamisin		-	-	-	-	-	-	29.33	15.6	31.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								±0.57											
Amfoterisin B		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	29.00	7.81	15.6	27.33	15.6	31.25
														±0.00			±0.57		



Resim 27. *S. aureus* üzerinde inhibisyon zon çaplarına bağlı antibakteriyel etki (1:aykara *Picea orientalis* reçine zt, 2:Borçka *Picea orientalis* reçine zt, 3:Artvin *Picea orientalis* reçine zt, K:Klorheksidin, F:Ferulik Asit, T: T-sinamik asit, A:Ampisilin)

4.3. Makaslama Bağlanma Dayanımı Testine Ait Bulgular

3-yönlü ANOVA test sonuçları Tablo 7’de gösterilmektedir. Tabloya göre üç ana faktör olan kavite dezenfektanları ($p>0.05$) ve yüzey hazırlama işlemleri ($p>0.05$) tek başına anlamlı bir fark oluturmazken, yaşlandırma grupları ($p:0.000$; $p<0.05$) tek başına anlamlı bir farklılık oluşturmaktadır.

Kavite dezenfektanı ile yüzey hazırlama yöntemlerinin ($p:0.000$; $p<0.05$) ve kavite dezenfektanı ile yalandırmanın ($p:0.001$; $p<0.05$) bağlanma dayanımı üzerindeki ortak etkisi istatistiksel olarak anlamlıdır. Fakat yüzey hazırlama işlemleri ve yalandırmanın bağlanma dayanımı ortak etkisi istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p:0.938$; $p>0.05$).

Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama işlemleri ve yalandırmanın bağlanma dayanımı ortak etkisi ise istatistiksel olarak anlamlı bulunmamaktadır ($p:0.152$; $p>0.05$).

Tablo 7: Kavite dezenfektanı, yüzey hazırlama yöntemi ve yaşlandırmanın bağlanma dayanımı üzerindeki ortak etkisinin değerlendirilmesi

	Karelerin Toplamı	df	Ortalamanın Karesi	F	p
Kavite Dezenfektanı	19.188	2	9.594	1.969	0.143
Yüzey Hazırlama	0.11	1	0.11	0.023	0.881
Yaşlandırma	516.465	1	516.465	105.981	0.000
					*
Dezenfektan * Yüzey Hazırlama	126.535	2	63.268	12.983	0.000
					*
Dezenfektan * Yaşlandırma	71.563	2	35.782	7.343	0.001
					*
Yüzey * Yaşlandırma	0.03	1	0.03	0.006	0.938
Dezenfektan * Yüzey * Yaşlandırma	18.575	2	9.288	1.906	0.152
3-Yönlü ANOVA Testi	*p<0.05				

İncelenen 12 grubun makaslama bağlanma dayanımı değerlerinin ortalama ve standart sapmaları (SS) Tablo 8’de gösterilmektedir. Kavite dezenfektan örneklerinin farklı yüzey hazırlama yöntemleri ile yaşlandırma işlemi yapılmış ve yapılmamış gruplarına ait makaslama bağlanma dayanımı değerleri karşılaştırıldığında; yaşlandırılmamış örneklerde en yüksek değerler kontrol grubunda etch&rinse yüzey hazırlama yönteminde (25.67 ± 1.18 MPa), yaşlandırılmış örneklerde ise *Picea orientalis* reçine özütünde etch&rinse yüzey hazırlama yönteminde (20.53 ± 2.51 MPa) elde edildi. En düşük makaslama bağlanma değerleri ise yaşlandırılmamış ve yaşlandırılmış örneklerde *Picea orientalis* reçine özütünde self etch yüzey hazırlama yönteminde (20.19 ± 2.34 MPa, 19.41 ± 2.61 MPa) elde edildi.

Yaşlandırılmamış örneklerde self etch yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; kavite dezenfektan grupları arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.076$; $p>0.05$).

Yaşlandırılmamış örneklerde etch&rinse yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; kavite dezenfektan grupları arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Kontrol grubunun bağlanma dayanımı, klorheksidin ($p:0.000$) ve *Picea orientalis* reçine özütü ($p:0.000$) gruplarından anlamlı şekilde yüksek bulunmaktadır ($p<0.05$). Klorheksidin ve *Picea orientalis* reçine özütü grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Yaşlandırılmış örneklerde self etch yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; kavite dezenfektan grupları arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p:0.000$; $p<0.05$). Kontrol grubunun bağlanma dayanımı, klorheksidin ($p:0.003$) ve *Picea orientalis* reçine özütü ($p:0.000$) gruplarından anlamlı şekilde düşük bulunmaktadır ($p<0.05$). Klorheksidin ve *Picea orientalis* reçine özütü grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Yaşlandırılmış örneklerde etch&rinse yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; kavite dezenfektan grupları arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p:0.138$; $p>0.05$).

Yaşlandırılmamış örneklerde kontrol grubunda; etch&rinse yönteminin bağlanma dayanımı, self-etch yönteminden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p:0.040$; $p>0.05$). Klorheksidin ($p:0.730$; $p>0.05$) ve *Picea orientalis* reçine özütü ($p:0.087$; $p>0.05$) gruplarına bakıldığında ise; etch&rinse ve self-etch yöntemleri arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

Yaşlandırılmış örneklerde kontrol grubunda; etch&rinse yönteminin bağlanma dayanımı, self-etch yönteminden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir ($p:0.000$; $p>0.05$). Klorheksidin ($p:0.247$; $p>0.05$) ve *Picea orientalis* reçine özütü ($p:0.060$; $p>0.05$) gruplarına bakıldığında ise; etch&rinse ve self-etch yöntemleri arasında bağlanma dayanımı ortalamaları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır.

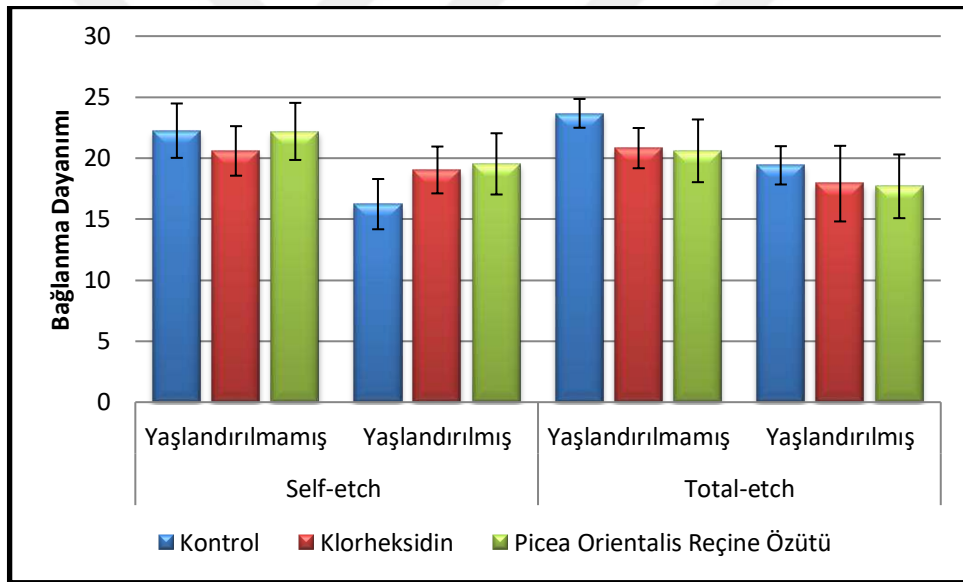
Tablo 8: Yaşlandırma ve farklı yüzey hazırlama yöntemlerinin kavite dezenfektanlarının bağlanma dayanımına etkisinin değerlendirilmesi

Yaşlandırma	Yüzey Yöntemi	Hazırlama	Kontrol	Klorheksidin	<i>Picea orientalis</i> Reçine Özütü
			Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Yaşlandırılmamış	Self-etch		21.25±2.23 ^{Aa}	20.59±2.03 ^{Aa}	20.19±2.34 ^{Aa}
	Etch&rinse		25.67±1.18 ^{Ab}	23.82±1.65 ^{Ba}	22.6±2.57 ^{Ba}
Yaşlandırılmış	Self-etch		17.23±2.06 ^{Aa}	19.91±1.92 ^{Ba}	19.41±2.61 ^{Ba}
	Etch&rinse		19.69±1.57 ^{Ab}	20.04±3.10 ^{Aa}	20.53±2.51 ^{Aa}

3-Yönlü ANOVA Testi

Satırlardaki farklı büyük harfler kavite dezenfektanları arasındaki farklılığı göstermektedir.

Sütunlardaki farklı küçük harfler yüzey hazırlama yöntemleri arasındaki farklılığı göstermektedir.



Şekil 5. Yüzey hazırlama yöntemine göre kavite dezenfektanlarının bağlanma dayanım değerleri

Tablo 9’da görüldüğü üzere kontrol grubunda etch&rinse ve self-etch yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; yaşlandırılmamış örneklerin bağlanma dayanımı, yaşlandırılmış örneklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir (p:0.000; p>0.05).

Klorheksidin grubunda etch&rinse (p:0.004; p>0.05) ve self-etch (p:0.040; p>0.05) yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; yaşlandırılmamış örneklerin bağlanma dayanımı, yaşlandırılmış örneklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir.

Picea orientalis reçine özütü grubunda etch&rinse (p:0.005; p>0.05) ve self-etch (p:0.006; p>0.05) yüzey hazırlama yöntemi kullanıldığında; yaşlandırılmamış örneklerin bağlanma dayanımı, yaşlandırılmış örneklerden istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksektir.

Tablo 9: Farklı yüzey hazırlama yöntemlerinin yaşlandırma sonrasında kavite dezenfektanlarının bağlanma dayanım değerlerine etkisinin incelenmesi

Yüzey Hazırlama Yöntemi	Yaşlandırma	Kontrol	Klorheksidin	<i>Picea orientalis</i> Reçine Özütü
		Ort±SS	Ort±SS	Ort±SS
Self-etch	Yaşlandırılmamış	21.25±2.23 ^a	20.59±2.03 ^a	20.19±2.34 ^a
	Yaşlandırılmış	17.23±2.06 ^b	19.91±1.92 ^b	19.41±2.61 ^b
Etch&rinse	Yaşlandırılmamış	25.67±1.18 ^a	23.82±1.65 ^a	22.6±2.57 ^a
	Yaşlandırılmış	19.69±1.57 ^b	20.04±3.10 ^b	20.53±2.51 ^b

3-yönlü ANOVA Test

Sütunlardaki farklı küçük harfler yaşlandırma işlemleri arasındaki farklılığı göstermektedir.

4.4. Kırılma Tiplerine Ait Bulgular

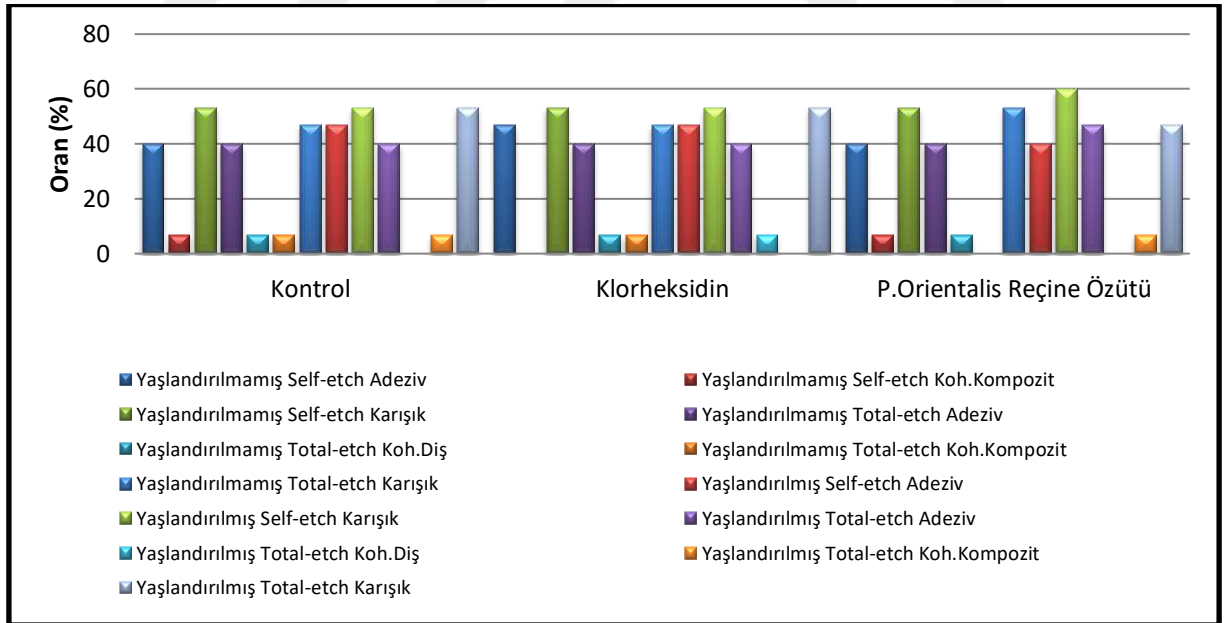
Makaslama bağlanma dayanımı testi sonrasında örnekler 40’lık büyütme altında stereo mikroskopta incelenerek grupların kırılma tipleri belirlenmiştir. Gruplarda görülen kırılma tipleri ve yüzdesel dağılımı Tablo 10’da gösterilmektedir. Tüm gruplar kendi içerisinde değerlendirildiğinde en büyük yüzdeye sahip olan kırılmanın karışık tipte olduğu görüldü.

Yaşlandırılmış ve yaşlandırılmamış örneklerde, self etch ve etch&rinse yüzey hazırlama yöntemleri kullanıldığında; kavite dezenfektan grupları arasında kırılma tipleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır (p>0.05).

Tablo 10: Yaşlandırma ve yüzey hazırlama yöntemlerinin kavite dezenfektanlarına göre kırılma tiplerinin yüzdesel dağılımı

					<i>Picea orientalis</i>	
	Yüzey Hazırlama	Kırılma Tipi	Kontrol	Klorheksidin	Reçine Özütü	
Yaşlandırma	Yöntemi		n (%)	n (%)	n (%)	p
Yaşlandırılmamış	Self-etch	Adeziv	6 (%40)	7 (%46.7)	6 (%40)	0.893
		Koheziv Kompozit	1 (%6.7)	0 (%0)	1 (%6,7)	
		Karışık	8 (%53.3)	8 (%53.3)	8 (%53.3)	
	Etch&Rinse	Adeziv	6 (%40)	6 (%40)	6 (%40)	0.982
		Koheziv Diş	1 (%6.7)	1 (%6.7)	1 (%6.7)	
		Koheziv Kompozit	1 (%6.7)	1 (%6.7)	0 (%0)	
Yaşlandırılmış	Self-etch	Karışık	7 (%46.7)	7 (%46.7)	8 (%53.3)	0.914
		Adeziv	7 (%46.7)	7 (%46.7)	6 (%40)	
		Karışık	8 (%53.3)	8 (%53.3)	9 (%60)	
	Etch&Rinse	Adeziv	6 (%40)	6 (%40)	7 (%46.7)	0.784
		Koheziv Diş	0 (%0)	1 (%6.7)	0 (%0)	
		Koheziv Kompozit	1 (%6.7)	0 (%0)	1 (%6.7)	
		Karışık	8 (%53.3)	8 (%53.3)	7 (%46.7)	

Ki-kare test



Şekil 6. Yaşlandırma ve yüzey hazırlama yöntemlerinin kavite dezenfektanlarına göre kırılma tiplerinin değerlendirilmesi

5. TARTIŞMA

Tıp bilimi insan vücuduna patojen bakterilere karşı çoklu ilaç direncinin ortaya çıkması ve antibiyotiklerin istenmeyen yan etkilerine karşı, antimikrobiyal fitobileşenlere sahip bitkisel ajanların araştırılmasına yönelmiştir (228). Bitkilerden hazırlanan özütlerin; flavonoid, polifenolik bileşikler, taninler ve terpenler gibi birçok fitobileşeni bünyesinde barındırdığı görülmüştür. Araştırmalar bitkilerin yapısında bulunan bu fitobileşenler sayesinde mikroorganizmalar üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite elde edilebildiğine dikkat çekmektedir (229). Günümüzde temel sağlık hizmeti olarak alternatif tıbbı kullanan insan sayısının dünya nüfusunun yaklaşık %80' ine denk geldiği düşünüldüğünde, fitobileşenlere sahip bitkisel kaynakların farklı parametrelere bağlı yapılan analizleri ile bu potansiyellerinin açığa çıkartılması önem kazanmaktadır (230).

Bu çalışmada antimikrobiyal fitobileşenlere sahip olduğu düşünülerek seçilen *Picea orientalis* reçinesi, doğrudan analiz veya tedavide kullanılamamaktadır. İlk olarak, en aktif bileşenlerin çözülmesi ve salınması için özüt haline getirilmesi gerekmektedir. Sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyonları, polifenolikler ve basit fenoliklerin analizinden önce en sık kullanılan prosedürlerdir. Reçine gibi ham hali ile kullanılamayan materyaller için etanol, metanol, su, heksan, aseton, diklorometan ve kloroform gibi çözücüler özütleyici olarak sıklıkla kullanılmaktadır (231). Aromatik veya doymuş organik bileşikler daha yüksek oranlarda çözebildiği için organik çözücüler yüksek bir antimikrobiyal etki sergilemektedir. Araştırmalar; etanol ve metanol özütlerinde genellikle polar, etil asetat özütlerinde ise daha çok semipolar sekonder metabolitlerin yoğunlaştığını göstermektedir (232).

Bu çalışma için kullanılan çözücü olan etanol; yapılan analiz ile araştırdığımız glikozitleri, poliasetilenleri, steroller, polifenoller, tanenleri, flavonoller, terpenoidleri ve alkaloidleri çekme yeteneğine sahip olması nedeniyle seçilmiştir (233). Aynı zamanda çözücü olarak kullanılan etanolün, hem gıda hem de tıbbi amaçlar için kullanılacak doğal maddeler üzerinde insan tüketimi için güvenli olduğu bilinmektedir (182). Bunun yanı sıra *Picea* türlerine ait reçinelerin tipik özelliği, polar olmayan solventlerde kısmen çözünebilirken, etanolde kolaylıkla çözünebilmeleri çözücü seçimimizi desteklemektedir (234).

HPLC DAD Sonuçlarının Değerlendirilmesi

DAD dedektörü ile birleştirilmiş HPLC, bitkisel ürünlerde fenolik bileşiklerin ayrılması ve tespiti için en çok kullanılan tekniktir. Bunun nedeni aynı anda çok sayıda standartın analizini gerçekleştirilebilmesi, ilgili gradient programlar uygulanması sayesinde analiz süresinin kısaltılabilmesi ve analiz öncesi numunenin gerekli işlemlerden geçirilerek analiz edilebilmesi gibi etkenlerden kaynaklanmaktadır (192, 193). Şeker ve ark. Türkiye'de yetişen beş çam kabuğu türünde fenolik bileşiklerin miktar tayini için basit ve hızlı bir metot olarak gördükleri HPLC yöntemi uygulamış ve pek çok fenolik bileşiği tespit etmiştir (235). Benzer fenolik bileşikler tespit etmeyi hedeflediğimiz bu çalışmada da HPLC-DAD metodu uygun görülmüştür.

Araştırmacılar ve üreticiler farklı solvent oranlarında ve farklı yöntemler kullanarak reçine türevlerinin ekstraktlarını hazırlamaktadır. Optimum solvent seçiminin yanı sıra optimum solvent-reçine oranı belirlenerek elde edilen faydanın maksimize edilebileceği bilinmektedir (236). Bu çalışmada bu konuyla ilgili dış hekimliğinde sıkça araştırılan ve çeşitli yüzdelerde konsantrasyon çalışmaları yapılan, aynı zamanda bir reçine türevi olan propolis referans alınmıştır. Kara ve ark. propolisin farklı yüzdelerde etanolik solüsyonlarını hazırlamış ve ekstraksiyon çalışmalarında fenolik bileşiklerin en yüksek elde edilebileceği konsantrasyonun %70 etanol-saf su sistemi olduğu sonucuna varmıştır (210). Dış hekimliği alanında propolisin %70 etanolde çözünmüş çözelti olarak kullanıldığı çalışmalar mevcuttur (237, 238). Bu çalışmada da bir reçine türevinin kavite dezenfektanı olarak kullanımını araştırmamız sebebiyle %70 etanol içeren bir solüsyon kullanım için hazırlanmıştır.

Bu çalışmada antioksidan aktivite testi, DPPH radikalleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, nispeten ucuz, etkili, verimli olarak kabul edilmesi nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır. Bir antioksidanın mevcudiyeti ile, antioksidan, Hidrojen atomunu DPPH radikaline bağışlar. Bu reaksiyon, DPPH'nin reaktivitesini kaybetmesi nedeniyle absorbans azalması ile karakterizedir (239). Bu çalışmada antioksidan aktivite, numunenin SC₅₀ değerine göre belirlenmiştir. Bu değer, DPPH radikallerinin %50'sini inhibe etmek için gereken numune konsantrasyonunu göstermektedir. Bir antioksidanın SC₅₀ değeri ne kadar küçükse, serbest radikalleri engelleme gücü o kadar yüksektir (240). Bu çalışmada tüm *Picea orientalis* reçine özütleri düşük SC₅₀ değerleri vererek yüksek antioksidan aktivite göstermiştir.

Reçinede bulunan fenolik ve flavonoid içerikler, diğer bitkisel örneklerde olduğu gibi antioksidan kaynağı olarak aktivitede önemli bir rol oynamaktadır. Fenolik bileşikler, etkilerini serbest radikallerin oluşumunu baskılayarak göstermektedir (241). Bu çalışmada analiz sonuçlarına göre toplam polifenol içeriği *Picea orientalis* reçine özütleri arasında 389.47 ile 378.289 mg GAE/g, toplam flavonoid içeriği ise 2.97 ile 0.085 mg QUE/g arasında değişen değerlerde bulunmuş ve buna dayanılarak, etanol solüsyonu sayesinde reçine özütünden elde edilebilen fenolik ve flavonoid bileşiklerin DPPH serbest radikali süpürme aktivitesi üzerinde bir etkiye sahip olabildiği düşünülmüştür.

Bu çalışmada reçine örneklerinin antioksidan aktivitesini belirlemek için ikinci bir yöntem olan Ferrik indirgeme güç analizi (FRAP) testi de uygulanmıştır. FRAP testi ferrik-tripiridiltriiazin kompleksindeki Fe^{+3} 'ün örnekte bulunan antioksidanlar tarafından Fe^{+2} 'ye indirgenmesi esas alınarak gerçekleştirilmektedir. FRAP aktivitesi, toplam antioksidan kapasitenin bir testidir ve propolis başta olmak üzere reçine ekstraktlarında en sık kullanılan yöntemdir (242). Bu çalışmada en güçlü FRAP aktivitesi 3646.689 μ mol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ g'de Borçka *Picea orientalis* reçine özütünde, en düşük FRAP aktivitesi ise 2955.522 μ mol $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ g'de Çaykara *Picea orientalis* reçinesinde bulunmuştur.

Üstün ve ark. yaptıkları çalışmada Türkiye'de görülen çam türlerinin iğne ve dal kısımlarından elde ettikleri etanol ekstraktlarında, toplam fenolik içeriği 128.127 ile 34.31 mg GAE/g, toplam flavonoid içeriği ise 137.72 ile 11.37 mg QUE/g arasında bulmuştur (243). Elde edilen sonuçlar bu çalışma ile paralel olmakla birlikte kullanılan bitki kısımları, çözücü yüzdesi, örneğin saklanma ve toplanma koşulları gibi çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Aynı çalışmada bu örnekler içerisinde yapılan DPPH ve FRAP analizlerine göre orta seviyede bir antioksidan aktivite tespit edildiği belirtilmiştir. Elde edilen bu sonuç Ulukanlı ve ark. yapmış olduğu farklı türdeki çam ekstraktlarının analiz sonuçları ile paralellik göstermekte ve her iki çalışmada da bu antioksidan kapasite toplam fenolik ve flavonoid içeriğe atfedilmektedir (244).

Dudonne ve ark. yaptıkları çalışmada 30 farklı bitki türünün sulu çözeltilerinin toplam fenolik içeriğini ve antioksidan kapasitesini araştırmış ve *Pinus maritima* çam bitkisinin kabuğundan elde ettikleri ekstraktta toplam fenolik içeriği 360.76 mg GAE/g bularak bu çalışma ile yakın sonuçlar elde etmiştir. Aynı çalışmada 30 bitki türü arasından DPPH ve FRAP aktivitelerinin incelenmesi sonucu *Pinus maritima* çam ekstraktında en yüksek antioksidan kapasiteye dikkat çekmişlerdir (245). Şeker ve ark. Türkiye'de yetişen

beş çam kabuğu türünün ekstraktlarını inceledikleri çalışmalarında toplam fenolik miktarlarının ve antioksidan kapasitelerinin çok yüksek olduğunu belirtmişlerdir. Bu çalışmaya göre *Pinus brutia* DPPH ve FRAP değerlerinin incelenmesi sonucu en yüksek antioksidan kapasiteyi göstermiştir (235). Aynı ülkede yetişen farklı çam türlerinde yüksek fenolik içerik ve antioksidan kapasitelerin bulunması, aynı şekilde ülkemizde yetişen *Picea orientalis* reçine içeriğinde bulduğumuz sonuçlarla benzerdir.

Bir reçine türevi olan propolisle ilgili olarak Kara ve ark. propolisin farklı yüzdelerde etanolik solüsyonlarını test ettikleri çalışmalarında en güçlü FRAP aktivitesi, 1486.124 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g'da %80 etanol ekstresi ile belirlenmiştir (246). Sun ve ark. ise alkol içerikli propolis ekstraktlarının DPPH süpürme gücünü sırasıyla 0,633 mg/ml olarak bildirmiştir (247). Bulduğumuz en yüksek FRAP aktivitesi 3646.689 $\mu\text{mol FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ g bu değerlerden çokça yüksektir. DPPH süpürme gücünde bulduğumuz en düşük değer ise 0.023 mg/ml olmak üzere bu değerlerden daha düşüktür. Buna dayanılarak *Picea orientalis* reçine özütlerinin de propolis çalışmalarında olduğu gibi başarılı sonuçlar verebilecek bir reçine türevi olduğu sonucuna ulaşılmıştır. Ne var ki *Picea orientalis* reçine özütü ile yapılmış detaylı DPPH ve FRAP incelemeleri ve antioksidan kapasite çalışmaları bulunmamaktadır.

İğne yapraklı ağaçların çoğunun ksileminde reçine kanal sistemi mevcuttur. Bu kanallar esas olarak monoterpen, seskiterpen ve reçine asitleri gibi sekonder metabolitleri içeren karmaşık bir karışımdan meydana gelen reçineyi üretmektedir. Çam, ladin, köknar gibi *Pinus* türüne ait ağaç reçinelerinin ana bileşikleri ağırlıklı olarak monoterpenlerdir (248). Hafizoğlu ve ark. tarafından yapılan çalışmada gaz kromatografi incelemesinde *Picea orientalis* kabuk reçinesinde monoterpenlerden; δ -3-karen, α -pinen ve β -pinen; seskiterpenlerden ise trans-karyofilen bulunduğu bildirilmiştir (249). Shmidt ve ark. yaptıkları çalışmada *Picea orientalis* reçinesinin terpenoid bileşimini incelemiş ve 32 monoterpen, seskiterpen ve diterpen bileşimi tanımlanmıştır (250).

Bu çalışmada incelediğimiz *Picea orientalis*'in de ait olduğu ladin türüne ait reçinenin bir diğer ana terpenoid bileşeninin dehidroabietik asit olduğu bilinmektedir. Mevcut diğer reçine asitleri, levopimarik, pimarik, palustrik, izopimarik, sandrakopimarik, abietik ve neoabietik asitlerdir ve kromatografik yöntemlerle çoğu reçine analiz çalışmasında tespit edilmektedir (251).

Pinus türleri ile ilgili olarak ladin kabuğunda bulunan izoflavonoid alt gruplarından lignanlara karşı ilgi her geçen gün artmaktadır (252). Hafizoğlu ve ark. yaptıkları çalışmada

Picea orientalis kabuklarında antioksidan özellik taşıyan izolariciresinol ve matairesinol gibi önemli lignan bileşiklerinin bulunduğunu belirtmiştir (253). Gönültaş ve ark. tarafından yapılan çalışmada da *Picea orientalis* kabuğunun kimyasal bileşimi incelenmiş ve yapılan fenolik ekstraksiyon sonucu bilinen en güçlü antioksidan bileşiklerden olan kondanse tanenler (proantosiyaniidinler) açısından önemli bir kaynak olduğu ortaya konulmuştur (252).

Bu çalışmada elde ettiğimiz ve baskın fenolik bileşikler olarak belirlediğimiz kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asidin en yüksek oksidasyon durumunda olan fenilpropan türevli bileşiklerin geniş bir grubunun ortak temsilcileri olarak kabul edilmesi dolayısıyla (254) bu çalışmada ulaşılan yüksek antioksidan değerine bahsedilen yönde katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu çalışmada incelenen 3 farklı bölgeye ait *Picea orientalis* reçine özütünde tespit ettiğimiz yüksek antioksidan kapasitede fenolik bileşiklerin etkisinin olması yanı sıra, dahil etmediğimiz fakat yapılan bu araştırmalardan yola çıkarak bu türe ait terpen bileşikleri, reçine asitleri ve lignan içeriği dolayısıyla da antioksidan kapasitenin desteklendiği düşünülmektedir.

HPLC analiz yönteminde ayrışan elüentler bir diğer HPLC sistem parçası olan dedektöre girmekte ve dedektör analitin alıkonma zamanı ve miktarına bağlı olarak sinyaller üretmektedir. Üretilen sinyaller zamanın fonksiyonu olarak kromatogram üzerinde pikler halinde kaydedilmektedir. Piklerin tanımlanması ise tutma sürelerine dayanmakta ve elde edilen içeriğin incelenmesine imkan sağlamaktadır (218).

Bu çalışmada elde edilen kromatogramlarda 3 farklı *Picea orientalis* reçine özütünde kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asit baskın fenolik asitler olarak tespit edilmiştir. Konuyla ilgili olarak Şeker ve ark. yaptıkları çalışmada Türkiye’de yetişen beş çam kabuğu türüne ait kromatograma göre kateşin, epikateşin, epikateşin gallat, ferulik asit ve taxifolin fenolik asit ve flavonoid çeşitlerinin baskın olarak bulunduğunu tespit etmişler (235) ve bu çalışmada her 3 reçine özütünde elde edilen ferulik asit ile ortak bir sonuca ulaşmışlardır. Bunun yanı sıra Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde elde edilen epikateşin ile de benzerdir. Holmbom ve ark. birçok ağaca ait reçine örneklerini inceledikleri çalışmada *Pseudotsuga menziesii* türüne ait kromatogram incelemesinde en yüksek pik değerini kafeik asitte elde etmiş ve baskın bileşik olarak tespit etmiştir (234). Sipponen ve ark. *Picea abies* reçine kromatogramında fenolik asit çeşitlerinden en yüksek pik değerini t-sinamik asitte elde etmiştir (251). Bu çalışmamızda da bahsedilen bulgulara paralel olarak fenolik asit

türlerine ait belirgin pikleri her 3 reçine türünde de kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asitte elde edilmiştir.

Holmbom ve ark. 4 farklı ağaca ait reçine türlerinin kimyasal analizleri sonucunda elde ettikleri kromatogramda *Picea abies* ve *Larix decidua* reçinelerinde en yüksek pik değerlerini lignanlarda bulmuşlardır. Bunun yanı sıra *Pinus sylvestris* türünde ise en yüksek pik değerleri reçine asitlerinde tespit edilmiştir (234). Benzer şekilde Sipponen ve ark. *Picea abies* reçine kromatogramında en yüksek pik değerlerini matairesinol gibi önemli bir lignan bileşiğinde ve reçine asitlerinde elde etmiştir (251). Bu iki çalışmada da flavonoid ve fenolik bileşikler daha düşük pik değerleri göstermiştir.

Kromatogramlarda elde edilen bu bileşiklere ait pikler dışında görülen ve tanımlanmayan diğer piklerin, birlikte elüe edilen ve fenolik sınıfına ait olmayan diğer bileşiklere ait olduğu belirtilmektedir. Aynı durum bu çalışmada da mevcuttur. Fakat Şeker ve ark. tarafından ifade edildiği üzere (235) fenolik içerikleri araştırdığımız çalışmamızın konusu dışında olması sebebiyle bu bileşikler tespit edilmeye çalışılmamıştır. Kromatogramda yüksek pik gösteren bu bileşiklerin pek çok çalışmada açıklandığı üzere lignanlar, terpenler ve reçine asitleri gibi bileşiklerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Sağlık alanında Pinaceae familyasına ait bitkilerin ve çeşitli kısımlarının bahsettiğimiz zengin fenolik bileşiklere sahip olması yönüyle ön plana çıkan ve tıbbi alanda kullanımına örnek olarak gösterilebilecek Pycnogenol, çam kabuğu özütünden elde edilen (*Pinus pinaster*), %65-75 oranında prosiyanidinlerden oluşan ve taxiofilin başta olmak üzere kateşin, epikateşin gibi polifenolik monomerler, fenolik asitler ve glikozitleri gibi alt birimlere sahip bir gıda takviyesi olarak kullanılmaktadır (255). Öte yandan, Flavangenol ise, çam kabuğunun sıcak suyla ekstrakte edilmesiyle elde edilmekte ve oligomerik proantosiyonidinleri içeren ve tıbbi kullanımı olan başka bir örnektir (256). Pycnogenol ve Flavangenol gibi ticarileşmiş ürünler, bir ormancılık endüstrisi yan ürününün, farklı türden ekstraksiyon yöntemleriyle besin takviyesi olarak kullanımına yönelik dikkat çekici örneklerdir.

Bahsedilen çalışmaların sonuçları, çam türlerine ait ekstraktların fenolik bileşikleri başta olmak üzere, biyolojik olarak aktif bileşiklerin umut vaat eden yeni bir kaynak olarak görüldüğünü ve fonksiyonel bir bileşen olarak uygulanabileceğini göstermektedir. Tıbbi ve gıda endüstrisi uygulamalarında kullanılmak üzere bu türe ait daha fazla çalışmaya ihtiyaç bulunmaktadır. *Picea orientalis* reçinesi ile ilgili olarak halk arasında sakızının çiğnenmesi

ve reçinesinin kaynatılarak iltihaplı yaralara sürülmesi sebebiyle sağlık alanında faydaları bilinse de (257), fenolik bileşenlerinin tespit edildiği ve tıbbi alanda kullanımda sağlayabileceği katkılar ile ilgili çalışmalar yok denecek kadar azdır. Bu çalışmada *Pinus* türüne ait yapılan birçok incelemeye katkıda bulunulması ve *Picea orientalis* reçinesine dikkat çekilmesi amaçlanmıştır.

Agar Difüzyon Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Diş çürükleri için yapılan restoratif tedavilerin amacı, enfekte olmuş dentini uzaklaştırarak bölgeyi uygun bir restoratif materyal ile doldurmak iken, enfekte diş yapısının tamamen ortadan kaldırılamaması ve kavitenin tam sterilizasyonunun sağlanamaması mikrosızıntı, artan pulpa duyarlılığı, pulpa iltihabı ve restorasyonun değiştirilmesini gerektiren sekonder çürüklere neden olabilmektedir (146). Bu sorunun üstesinden gelmek için önerilen en etkili çözüm yollarından biri, restorasyon öncesinde bakterilerin tamamına yakınının ortadan kaldırılmasını sağlamak amacıyla kavite dezenfektanı kullanımıdır.

Oral antiseptiklerin altın standardı olarak ifade edilen klorheksidin; dental plak oluşumunu engelleyerek Gram pozitif ve negatif bakteriler üzerinde geniş spektrumlu antibakteriyel etki gösterebilen güçlü bir antiseptik ajandır (258). Klorheksidin solüsyonunun antimikrobiyal etkinliği katyonik molekülün negatif yüklü mikrobiyal hücre duvarına rahatça tutunabilmesiyle meydana gelmektedir. Mikroorganizmalar ve diş sert dokusu arasındaki kalsiyum köprülerini inhibe ederek mikroorganizmaların diş yüzeyine tutunmasına engel olmaktadır (259). Bu nedenle antimikrobiyal aktivitesi kanıtlanmış bu ajan, yeni bir antimikrobiyal kavite dezenfektan adayının araştırıldığı bu çalışmaya bir referans olarak dahil edilmiştir.

Kavite dezenfektan kullanımı konusunda pulpa ile biyouyumluluk veya adeziv restoratif materyallerin diş yüzeyine adezyonu ile ilgili endişeler bulunmaktadır (146). Klorheksidin, kavite dezenfektanları üzerine gelecek çalışmalar için pozitif bir kontrol olarak kabul görse de (260) mevcut dental literatür, kavite dezenfeksiyonunun klorheksidin ile ilişkisini ve sonrasında uygulanan adeziv sistemin bağlanmasını tartışmalı bir konu olarak yansıtmaktadır (129, 130, 148, 261, 262).

Tüm bu sınırlamaların üstesinden gelebilen, güvenli, etkili ve ekonomik alternatif bir kavite dezenfektanına her zaman ihtiyaç duyulmaktadır. Mevcut antibakteriyel ajanlara karşı direnç gelişmesi probleminin yanı sıra toksisite tehlikesi ve açığa çıkabilecek yan etkilerin ortadan kaldırılması isteği yeni antimikrobiyal ajanları keşfetme çabalarını motive

etmektedir. Bu amaçla yapılan antimikrobiyal araştırma yaklaşımları; yeni kimyasal formüllerin keşfine ve geliştirilmesine odaklanmaktadır (263, 264).

Potansiyel antimikrobiyal ve antiseptik aktiviteye sahip olan doğal bileşik gruplarından olan bitkisel reçineler, esas olarak hasar veya enfeksiyondan sonra bitkilerden yayılan, yapışkan ve suda çözünmeyen yapılar olarak tanımlanmaktadır. Biyosentetik evrim, biyotik etkileşimlere yanıt olarak bu reçinelerde ikincil metabolitlerin üretilmesine yol açmıştır. Bu nedenle reçinelerin antimikrobiyal aktiviteye sahip olması beklenmektedir. Bununla birlikte, antibakteriyel aktivite için reçineler ve reçine içeren bitkiler hakkında az sayıda rapor mevcuttur (265).

Reçine içeren bitkilere örnek olarak bazı farmakolojik kodekslerde yer alan tıbbi bitkiler arasında *Picea* türleri de bulunmaktadır (266). Cilt yaralarını ve çeşitli cilt enfeksiyonlarını iyileştirmek için kullanılan *Picea abies* kaynaklı reçine merhemi, Finlandiya'da yüzyıllardır süren halk hekimliğinin bir örneğidir (251). Aynı şekilde Pinaceae ailesine ait Doğu Karadeniz bölgesinde yaygın olarak bulunan ve halk arasında Doğu ladini olarak isimlendirilen *Picea orientalis* reçinesinin de iltihaplı yaraların tedavisinde kullanıldığı bilinmektedir (163, 164, 267). Reçine türevi ürünlerin cilt enfeksiyonlarını ve enfekte yaraları tedavi etmek için potansiyel araçlar olabileceğini gösteren bazı bilimsel raporlar vardır (268). Bununla birlikte halk arasında kullanılan reçine merhemi, modern tıpta çok az ilgi görmekte ve bu reçine merhemlerin özellikle insanlarda klinik olarak önemli mikroorganizmalara karşı antibakteriyel etkileri bilinmemektedir (251). Tüm bu bigilere dayanılarak bu çalışmada 3 çeşit *Picea orientalis* reçine örneği antibakteriyel özelliklerinin tespit edilmesi amacıyla seçilmiştir.

Fitoterapinin bahsedilen bu özelliklere dayanılarak artan popülaritesi sonucu koruyucu diş hekimliği literatürlerinde sıklıkla karşılaştığımız aloe vera ve propolis kullanılarak hazırlanan özütlerin kavite dezenfeksiyonu amacıyla denenmesi ve etkili olduğu bulunması ile birlikte bu konuda farklı bitki türleri ile yapılacak çalışmaların da önü açılmıştır (145). Bununla birlikte, kavite dezenfektanları olarak denen bitkisel özler hakkında çok az şey bilinmektedir ve daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir.

Tüm bu bilgilerin ışığında bu çalışma; antibakteriyel etkinliği kanıtlanan ve kavite dezenfektanları içerisinde altın standart olarak kabul edilen klorheksidin ile antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu düşünülen kavite dezenfektan adayı *Picea orientalis* reçine özütünün, çalışmada kullanılan oral mikroorganizmalar üzerindeki antibakteriyel aktivitesinin yanı sıra

minimum inhibitör konsantrasyonu (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyonunun (MBK) karşılaştırılarak değerlendirilmesi amacıyla yapılmıştır.

Agar difüzyon teknikleri ucuz ve kolay uygulama imkanı sağlaması sayesinde diş hekimliğinde kullanılması planlanan ve antibakteriyel etkinliğinin tespiti gereken materyallerin araştırılmasında akla gelen ilk metotlardan biridir (123, 262). Buna ilaveten birden fazla materyalin antibakteriyel etkisinin aynı anda karşılaştırılabilmesi ve difüzyon yeteneğine sahip materyallerin dentin dokusunda da daha derin penetrasyon göstererek daha etkin aktivite gösterebilmesi gibi avantajlar da mevcuttur (269). Bu faktörler göz önüne alınarak bu çalışmada agar difüzyon tekniği kullanılmıştır.

Bu çalışmada kavite dezenfektanlarının antibakteriyel etkinliğinin saptanması için seçilen oral bakteri türleri *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) ve *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) olarak sıralanmaktadır.

S. mutans, esas olarak çürüklerle ilişkisi iyi bilinen diş patojenlerinden biridir (270). Sükrozdan glukan sentezlemesi nedeniyle, organizmanın diş yüzeyine güçlü bir şekilde tutunmasını ve biyofilm oluşumunda yer almasını sağlayarak çürük oluşumunda kilit bir rol oynamaktadır. Glukanın jelatinimsi formu, diş plağında kolonize olan bakteri suşları tarafından salgılanan asit difüzyonunu engelleyerek diş minesine zarar vermekte ve çürük oluşumunu başlatmaktadır (271).

Fitoterapinin artan popülaritesi ile birlikte, dental araştırmalarda da sıkça öne çıkan reçine benzeri bir materyal olan propolis kavite dezenfeksiyonu açısından denenmiş (145) ve başta *S. mutans* olmak üzere çürük patogenezinde rol alan bakterilerin eliminasyonunda ya da aktivitelerinin azaltılmasında etkili olduğu tespit edilmiştir (272, 273). Reçine türevi doğal bir ürünün bu yöndeki etkisi de göz önüne alınarak biyofilm oluşumunda erken kolonize olan bakterilerden olan *S. mutans* bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Dental biyofilm yapısına katılarak diş çürüğü oluşumunda etkisi bulunan ve dirençli kanal enfeksiyon etmeni olarak bilinen fırsatçı patojenlerden *E. faecalis*, Koudhi ve ark. ve Gold ve ark. tarafından yapılan çalışmalarda oral mikroflorada yüksek prevelansı olan bir bakteri olarak kendini göstermektedir (274, 275). Ayrıca Koudhi ve ark. *E. faecalis*'in çürük lezyonları içindeki kalıcılığı ve tutunma yeteneklerine ek kanıt sağlayarak, çeşitli ilaçlara dirençli olduğu sonucuna vardıkları bu tür için ağız ortamının bir rezervuar görevi gördüğünü belirtmişlerdir (274).

Antimikrobiyal ajanların diş hekimliğinde sıklıkla kullanılması sonucu diğer oral bakteriler arasında ilaç direncine yol açma tehlikesine değinilerek fitoterapiye yöneldiğimiz ve doğal bir antibakteriyel ajanı araştırdığımız bu çalışmada seçtiğimiz oral bakterilere *E. faecalis* de dahil edilmiştir. Dental biyofilmde bu tür patojenlerin yerleşmesi, direnç gelişimine ek olarak, vücudun diğer bölgelerinde enterokokların neden olduğu sistemik hastalıkların gelişme riskini arttırabileceği bilindiğinden bu çalışmada test edildiği gibi enterokoklar üzerinde etkili doğal bir antibakteriyel ajanın tespit edilmesinin faydalı olabileceği düşünülmüştür.

P. aeruginosa hücre dışı polimerik madde (EPS) üretimi sayesinde dental biyofilme katılabilmektedir (62). Çürük oluşumuna sebebiyet veren dental biyofilmde de yeri olan bu bakteri yapılan çalışmalarda tüm çürük lezyonlarından izole edilebilmiştir (14, 276, 277). Ayrıca oral mikroflorada *P. aeruginosa* varlığının solunum yolu patojen kolonizasyonunu destekleyerek veya yoğun bakım üniteleri ve bakım evlerindeki hastalar da dahil olmak üzere yüksek riskli kişilerde alt solunum yolu enfeksiyonu riskini etkileyebileceği görülmüştür (61). Bu özelliklerinin yanı sıra *P. aeruginosa*'nın fırsatçı bir patojenik bakteri olması ve penisilin başta olmak üzere amoksisilin gibi diş hekimliğinde sıklıkla reçete edilen antibiyotiklere dirençli olması (62) gibi faktörler de düşünülerek bu tarz bakterilere karşı doğal bir antimikrobiyal ajanı test ettiğimiz bu çalışmaya dahil edilmiştir.

S. aureus'un, ağız boşluğunda çok sayıda enfeksiyondan sorumlu olduğu bilinmektedir. Angular cheilitis, çeşitli endodontik enfeksiyonlar, çene osteomyeliti ve parotite ilaveten parenteral beslenme alan yaşlı, oldukça bağımlı hastalarda görülen oral mukozit bu enfeksiyonlara örnektir (52, 56, 58, 278). Hastane enfeksiyonunun en yaygın nedenlerinden da olan *S. aureus*'un metisiline ve vankomisine dirençli suşları dünya çapında giderek daha fazla rapor edilmektedir. Özellikle hastanede yatan veya immünsüpresif bireyler üzerinde gelişen oral mukoza hastalıklarının birçoğunda fırsatçı patojenler olan mantarlarla birlikte izole edilebilen *S. aureus*'un, oral kaynaklı enfeksiyon geliştirme riski bulunmaktadır (279).

Bu çalışmada tüm *Picea orientalis* reçine özütlerinde *S. aureus* suşunda en yüksek antimikrobiyal aktivite değerleri bulunmuştur. Bahsedilen enfeksiyonları ile hem oral mukozada hem de hastane enfeksiyonlarında başlıca sebep olan ve antibiyotik direncine sahip olması yönüyle üzerinde etkili olabilecek pek çok doğal ve sentetik ajanın araştırıldığı

bu suş üzerinde elde ettiğimiz antimikrobiyal aktivite ile literatüre katkıda bulunulması hedeflenmiştir.

Klorheksidin, antibakteriyel gargaralarda düşük konsantrasyonlarda kullanımda altın standart haline gelmiştir (280). Bu konudan yola çıkarak Van de Lagemaat ve ark. çeşitli klinik enfeksiyonlarda yer alan bir patojen olan *S. aureus*'un (279) klorheksidine karşı direnç kazanmasına karşılık, karyojenik bir oral patojen olan *S. mutans*'ın (281) klorheksidine karşı duyarlı olmasının nedenini araştırmıştır. Buna göre *S. mutans*'ın klorheksidin maruziyeti sonucu hücre duvarı hasarını apoptoz ile kendi kendine onararak klorheksidine duyarlılığını sürdürebilirken *S. aureus*, bu mekanizmalarından yoksun olması nedeniyle klorheksidinin hücre dışarı akabilmesi için klorheksidin direnci geliştirmesine izin veren yollar bulmaktadır (282).

Bahsedildiği üzere altın standart olarak kabul edilen klorheksidine karşı, ağız florasında baskın olarak bulunan ve birçok oral mukoza enfeksiyonunun kaynağı inatçı bir patojen olan *S. aureus*'un direnç geliştirmesi durumunda kullanılabilecek alternatif bir antimikrobiyal ajana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu çalışmada *Picea orientalis* reçine özütleri *S. aureus* suşu üzerinde yüksek bir antimikrobiyal aktivite göstermekte ve bu sayede bahsedildiği üzere bu suşun klorheksidine direnç geliştirmesi durumunda alternatif bir antimikrobiyal ajan olarak rol alabileceği görüşü desteklenmektedir.

İzole edildiği oral mukoza hastalıklarına ilaveten sahip olduğu adezyon ve adezin genleri sayesinde dental biyofilme tutunarak kolonize olabilen ve diş çürüğü izolatlarından elde edilmesiyle oral patolojideki etkinliği kanıtlanan (283) *S. aureus* üzerinde etkili olabilecek bir bitkisel antimikrobiyal ajanın dental literatüre katkısının faydalı olabileceği düşünülerek bu çalışmaya dahil edilmiştir.

Konuyla ilişkili olarak tıp alanında kullanıma kazandırılmış; yanık, yara ve inflamatuvar süreçlerin tedavisinde kullanılan çam reçinesi içerikli Biopin merhemi iyi bir örnek olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu materyalle ilgili olarak Simbirtsev ve ark. çam reçinesi içerikli müstahzar ilaç preparatının in vitro antibakteriyel aktivite tespitinde *S. aureus* üzerinde 16 mm inhibisyon zon çapı tespit edilmiştir (284). Aynı konsantrasyonda çam reçinesi kullanılarak hazırlanan Artvin reçine özütünde 18.33 mm, Çaykara reçine özütünde 16 mm, Borçka reçine özütünde 18.66 mm inhibisyon zon çapları bulunarak benzer sonuçlar elde edilmiştir. Simbirtsev ve ark yaptıkları çalışmada *P. aueruginosa* için

inhibisyon zon çapı tespit edebilirken (284), bu çalışmada *P.aeruginosa* üzerinde inhibisyon çapı oluşmamıştır.

Aynı çalışmada Simbirtsev ve ark. *S. aureus* ve *P. aeruginosa* üzerinde MİK ve MBK değerleri tespit ederek, MİK değerini *S. aureus*'ta daha düşük konsantrasyonda belirlemiş ve bu suştaki etkisinin daha fazla olduğunu tespit etmiştir (284). Bu çalışmada ise *S. aureus* için her 3 reçine ekstraktında da MİK ve MBK değeri tespit edilebilmiş, Artvin *Picea orientalis* reçine özütünde ise daha düşük konsantrasyonda MİK değeri belirleyerek paralel sonuçlara ulaşılmıştır. *P. aeruginosa* üzerinde ise bakteriyostatik ve lethal etki görülmemiştir.

Pinaceae familyasına ait olan *Picea orientalis* dışında birçok çam çeşidinin reçinesine ait analiz ve antimikrobiyal etkinlik çalışmaları mevcuttur. Kızıl ve ark. tarafından yapılan çalışmada Pinaceae familyasına ait *Cedrus libani* ve *Abies cilicia* reçine ekstraktlarında *S. aureus* için 12-14 mm arasında, *P. aeruginosa* için ise inhibisyon çapı elde edemeyerek bu çalışmaya benzer yönde antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (285). Bahsedilen çalışmalar ile görülen farklılıkların sebepleri *P. aeruginosa* bakteri suşlarının, kullanılan çözücü türlerinin ve antibakteriyel test yöntemlerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Ulukanlı ve ark. yaptıkları çalışmada *Pinus brutia* ve *Pinus pinea* çam reçinelerinden elde edilen uçucu yağın antimikrobiyal aktivitesini incelemiştir. Çalışmanın sonuçlarına göre *S. aureus*'ta 13 mm inhibisyon zon çapı ile orta seviyede, *E. faecalis* ve *C. albicans*'ta 9 mm inhibisyon zon çapı ile çok düşük antimikrobiyal aktivite tespit edilmiştir (244). *P. aeruginosa*' da ise inhibisyon zon çapı oluşmamıştır. Bu çalışmada *S. aureus*'a karşı her üç reçine özütünde de yüksek antimikrobiyal aktivite tespit edilirken, bahsedilen çalışmaya benzer şekilde *E. faecalis*, *C. albicans* ve *P. aeruginosa* suşlarında antimikrobiyal aktivite tespit edilememiştir.

Furiga ve ark. çam kabuğu ekstraktının *S. mutans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitesini klorheksidinle kıyaslamıştır. Buna göre klorheksidin ile çok düşük MİK ve MBK değerleri tespit edilirken, çam ekstraktı çok daha yüksek MİK ve MBK değerleri vermiş ve klorheksidin karşısında düşük bir antimikrobiyal aktivite sergilemiştir (286). Bahsedilen çalışma ile paralel olarak yaptığımız bu çalışmada da *S. mutans* ve klorheksidinin MİK ve MBK değerleri arasında ciddi fark bulunmuş, inhibisyon zon çapları da değerlendirilerek

Picea orientalis reçine özütlerinin *S. mutans* üzerinde düşük antimikrobiyal aktivite sergilediği sonucuna varılmıştır.

Ayrıca Furiga ve ark. yaptıkları çalışmada laboratuvarından hazır olarak temin edilen bir çam kabuğu ekstraktı kullanarak (286), bu çalışmaya göre daha düşük MİK ve MBK değerleri elde etmiştir. Bu çalışmada ise reçinenin ham hali ile etanol çözücüsü kullanılarak yeni bir ekstrakt hazırlanmıştır. Bu parametrelere bağlı olarak iki çalışma arasında bulunan MİK ve MBK değerlerinin farklı olduğu sonucuna varılmaktadır.

Bahsedilen çalışmalar arasında kullanılan çözücülerin, referans ilaçların ve bakteri suşlarının duyarlılığının farklı olması ulaşılan sonuçları da etkilemektedir. Aynı zamanda doğal bitki özütleri kullanılarak yapılan tedavilerdeki (fitoterapi) bitki özütlerinin hazırlanma koşullarının yanı sıra bitkilerin iklimsel ve mevsimsel değişimlerden, coğrafi konumdan ve elde edilme zamanından da etkilendiği bilinmektedir. Bunun sonucunda test edilecek bitkisel kaynağın kimyasal yapısında kalitatif ve özellikle kantitatif değişiklikler meydana gelebilmektedir (287). Bu çalışmada da *Picea orientalis* bitki gövdesinden elde edilen çam reçinelerinin kullanılması aynı değişkenlerden etkilenmelerine ve farklılıklar görülmesine neden olabilmektedir.

Klorheksidinin *S. mutans* başta olmak üzere hem Gram pozitif, hem de Gram negatif bakterilere karşı yüksek antibakteriyel aktivitesinin bulunduğu ispatlanmıştır (288, 289). Ancak bunların Gram negatif bakteri üzerindeki etkileri, Gram pozitif bakteriler üzerindeki etkilerinden daha az bulunmuştur (107, 290). Klorheksidinin %0,05 ile %2 arasında değişen konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkinliği vardır. Oral mukozada kullanılan ağız gargaralarında %0.12 ila %0.2 konsantrasyonları kullanılmaktadır (291). Kavite dezenfeksiyonu ile ilgili çalışmalarda ise tercih edilen klorheksidin konsantrasyonu çoğunlukla %2'dir (113, 130, 291–293). Bu sebeple bu çalışmada %2'lik konsantrasyon kullanılmıştır.

Bu çalışmada antimikrobiyal aktivite tespit ettiğimiz *S. aureus* ve *S. mutans* suşları üzerinde klorheksidin ve reçine özütlerinin etkisine bakıldığında, klorheksidinin her iki bakteri üzerinde de reçine özütünden fark edilir derecede düşük MİK ve MBK değerleri verdiği ve daha yüksek aktivite oluşturduğu görülmüştür. Bunun sebebi en düşük konsantrasyonlarda test ettiğimiz reçine özütlerine göre %2'lik klorheksidin konsantrasyonunun daha yüksek olmasıdır. Reçine özütlerinin üzerinde en fazla antimikrobiyal aktiviteyi gösterdiği *S. aureus* düşünüldüğünde, dental biyofilmin yanı sıra

oral florada da baskın olarak bulunan bu suşun ağız gargaralarında tercih edilen %0.02 konsantrasyonundaki klorheksidin ile kıyaslanması durumunda reçine özütleri ve klorheksidin MİK ve MBK değerlerinin yakın bulunacağı düşünülmektedir.

Artan mikrobiyal enfeksiyon vakalarıyla mücadele etmek ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç mekanizmalarını frenlemek için birçok alanda bitki bazlı fenolik bileşikler keşfedilmektedir. Bunlardan biri olan kafeik asit (3,4-dihidroksi sinamik asit) antioksidan özellikleriyle ön plana çıkan bir bileşik olmakla beraber bakteri, mantar ve virüslerin neden olduğu mikrobiyal patogeneze ve kronik enfeksiyonla mücadelede alternatif bir strateji olarak kullanılmaktadır (294).

Bu çalışmada reçine özütlerinin analiz edilmesinin ardından baskın olan fenolik asitlerin standart solüsyonları ile ayrı olarak antimikrobiyal aktivite testi yapılmış ve kafeik asit standart solüsyonunda test edilen tüm bakteriler üzerinde antimikrobiyal aktivite görülmüştür. Reçine özütleri ve kafeik asit verileri kıyaslandığında; özütlerin en yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği *S. aureus* suşunda kafeik asidin MİK ve MBK değerleri oldukça az bulunarak daha yüksek antimikrobiyal aktivite sergilediği tespit edilmiştir. *S. mutans* suşu üzerinde ise MİK ve MBK değerleri aynıdır. *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* üzerinde reçine özütlerinde MİK ve MBK değerleri tespit edilemezken, kafeik asitte bu değerler elde edilebilmiştir. Elde edilen sonuçlardan yola çıkarak bu çalışmada en düşük konsantrasyonda kullandığımız reçine özütlerinin içeriğinde bulunan kafeik asidin yoğunlaştırılmasına yönelik ileri dönemlerde yapılabilecek çalışmalarda reçine özütleri ile daha yakın MİK ve MBK değerleri elde edilebileceği düşünülmektedir.

Çam reçinesi içeriğiyle sağlık alanında kullanılan materyallere bir örnek olan biopin merheminin ve yanıkların, yaraların ve cilt ve deri altı yağının pürülan ve iltihaplı hastalıklarının tedavisi sırasında etkili olduğu görülmüştür (295). Bu materyalin immunotoksik özelliklerini araştıran Simbirtsev ve ark. klinik dozlarda biopin ile uzun süreli tedavinin nonspesifik bağışıklık üzerinde hiçbir etkisi olmadığını, ancak spesifik bağışıklığı modüle ettiği sonucuna varmıştır. Ayrıca uzun süreli epikutan uygulamadan sonra ne lokal irritasyon ne de alerjik reaksiyon gözlemlenmediği belirtilmiştir (296).

Bu çalışmada çeşitli yönleriyle araştırılan *Picea orientalis* reçinesinin halk tıbbında kullanımı incelendiğinde; sakız olarak çiğnenmesi ile ağız sağlığında, kaynatılarak yutulması ile mide rahatsızlıklarında ve iltihaplı yaraların üzerine sürülmesi ile iyileşme sürecinde kullanıldığı yapılan araştırmalar ile tescillenmiştir (257). Simbirsev ve ark.

yaptıkları bu çalışma ile allerjik reaksiyon tespit etmemekte (296) ve bu yönüyle halk tıbbında görülen bu kullanımı desteklemektedir.

Test Yönteminin Değerlendirilmesi

Bu çalışmada Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı'ndan 2020-339 protokol numarası ile etik kurul onayı alındıktan sonra hayvansal diş örnekleri ile kıyaslandığında bağlantı karakteristiği, ısı iletkenliği, elastisite modülü ve dayanım gibi fiziksel özellikleri ile klinik koşullara daha uygun görülen son 6 ay içerisinde çekimi gerçekleştirilmiş çürüksüz, gömülü insan yirmi yaş dişleri kullanılmıştır (297). Sanches ve ark. tarafından yapılan incelemede sığır dişlerinin belirli deneylerde uygulanabilirliğine rağmen, sahip olduğu daha büyük ortalama tübül çapı, daha düşük tübül yoğunluğu ve daha küçük ortalama apatit kristalit yarıçapı nedeniyle mikromorfolojik araştırmalar için tavsiye edilmemektedir (298). Bu nedenle bu çalışmada insan dişleri kullanılmıştır.

Diş örneklerinin saklanma koşulları, uygulanan dezenfeksiyon ve sterilizasyon yöntemleri ve saklama süresi çekilen dişlerin mekanik ve kimyasal özellikleri ile beraber in vitro araştırmaların sonucunu da etkilemektedir. Antibakteriyel özelliklerinden dolayı timol, adezyon çalışmalarında saklama solüsyonu olarak sıklıkla tercih edilmektedir (299, 300). Timolün çeşitli konsantrasyonları (%0.02'den %0.1'e kadar) ve süreleri (24 saatten 6 aya kadar) farklı çalışmalarda kullanılmıştır (299–302). Seçilmiş ve ark ile Humel ve ark. yaptıkları çalışmalarda dişlerin 6 ay timol içerisinde saklanması dentin-kompozit makaslama bağlanma dayanımı üzerinde önemli bir etki yaratmadığını gözlemlemiştir (302, 303). Benzer şekilde Haller ve ark. ile Ziskind ve ark. yaptıkları çalışmalarda timol solüsyonunun mine geçirgenliği, bağlanma gücü ve mikrosızıntı gibi önemli parametreler üzerinde etkisi olmadığını belirtmişlerdir (304, 305). Buna dayanılarak çalışmamızda kullanılacak dişler, dezenfeksiyon amacıyla öncelikle (1 hafta süreyle) %0,1 konsantrasyondaki timol solüsyonu içerisinde, daha sonra da distile su içerisinde muhafaza edilmiştir.

Bağlanma gücünde zamanla meydana gelen değişiklikler, depolama solüsyonunun dentin tübülleri ve mineral içeriği üzerindeki etkisinden kaynaklanabilmektedir. Solderholm ve ark. tarafından yapılan literatür çalışmasında, adeziv sistemlerin laboratuvar çalışmalarında maksimum 6 ay süreyle çekilmiş diş örneklerinin kullanılmasının daha iyi olduğu sonucuna varmıştır (306). Altı aydan fazla saklanan çekilmiş dişlerin dentin

proteinlerinde dejeneratif değişikliklere maruz kalması beklenebilmektedir (201). Rueggeberg ve ark. dişlerin 24 saat, 3 ay ve 5 yıl kadar süre ile %0.05 timol ve distile suda bekletilme sonrası mineye bağlanma dayanımları arasında fark olmadığını belirtmişlerdir (307). Bu verilere dayanılarak 6 aylık çalışma süresi bu çalışma için uygun bulunmuştur.

Dental adezyon etkinliğinin tespitinde, uzun süreli klinik takiplerin zaman alıcı ve standardizasyonunun zor olması nedeniyle in vitro bağlanma dayanım testleri sıklıkla kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden biri olan ve sıklıkla kullanılan makaslama bağlanma dayanım testi bu çalışmada da olduğu gibi 3 mm çapında geniş bağlanma yüzeyleri olan örnekler için idealdir (308, 309). Ayrıca minimal teçhizat gerektirmesi, örnek hazırlama kolaylığı sağlaması ve güvenilir sonuçlar elde edilmesi nedeniyle bu çalışmada bağlanma dayanım değerlerinin ölçümünde kullanılmıştır (310).

Dental adezyon, sadece kullanılan kavite dezenfektanından değil aynı zamanda dental substrattan da etkilenmektedir. Bu etkiyi en aza indirmek için sağlıklı dişlerin yüzeyel dentininde adezyon testlerinin yapılması ideal olarak görülmektedir (311). Bunun sebebi derin dentinin esas olarak dentin tübüllerinden ve az miktarda intertübüler dentinden oluşmasının aksine yüzeyel dentinin daha yüksek oranda organik bileşenlere (kolajen), intertübüler dentine ve daha az sayıda dentinal tübüllere sahip olmasıdır (312). Bu nedenle bu çalışmada makaslama bağlanma dayanımı testlerinde kullanılmak üzere ISO/TS 11405:2003 standartlarına (313) uyularak deneye uygun bulunan dişlerin hassas kesme cihazında mine dokusu kaldırılıp yüzeyel dentin dokusu elde edilmiştir.

Sağlıklı ve çürükten etkilenmiş dentin arasındaki farkların da adezyon konusunda önem arz etmektedir. Çürükten etkilenen dentin, kısmi demineralizasyonu nedeniyle daha gözenekli ve daha yumuşaktır. Bu nedenle daha az etkili bir adezyon görülmektedir (314, 315). Bu çalışmada da bahsedilen sebepten ötürü çürük dentin yapısı bulunmayan dişler kullanılmıştır. Buna ilaveten çoğu literatür yazarının, ISO/TS 11405/201545'in önerileriyle uyumlu olarak azı dişleri üzerinde adezyon testleri yapması sebebiyle bu çalışmada da azı dişleri kullanılmıştır.

Literatüre bakıldığında farklı kalınlıktaki smear tabakalarının bağlanma değerleri üzerinde negatif etkisi bulunmazken, kalın bir smear tabakasının ara yüzde aralık meydana gelme olasılığını arttırdığı görülmektedir (309). Bu çalışmada bahsedilen sonuçlara uygun olacak şekilde 600 grit zımpara ile yüzeylerde standart smear tabakası elde edilmiştir.

Makaslama Bağlanma Dayanım Test Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Kavite dezenfektanı olarak kullanılan bir ajan, güçlü bir antimikrobiyal etki sağlamasının yanı sıra, restoratif materyalin dental substratlara adezyonunu da olumsuz yönde etkilememelidir (316). Bu sebeple bu çalışmada ideal bir kavite dezenfektanı olarak kabul gören klorheksidin ile, bir kavite dezenfektan adayı olan *Picea orientalis* reçine özütünün kısa ve uzun dönemdeki bağlanma dayanımı araştırılmıştır. Bu çalışmada seçtiğimiz Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) ise kavite dezenfektanı uygulanmadan kullanılarak kontrol grubunu temsil etmekte ve kısa ve uzun dönemdeki bağlanma dayanımı kavite dezenfektanı uygulanan gruplarla karşılaştırılmaktadır.

Bağlanma değerlerinin tespit edilmesini sağlayacak makaslama testi öncesinde örneklerin maruz bırakıldığı bekleme koşulları, deney sonuçlarını etkileyebilecek bir parametredir. Bu çalışmada örneklerin yarısının başlangıç bağlanma değerleri araştırılacağı için kompozit rezinlerin polimerizasyonunu takiben 24 saat 37 °C'lik etüvde bekletildikten sonra makaslama bağlanma testi uygulanmıştır (311).

Oral ortam koşullarını taklit etmek amacıyla adeziv sistem ile dentin substratı arasındaki etkileşimin değerlendirildiği termal siklus ile yaşlandırma testleri sıklıkla laboratuvar çalışmalarına dahil edilmektedir. Bu sayede hibrit tabakanın kimyasal bozunmasında bir artışla birlikte büzülme ve genleşme gerilimleri teşvik edilmektedir. Resin ve dentin arasındaki lineer termal genleşme katsayılarındaki farklılıklar, marjinal sızdırmazlığı ve bağlanma kuvvetini azaltmakta, diş ile restorasyon arayüzünde marjinal boşlukların varlığını ise arttırmaktadır (317). Bu çalışmada da klorheksidin ve *Picea orientalis* reçine solüsyonları ile yapılacak dentin tedavisinin bağlanma dayanımı, termal siklus ile yaşlandırılmasının etkisi ile uzun vadede değerlendirilmektedir. Bu çalışmada dental literatürde (208) belirtildiği üzere, örneklerin diğer yarısı 6 aylık bir yaşlandırma süresine karşılık gelen ve bağlanma dayanımında anlamlı bir düşüş yaratabilen 5000 döngüye maruz bırakılmıştır.

Restorasyonun klinik başarısı kompozit ve diş dokuları arasındaki adezyondan sorumlu dentin bonding ajanlarının sağlayacağı hibridizasyonunun kalitesine ve sürekliliğine bağlıdır. Dentin bondinglerin uygulandığı dokunun özellikleri, dentinde yapılan farklı yüzey hazırlama yöntemleri, bondinglerin uygulanma prosedüründeki farklılıklar hibrit tabakanın klinik performansını belirleyen başlıca etmenlerdir (318).

Kavite dezenfektanlarının asitleme öncesi veya sonrasında kullanılması ile bağlanma dayanımında oluşacak etki değişebilmektedir. Dentin yüzeyine kavite dezenfektanlarının asitten önce uygulanması durumunda yüzeyin pürüzlendirme prosedürüne karşı dirençli hale getirilmesi etch&rinse tedavisinin etkisini azaltabilmektedir (293). Bu nedenle, etch&rinse uygulamasında klorheksidin başta olmak üzere kavite dezenfektan ajanlarının asit uygulaması sonrasında, self-etch yönteminde ise öncesinde uygulanması önerilmektedir. Bu çalışmada da kavite dezenfektan uygulaması asitleme işleminden sonra ve self-etch yönteminden önce uygulanmıştır.

Araştırmaların çoğunda klorheksidin uygulama süresi 60 saniye olarak kullanılmakta ve bu süre 15 ile 120 saniye arasında değişmektedir (319). Loguercio ve ark. iki uygulama süresini (15 ve 60 saniye) değerlendirerek, 15 saniye uygulamayla bile klorheksidinde yaşlandırmanın ardından oluşabilecek dentin arayüz degradasyonunun yavaşlatılabildiğini göstermiştir (320). Bu çalışmada da genel kabul görmüş 60 saniye uygulama süresi tercih edilmiştir.

Bu çalışmada kullanılan universal adeziv sistem olan Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) MDP fosfat monomeri, dimetakrilat reçineleri, HEMA, Vitrebond kopolimeri, dolgu maddesi, etanol, su, başlatıcılar ve silandan oluşmaktadır. Sahip olduğu 2.7 pH değeri ile zayıf asidik adezivler grubundadır. Universal bir adeziv sistem olması dolayısıyla hem etch&rinse hem de self etch modlarında kullanılabilir (321). Bu çalışmada da aynı adeziv sistemin her iki modda da kullanılabilmesi özelliğinden faydalanılarak, bağlanma dayanımını etkileyebilecek kimyasal içeriğe dayalı faktörler elemine edilmiş ve sadece yüzey hazırlama yöntemleri kıyaslanabilmektedir.

Etch&rinse modunda, smear tabakası asit ile kaldırılarak dentin tübülleri açılmakta ve monomerin dentin tübülleri ve kollajen liflerine nüfuz etmesi için yeterli alan yaratılarak ideal adezyon sağlanmaktadır (322). Self-etch modunda ise var olan asidik monomer, smear tabakasını tamamen kaldıramayarak dentini demineralize etmekte ve daha kısa rezin tag ile daha ince bir hibrit tabaka oluşturmaktadır (323). Bu çalışmada yaşlandırma öncesi ve sonrasında kontrol grubu etch&rinse değerleri, self etch değerlerinden anlamlı şekilde yüksek bulunmuştur. Bu durumun kullanılan adeziv sistemin zayıf asidik yapısı nedeniyle self etch yönteminde yeterli yüzey pürüzlendirme etkisini yaratamaması ile ilgili olabileceği düşünülmektedir.

Barutçugil ve ark. yaptıkları çalışmada Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) adezivini hem etch&rinse, hem de self etch yöntemiyle kullanarak bağlanma dayanımını test etmiş ve fosforik asit uygulamasının bağlanma değerlerini arttırdığı sonucuna ulaşmıştır (324). Aynı çalışmayı yapan Dönmez ve ark. termal siklus ile yaşlandırmayı da incelemelerine eklemiş ve en yüksek bağlanma dayanım değerini yaşlandırma uygulanmayan etch&rinse grubunda elde ederek çalışmamız ile aynı sonuca ulaşmıştır (325).

Bu çalışmada kavite dezenfektan adaylarının dentin bağlanma dayanım değerlerinde yaşlandırma sonrasında fark olmadığına dair kurulan hipotez reddedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bağlanma dayanım değerleri test edilen her deney grubunda yaşlandırma işlemi sonrasında istatistiksel olarak daha düşük bulunmuştur ($p<0.05$).

Etch&rinse ve self etch adeziv sistemlerinde fosforik asit veya asidik primer pürüzlendirmesinden sonra açığa çıkan kollajen ağı, dentininde bulunan endojen metaloproteinazlar (MMP'ler) tarafından da bozulmaya karşı savunmasızdır (326). Kollajen matrisin bu enzimatik bozunması, adeziv arayüz başarısızlığında önemli bir rol oynamaktadır (113). Proteinazları (MMP inhibitörleri) inhibe etmede en çok kullanılan ajan klorheksidindir. Bu etkiye dayanılarak klorheksidinin kompozit ve dentin arayüzünü 6 aydan fazla koruyabildiği düşünülse de (111, 282) adeziv arayüzünü uzun süre korumadaki etkisi hala çelişkili kabul edilmektedir.

Asitle pürüzlendirme sonrasında dentinde daha fazla tetiklenen endojen metaloproteinazlar aktivitesinin, MMP inhibitör uygulaması ile önüne geçilerek restorasyon bütünlüğü ve stabilitesinin zaman içinde iyileştirilmesine neden olacağına yönelik çalışmalar bulunmaktadır (320, 327). Buna dayanılarak bu çalışmada yaşlandırma sonrasında etch&rinse yönteminde kontrol grubunun bahsedilen MMP inhibisyon etkisinden faydalanamayarak, klorheksidine göre daha fazla oranda düşen bağlanma değerleri göstermesi beklenebilmektedir.

Hibrit tabakanın bozulmasını etkileyen birkaç faktör vardır ve dentin ile rezin arasındaki bağlanma kuvveti değerlerinin azalmasına katkıda bulunmuş olabilir. Bu faktörlerden ilki Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) adeziv sisteminin kimyasal özellikleri ile ilgilidir. Kimyasal bileşiminde %20'ye kadar su içermesi nedeniyle oldukça hidrofiliktir ve yarı geçirgen bir zar gibi davranabilmektedir (328). Bu nedenle adeziv bağlanma gücünü azaltan su ağaçlarının ve poli-HEMA hidrojellerinin oluşumunu teşvik

ederek bağlanma gücünü tehlikeye atabilmektedir (328–330). Bu hidrofilik yapı adeziv sistemi su emilimine karşı oldukça hassas hale getirmekte, bu da polimer bozulmasına ve zamanla dentin bağlanma gücünün azalmasına neden olabilmektedir (331). Bu çalışmada self etch yönteminde yaşlandırma öncesinde bağlanma dayanım değerleri istatistiksel olarak aynı iken, yaşlandırma sonrasında klorheksidine göre daha küçük değerler elde edilerek daha fazla oranda düşüş göstermiştir. Bunun sebebinin Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) adeziv sisteminin bahsedilen bu kimyasal özelliklerine ilaveten MMP inhibisyon etkisinden de faydalanılamaması kaynaklı olabileceği düşünülmektedir.

Restorasyona yaşlandırma prosedürünün uygulandığı kavite dezenfektan çalışmalarında, araştırmacılar zamanla bağlanma dayanımında azalma bulmuşlardır. Buna ilaveten, klorheksidin grubunun, kontrol grubuna göre daha küçük bir azalma gösterdiği çeşitli literatürlerde belirtilmektedir (327, 332, 333). Campos ve ark., %2’lik klorheksidinin, etch&rinse ve self etch yöntemleriyle uygulanmasında zamanla bağlanma dayanım değerlerinde görülebilecek kaybı azaltabileceğini belirtmiştir (332). Syntac ve ark. tarafından yapılan çalışmada %2’lik klorheksidin uygulamasının ileriki dönemlerde adeziv bağlanma dayanımının kalıcı olacağını savunan görüşün aksine ters bir etki belirterek yaşlandırma sonrasında klorheksidinde görülen bağlanma değerlerindeki azalmayı desteklemektedir. Bu çalışmalara ilaveten 2 yılı aşkın takip süresine sahip klinik araştırmalar, potansiyel bir MMP inhibitörü olarak klorheksidin kullanılmasının adeziv arayüz bozulmasını azaltma yönünde fayda sağlayamadığını bildirerek birçok in vitro ve in situ çalışmanın bulgularıyla çelişmektedir (334, 335). Bahsedilen çalışmalar ile aynı doğrultuda olan bu çalışmada da etch&rinse ve self etch metodunda bağlanma dayanım değerlerinde düşüş görülmüş fakat kontrol grubuna kıyasla klorheksidinin bağlanma dayanım değerlerinde daha az oranda bir düşüş tespit edilmiştir.

Bu çalışmada klorheksidinin, yaşlandırma işlemi öncesinde ve sonrasında etch&rinse ve self etch uygulama metodları kıyaslandığında istatistiksel olarak aynı bağlanma değerlerine ulaşılmıştır. Bu çalışmada kullanılan Single Bond Universal (3M ESPE, Almanya) universal bir adeziv sistem olması ve her iki uygulama yönteminde de başarılı bir bağlanma vadedmesi dolayısıyla her iki uygulama modunda da farklı bağlanma değerlerine ulaşılmama sonucunu desteklemektedir. Elde edilen bu sonuç klorheksidin bağlanma değerlerinin adeziv uygulama modlarının (self etch/ total etch) etkisiyle değişmediğini gösteren çalışmalar ile desteklenmektedir (259, 336).

Klorheksidinin adeziv arayüzünü korumadaki rolü MMP inhibisyon özelliğine dayandırılmaktadır. Klorheksidine alternatif bir kavite dezenfektanı aradığımız bu çalışmada, *Picea orientalis* reçine özütlerinde yapılan kimyasal analizde baskın olan fenolik bileşik kafeik asit olarak bulunmuştur. Propolis gibi reçine kaynaklı veya bu konuyla ilgili araştırılan doğal alternatiflerde MMP inhibisyon özelliği aranmaktadır. Bu inhibitör etkinin MMP'lerin genetik ekspresyonunu, üretimini ve aktivitesini inhibe edebilen ve MMP katalitik bölgesini bloke edebilen kafeik asit ve türevlerinin varlığından kaynaklandığı rapor edilmiştir. Bu bilgiye dayanılarak *Picea orientalis* reçine özütünün kafeik asit içeriğinin sağladığı bu faydanın klorheksidinle aynı bağlanma değerlerini elde etme konusunda katkı sağladığı düşünülmektedir.

Picea orientalis reçinesinden özüt elde etme aşamasında etanol kullanılmıştır. Reçine örneğinde bulunan yağda çözünebilen fitokimyasal bileşenler, alkole daha kolay ekstrakte edilir, maddelerin daha fazla emilmesini sağlar ve bu sayede daha yüksek bir reçine konsantrasyonu elde edilir. Ancak etanol MMP-9 aktivitesini inhibe edebilmektedir. Bu durum konsantrasyona bağlıdır (337). Etanol, katalitik çinko alanı ile alkolün hidroksil grubunun oksijen atomu arasında bir koordinat bağı oluşturabilmekte ve katalitik bölgelerden suyu uzaklaştırarak MMP-9 aktivitesini inhibe edebilmektedir (338). Bu bilgilerden yola çıkarak bu çalışmada hazırlanan *Picea orientalis* reçine özütünün, etanolik çözücüsü sayesinde MMP inhibisyon etkisini elde ederek klorheksidinle aynı bağlanma değerlerine ulaşabildiği düşünülmektedir.

Chen ve ark. yaptıkları çalışmada, reçine benzeri bir materyal olan propolisten elde edilen etanolik ekstraktın, dentin yüzeyinde ve dentin tübüllerinde içeriğe bağlı olarak reçinelerin ve mumların birikmesine yol açtığını göstermiştir. Bu birikim dentin tübüllerinin girişi bloke edilebilmekte ve dentin yüzeyini kaplayarak hibrit tabakanın ve rezin taglerin düzgün oluşumuna müdahale edebilmektedir (339). Bu çalışmada da reçine türevli bir örneğin test edilmesi sebebiyle aynı durumun meydana gelmesi ve bu sebeple bağlanma dayanımının negatif yönde etkilenmesi beklenebilmektedir. Fakat bu çalışmada özütün elde edilmesinin ardından 5 defa 5 ml hekzan ile sıvı-sıvı ekstraksiyona tabi tutulması ile, etanolik ekstrakt içinde bulunan reçine ve mumlardan arındırma işlemi yapılmıştır. Bu sebeple bu etki elemine edilerek *Picea orientalis* reçine özütü bağlanma dayanımında negatif bir etki tespit edilmemiştir.

Bu çalışmada her deney grubunda en fazla görülen kırılma %53.3 ile %46.7 arasında değişen oranları ile karışık tiptedir. Toledano ve ark. düşük bağlanma dayanımının yüksek adeziv başarısızlıkla ilişkili olduğunu rapor etmiştir (340). Buna karşılık karışık ve koheziv kırılma, adeziv kırılma ile karşılaştırıldığında klinik açıdan daha kabul edilebilir görülmektedir (340, 341). Buna ilaveten Hashimoto ve ark. bu konuyla ilgili yaptıkları çalışmada örneklerin %93,5'inin, yaşlandırmanın ardından kontrol ve klorheksidin grupları arasında karışık başarısızlık tipini gösterdiğini belirtmektedir (342).

Bu çalışmanın limitasyonları; az sayıda fenolik asit standardının kullanılması, kromatogram analizinde görülen yüksek pik değerlerinin tespit edilmemesi, hazırlanan reçine solüsyonunda farklı konsantrasyon ve çözücüler ile değişebilecek analiz ve antimikrobiyal deney sonuçları, bağlanma dayanım testinde tek çeşit adeziv sistemin kullanılması olarak sıralanmaktadır.

Picea orientalis reçine özütü ile ilgili olarak yapılan analiz sonuçlarına göre fazla oranda tespit edilen kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asit standart solüsyonları antimikrobiyal aktivite testinde tabi tutulmuştur. Bu özütlerde var olabilecek farklı fenolik asit ve flavonoid bileşiklerinin standartlarının kullanılması ile bu çalışmaya eklenebilecek farklı antimikrobiyal aktivite sonuçlarının olması mümkündür.

Picea orientalis reçine özütünden elde edilen kromatogram grafiğinde görülen yüksek pik değerleri, farklı reçine özütlerini inceleyen çalışmaların kromatogramları ile kıyaslandığında bu materyal içerisinde bulunabilecek lignan ve terpen içeriği açığa çıkmıştır. Reçine içeriğindeki bu bileşiklerin de araştırılması ile yüksek pik değerlerini gösteren bileşikler ileri çalışmalar ile tanımlanabilecektir.

Bu çalışmada *Picea orientalis* reçine özütü %70 etanol içeren bir çözelti olarak hazırlanmıştır. Bitkisel kaynakların antimikrobiyal etkinlikleri ve analizlerini içeren çalışmalarda çeşitli konsantrasyonlarda ve farklı çözücülerde değişen sonuçlar elde edilebildiğine dair çalışmalar bulunmaktadır.

Bu çalışmada tek bir universal adeziv ile farklı yüzey hazırlama yöntemleri test edilse de, kimyasal içerik ve kullanım metoduna göre her adeziv ajanın değişen değerlerde bağlanma dayanımı yaratabildiği bilinmektedir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmanın sonuçlarına göre:

1. Karadeniz Bölgesi'nde seçtiğimiz 3 farklı *Picea orientalis* reçine özütü kimyasal metodlarla analiz edildi ve bunun sonucunda içeriğinde fazla miktarda kafeik asit, ferulik asit ve t-sinamik asit gibi fenolik bileşiklerin bulunduğu görüldü
2. *Picea orientalis* reçine özütlerinde yapılan kimyasal analiz sonuçlarına göre, özütlerin sahip olduğu yüksek antioksidan kapasite tespit edildi.
3. Hazırlanan *Picea orientalis* reçine özütlerinde seçilen oral mikroorganizmalar üzerinde yapılan antimikrobiyal aktivite testi sonucunda *S. aureus* üzerinde yüksek antimikrobiyal aktivite elde edildi.
4. *Picea orientalis* reçine özütlerinde yüksek oranda bulunan kafeik asit, mantar türleri haricinde test edilen tüm bakteriyel suşlarda antimikrobiyal aktivite gösterdi.
5. *Picea orientalis* reçine özütleri ile kavite dezenfektanları arasında altın standart kabul edilen klorheksidinin bağlanma dayanım değerleri kıyaslandığında, aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

KAYNAKLAR

1. Marsh PD (2009). Dental plaque as a biofilm: the significance of pH in health and caries. *Compendium of continuing education in dentistry* 30: 76–8.
2. Keyes PH (1968). Research in dental caries. *Journal of the American Dental Association* 76: 1357–1373.
3. Boushell LW, Sturdevant JR, Boushell LW, Walter R, Donovan TE, Sulaiman TA, Stefan GM, Bayne SC, Thompson JY, Smith GE (2019). *Sturdevant's Art And Science Of Operative Dentistry*, Seventh Ed Elsevier Inc.
4. Per A (2000). *Diagnosis And Risk Prediction Of Dental Caries* Chicago: Quintessence Publishing Co.
5. Hara AT, Zero DT (2010). The Caries Environment: Saliva, Pellicle, Diet, and Hard Tissue Ultrastructure. *Dental Clinics of North America* 54: 455–467.
6. Zero DT (1999). Dental Caries Process. *Dental Clinics of North America* 43: 635–664.
7. Mese H, Matsuo R (2007). Salivary secretion, taste and hyposalivation. *Journal of Oral Rehabilitation* 34: 711–723.
8. Dawes C (2008). Salivary flow patterns and the health of hard and soft oral tissues. *Journal of the American Dental Association* 139: 18S-24S.
9. Fejerskov O, Edwina K (2003). *Dental caries: the disease and its clinical management* Copenhagen,Denmark: Blackwell Monksgaard.
10. Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CYS (2016). Salivary biomarkers for dental caries. *Periodontology 2000* 70: 128–141.
11. Renke W (2016). Saliva and dental caries. *Dental Caries: Principles and Management* 59–69.
12. Koray F. Diş çürükleri, Altın matbaacılık, İstanbul.1981;67-96.
13. Bayırlı G, Şirin Ş. Restoratif Tedavi.Taş matbaası, İstanbul.1985;96-120
14. Yadav K, Prakash S (2017). Dental Caries: A Microbiological Approach. *Journal of Clinical Infectious Diseases & Practice* 02: 1–15.

15. Samaranayake, Lakshman. (2006). *Essential Microbiology For Dentistry* (Third Edition). London: Churchill Livingstone.
16. Lamont RJ, Koo H, Hajishengallis G. The oral microbiota: dynamic communities and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*.
17. Cengiz T, Mısırlıgil A, Aydın M. Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji. Güneş yayınevi, 2005, Ankara
18. Kolenbrander PE, Palmer RJ, Periasamy S, Jakubovics NS (2010). Oral multispecies biofilm development and the key role of cell–cell distance. *Nature Reviews Microbiology* 8:7 8: 471–480.
19. Bowen WH, Burne RA, Wu H, Koo H (2018). Oral Biofilms: Pathogens, Matrix and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. *Trends in microbiology* 26: 229.
20. Xuedong, Z. (Ed.). (2015). *Dental Caries: Principles and Management*. Springer.
21. Kaplan A, Kaplan CW, He X, McHardy I, Shi W, Lux R (2014). Characterization of aid1, a Novel Gene Involved in *Fusobacterium nucleatum* Interspecies Interactions. *Microbial Ecology* 68: 379–387.
22. Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, Nakata M, Kreikemeyer B (2018). Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease - Connection of periodontitis and rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. *Frontiers in Microbiology* 9: 1–14.
23. Takeshita T, Yasui M, Shibata Y, Furuta M, Saeki Y, Eshima N, Yamashita Y (2015). Dental plaque development on a hydroxyapatite disk in young adults observed by using a barcoded pyrosequencing approach. *Scientific Reports* 5: 1–9.
24. Zijnga V, Van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJM (2010). Oral biofilm architecture on natural teeth. *Plos One* 5: 1–9.
25. Yadav K (2015). Antibiofilm profiles against polymicrobial pathogens among dental caries patients at Janaki Medical College teaching hospital, Nepal. *International Journal of Applied Dental Sciences* 1: 156–162.
26. Erganiş O, Öztürk A. *Oral Mikrobiyoloji & İmmünoloji*. Nobel Matbaacılık. 2003; 91-109.

27. Bishop CJ, Aanensen DM, Jordan GE, Kilian M, Hanage WP, Spratt BG (2009). Assigning strains to bacterial species via the internet. *BMC Biology* 7: 1–20.
28. Marsh, P. D., Lewis, M. A., Rogers, H., Williams, D. W., & Wilson, M. (2016). *Marsh and Martin's Oral Microbiology-E-Book*. Elsevier Health Sciences.
29. Whiley, R. A., & Beighton, D. (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral microbiology and immunology*, 13(4), 195–216
30. Samaranayake L (2018). *Essential Microbiology For Dentistry*, 4th ed. (Elsevier Health Sciences).
31. Whiley RA, Beighton D (1998). Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiology and Immunology* 13: 195–216.
32. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ (2008). Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of Clinical Microbiology* 46: 1407–1417.
33. Arciola CR, Baldassarri L, Campoccia D, Creti R, Pirini V, Huebner J, Montanaro L (2008). Strong biofilm production, antibiotic multi-resistance and high gelE expression in epidemic clones of *Enterococcus faecalis* from orthopaedic implant infections. *Biomaterials* 29: 580–586.
34. Estrela CR de A, Pimenta FC, de Alencar AHG, Ruiz LFN, Estrela C (2010). Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Applied Oral Science* 18: 426.
35. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiology and Immunology* 19: 95–101.
36. Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A (2005). Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Archives of Oral Biology* 50: 575–583.
37. Sami A, Elimairi I, Stanton C, Ross RP, Ryan CA (2020). The Role of the Microbiome in Oral Squamous Cell Carcinoma with Insight into the Microbiome–Treatment Axis. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol 21, Page 8061 21: 8061.

38. Aydın M MA (2012). *Ağız Mikrobiyolojisi* İstanbul: MN medikal Nobel Kitapevi.
39. Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, Flannagan SE (2008). Antibiotic Resistance Gene Transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in Root Canals of Teeth Ex Vivo. *Journal of Endodontics* 34: 570–574.
40. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J (n.d.). *The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity*.
41. Rams TE, Feik D, Slots J (1990). Staphylococci in human periodontal diseases. *Oral Microbiology and Immunology* 5: 29–32.
42. Kluytmans JAJW, Wertheim HFL (2005). Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* and Prevention of Nosocomial Infections. *Infection* 33: 3–8.
43. Ammerlaan HSM, Kluytmans JAJW, Wertheim HFL, Nouwen JL, Bonten MJM (2009). Eradication of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Carriage: A Systematic Review. *Clinical Infectious Diseases* 48: 922–930.
44. Knighton HT (1965). Coagulase-positive Staphylococci in Oral and Nasal Areas of Dental Students: A Four-Year Study. *Journal of Dental Research* 44: 467–470.
45. Owen MK (1994). Prevalence of oral methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in an institutionalized veterans population. *Special Care in Dentistry* 14: 75–79.
46. Nilsson P, Ripa T (2006). *Staphylococcus aureus* throat colonization is more frequent than colonization in the anterior nares. *Journal of Clinical Microbiology* 44: 3334–3339.
47. Garrouste-Orgeas M, Chevret S, Arlet C, Marie O, Rouveau M, Popoff N, Schlemmer B (2012). Oropharyngeal or Gastric Colonization and Nosocomial Pneumonia in Adult Intensive Care Unit Patients.
48. MacFarlane TW, Helnarska SJ (1976). The microbiology of angular cheilitis. 140: 403–406.
49. Topazian RG, Goldberg MH (1981). Management of infections of the oral and maxillofacial regions 465.

50. Bagg J, Sweeney MP, Harvey Wood K, Wiggins A (1995). Possible Role of *Staphylococcus aureus* in Severe Oral Mucositis among Elderly Dehydrated Patients. *Microbial Ecology In Health And Disease* 8: 1–56.
51. Rokadiya S, Malden NJ (2008). An implant periapical lesion leading to acute osteomyelitis with isolation of *Staphylococcus aureus*. *British Dental Journal* 208 205:9 205: 489–491.
52. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J (2003). *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *British Dental Journal* 203 195:12 195: 701–703.
53. Jackson MS, Bagg J, Gupta MN, Sturrock RD (1999). Oral carriage of staphylococci in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 38: 572–575.
54. Ridder-Schaphorn S, Ratjen F, Dübbers A, Häberle J, Falk S, Küster P, Schuster A, Mellies U, Löwe B, Reintjes R, *et al.* (2007). Nasal *Staphylococcus aureus* Carriage Is Not a Risk Factor for Lower-Airway Infection in Young Cystic Fibrosis Patients. *Journal of Clinical Microbiology* 45: 2979.
55. Garcia R (2005). A review of the possible role of oral and dental colonization on the occurrence of health care-associated pneumonia: Underappreciated risk and a call for interventions. *American Journal of Infection Control* 33: 527–541.
56. Didilescu AC, Skaug N, Marica C, Didilescu C (2005). Respiratory pathogens in dental plaque of hospitalized patients with chronic lung diseases. *Clinical Oral Investigations* 9: 141–147.
57. Fayaz M, Sivakumaar PK, Joe MM (2014). Prevalence and antibiotic susceptibility pattern of dental biofilm forming bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3: 46–50.
58. Brady RA, Leid JG, Calhoun JH, Costerton JW, Shirtliff ME (2008). Osteomyelitis and the role of biofilms in chronic infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 52: 13–22.
59. Luong TT, Lei MG, Lee CY (2009). *Staphylococcus aureus* Rbf activates biofilm formation in vitro and promotes virulence in a murine foreign body infection model. *Infection and Immunity* 77: 335–340.

60. Murphy TF, Brauer AL, Eschberger K, Lobbins P, Grove L, Cai X, Sethi S (2012). *Pseudomonas aeruginosa* in Chronic Obstructive Pulmonary Disease.
61. Scannapieco FA (1999). Role of Oral Bacteria in Respiratory Infection. *Journal of Periodontology* 70: 793–802.
62. Wu X, Al Farraj DA, Rajaselvam J, Alkufeidy RM, Vijayaraghavan P, Alkubaisi NA, Agastian P, Alshammari MK (2020). Characterization of biofilm formed by multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* DC-17 isolated from dental caries. *Saudi Journal of Biological Sciences* 27: 2955–2960.
63. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria.
64. Klink T, Kneist S, De Soet JJ, Kuhlisch E, Mauersberger S, Förster A, Klimm W (2009). Acid production by oral strains of *Candida albicans* and *Lactobacilli*. *Caries Research* 43: 83–91.
65. Nikawa H, Yamashiro H, Makihira S, Nishimura M, Egusa H, Furukawa M, Setijanto D, Hamada T (2003). In vitro cariogenic potential of *Candida albicans*. *Mycoses* 46: 471–478.
66. Hilton TJ, Ferracane JL, Broome JC (n.d.). Summitt's fundamentals of operative dentistry : a contemporary approach 600.
67. Robinson C, Shore RC, Brookes SJ, Strafford S, Wood SR, Kirkham J (n.d.). *The Chemistry Of Enamel Caries*.
68. Featherstone J (2008). Dental caries: a dynamic disease process. *Australian Dental Journal* 53: 286–291.
69. Edwina K, Fejerskov O (2016). *Essentials of Dental Caries*, 4th ed. Oxford University Press.
70. Silverstone LM, Johnson NM, Hardie JM, Williams RAD (1981). *Dental caries : aetiology, pathology and prevention* London: Macmillan.
71. Sakaguchi RL, Ferracane JL, Powers JM (2018). *Craig's restorative dental materials*, Fourteenth. *Craig's Restorative Dental Materials* Elsevier Inc.

72. Veis A (1993). Mineral-matrix interactions in bone and dentin. *Journal of Bone and Mineral Research* 8: S493–S497.
73. Duke ES, Lindemuth J (1991). Variability of clinical dentin substrates. *American Journal of Dentistry* 4: 241–246.
74. Pashley DH (2012). Dentin: A Dynamic Substrate - A Review. *Scanning Microscopy* 3: 161–176.
75. Eick, J. D., Cobb, C. M., Chappell, R. P., Spencer, P., & Robinson, S. J. (1991). The dentinal surface: its influence on dentinal adhesion. (n.d.). .
76. Torney DL (1978). The retentive ability of acid-etched dentin. *Journal of Prosthetic Dentistry* 39: 169–172.
77. Pashley DH, Tay FR, Breschi L, Tjäderhane L, Carvalho RM, Carrilho M, Tezvergil-Mutluay A (2010). State of the art etch-and-rinse adhesives.
78. Buonocore MG (1955). A simple method of increasing the adhesion of acrylic filling materials to enamel surfaces. *Journal of Dental Research* 34: 849–853.
79. De Munck J, Van Landuyt K, Peumans M, Poitevin A, Lambrechts P, Braem M, Van Meerbeek B (2005). A critical review of the durability of adhesion to tooth tissue: Methods and results. *Journal of Dental Research* 84: 118–132.
80. Van Meerbeek, Bart, Vargas, M, Inoue, S, Yoshida, Y, Peumans, Marleen, Lambrechts, Paul, & Vanherle, Guido. (2001). Adhesives and cements to promote preservation dentistry. *Operative Dentistry*, 119-144. (n.d.). .
81. Fusayama T (1992). Total Etch Technique and Cavity Isolation. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 4: 105–109.
82. Mittal, K. L., & Etzler, F. M. (Eds.). (2017). *Adhesion in pharmaceutical, biomedical, and dental fields*. John Wiley & Sons.
83. Van Meerbeek, B., Perdigao, J., Gladys, S., Lambrechts, P., & Vanherle, G. (1996). Enamel and Dentin Adhesion. In R. Schwartz, J. B. Summit, & J. W. Robbins (Eds.), *Fundamentals of Operative Dentistry: A Contemporary Approach* (1 ed.). Quintessence Publish

84. Finger WJ, Balkenhol M (1999). Practitioner Variability Effects on Dentin Bonding with an Acetone-Based One-Bottle Adhesive. *J Adhesive Dent* 1: 311–314.
85. Nakabayashi N, Pashley DH (1998). Hybridization of dental hard tissues 129.
86. Lima, G., Ogliari, F. A., da Silva, E. O., Ely, C., Demarco, F. F., Carreño, N. L., Petzhold, C. L., & Piva, E. (2008). Influence of water concentration in an experimental self-etching primer on the bond strength to dentin. *The journal of adhesive dentist* .
87. Ferracane JL, Stansbury JW, Burke FJT (2011). Self-adhesive resin cements – chemistry, properties and clinical considerations. *Journal of Oral Rehabilitation* 38: 295–314.
88. Van Meerbeek B, Yoshihara K, Yoshida Y, Mine A, De Munck J, Van Landuyt KL (2011). State of the art of self-etch adhesives. *Dental Materials* 27: 17–28.
89. Muñoz MA, Sezinando A, Luque-Martinez I, Szesz AL, Reis A, Loguercio AD, Bombarda NH, Perdigão J (2014). Influence of a hydrophobic resin coating on the bonding efficacy of three universal adhesives. *Journal of Dentistry* 42: 595–602.
90. Perdigão J, Kose C, Mena-Serrano AP, De EA, Ly P, Reis TA, Loguercio AD, Perdigão J, Mena-Serrano AP, De Paula EA, *et al.* (2014). A New Universal Simplified Adhesive: 18-Month Clinical Evaluation. *Operative Dentistry* 39: 113–127.
91. Erickson RL, Barkmeier WW, Latta MA (2009). The role of etching in bonding to enamel: A comparison of self-etching and etch-and-rinse adhesive systems. *Dental Materials* 25: 1459–1467.
92. Da Rosa WLDO, Piva E, Da Silva AF (2015). Bond strength of universal adhesives: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dentistry* 43: 765–776.
93. Crone F. L. (1968). Deep dentinal caries from a microbiological point of view. *International dental journal* 18: 481–488.
94. Friedman M. M. (1979). The qualitative and quantitative bacterial content of stained dentin: an experimental study. *General dentistry* 27: 38–44.
95. Brännström M (1986). The cause of postrestorative sensitivity and its prevention. *Journal of Endodontics* 12: 475–481.

96. Gwinnett A. J. (1992). Effect of cavity disinfection on bond strength to dentin. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 4: 11–13.
97. Meiers, J. C., Kresin JC (1996). Cavity disinfectants and dentin bonding. *Operative Dentistry* 21: 153–159.
98. Tulunoglu, O., Ayhan, H., Olmez, A., & Bodur H (1998). The effect of cavity disinfectants on microleakage in dentin bonding systems. *The Journal of clinical pediatric dentistry* 22: 299–305.
99. Miller MB (1995). Cavity cleaners/disinfectants Reality 9: 21–26.
100. Gultz, J., Do, L., Boylan, R., Kaim, J., & Scherer W (1999). Antimicrobial activity of cavity disinfectants. *General dentistry* 47: 187–190.
101. Kaya D., A, Türkün M, Türkün L. Ş (2004). Kavite dezenfeksiyonunun restorasyon sonrası hassasiyet üzerine etkisi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 21: 181–186.
102. Baum L, Phillips RW LM (1995). *Textbook of Operative Dentistry*, 3 ed. Philadelphia: WB Saunders.
103. Matthijs S, Adriaens PA (2002). Chlorhexidine varnishes: a review. *Journal of Clinical Periodontology* 29: 1–8.
104. Miranda, C., Silva, G.V., Vieira, M.D., & Costa SX (2014). Influence of the chlorhexidine application on adhesive interface stability: literature review.
105. Türkün, M., Türkün, L.S., Ergücü, Z., & Ateş M (2006). Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants? *American Journal of Dentistry* 19: 166–170.
106. Kidd E. A. (1991). Role of chlorhexidine in the management of dental caries. *International dental journal* 41: 279–286.
107. Fardal O, Turnbull RS (1986). A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *The Journal of the American Dental Association* 112: 863–869.
108. Martin-De Las Heras S, Valenzuela A, Overall CM (2000). The matrix metalloproteinase gelatinase A in human dentine. *Archives of Oral Biology* 45: 757–765.

109. Frassetto A, Breschi L, Turco G, Marchesi G, Di Lenarda R, Tay FR, Pashley DH, Cadenaro M (2016). Mechanisms of degradation of the hybrid layer in adhesive dentistry and therapeutic agents to improve bond durability - A literature review. *Dental Materials* 32: e41–e53.
110. Liu Y, Tjäderhane L, Breschi L, Mazzoni A, Li N, Mao J, Pashley DH, Tay FR (2011). Limitations in bonding to dentin and experimental strategies to prevent bond degradation. *Journal of Dental Research* 90: 953–968.
111. Tjäderhane L, Nascimento FD, Breschi L, Mazzoni A, Tersariol ILS, Geraldeli S, Tezvergil-Mutluay A, Carrilho M, Carvalho RM, Tay FR, *et al.* (2013). Strategies to prevent hydrolytic degradation of the hybrid layer - A review. *Dental Materials* 29: 999–1011.
112. Hebling J, Pashley DH, Tjäderhane L, Tay FR (2005). Chlorhexidine arrests subclinical degradation of dentin hybrid layers in vivo. *Journal of Dental Research* 84: 741–746.
113. Carrilho MRO, Carvalho RM, De Goes MF, Di Hipólito V, Geraldeli S, Tay FR, Pashley DH, Tjäderhane L (2007). Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *Journal of Dental Research* 86: 90–94.
114. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D (1999). Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 6: 437–439.
115. Kim J, Uchiyama T, Carrilho M, Agee KA, Mazzoni A, Breschi L, Carvalho RM, Tjäderhane L, Looney S, Wimmer C, *et al.* (2010). Chlorhexidine binding to mineralized versus demineralized dentin powder. *Dent Mater* 26: 771–778.
116. Lacerda-Santos R, Sampaio GAM, de Moura MFL, de Carvalho FG, dos Santos A, Pithon MM, Alves PM (2016). Effect of different concentrations of chlorhexidine in glass-ionomer cements on in vivo biocompatibility. *Journal of Adhesive Dentistry* 18.
117. Gomes BPFA, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 34: 424–428.

118. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC (2000). Chemomechanical Reduction of the Bacterial Population in the Root Canal after Instrumentation and Irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% Sodium Hypochlorite. *Journal of Endodontics* 26: 331–334.
119. McDonnell G, Russell AD (1999). Antiseptics and disinfectants: Activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 147–179.
120. Saboia VPA, Silva FCFA, Nato F, Mazzoni A, Cadenaro M, Mazzotti G, Giannini M, Breschi L (2009). Analysis of differential artificial ageing of the adhesive interface produced by a two-step etch-and-rinse adhesive. *European Journal of Oral Sciences* 117: 618–624.
121. Berber VB, Gomes BPFA, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2006). Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International Endodontic Journal* 39: 10–17.
122. Block S (1991). *Disinfection, sterilization, and preservation*, 4th ed. (S. Block, editor) *Disinfection, sterilization, and preservation* Philadelphia: Lea & Febiger.
123. Özel E, Yurdagüven H, Say C, E KS (2005). Fosforik asit ve dezenfektan solüsyonların *Streptococcus mutans*'a karşı antibakteriyel etkisinin saptanması. *Hacettepe Dişhekimliği Fakültesi Dergisi* 29: 8–14.
124. Wessels S, Ingmer H (2013). Modes of action of three disinfectant active substances: A review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 67: 456–467.
125. Şengül SN, Örs SA, Küçükaya Eren S (2020). Effects Of Irrigant Activation And Surfactant Addition On Tissue-Dissolving Capacity Of Sodium Hypochloride. *Original Research Article Correspondence* 44: 50–56.
126. Iglesias JE, Pinheiro LS, Weibel DE, Montagner F, Grecca FS (2019). Influence of surfactants addition on the properties of calcium hypochlorite solutions. *Journal of Applied Oral Science* 27: 1–9.
127. Güneş Ş, Bahsi E, İnce B, Çolak H, Dalli M, Yavuz İ, Sahbaz C, Cangül S (2014). The Journal of the International Ozone Association Comparative Evaluation of the Effects of Ozone, Diode Laser, and Traditional Cavity Disinfectants on Microleakage.

128. Shafiei F, Memarpour M (2012). Antibacterial activity in adhesive dentistry: A literature review. *General Dentistry* 60.
129. Mazzoni A, Tjäderhane L, Checchi V, Di Lenarda R, Salo T, Tay FR, Pashley DH, Breschi L (2015). Role of dentin MMPs in caries progression and bond stability. *Journal of Dental Research* 94: 241–251.
130. MS B-S (2016). Effects and Effectiveness of Cavity Disinfectants in Operative Dentistry: A Literature Review. *The journal of contemporary dental practice* 17: 867–879.
131. Athanassiadis B, Abbott P V, Walsh LJ (2007). *The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics*. S64 *Australian Dental Journal Endodontic Supplement* (Vol. 52).
132. Ersöz EÖP. (1999). The effect of various acids in different concentrations on the dentin surface, a SEM study. *Türkiye Klin Diş Hek Bil Derg* 5: 9.
133. Legler LR, Retief DH, Bradley EL (1990). Effects of phosphoric acid concentration and etch duration on enamel depth of etch: An in vitro study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 98: 154–160.
134. Esteves CM, Ota-Tsuzuki C, Reis AF, Rodrigues JA (2010). Antibacterial activity of various self-etching adhesive systems against oral streptococci. *Operative Dentistry* 35: 448–453.
135. Imazato, S., Kaneko, T., Takahashi, Y., Noiri, Y., & Ebisu S (2004). In vivo antibacterial effects of dentin primer incorporating MDPB. *Operative dentistry* 29: 369–375.
136. Wang S, Zhang K, Zhou X, Xu N, Xu HHK, Weir MD, Ge Y, Wang S, Li M, Li Y, *et al.* (2014). Antibacterial effect of dental adhesive containing dimethylaminododecyl methacrylate on the development of *Streptococcus mutans* biofilm. *International journal of molecular sciences* 15: 12791–12806.
137. Kim JG, Yousef AE, Dave S (1999). Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. *Journal of Food Protection* 62: 1071–1087.

138. Azarpazhooh A, Limeback H (2008). The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *Journal of Dentistry* 36: 104–116.
139. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS (2008). The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm in vitro on dentine pretreated with ozone. *Australian Dental Journal* 53: 349–353.
140. Verma SK, Maheshwari S, Singh RK, Chaudhari PK (2012). Laser in dentistry: An innovative tool in modern dental practice. *National Journal of Maxillofacial Surgery* 3: 124.
141. Uday Mohan PVM, Uloopi KS, Vinay C, Rao RC (2016). *In vivo* comparison of cavity disinfection efficacy with APF gel, Propolis, Diode Laser, and 2% chlorhexidine in primary teeth. *Contemporary Clinical Dentistry* 7: 45.
142. Türkün M, Türkün LŞ, Çelik EU, Ateş M (2006). Bactericidal Effect of Er,Cr:YSGG Laser on *Streptococcus mutans*. *Dental Materials Journal* 25: 81–86.
143. de Sousa Farias SS, Nemezio MA, Corona SAM, Aires CP, Borsatto MC (2016). Effects of low-level laser therapy combined with toluidine blue on polysaccharides and biofilm of *Streptococcus mutans*. *Lasers in Medical Science* 31: 1011–1016.
144. Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K (1999). A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser. *International Endodontic Journal* 32: 32–39.
145. Pattanaik N (2013). Topic-the effect of three cavity disinfectants (chlorhexidine gluconate-based. Consepis; benzalkonium chlorite-based, Tubulicid red; sodium hypochlorite based-Chlorcid V on the self - etch dentine bonding agent (Adeper Easy One,3M ESPE) under SEM. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences* 8: 84–89.
146. Sharma V, Rampal P, Kumar S (2011). Shear bond strength of composite resin to dentin after application of cavity disinfectants – SEM study. *Contemporary Clinical Dentistry* 2: 155.

147. Kimyai S, Mohammadi N, Bahari M, Pesyanian E, Pesyanian F (2020). Effect of Cavity Disinfection with Chlorhexidine on Marginal Gap of Class V Composite Restorations Bonded with a Universal Adhesive Using Self-Etch and Etch-and-Rinse Bonding Strategy. *Frontiers in Dentistry* 17: 1.
148. Fure S, Emilson CG (1990). Effect of Chlorhexidine Gel Treatment Supplemented with Chlorhexidine Varnish and Resin on Mutans Streptococci and Actinomyces on Root Surfaces. *Caries Research* 24: 242–247.
149. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S (2006). In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 6: 1–8.
150. Akyuz S, Chousein (Ntemir) OM, Sacan O, Yanardag R, Kalaycı S, Yarat A, Sahin F (2019). Antibacterial and photodynamic effects of some plant extracts for cavity disinfection. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 26: 48–52.
151. Oussalah M, Caillet S, Saucier L, Lacroix M (2006). Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. *Meat Science* 73: 236–244.
152. Sharififar F, Moshafi MH, Mansouri SH, Khodashenas M, Khoshnoodi M (2007). In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic *Zataria multiflora* Boiss. *Food Control* 7: 800–805.
153. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL (2002). Botanical Origin and Chemical Composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50: 2502–2506.
154. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J (2008). Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytotherapy Research* 22: 1256–1263.
155. Ikenoa K, Ikeno T, Miyazawah C (1991). Effects of Propolis on Dental Caries in Rats. *Caries Research* 25: 347–351.
156. Kayacik H (1955). The Distribution of *Picea orientalis* (L.) Carr. *Kew Bulletin* 10: 481.

157. Kazancı C, Oruç S, Mosulishvili M (n.d.). Medicinal ethnobotany of wild woody plants: A cross-cultural comparison around Georgia-Turkey border, The Western Lesser Caucasus.
158. Şahin H (2011). The Effect Of Solvent Exchange On The Pit Aspiration In Oriental Spruce (*Picea orientalis* (L.) Link.). *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 4: 52–62.
159. Celiktaş MS, Yaglıkçı M, Khosravi Maleki F (2019). Subcritical water extraction derived lignin for creation of sustainable reinforced composite materials. *Polymer Testing* 77.
160. Davis PH (Peter H, Chamberlain DF, Matthews VA (1965). *Flora of Turkey and the East Aegean Islands*, Edinburgh: University Press.
161. Akgül, E., Gençtürk İ (1975). Türkiye’de Doğu ladininin (*Picea orientalis* Link. ve Carr.) yayılış sahası topraklarında tespit edilen başlıca özelliklerle bunlar arasındaki ilişkiler. *Ankara: Ormancılık Araştırma Enstitüsü Müdürlüğü*.
162. Kültür Ş, Altınbaşak O, Anıl S, Melikoğlu G (2018). Türkiye’de mide ülserinde kullanılan tıbbi bitkiler. *Marmara Pharmaceutical Journal* 22: 1–14.
163. Sefa *, Zafer A, Ozkan C, Tarihi G (2014). Traditional Usage of Some Wild Plants in Trabzon Region (Turkey). *Journal of Forestry Faculty* 14: 135–145.
164. Karaköse M, Karaköse GÇ (2017). Medicinal and Aromatic Plants of Esenli (Giresun) Forest Planning Unit. *International Journal of Secondary Metabolite* 4: 285–305.
165. Altundağ Çakır E (2017). A Comprehensive Review on Ethnomedicinal Utilization of Gymnosperms in Turkey. *Eurasian Journal of Forest Science* 5: 35–47.
166. Bussmann RW, Paniagua-Zambrana NY, Sikharulidze S, Kikvidze Z, Kikodze D, Tchelidze D, Batsatsashvili K, Hart RE (2017). Plant and fungal use in Tusheti, Khevsureti, and Pshavi, Sakartvelo (Republic of Georgia), Caucasus. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 86.

167. Cheraghi Niroumand M, Hosein Farzaei M, Elahe Karimpour-Raz-kenari E, Amin G, Khanavi M, Akbarzadeh T, Reza Shams-Ardekani M, Author C, Reza M (2016). An Evidence-Based Review on Medicinal Plants Used as Insecticide and Insect Repellent in Traditional Iranian Medicine. *Iran Red Crescent Med J* 18: 22361.
168. Savluchinske Feio S, Gigante B, Carlos Roseiro J, Marcelo-Curto MJ (1999). Antimicrobial activity of diterpene resin acid derivatives. *Journal of Microbiological Methods* 35: 201–206.
169. Evans WC, Evans D, Trease GE (2002). Trease and Evans' pharmacognosy 253–257.
170. Shuaib M, Ali A, Ali M, Panda BP, Ahmad MI (2013). Antibacterial activity of resin rich plant extracts. *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences* 5: 265.
171. Goldberg G (2008). *Plants: diet and health*, 2nd ed. John Wiley & Sons, Ltd.
172. Aherne SA, O'Brien NM (2002). Dietary flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition* 18: 75–81.
173. Falcone Ferreyra ML, Rius SP, Casati P, Hellmann HA, de Estudios Fotosintéticos Bioquímicos C (2012). Flavonoids: biosynthesis, biological functions, and biotechnological applications. doi:10.3389/fpls.2012.00222.
174. Havsteen BH (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics* 96: 67–202.
175. Perumal Samy R, Gopalakrishnakone P (2010). Therapeutic Potential of Plants as Anti-microbials for Drug Discovery. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM* 7: 283.
176. Górniak I, Bartoszewski R, Króliczewski J (2019). *Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. Phytochemistry Reviews* (Vol. 18).
177. Clifford MN (1999). Chlorogenic acids and other cinnamates – nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 79: 362–372.
178. Görg E (2014). Integrating Chemistry, Electricity and Magnetism into Dynamical Natural Philosophy: J. F. Fries's Extension of Kant's Metaphysical Foundations. *Advances in Historical Studies* 03: 56–67.

179. Dietrich H, Pour Nikfardjam MS (2017). Influence of phenolic compounds and tannins on wine-related microorganisms. *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine* 421–454.
180. Hostettmann K (2014). *Handbook of chemical and biological plant analytical methods*. (John Wiley & Sons., editor).
181. Gómez-Caravaca AM, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A (2006). Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1220–1234.
182. Sultana B, Anwar F, Ashraf M (2009). Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. *Molecules (Basel, Switzerland)* 14: 2167–2180.
183. Brunner G (2005). Supercritical fluids: Technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering* 67: 21–33.
184. Díaz-Reinoso B, Moure A, Domínguez H, Parajó JC (2006). Supercritical CO₂ Extraction and Purification of Compounds with Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54: 2441–2469.
185. Pinelo M, Zornoza B, Meyer AS (2008). Selective release of phenols from apple skin: Mass transfer kinetics during solvent and enzyme-assisted extraction. *Separation and Purification Technology* 63: 620–627.
186. Solana M, Boschiero I, Dall’Acqua S, Bertucco A (2015). A comparison between supercritical fluid and pressurized liquid extraction methods for obtaining phenolic compounds from *Asparagus officinalis* L. *The Journal of Supercritical Fluids* 100: 201–208.
187. Sathishkumar K, Gao X, Raghavamenon AC, Murthy SN, Kadowitz PJ, Uppu RM (2010). Free Radicals and Antioxidant Protocols 610: 51–61.

188. Sepici Dinçel A, Bilimleri Üniversitesi S, Sağlık Bilimleri Enstitüsü G, Üniversitesi Tıp Fakültesi G, Biyokimya Anabilim Dalı T, Eser B, Giriş K, Performanslı Sıvı Kromatografi Kullanımında Basit İpuçları Y . Introduction to Chromatography, Basic Working Tips for High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Health Services and Education* 2: 2636–8285.
189. Zhao L, Lee HK (2001). Determination of phenols in water using liquid phase microextraction with back extraction combined with high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 931: 95–105.
190. Stalikas CD (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of separation science* 30: 3268–3295.
191. Xu CC, Wang B, Pu YQ, Tao JS, Zhang T (2017). Advances in extraction and analysis of phenolic compounds from plant materials. *Chinese Journal of Natural Medicines* 15: 721–731.
192. Alqahtani A, Tongkao-On W, Li KM, Razmovski-Naumovski V, Chan K, Li GQ (2015). Seasonal variation of triterpenes and phenolic compounds in australian *Centella asiatica* (L.) Urb. *Phytochemical Analysis* 26: 436–443.
193. da Silva Siqueira EM, Félix-Silva J, de Araújo LML, Fernandes JM, Cabral B, Gomes JA dos S, de Araújo Roque A, Tomaz JC, Lopes NP, de Freitas Fernandes-Pedrosa M, *et al.* (2016). *Spondias tuberosa* (Anacardiaceae) leaves: profiling phenolic compounds by HPLC-DAD and LC–MS/MS and in vivo anti-inflammatory activity. *Biomedical Chromatography* 30: 1656–1665.
194. Wilkinson JM (2006). Methods for Testing the Antimicrobial Activity of Extracts. *Modern Phytomedicine: Turning Medicinal Plants into Drugs* 157–171.
195. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446–475.
196. Burt S (n.d.). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review.
197. Schelz Z, Molnar J, Hohmann J (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia* 77: 279–285.

198. Oilo G. (1993). Bond strength testing-what does it mean? *International dental journal* 43: 492–498.
199. Van Meerbeek B, Peumans M, Poitevin A, Mine A, Van Ende A, Neves A, De Munck J (2010). Relationship between bond-strength tests and clinical outcomes. *Dental Materials* 26: e100–e121.
200. Pashley DH, Sano H, Ciucchi B, Yoshiyama M, Carvalho RM (1995). Adhesion testing of dentin bonding agents: A review. *Dental Materials* 11: 117–125.
201. Salz U, Bock T (2010). Testing adhesion of direct restoratives to dental hard tissue - a review. *The journal of adhesive dentistry* 12: 343–71.
202. McDonough WG, Antonucci JM, He J, Shimada Y, Chiang MYM, Schumacher GE, Schultheisz CR (2002). A microshear test to measure bond strengths of dentin–polymer interfaces. *Biomaterials* 23: 3603–3608.
203. Poitevin A, De Munck J, Cardoso MV, Mine A, Peumans M, Lambrechts P, Van Meerbeek B (2010). Dynamic versus static bond-strength testing of adhesive interfaces. *Dental Materials* 26: 1068–1076.
204. Ercan E, Erdemir A, Unverdi Eldeniz A (2009). Effect of Different Cavity Disinfectants on Shear Bond Strength of Composite Resin to Dentin Effect of several laser systems on removal of smear layer with a variety of irrigation solutions View project ertuğrul View project. *Article in The Journal of Adhesive Dentistry*.
205. Angeloni V, Mazzoni A, Marchesi G, Cadenaro M, Comba A, Maravić T, Scotti N, Pashley DH, Tay FR, Breschi L (2017). Role of chlorhexidine on long-term bond strength of self-adhesive composite cements to intraradicular dentin. *Journal of Adhesive Dentistry* 19: 341–348.
206. Nelsen RJ, Wolcott D S RB, Paffenbarger GC (1952). Fluid exchange at the margins of dental restorations.
207. Bedran-de-Castro, A. K., Cardoso, P. E., Ambrosano, G. M., & Pimenta LA (2004). Thermal and mechanical load cycling on microleakage and shear bond strength to dentin. *Operative dentistry* 29: 42–48.
208. Gale MS, Darvell BW (1999). Thermal cycling procedures for laboratory testing of dental restorations. *Journal of Dentistry* 27: 89–99.

209. Miyazaki, M., Sato, M., Onose, H., & Moore BK (1998). Influence of thermal cycling on dentin bond strength of two-step bonding systems. *American Journal of Dentistry* 11: 118–122.
210. Kara Y, Can Z, Kolaylı · Sevgi (n.d.). What Should Be the Ideal Solvent Percentage and Solvent-Propolis ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract? *Food Analytical Methods* 1: 3.
211. Savka MA, Dailey L, Popova M, Mihaylova R, Merritt B, Masek M, Le P, Nor SRM, Ahmad M, Hudson AO, *et al.* (2015). Chemical composition and disruption of quorum sensing signaling in geographically diverse United States propolis. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015.
212. Büyüktuncel E, Porgalı E, Çolak C (2014). Comparison of Total Phenolic Content and Total Antioxidant Activity in Local Red Wines Determined by Spectrophotometric Methods. *Food and Nutrition Sciences* 05: 1660–1667.
213. Slinkard K, Singleton VL (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American journal of enology and viticulture* 28: 49–55.
214. Singleton VL, Rossi JA (1965). Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16.
215. Fukumoto LR, Mazza G (2000). Assessing Antioxidant and Prooxidant Activities of Phenolic Compounds†. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 3597–3604.
216. Cuendet M, Hostettmann K, Potterat O, Dyatmiko W (1997). Iridoid Glucosides with Free Radical Scavenging Properties from *Fagraea blumei*. *Helvetica Chimica Acta* 80: 1144–1152.
217. Benzie IFF, Strain JJ (1996). The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. *Analytical Biochemistry* 239: 70–76.
218. Kara Y (2022). Applicability of Phenolic Profile Analysis Method Developed with RP-HPLC-PDA to some Bee Product 65.

219. Çakır HE, Şirin Y, Kolaylı S, Can Z (2018). Validation Methods for Phenolic Components with RP-HPLC-UV in Various Bee Products. *Journal of Apitherapy and Nature* 1: 13–19.
220. Malkoç M, Çakır H, Kara Y, Can Z, Kolaylı S (2019). Phenolic composition and antioxidant properties of anzer honey from black sea region of Turkey. *Uludağ Arıcılık Dergisi* 19: 143–151.
221. Denev P, Kratchanova M, Ciz M, Lojek A, Vasicek O, Nedelcheva P, Blazheva D, Toshkova R, Gardeva E, Yossifova L, *et al.* (2014). Biological activities of selected polyphenol-rich fruits related to immunity and gastrointestinal health. *Food Chemistry* 157: 37–44.
222. Gür D. (2016). Antibiyotik duyarlılık testleri, EUCAST: uygulama, yorum ve uzman kurallar. *Türk Mikrobiyol Cemiyeti Derg* 46.
223. Murray PR, EJ B, MA P, JH J, RH Y (2009). Manual of Clinical Microbiology. 9th ed. ASM Press, Washington, DC., pp 390–770.
224. EUCAST (2022) European committee on antimicrobial susceptibility testing Broth microdilution - EUCAST reading guide v 4.0 (1 January 2022).
225. EUCAST (2020) European committee on antimicrobial susceptibility testing, EUCAST method for susceptibility testing of yeasts (v 7.3.2 valid from 22 April, 2020).
226. Erhardt MCG, Rodrigues JA, Valentino TA, Ritter AV, Pimenta LAF (2008). In vitro μ TBS of one-bottle adhesive systems: Sound versus artificially-created caries-affected dentin. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 86B: 181–187.
227. Kwong SM, Cheung GSP, Kei LH, Itthagarun A, Smales RJ, Tay FR, Pashley DH (2002). Micro-tensile bond strengths to sclerotic dentin using a self-etching and a total-etching technique. *Dental Materials* 18: 359–369.
228. Ríos JL, Recio MC (2005). Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 100: 80–84.

229. Mehrgan H, Mojab F, Pakdaman S, Poursaeed M (2008). Antibacterial activity of *Thymus pubescens* methanolic extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 7: 291–295.
230. Kumar Meena A, Rekha P, Ilavarasan R (2019). Determination of heavy metal contents in herbal plant leaves collected from different locations of Chennai city. *IP International Journal of Comprehensive and Advanced Pharmacology* 4: 53–55.
231. Przybyłek I, Karpiński TM (2019). Antibacterial properties of propolis. *Molecules* 24: 11–13.
232. Mohd Nazri NAA, Ahmat N, Adnan A, Syed Mohamad SA, Syaripah Ruzaina SA (2011). In vitro antibacterial and radical scavenging activities of Malaysian table salad. *African Journal of Biotechnology* 10: 5728–5735.
233. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, Jahurul MHA, Ghafoor K, Norulaini NAN, Omar AKM (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering* 117: 426–436.
234. Holmbom T, Reunanen M, Fardim P (2008). Composition of callus resin of Norway spruce, Scots pine, European larch and Douglas fir. *Holzforschung* 62: 417–422.
235. Şeker ME, Çelik A, Dost K, Erdoğan A (2021). Investigation of phenolic content in five different pine barks species grown in Turkey by HPLC-UV and LC-MS. *Journal of Chromatographic Science* 59: 491–501.
236. Touzani S, Embaslat W, Imtara H, Kmail A, Kadan S, Zaid H, Elarabi I, Badiaa L, Saad B, Kabir Y (2019). Vitro Evaluation of the Potential Use of Propolis as a Multitarget Therapeutic Product: Physicochemical Properties, Chemical Composition, and Immunomodulatory, Antibacterial, and Anticancer Properties.
237. Prabhakar AR, Karuna YM, Yavagal C, Deepak BM (2015). Cavity disinfection in minimally invasive dentistry-comparative evaluation of Aloe vera and propolis: A randomized clinical trial. *Contemporary Clinical Dentistry* 6: S24–S31.

238. Arslan S, Yazici AR, Gorucu J, Ertan A, Pala K, Üstün Y, Antonson SA, Antonson DE (2011). Effects of different cavity disinfectants on shear bond strength of a silorane-based resin composite. *Journal of Contemporary Dental Practice* 12: 279–286.
239. Huyut Z, Beydemir F, Gülçin E (2017). Antioxidant and Antiradical Properties of Selected Flavonoids and Phenolic Compounds.
240. Do QD, Angkawijaya AE, Tran-Nguyen PL, Huynh LH, Soetaredjo FE, Ismadji S, Ju YH (2014). Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *Journal of Food and Drug Analysis* 22: 296–302.
241. Fernandez-Panchon MS, Villano D, Troncoso AM, Garcia-Parrilla MC (2008). Antioxidant activity of phenolic compounds: From in vitro results to in vivo evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 48: 649–671.
242. Hernández Zarate MS, Abraham Juárez M del R, Cerón García A, Ozuna López C, Gutiérrez Chávez AJ, Segoviano Garfias J de JN, Avila Ramos F (2018). Flavonoids, phenolic content, and antioxidant activity of propolis from various areas of Guanajuato, Mexico. *Food Science and Technology (Brazil)* 38: 210–215.
243. Ustun O, Senol FS, Kurkcuoglu M, Orhan IE, Kartal M, Baser KHC (2012). Investigation on chemical composition, anticholinesterase and antioxidant activities of extracts and essential oils of Turkish Pinus species and pycnogenol. *Industrial Crops and Products* 38: 115–123.
244. Ulukanli Z, Karabörklü S, Bozok F, Ates B, Erdogan S, Cenet M, Karaaslan MG (2014). Chemical composition, antimicrobial, insecticidal, phytotoxic and antioxidant activities of Mediterranean Pinus brutia and Pinus pinea resin essential oils. *Chinese Journal of Natural Medicines* 12: 901–910.
245. Dudonné S, Vitrac X, Coutière P, Woillez M, Mérillon J-M (2009). Comparative Study of Antioxidant Properties and Total Phenolic Content of 30 Plant Extracts of Industrial Interest Using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC Assays - Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 1768–1774.

246. Kara Y, Can Z, Kolaylı S (2022). What Should Be the Ideal Solvent Percentage and Solvent-Propolis ratio in the Preparation of Ethanolic Propolis Extract? *Food Analytical Methods* 15: 1707–1719.
247. Sun C, Wu Z, Wang Z, Zhang H (2015). Effect of ethanol/water solvents on phenolic profiles and antioxidant properties of Beijing propolis extracts. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 2015.
248. Trapp S, Croteau R (2001). Defensive resin biosynthesis in conifers. *Annual Review of Plant Biology* 52: 689–724.
249. Hafizoğlu H, Reunanen M (1994). Composition of Oleoresins from Bark and Cones of *Abies Nordmanniana* and *Picea Orientalis*. *Holzforschung* 48: 7–11.
250. Shmidt EN, Khan VA, Isaeva ZA, Drebuschak TD, Dubovenko Z V., Kemertelidze EP, Pentegova VA (1983). Terpenoids of the oleoresins of *Picea orientalis* and *Abies normanniana* growing in the Caucasus. *Chemistry of Natural Compounds* 18: 173–176.
251. Rautio M, Sipponen A, Peltola R, Lohi J, Jokinen JJ, Papp A, Carlson P, Sipponen P (2007). Antibacterial effects of home-made resin salve from Norway spruce (*Picea abies*). *Apmis* 115: 335–340.
252. Gönültaş O, Balaban Uçar M (2017). Chemical composition of oriental spruce (*Picea orientalis*) and oak (*Quercus* spp.) barks. *Türkiye Ormancılık Dergisi* 18: 321–327.
253. Hafizoğlu H, Usta M, Bilgin Ö (1997). Wood and bark composition of *Picea orientalis* (L.) link. *Holzforschung* 51: 114–118.
254. Cowan MM (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical Microbiology Reviews* 12: 564–582.
255. Rohdewald P (2002). A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics* 40: 158–168.

256. Shimada T, Tokuhara D, Tsubata M, Kamiya T, Kamiya-Sameshima M, Nagamine R, Takagaki K, Sai Y, Miyamoto KI, Aburada M (2012). Flavangenol (pine bark extract) and its major component procyanidin B1 enhance fatty acid oxidation in fat-loaded models. *European Journal of Pharmacology* 677: 147–153.
257. Erşen Bak F, Kenan Ç (2020). Artvin'in Merkez Köylerinde Bazı Tıbbi Bitkilerin Yöresel Kullanımları. *Artvin Çoruh Üniversitesi Orman Fakültesi Dergisi* 21: 318–329.
258. Boushell LW, Swift JR. EJ (2011). Dentin Bonding: Matrix Metalloproteinases and Chlorhexidine. *Journal of Esthetic and Restorative Dentistry* 23: 347–352.
259. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, Do Prado CJ (2008). Effect of Chlorhexidine Application on Microtensile Bond Strength to Dentin. *Operative Dentistry* 33: 183–188.
260. Agrawal N, Agrawal H, Patel P (2013). Effect of cavity disinfection with chlorhexidine on microleakage of composite restorations using total etch and self etch single bottle adhesive systems: an in-vitro study. *International J of Healthcare & Biomedical Research* 43.
261. De Luca MP, Franca JR, Augusto F, Macedo FF, Grenho L, Cortes ME, Augusto A, Faraco G, Moreira AN, Santos VR (2014). Propolis Varnish: Antimicrobial Properties against Cariogenic Bacteria, Cytotoxicity, and Sustained-Release Profile.
262. Turkun M, Ozata F, Uzer E, Ates M (2005). Antimicrobial substantivity of cavity disinfectants. *General Dentistry* 53: 182–186.
263. Newman DJ (2008). Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? *Journal of Medicinal Chemistry* 51: 2589–2599.
264. Newman DJ, Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products* 70: 461–477.
265. Termentzi A, Fokialakis N, Leandros Skaltsounis A (2012). Natural Resins and Bioactive Natural Products thereof as Potential Antimicrobial Agents. *Current Pharmaceutical Design* 17: 1267–1290.
266. Ceylan A (1995). Tıbbi Bitkiler I. *Ege Üniv Zir Fak Yay* 312.
267. Ozkan ZC, Akbulut S (2013). Ethnobotanic features of Rize / Turkey province.

268. Mahady G (2005). Medicinal Plants for the Prevention and Treatment of Bacterial Infections. *Current Pharmaceutical Design* 11: 2405–2427.
269. Türkün Ş, Türkün M, Ateş M (2003). “MDPB” İçeren Self-Etching Adeziv Sisteminin Antibakteriyal Aktivitesi. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 20: 41–46.
270. Ito Y, Ito T, Yamashiro K, Mineshiba F, Hirai K, Omori K, Yamamoto T, Takashiba S (2020). Antimicrobial and antibiofilm effects of abietic acid on cariogenic *Streptococcus mutans*. *Odontology* 108: 57–65.
271. Kuramitsu HK (1993). Virulence factors of mutans streptococci: Role of molecular genetics. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 4: 159–176.
272. Park YK, Koo MH, Abreu JAS, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL (n.d.). *Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms*.
273. Koo H, Gomes BPFA, Rosalen PL, Ambrosano GMB, Park YK, Cury JA (2000). In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Archives of Oral Biology* 45: 141–148.
274. Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Hentati H, Bakhrouf A (2011). Antibiotic resistance and adhesion properties of oral Enterococci associated to dental caries. *BMC Microbiology* 11.
275. Gold OG, Jordan H V., van Houte J (1975). The prevalence of enterococci in the human mouth and their pathogenicity in animal models. *Archives of Oral Biology* 20.
276. Yadav K (2016). *Dental Caries Bacteriological Profile of Dental Caries* LAP LAMBERT Academic Publishing.
277. Omolaja BO, O EH, O AT, M AA (2013). Antibiotic Sensitivity Profiles of Bacteria Isolated from Decayed Teeth. *Scholars Academic Journal of Pharmacy (SAJP)* 2: 424–428.
278. Martin M V., Hardy P (1991). Two cases of oral infection by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Dental Journal* 1991 170:2 170: 63–64.

279. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G (2015). Staphylococcus aureus and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection? *American Journal of Infection Control* 43: 35–37.
280. Balagopal S, Arjunker R (2013). Chlorhexidine: The gold standard antiplaque agent. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 5: 270–274.
281. Loesche WJ (1986). Role of Streptococcus mutans in Human Dental Decay. *Microbiological Reviews* 50: 353–380.
282. Montagner AF, Sarkis-Onofre R, Pereira-Cenci T, Cenci MS (2014). MMP inhibitors on dentin stability: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Dental Research* 93: 733–743.
283. Kouidhi B, Zmantar T, Hentati H, Bakhrouf A (2010). Cell surface hydrophobicity, biofilm formation, adhesives properties and molecular detection of adhesins genes in Staphylococcus aureus associated to dental caries. *Microbial Pathogenesis* 49: 14–22.
284. Simbirtsev AS, Konusova VG, Sh Mcheldze G, Fidarov EZ, Paramonov BA, Yu Chebotarev V (2002). Pine Resin and Biopin Ointment: Effects on Repair Processes in Tissues. *Byullete Eksperimental noi Biologii i Meditsiny* 133: 530–533.
285. Kizil M, Kizil G, Yavuz M, Aytekin C (2002). Antimicrobial activity of the resins obtained from the roots and stems of Cedrus libani and Abies cilicica. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiia* 38: 166–168.
286. Furiga A, Lonvaud-Funel A, Dorignac G, Badet C (2008). In vitro anti-bacterial and anti-adherence effects of natural polyphenolic compounds on oral bacteria. *Journal of Applied Microbiology* 105: 1470–1476.
287. Dortunç T, Çevikbaş A (2015). Bazı uçucu yağların antibakteriyel ve antifungal etkileri üzerinde araştırmalar. *Marmara Pharmaceutical Journal* 8: 117–128.
288. Horner C, Mawer D, Wilcox M (2012). Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67: 2547–2559.

289. Milstone AM, Passaretti CL, Perl TM (2008). Chlorhexidine: Expanding the armamentarium for infection control and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 46: 274–281.
290. Emilson CG (1994). Potential Efficacy of Chlorhexidine against Mutans Streptococci and Human Dental Caries. *Journal of Dental Research* 73: 682–691.
291. Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ (2003). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal* 36: 267–275.
292. Goël Brackett M, professor assistant, Tay FR, professor associate, Brackett WW, Mai S, Pashley DH, Brackett M, Tay F, Brackett W, *et al.* (2009). In Vivo Chlorhexidine Stabilization of Hybrid Layers of an Acetone-based Dentin Adhesive. *Operative Dentistry* 34: 379–383.
293. de Castro FLA, de Andrade MF, Duarte Júnior SLL, Vaz LG, Ahid FJM (2003). Effect of 2% chlorhexidine on microtensile bond strength of composite to dentin. *The journal of adhesive dentistry* 5: 129–38.
294. Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Kim YM (2021). Caffeic Acid and Its Derivatives: Antimicrobial Drugs toward Microbial Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 69: 2979–3004.
295. Khmel OK, Simbirtsev AS, Konusova VG, Sh Mchedlidze G, Fidarov EZ, Paramonov BA, Yu Chebotarev V (2002). Pine Resin and Biopin Ointment: Effects on Cell Composition and Histochemical Changes in Wounds. *Byulleten Eksperimental noi Biologii i Meditsiny* 133: 672–674.
296. Simbirtsev AS, Konusova VG, Mchedlidze GS, Fidarov EZ, Paramonov BA, Chebotarev VY (2002). Pine Resin and Biopin Ointment: Immunotoxic and Allergenic Activity. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 2002 133:4 133: 384–385.
297. Stappert CFJ, Att W, Gerds T, Strub JR (2006). Fracture resistance of different partial-coverage ceramic molar restorations: An in vitro investigation. *The Journal of the American Dental Association* 137: 514–522.

298. Sanches RP, Otani C, Damião AJ, Miyakawa W (2009). AFM characterization of bovine enamel and dentine after acid-etching. *Micron* 40: 502–506.
299. Tosun G, Sener Y, Sengun A (2007). Effect of Storage Duration/Solution on Microshear Bond Strength of Composite to Enamel. *Dental Materials Journal* 26: 116–121.
300. Maciej Serda, Becker FG, Cleary M, Team RM, Holtermann H, The D, Agenda N, Science P, Sk SK, Hinnebusch R, *et al.* (2005). Influence of storage methods on microtensile bond strength of dentin adhesive system. (G. Balint, B. Antala, C. Carty, J.-M. A. Mabieme, I. B. Amar, & A. Kaplanova, editors) *Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology* 14: 147–150.
301. Hope CK, Griffiths DA, Prior DM (2013). Finding an Alternative to Formalin for Sterilization of Extracted Teeth for Teaching Purposes. *Journal of Dental Education* 77: 68–71.
302. Secilmis A, Dilber E, Ozturk N, Gokmen Yilmaz F (2013). The Effect of Storage Solutions on Mineral Content of Enamel. *Materials Sciences and Applications* 4: 439–445.
303. Humel MMC, Oliveira MT, Cavalli V, Giannini M (2007). Effect of storage and disinfection methods of extracted bovine teeth on bond strength to dentin.
304. Haller B, Hofmann N, Klaiber B, Bloching U (1993). Effect of storage media on microleakage of five dentin bonding agents. *Dental Materials* 9: 191–197.
305. Ziskind D, Gleitman J, Rotstein I, Friedman M (2003). Evaluation of cetylpyridinium chloride for infection control in storage solution. *Journal of Oral Rehabilitation* 30: 477–481.
306. Söderholm KJM (1991). Correlation of in vivo and in vitro performance of adhesive restorative materials: A report of the ASC MD156 task group on test methods for the adhesion of restorative materials. *Dental Materials* 7: 74–83.
307. Rueggeberg FA (1991). Substrate for adhesion testing to tooth structure— Review of the literature: A report of the ASC MD156 Task Group on Test methods for the adhesion of restorative materials Accredited standards committee MD156 for dental materials and devices. *Dental Materials* 7: 2–10.

308. Ayaz F, Taętekin D, Yanıkoğlu F (2011). Dentine bağlanma ve değerlendirme metodları. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi* 2011: 49–56.
309. Tekęe N, Demirci M (2015). Mikrogerilim Bağlanma Dayanım Testi Ve Sonuçlarını Etkileyen Etkenler. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi* 24.
310. Pelin K, Sertgöz A (2012). Adezivlerin diş dokusuna olan bağlantı dayanıklılığının değerlendirilmesinde kullanılan in vitro test metotları. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi* 2012.
311. ISO - ISO/TS 11405:2015 - Dentistry — Testing of adhesion to tooth structure [Accessed: 21 November 2022].
312. Uceda-Gómez N, Reis A, Carrilho MR de O, Loguercio AD, Rodriguez Filho LE (2003). Effect of sodium hypochlorite on the bond strength of an adhesive system to superficial and deep dentin. *Journal of Applied Oral Science* 11: 223–228.
313. Piwowarczyk A, Bender R, Ottl P, Lauer HC (2007). Long-term bond between dual-polymerizing cementing agents and human hard dental tissue. *Dental Materials* 23: 211–217.
314. Pashley EL, Talman R, Horner JA, Pashley DH (1991). Permeability of normal versus carious dentin. *Dental Traumatology* 7.
315. Pashley DH, Carvalho RM (1997). Dentine permeability and dentine adhesion. *Journal of Dentistry* 25: 355–372.
316. Elkassas Dr. DW, Fawzi EM, El Zohairy A (2014). The effect of cavity disinfectants on the micro-shear bond strength of dentin adhesives. *European Journal of Dentistry* 8: 184.
317. Caneppele T, Bresciani E, Da Silva Ávila D, Barcellos D, Pucci C (2017). Effect of Lining Materials on Shear Bond Strength for Composite Restorations In Vitro. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry* 37: 137–143.
318. Sancaklı HŞ (2010). Dentin Bağlayıcı Sistemler ve Hibrid Tabakanın Oluşturulması. *İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Dergisi* 189–195.
319. Miranda C, Silva GV, Vieira MD, Costa SXS (2014). Influence of the chlorhexidine application on adhesive interface stability: literature review.

320. Loguercio AD, Stanislawczuk R, Polli LG, Costa JA, Michel MD, Reis A (2009). Influence of chlorhexidine digluconate concentration and application time on resin–dentin bond strength durability. *European Journal of Oral Sciences* 117: 587–596.
321. Mishra A, Koul M, Upadhyay VK, Abdullah A (2020). A Comparative Evaluation of Shear Bond Strength of Seventh- and Eighth-Generation Self-etch Dentin Bonding Agents in Primary Teeth: An In Vitro Study. *International Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 13: 225.
322. Hegde MN, Bhandary S (2008). An evaluation and comparison of shear bond strength of composite resin to dentin, using newer dentin bonding agents. *Journal of Conservative Dentistry* 11: 71.
323. Elkaffas AA, Hamama HHH, Mahmoud SH (2018). Do universal adhesives promote bonding to dentin? A systematic review and meta-analysis. *Restorative Dentistry & Endodontics* 43.
324. Barutçigil K (2013). Araştırma Makalesi Güncel Dentin Bağlayıcı Ajanların ve Uygulama Yöntemlerinin Makaslama Bağlanma Dayanımlarının Karşılaştırılması 27–32.
325. Donmez N, Siso SH, Usumez A, Bayrak I (2015). Effect of thermal cycling on micro-tensile bond strength of composite restorations bonded with multimode adhesive. *Journal of Adhesion Science and Technology* 29: 731–739.
326. Mazzoni A, Pashley DH, Nishitani Y, Breschi L, Mannello F, Tjäderhane L, Toledano M, Pashley EL, Tay FR (2006). Reactivation of inactivated endogenous proteolytic activities in phosphoric acid-etched dentine by etch-and-rinse adhesives. *Biomaterials* 27: 4470–4476.
327. Carrilho MRO, Geraldeli S, Tay F, De Goes MF, Carvalho RM, Tjäderhane L, Reis AF, Hebling J, Mazzoni A, Breschi L, *et al.* (2007). In vivo preservation of the hybrid layer by chlorhexidine. *Journal of Dental Research* 86: 529–533.
328. Gonçalves LL, Da Silva TM, Prakki A, Barcellos DC, Caneppele TMF, De Oliveira HPM, Gonçalves SE de P (2022). Universal adhesive: the effect of different simulated pulpal pressure fluids and bonding modes to dentin. *Odontology* 110: 62–69.

329. Ito S, Hashimoto M, Wadgaonkar B, Svizero N, Carvalho RM, Yiu C, Rueggeberg FA, Foulger S, Saito T, Nishitani Y, *et al.* (2005). Effects of resin hydrophilicity on water sorption and changes in modulus of elasticity. *Biomaterials* 26: 6449–6459.
330. Paul SJ, Leach M, Rueggeberg FA, Pashley DH (1999). Effect of water content on the physical properties of model dentine primer and bonding resins. *Journal of Dentistry* 27: 209–214.
331. Pucci CR, Gu LS, Zeng C, Gou YP, Tay FR, Niu LN (2017). Susceptibility of contemporary single-bottle self-etch dentine adhesives to intrinsic water permeation. *Journal of Dentistry* 66: 52–61.
332. Campos EA, Correr GM, Leonardi DP, Barato-Filho F, Gonzaga CC, Zielak JC (2009). Chlorhexidine diminishes the loss of bond strength over time under simulated pulpal pressure and thermo-mechanical stressing. *Journal of Dentistry* 37: 108–114.
333. Lin J, Kern M, Ge J, Zhu J, Wang H, Vollrath O, Mehl C (2013). Influence of peripheral enamel bonding and chlorhexidine pretreatment on resin bonding to dentin. *The journal of adhesive dentistry* 15: 351–9.
334. Favetti M, Schroeder T, Montagner AF, Correa MB, Pereira-Cenci T, Cenci MS (2017). Effectiveness of pre-treatment with chlorhexidine in restoration retention: A 36-month follow-up randomized clinical trial. *Journal of Dentistry* 60: 44–49.
335. Sartori N, Stolf SC, Silva SB, Lopes GC, Carrilho M (2013). Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: A 3-year follow-up. *Journal of Dentistry* 41: 1188–1195.
336. El-Housseiny AA, Jamjoum H (2001). The effect of caries detector dyes and a cavity cleansing agent on composite resin bonding to enamel and dentin. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry* 25: 57–63.
337. Tezvergil-Mutluay A, Agee KA, Hoshika T, Carrilho M, Breschi L, Tjäderhane L, Nishitani Y, Carvalho RM, Looney S, Tay FR, *et al.* (2010). The requirement of zinc and calcium ions for functional MMP activity in demineralized dentin matrices. *Dental Materials* 26: 1059–1067.

338. Perote LCCC, Kamozaiki MBB, Gutierrez NC, Tay FR, Pucci CR (2015). Effect of matrix metalloproteinase-inhibiting solutions and aging methods on dentin bond strength. *Journal of Adhesive Dentistry* 17.
339. Chen CL, Parolia A, Pau A, Celerino De Moraes Porto IC (2015). Comparative evaluation of the effectiveness of desensitizing agents in dentine tubule occlusion using scanning electron microscopy. *Australian Dental Journal* 60: 65–72.
340. Toledano M, Osorio R, Osorio E, Aguilera FS, Yamauti M, Pashley DH, Tay F (2007). Durability of resin–dentin bonds: Effects of direct/indirect exposure and storage media. *Dental Materials* 23: 885–892.
341. Pollington S, Fabianelli A, Van Noort R (2010). Microtensile bond strength of a resin cement to a novel fluorcanasite glass-ceramic following different surface treatments. *Dental Materials* 26: 864–872.
342. Hashimoto M, Ohno H, Sano H, Kaga M, Oguchi H (2003). In vitro degradation of resin-dentin bonds analyzed by microtensile bond test, scanning and transmission electron microscopy. *Biomaterials* 24: 3795–3803.