

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

Streptococcus salivarius K12 KULLANIMININ AĞIZ SAĞLIĞINA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HAZIRLAYAN

DİDEM SAKARYALI UYAR

DOKTORA TEZİ

ANKARA - 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI
TIBBİ MİKROBİYOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

Streptococcus salivarius K12 KULLANIMININ AĞIZ SAĞLIĞINA
ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

HAZIRLAYAN
DİDEM SAKARYALI UYAR

DOKTORA TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. AHMET CELAL BAŞUSTAOĞLU

ANKARA - 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı çerçevesinde Didem SAKARYALI UYAR tarafından hazırlanan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 18/01/2024

Tez Adı: Streptococcus salivarius K12 Kullanımının Ağız Sağlığına Etkisinin Değerlendirilmesi

ONAY

Prof. Dr. F. Belgin ATAÇ
Enstitü Müdürü

Tarih: 18 / 01 / 2024

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

Tarih:....23.01.24..

Öğrencinin Adı, Soyadı: Didem SAKARYALI UYAR

Öğrencinin Numarası: 21920152

Anabilim Dalı: Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

Programı: Doktora Programı

Danışmanın Unvanı/ Adı, Soyadı: Prof. Dr. Ahmet Celal BAŞUSTAOĞLU

Tez Başlığı: *Streptococcus salivarius K12 KULLANIMININ AĞIZ SAĞLIĞINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ*

Yukarıda başlığı belirtilen Doktora tez çalışmamın; Giriş, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Tartışma Bölümlerinden oluşan, toplam 69 sayfalık kısmına ilişkin, 11/12/2023 tarihinde şahsım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %6'dır. Uygulanan filtrelemeler:

1. Kaynakça hariç
2. Alıntılar hariç
3. Beş (5) kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

"Başkent Üniversitesi Enstitüleri Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Usul ve Esaslarını" inceledim ve bu uygulama esaslarında belirtilen azami benzerlik oranlarına tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Öğrenci İmzası:

ONAY

TEŞEKKÜR

Doktora hayatımın ve tez çalışmamın her aşamasında desteğini ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, zaman ayırıp değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, doktora eğitimime başladığım ilk günden itibaren sıcak bir ailenin içinde olduğumu hissettiren, öğrencisi olmaktan ve kendisiyle çalışma fırsatı elde etmiş olmaktan onur duyduğum değerli tez danışmanım, sayın sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince desteğini hiç esirgemeyen, her sorunda rahatlıkla danışabildiğim ve sabırla yardımcı olan, bugüne kadar tanıdığım en çalışkan, dürüst ve yardımsever hocalardan, doktora hayatımın bana kazandırdığı arkadaşım ve çok değerli hocam, sayın ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince yardımcı olan sayın Doktora eğitimim boyunca bilgilerini benimle tereddütsüz paylaşan ve değerli zamanını bana ayıran hocalarım, sayın ve teşekkürlerimi sunarım. Değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan ideal eğitimci, öğrencisi olmaktan ve kendisini tanımış olmaktan onur duyduğum, tez sürecimde ihtiyaç duyduğumda desteğini esirgemeyip bana yardımcı olduğu için sonsuz minnet duyduğum hocam, sayın teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimime başlama kararımı destekleyen, ihtiyaç duyduğumda kapısını çalabilme rahatlığı veren, çok değerli Dekan hocam, sayın ; Doktora eğitimime gerekli zamanı ayırmam konusunda destek veren ve elinden gelen yardımı esirgemeyen, çok değerli Anabilim Dalı Başkanım, sayın sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, doktora eğitimim ve özellikle tez çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen olmak üzere tüm asistan arkadaşlarıma teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak, her zaman yanımda olup tüm endişelerimi sabırla dinleyen ve her zaman anlayışlı olan, sayesinde hayatımın kolaylaştığı, hayattaki en büyük destekçim, sevgili eşim sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

***Streptococcus salivarius* K12 KULLANIMININ AĞIZ SAĞLIĞINA ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Probiyotik mikroorganizmaların, sistemik hastalıklar üzerinde iyileştirici etkisi ve bağışıklık sistemini desteklemesi çalışmalarla gösterilmiştir. Oral mikrobiyotadaki etkisine yönelik ise dişler ve çevresindeki yumuşak dokular üzerinde biyofilm tabakanın oluşumunun önlenmesine yönelik tartışmalı sonuçlar bulunmaktadır. Bu nedenle, bu tez çalışmasının birincil amacı karyojenik diyet sonrası değişen oral mikrobiyotada *Streptococcus salivarius* K12 diye bilinen oral probiyotiğin kullanımının *Streptococcus mutans* ve *Lactobacillus* türlerinin sayısı üzerindeki etkisinin değerlendirilmesidir. Ayrıca, ikincil amacı da probiyotik bırakıldıktan sonra da benzer etkinin sürüp sürdürmediğinin değerlendirilmesidir. Çalışma randomize, kontrollü, takip süreli ve kesitsel tasarlanmış bir hayvan çalışmasıdır. Çalışmaya 3-5 aylık dişi Sprague-Dawley türünden 32 adet sıçan dahil edilmiş ve karyojenik diyet ile probiyotik değişkenlerine göre 4 gruba dağıtılmıştır. Bu gruplar: (G1) Karyojenik diyet ve probiyotik uygulanan grup, (G2) Karyojenik diyet uygulanan, probiyotik uygulanmayan grup, (G3) Karyojenik diyet uygulanmayan, probiyotik uygulanan grup, (G4) Karyojenik diyet ve probiyotik uygulanmayan gruptur. Çalışma dahilinde karyojenik diyet uygulanan gruplarda sıçanlar, 2 ay boyunca sükröz ağırlıklı yem ile beslenmiştir. Probiyotik uygulanan gruplarda ise *S. salivarius* K12 içeren probiyotik tablet çözünmüş suları 1 ay boyunca içmeleri sağlanmıştır. İki aylık takip sürecinde, dahil edilen tüm sıçanlardan deney başlamadan önce (T0), 1 aylık (T1) ve 2 aylık (T2) takip süreci sonunda pipetaj yöntemi ile ağız içi örnekler alınmıştır. Alınan tüm örneklerden DNA izolasyonu yapılarak elde edilen DNA izolatlarındaki *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerinin nicel miktarları gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR) ile analiz edilmiştir. Gerçek zamanlı kPZR analizi sırasında kullanılacak olan *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerine özgü primer ve prob tasarımları yapılmış ve ‘TaqMan’ problemlerinin kullanıldığı standart örnekler de dahil bütün reaksiyonlar 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Gerçek zamanlı kPZR analizinden elde edilen verilerin gruplar arası karşılaştırmasında *Lactobacillus* türlerine ait veriler ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi, *S. salivarius* verileri de ‘Kruskal-Wallis’ varyans analizi ile test edilmiştir. *S. salivarius* verilerinin grup içi değerlendirilmesinde de ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi ve Bağımlı Örneklem T-testi ile istatistiksel analizler yapılmıştır. Tüm sonuçlar için istatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak kabul edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda,

Lactobacillus türlerine yönelik T0 ($p=0.131$; $p\geq 0.05$), T1 ($p=0.676$; $p\geq 0.05$) ve T2 ($p=0.435$; $p\geq 0.05$) dönemlerinde alınan örneklerde gruplar arasında ve her grupta kendi içerisinde zamana bağlı değişimi açısından değerlendirildiğinde G1 ($p=0.430$; $p\geq 0.05$), G2 ($p=0.325$; $p\geq 0.05$), G3 ($p=0.882$; $p\geq 0.05$) ve G4 ($p=0.368$; $p\geq 0.05$) istatistiksel fark görülmemiştir. *S. salivarius* verilerinin istatistiksel analizi sonucunda T0 ($p=1$; $p\geq 0.05$) döneminde istatistiksel fark görülmezken; T1 ($p<0.05$) ve T2 ($p<0.05$) dönemlerinde gruplar arasında istatistiksel fark görülmüş ve probiyotik uygulanan tüm gruplarda (G1-G2: $p=0.002$, G1-G4: $p=0.002$, G2-G3: $p=0.001$, G3-G4: $p=0.001$; $p<0.05$) istatistiksel olarak anlamlı fark görülmüştür. Grup içi karşılaştırma sonuçlarına göre, *S. salivarius* için probiyotik uygulanan G1 ve G3 gruplarında sırasıyla T0-T1 ($p=0.018$; $p<0.05$), T0-T2 ($p=0.003$; $p<0.05$) ve T0-T1 ($p=0.03$; $p<0.05$), T0-T2 ($p=0.043$; $p<0.05$) için farklı takip sürelerinde alınan örnekler arasında istatistiksel fark görülürken, yine sırasıyla G1 ve G3 gruplarında T1-T2 ($p=1$; $p\geq 0.05$) ve T1-T2 ($p=0.448$; $p\geq 0.05$) arasında istatistiksel fark görülmemiştir. *S. mutans* verileri incelendiğinde gruplarda kolonizasyon gözlenmemiştir. Hayvanlar üzerinde yürütülen bu çalışmanın sonuçlara göre, probiyotik kullanan gruplarda ise *S. salivarius* kolonizasyonunun anlamlı derecede yüksek olduğu ve probiyotik bırakıldıktan sonra bile etkisinin devam ettiği görülmüştür. Ayrıca, *Lactobacillus* sayısının da hem karyojenik diyet hem de probiyotik uygulanmasından etkilendiği ve anlamlı derecede olmasa da artış gösterdiği görülmüştür. Sonuç olarak, bu çalışma *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizmanın oral mikrobiyota kolonizasyonunu gösterdiğinden, klinik çalışmalar için öncü çalışma olma niteliği taşımaktadır.

Anahtar kelimeler: Dental biyofilm, Karyojenik diyet, *Lactobacillus*, Probiyotik, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* K12

Bu çalışma için gerekli onaylar Başkent Üniversitesi Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan 11.08.2022 tarihinde alınmış ve çalışma Başkent Üniversitesi Araştırma Fonu'na desteklenmiştir (Proje numarası: DA 22/24).

ABSTRACT

EVALUATION OF THE EFFECT OF *Streptococcus salivarius* K12 USE ON ORAL HEALTH

Probiotic microorganisms are known as beneficial microorganisms and their healing effect on general health and supportive effect on immun system have been shown by studies. There are controversial results regarding its effect on the oral microbiota and the prevention of dental biofilm formation, which is the microbial layer that accumulates on teeth and surrounding soft tissues. Therefore, the primary aim of this study was to evaluate the effect of the use of an oral probiotic known as *Streptococcus salivarius* K12 on the number of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* species in the oral microbiota changed after the cariogenic diet. Secondary aim was to evaluate whether the similar effect continues after the probiotic was discontinued. This thesis was a randomized, controlled, follow-up and cross-sectional animal study. Three-five month old, female, 32 Sprague-Dawley rats were included in the study and distributed into 4 groups according to the administration of cariogenic diet and probiotics. These groups were: (G1) Cariogenic diet and probiotics administreted, (G2) Only cariogenic diet administered, (G3) Only probiotics administered, (G4) Group without administration of cariogenic diet and probiotics. The rats included in the study were fed with a sucrose-based bait for 2 months in the groups that received cariogenic diet. Probiotic administered groups were allowed to drink probiotic tablet dissolved water containing *S. salivarius* K12 for 1 month. During the 2-month follow-up period, intraoral samples were taken from all included rats using pipetting method before the start of the experiment (T0), at the end of the 1-month (T1) and 2-month (T2) follow-up period. DNA was isolated from all samples and quantitative amounts of *S. mutans*, *S. salivarius* and *Lactobacillus* species in the DNA isolates were analyzed by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR). Primer and probe designs specific to *S. mutans*, *S. salivarius* and *Lactobacillus* species to be used during real-time qPCR analysis were produced and all reactions, including standard samples, were run in duplicate using TaqMan probes. In the intergroup comparison of the data obtained from real-time qPCR analysis, data for *Lactobacillus* species were tested with Friedman ranked two-way variance analysis, and *S. salivarius* data were tested with Kruskal-Wallis analysis of variance. In the intra-group evaluation of *S. salivarius* data, statistical analyzes were performed using Friedman ranked two-way analysis of variance and Dependent Sample T-test. Statistical significance level was accepted as $p < 0.05$. As a result of statistical analysis, no statistical difference was observed between the groups in the

samples taken during T0 ($p=0.131$; $p\geq 0.05$), T1 ($p=0.676$; $p\geq 0.05$) and T2 ($p=0.435$; $p\geq 0.05$) periods for *Lactobacillus* species, and no statistical difference was observed for each group G1 ($p=0.430$; $p\geq 0.05$), G2 ($p=0.325$; $p\geq 0.05$), G3 ($p=0.882$; $p\geq 0.05$) and G4 ($p=0.368$; $p\geq 0.05$) when evaluated in terms of its change over time. As a result of the statistical analysis of *S. salivarius* data, no statistical difference was observed for T0 ($p=1$; $p\geq 0.05$) period but, statistical difference was observed between the groups during T1 ($p<0.05$) and T2 ($p<0.05$) periods, and statistically significant increase was seen in all groups that administered probiotics (G1-G2: $p=0.002$, G1-G4: $p=0.002$, G2-G3: $p=0.001$, G3 -G4: $p=0.001$; $p<0.05$). According to the intra-group comparison results for *S. salivarius*, there was a statistical difference between the samples taken at different follow-up periods for T0-T1 ($p=0.018$; $p<0.05$), T0-T2 ($p=0.003$; $p<0.05$) and T0-T1 ($p=0.03$; $p<0.05$), T0-T2 ($p=0.043$; $p<0.05$); while there was no statistical difference between T1-T2 ($p=1$; $p\geq 0.05$) and T1-T2 ($p=0.448$; $p\geq 0.05$) samples for G1 and G3, respectively. *S. mutans* colonization was not observed in the groups. According to the results of this study conducted on animals, it was observed that *S. salivarius* colonization was at a significantly higher level in the groups using probiotics and its effect continued even after the probiotic was discontinued. In addition, it was found that the number of *Lactobacillus* species was affected by both cariogenic diet and probiotic administration. In conclusion, this is a pioneer study for in-vivo studies as it evidences the colonization of *S. salivarius* K12 probiotic microorganisms in the oral microbiota even after the discontinuation of probiotics.

Key words: Dental biofilm, Cariogenic diet, *Lactobacillus*, Probiotics, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* K12

The necessary approvals for this study were received from Başkent University Medicine and Health Sciences Research Board and Animal Experiments Local Ethics Committee (Project number: DA 22/24) on 11.08.2022. This study was supported by Başkent University Research Fund (Project number: DA 22/24).

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
ÖZET	ii
ABSTRACT	iv
İÇİNDEKİLER	vi
TABLolar LİSTESİ	viii
ŞEKİLLER LİSTESİ	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ	x
1. GİRİŞ	1
1.1. Oral Mikrobiyota	1
1.1.1. Oral mikrobiyota gelişimi	3
1.2. Mikrobiyal Biyofilm Gelişimi	5
1.2.1. Dental biyofilm oluşumu	6
1.2.2. Dental plak oluşumu	8
1.3. <i>Streptococcus mutans</i>	10
1.3.1. Dental biyofilm oluşumunda <i>Streptococcus mutans</i> 'ın rolü	10
1.3.2. <i>Streptococcus mutans</i> 'ın kolonizasyon mekanizması	12
1.4. Probiyotikler	14
1.4.1. Probiyotiklerin tarihsel gelişimi	14
1.4.2. Probiyotik tanımı ve genel özellikleri	16
1.4.3. Probiyotik mikroorganizmalar	18
1.4.3.1. <i>Lactobacillus</i> spp	19
1.4.3.2. <i>Streptococcus salivarius</i>	20
1.4.4. Probiyotiklerin etki mekanizmaları	21
1.4.5. Probiyotiklerin oral mikrobiyotaya kolonizasyonu.....	24
1.4.6. Probiyotiklerin uygulanma şekilleri.....	25
1.4.7. Probiyotiklerin kullanım alanları.....	26
1.4.7.1. Periodontal hastalıklara etkisi.....	27
1.4.7.2. Diş çürüğüne etkisi.....	28
2. GEREÇ ve YÖNTEM	32
2.1. Etik onay	32

2.2. Ön istatistiksel analiz	32
2.3. Çalışma tasarımı.....	32
2.4. Deney hayvanları hazırlanması.....	33
2.5. Karyojenik beslenme.....	35
2.6. Probiyotik kullanımı.....	35
2.7. Deney hayvanlarından ağız içi örnek alımı.....	36
2.8. Mikrobiyolojik analiz.....	37
2.8.1. DNA izolasyonu.....	38
2.8.2. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu	39
2.9. İstatistiksel analiz.....	42
3. BULGULAR	43
4. TARTIŞMA	50
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR.....	72
EKLER	
EK 1: Proje ve etik kurul onayı	
EK 2: İstatistiksel ön analiz	

TABLÖLER LİSTESİ

	Sayfa
Tablo 1.1. Probiyotikler için yıllar içerisinde yapılmış tanımlamalar	15
Tablo 1.2. En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmaların genel sağlık üzerindeki etkileri	18
Tablo 2.1. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon karışımı (1X)	41
Tablo 3.1. Tüm örneklerdeki <i>Lactobacillus</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılma sonuçları	45
Tablo 3.2. Grup 1 örneklerindeki <i>Lactobacillus</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	45
Tablo 3.3. Grup 2 örneklerindeki <i>Lactobacillus</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	45
Tablo 3.4. Grup 3 örneklerindeki <i>Lactobacillus</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	46
Tablo 3.5. Grup 4 örneklerindeki <i>Lactobacillus</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	46
Tablo 3.6. Tüm örneklerdeki <i>S. salivarius</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılma sonuçları	47
Tablo 3.7. <i>S. salivarius</i> koloni sayılarının her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılmasına yönelik istatistiksel analiz sonuçları	48
Tablo 3.8. Grup 1 örneklerindeki <i>S. salivarius</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	49
Tablo 3.9. Grup 3 örneklerindeki <i>S. salivarius</i> koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları	49

ŞEKİLLER LİSTESİ

	Sayfa
Şekil 2.1. Çalışmanın akış şeması, grupların dağılımı ve örnek alım zamanları	33
Şekil 2.2. Sıçanların tutulduğu kafeslerin görseli, üst rafta karyojenik diyet ve alt rafta standart diyet uygulanan gruplar	34
Şekil 2.3. (a) Kafeslerin kodlandığı harflerin yazılı olduğu kartlar; (b) Sıçanların numaralandırılmasını gösteren kuyruk boyaması	34
Şekil 2.4. (a) Sıçanlara içirilen probiyotik tabletlerin çözdürüldüğü su; (b) Sıçanların su içme şekli	36
Şekil 2.5. (a) Sıçanlardan mikropipet aracılığı ile ağız içi örnek alımı; (b) Steril mikrosantrifüj tüpüne toplanmış bir sıçandan alınmış ağız içi örnek	37
Şekil 2.6. (a) <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG; (b) <i>Streptococcus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> ; (c) <i>Streptococcus mutans</i> ekilmiş plaklar	40
Şekil 2.7. (a) kPZR analizi sırasında PZR karışımlarının hazırlandığı biyogüvenlik kabini; (b) Gerçek zamanlı kPZR analizi sırasında kullanılan cihaz	42
Şekil 3.1. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde <i>Lactobacillus</i> türlerinin nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi	43
Şekil 3.2. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde <i>S. salivarius</i> 'a ait nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi	46
Şekil 3.3. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde <i>S. mutans</i> 'a ait nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi	49

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	deoksiriboz nükleik asit
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
GTÖ	Gıda ve Tarım Örgütü
Ig	immünglobulin
IL	interlökin
kPZR	gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time Of Flight
mRNA	haberci ribonükleik asit
MUC	müsin benzeri özellikler taşıyan glikoprotein
µl	mikrolitre
RNA	ribonükleik asit
rRNA	ribozomal ribonükleik asit
TNF	tümör nekroz faktörü

1. GİRİŞ

İnsan vücudunda bulunan bütün mikroorganizmaların, vücudun tümünü oluşturan hücre sayısından çok daha fazla olduğu 30 yıldan uzun süredir kabul edilen bir gerçektir. Bu mikroorganizmaların özellikle dış ortam ile teması olan vücut dokularından deri, ağız boşluğu, solunum, ürogenital ve gastrointestinal sistemler gibi hemen her yüzeyde bulunduğu bilinmektedir. Bu bölgeler arasında mikroorganizmaların en yoğun kolonizasyonu gastrointestinal sistemde görülmektedir. Bu sistemde kolonize olan mikroorganizmaların kompleks yapısı, insan sağlığı üzerinde önemli rol oynamaktadır. Kültüre bağımlı olmayan yeni moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile bu sistemde yer alan organların florasının içeriği ve çeşitliliği giderek daha iyi anlaşılmaktadır.^{1,2} Bu nedenle, son yıllarda mikroflora terimi yerine mikrobiyota ve mikrobiyom terimlerinin kullanımı tercih edilmektedir. Mikrobiyota; vücudun bir organında veya bölümünde bulunan mikroskopik boyuttaki organizmaların tümünü, mikrobiyom ise; tüm vücutta bulunan mikroorganizmaları ve mikroorganizmaların genetik özelliklerini gösteren elemanları ifade eden terimdir.^{2,3}

1.1. Oral Mikrobiyota

Tarihte ilk kez, Antonie Philips van Leeuwenhoek kendisinden ve başka bireylerden aldığı dental plak örneklerini mikroskopuyla incelemiş ve mikroplara küçük canlı nesneler anlamına gelen ‘Dierken’ adını vermiştir. Sonraki yıllarda, mikroskop ve diğer tanı yöntemlerindeki gelişmelerle birlikte mikroorganizmalara ilişkin bakış açısı giderek derinleşmiştir.^{4,5}

İnsanlarda ağız boşluğu dişler, dişeti oluğu, dil, sert damak, yumuşak damak ve tonsiller de dahil olmak üzere mikroorganizmalar için bir dizi farklı yaşama ortamı içermekte ve insan vücudunun dışını, sindirim sistemini ve solunum yollarını birbirine bağlayan mikroorganizmaların kolonizasyonu için uygun bir alan olan tüp görevi görmektedir. İnsan ağız boşluğunda bulunan mikroorganizmalara ağız mikroflorası, ağız mikrobiyotası veya ağız mikrobiyomu adı verilmektedir.^{5,6} Çeşitli oral mikroorganizmaların etkileşimi, insan vücudunun dışarıdan istenmeyen etkenlerin saldırısına karşı korunmasına yardımcı olurken, mikrobiyal floranın dengesizliği de diş çürüğü ve periodontitis gibi ağız hastalıklarının, oral mukoza ve gastrointestinal sistem hastalıkları gibi sistemik hastalıkların gelişmesine de neden olmaktadır.⁵⁻¹⁹

Sonuç olarak, oral mikrobiyota insan mikrobiyal topluluğunun oluşmasında ve insan sağlığında önemli rol oynamaktadır.¹⁹ İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı, insanla ilişkili bir mikrobiyomun ilk derlenmiş tanımıdır ve mikrobiyomun sağlık ve hastalıktaki rolünün anlaşılmasında kullanılacak araçları içermektedir. İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı'nın temel amacı, bilim camiasına insan ağız boşluğunda bulunan yaklaşık 700 prokaryot tür hakkında kapsamlı bilgi sağlamaktır. İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı mikroorganizma kültürüne dayanmaktadır. Ancak İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı verilerinin büyük bir kısmının (%20-60) kültüre edilemez olduğu tahmin edilmektedir.²⁰ Birçok türün kültüre edilememesi, İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı'nın genişletilmesi için önemli bir sınırlandırma olarak kabul edilmesine rağmen, kültür durumları mikroorganizma etkileşimlerine bağlanarak bu durum çözülmeye çalışılmaktadır.

İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı, seçilmiş 16S rRNA gen bazlı geçici adlandırma şemasına dayanmaktadır. Son 20 yılda 600'den fazla 16S RNA gen kütüphanesi dizilenmiş ve 35.000'den fazla klon dizisi elde edilmiştir. Örnekler sağlıklı, çürük, periodontal hastalık, endodontik enfeksiyonlar ve ağız kanseri gibi bir düzineden fazla hastalık durumuna sahip hasta bireylerden alınmıştır. İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı, sekans verilerini fenotipik, filogenetik, klinik ve bibliyografik bilgilerle bağlamaktadır. İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı, verilerinin organizasyonu, entegrasyonu ve sunumu, bağırsak, deri, vajina gibi insan vücudunun diğer bölgelerinden alınan mikrobiyom verileri için model olarak kullanılmaktadır.^{6,11,21-23}

İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı'nda listelenen yaklaşık 150 cins ve 700 tür bulunmaktadır. Bunların %51'i resmi olarak adlandırılmış, %13'ü kültürü yapılmış ancak adlandırılmamış ve %28'i kültürü yapılamamış filotipler olarak kaydedilmiştir.²³ İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı'nda 400 oral taksonun ve 1.300'den fazla mikroorganizma türünün genomları mevcuttur. Örneğin *Streptococcus* birçok cinsten daha fazla çeşitliliğe sahip bir cinstir.²⁴ İnsan Oral Mikrobiyomu Veritabanı'nda diş çürüğü gelişiminde önemli rolü bulunan *Streptococcus* cinsinin 43 türünden 26'sı isimlendirilmiş ve 9'u isimlendirilememiştir. Otuz oral takson ve 202 *Streptococcus* türü için genomlar veritabanında bulunmaktadır. Ayrıca oral, vajinal ve bağırsak mikrobiyotasının üyesi olan *Prevotella* cinsinin 53 türü veritabanında kayıtlı bulunmakta ve bunların 32'sinin tür ve 67 suşunun genomu da sistemde tanımlanmıştır.²⁵

İnsan Mikrobiyom Projesi, Amerikan Sağlık Enstitüsü önderliğinde insan vücudunda bulunan tüm mikroorganizmaların genetik özelliklerini gösteren elemanlarındaki dizilimi öğrenebilmek amacıyla kurgulanmıştır. İnsan Mikrobiyom Projesi, insan mikrobiyotasının kapsamlı karakterizasyonu ve bunların insan sağlığı ve hastalığındaki rollerinin analizine olanak tanıyan araştırmaların kaynağı olarak tanımlanmıştır.²⁶ Proje kapsamında, çalışmaya dahil edilen 242 sağlıklı bireyler arasında kadınlardan 18, erkeklerden ise 15 vücut bölgesinden başta ağız boşluğu, burun boşluğu, vajina, bağırsak yolu ve deri olmak üzere beş ana vücut bölgesinden, toplam 4788 örnek alınmıştır.^{20,26} Bölgelerin yarısından fazlasını oluşturan ağız boşluğu ve orofarinksten tükürük, yanak içi mukoza, keratinize dişeti, damak, tonsiller, boğaz ve dilden yumuşak doku örneği ve dişeti üstünden ve altından diş plağı olmak üzere dokuz farklı bölgeden örnek toplanmıştır. Toplanan örneklerden dizilimi yapılabilen oral bakteriler, tüm vücut bölgelerinin %26'sını oluşturmuştur.^{27,28}

Çalışmanın sonuçlarına göre, ağız boşluğunda çoğu bölgede *Streptococcus* baskın olmakla beraber, yanak içi mukozada *Haemophilus*, dişeti üstünden alınan dental plakta *Actinomyces* ve dişeti altından alınan dental plakta *Prevotella* bulunmuştur. Ayrıca, dahil edilen bireylerdeki mikrobiyal kolonizasyonun tür ve suş seviyesine kadar değiştiğini ve sağlıklı bir popülasyonda metabolik yollar stabil kalırken mikrobiyal taksonların çeşitliliğini göstermiştir.²⁸ Ayrıca, sağlıklı bireylerde mikrobiyota ile başta zaman, yaş, diyet ve çevre olmak üzere cinsiyet, eğitim düzeyi, doğum şekli ve bebeklik döneminde emzirip/emzirmeme gibi faktörler arasında güçlü ilişkiler olduğu da bildirilmiştir.²⁹⁻³⁵

1.1.1. Oral mikrobiyota gelişimi

Gastrointestinal sistem mikrobiyotası farklı cins ve türde mikroorganizmalardan oluşan bir ekosistemdir. Oral mikrobiyota çevreden en fazla etkilenen bölgedir ve gastrointestinal sistemin başlangıç noktasıdır. Yenidoğan bebeklerde, doğum sırasında gastrointestinal sistemin steril olduğu kabul edilmektedir. Yenidoğan bebek, doğum ile mikroorganizma içermeyen uterus içi yaşamdan oldukça kontamine olan uterus dışı yaşama geçiş yapmaktadır.¹⁻³ Son yıllarda yayınlanan bazı çalışmalarda, fetüsün amniyon sıvısını yutmasından dolayı bağırsaklarının mikroorganizmalar ile karşılaştığı da ileri sürülmektedir.^{1,2,14,36} Ancak bu konuda yeterince veri bulunmadığından halen tartışmalıdır.

Doğum sırasında, mikroorganizmaların mukozal membranlara kolonizasyonu bebek ilk nefesini almadan önce başlamakta ve yaşamının ilk günlerinde hızla artmaktadır.

Doğumdan sonra başlayan kolonizasyon çeşitli faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler annenin yaşı, vajinal veya sezaryen doğum gibi bebeğin doğum şekli, annenin doğum yaptığı yer ve hijyenik koşulları, bebeğin doğum sırası, neonatal beslenme şekli, antibiyotik kullanımı ve genetik faktörlerdir.^{1,2,29,36,37} Bu faktörlerden annenin florası, başlangıç mukozal kolonizasyonu önemli ölçüde etkilemektedir. Doğum şekline bağlı sezaryenle doğan, prematüre doğan veya perinatal ya da postnatal dönemde antibiyotik kullanan bebeklerde yararlı mikroorganizmaların kolonizasyonu gecikmektedir. Bunun dışında, vajinal doğum şekli ile doğan, anne sütü veya mama ile beslenen bebeklerin florası 2 gün içerisinde anneye benzemeye başlarken, 7. güne doğru mama ile beslenmeye başlayan bebeklerin 2/3'ünde yüksek oranda, tamamen anne sütü ile beslenenlerde ise %22 oranında *Bacteroides fragilis* bulunmaktadır. Ayrıca, bebeklik döneminde beslenme tipine bağlı olarak anne sütü ile beslenen bebeklerin bağırsaklarında mama ile beslenenlere göre *Bifidobacterium* türleri de daha fazla bulunmaktadır.^{1,5,38,39}

Bebeklik döneminde beslenme başladıktan sonra bakteri çeşitliliği gittikçe artmaktadır. Yenidoğanda bakterilerin kolonizasyonunu inhibe edebilen antikör seviyesi düşük olduğundan mikrobiyal kolonizasyon başlayabilmektedir. Erken bebeklik döneminde sadece yumuşak dokulara ait mukozal yüzeyler olduğundan, sert doku yüzeyleri olmadığından mikrobiyal tür çeşitliliği azdır. Mukozal yüzeylere ve birbirlerine tutunarak kolonize olan ilk türler *Actinomyces* ve *Streptococcus* türleridir.^{2,5,36}

Ağız ortamında en sık bulunan ve kültürü yapılabilen *Fusobacterium nucleatum* oral biyofilm oluşumunda önemli rol oynamaktadır. *F. nucleatum*'un kolonizasyonunun ardından başta aerob bakterilerden *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Actinomyces* ve *Neisseria* türleri tarafından ve anaerob bakterilerden *Veillonella* türleri ve *Prevotella melaninogenica* kolonizasyonu ile devam eder. Ağız ortamında sert doku görevi gören dişlerin sürmesi ile de dişler üzerindeki çukur ve oluklar mikroorganizmaların kolonize olabileceği retantif alan görevi gördüğünden mikrobiyal çeşitliğin artmasına neden olur.^{8,39-41}

Oral mikrobiyota genel olarak diğer bireylerden direkt veya indirekt geçiş sonucunda oluşmaktadır. Prenatal dönemde annenin ağız sağlığı ve perinatal dönemde antibiyotik kullanımı etkisiyle değişirken, postnatal dönemde de antibiyotik kullanımı, ağız hijyeni, çevrede sigara içilmesi ve şeker tüketimi gibi faktörlerin etkisinde gelişmektedir. Ayrıca, postnatal dönemde oral mikrobiyota gelişirken tükürük aracılığı ile anne, bakıcı veya çevredeki bebeklerden direkt ağız yolu ile veya indirekt ortak araç (emzik, kaşık vs.)

kullanımı ile geçiş gerçekleşmektedir. Oral mikrobiyota gelişirken en fazla bu geçişlerin etkisiyle ağız hastalıkları geliştiğı bilinmektedir.^{14,39,42-44}

1.2. Mikrobiyal Biyofilm Gelişimi

Mikroorganizmaların üzerinde taze ve kuru doku artıkları olan tıbbi aletlerin yüzeyinde, dişlerin en dış yüzeyinde bulunan mine dokusu, kalp kapakçığı, akciğer, orta kulak gibi dokulara yerleşerek, kolonize olduğı ve çoğaldığı bilinmektedir. 18. yüzyılda mikroorganizmaların sadece tek hücre formunda yaşamadığı aynı zamanda müsilağınöz yapıda hücre dışı madde içerisinde kümeler kurabildiğı gösterilmiştir. Sonraki yıllarda da hücrelerin, dokuların yüzeylerine yapışarak kolonize olduğı ve çoğalarak oluşturduğu bu tabaka biyofilm olarak adlandırılmıştır. Biyofilm tabaka, mikroorganizmaların canlı veya ölü yüzeylere tutunarak kolonize olmaları, çoğalmaları ve hücre dışı polimer üreterek matriks oluşumu içerisine gömülmeleri ile oluşmaktadır.^{40,45,46}

Biyofilmin çevresi primer polisakkarit tabaka ile kaplanmakta ve mikroskobik düzeyde incelendiğinde, iç yapısında kanal benzeri boşlukların ve piramit veya mantar şeklinde oluşumların görüldüğü mercan resiflerindeki benzer yapıda görülmektedir.⁴⁵ Biyofilmler genellikle organize yapıdadır. Biyofilmin alt plak katmanları daha yoğun, polisakkarit ağının oluşturduğu kanal benzeri boşluklarda bulunan mikroorganizmalar, organik ve inorganik yapılar birlikte bulunmaktadır. Alt biyofilm katmanının üzerinde görünümü sık sık değişen, daha zayıf bir tabaka bulunmaktadır. Biyofilme en yakın olan katman ise altındaki tabakaya göre hareketli, akışkandır.^{45,47,48}

Mikrobiyal türlerin örneğın, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermidis*, *Legionella pneumophila* veya *Pseudomonas aeruginosa* patojenitesi doku, kateter ve implant gibi sert yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneğı ile bağlantılıdır.^{49,50} Bu özellik, mikroorganizmaların üç boyutlu yapı oluşturarak antibiyotiklere ve değişen çevre koşullarına daha dirençli olmasını sağlamaktadır. Bu direnç genelde bakteriler arası ilişkide değişim ve yapılarında bulunan koruyucu ekzopolisakkarit matriks varlığına bağlı gelişmektedir. Ayrıca, bulundukları bölgeye göre yapısal olarak da farklılaşırlar. Örneğın oral kavitedeki biyofilm tabakalar, bakterilerin kolonize oldukları yumuşak ve sert doku yüzeylerine göre mikrobiyal içerik olarak farklılaşır. Ayrıca, oral kavitenin en önemli özelliklerinden olan tükürük varlığı nedeniyle salınan tükürük proteinleri de bakteriyel

kolonizasyonu etkiler ve vücudun diğer bölgelerine göre farklı çeşitlilikte mikrobiyal biyofilm oluşumunu sağlar.⁴⁷

Biyofilmler her zaman zararlı olmamakla beraber genel olarak toplum sağlığı için sorun oluşturabilmektedir. Bazı biyofilmler vücudumuzun normal florasında bulunur ve vitamin üretilmesini sağlarken, bazıları mikroorganizmaların antibakteriyel ajanlara karşı direncini arttırdığı ve tıbbi aletlere yapışarak vücutta enfeksiyona neden olabildikleri için zararlı sayılabilmektedir.^{46,51}

1.2.1. Dental biyofilm oluşumu

Biyofilm oluşumu çok adımlı ve oldukça karmaşık bir süreçtir. Ağız boşluğunda bu sürecin doğru bir şekilde ilerlemesi için birtakım faktörler ve koşullar gereklidir. Ağız mikrobiyotası, bireyden bireye hatta aynı bireyde, ağızdaki farklı alanlarda bile değişiklik gösterebilir. Farklılıkları ve bu farklılıklara neden olan dinamik ve karmaşık ilişkiyi anlayabilmek için ağız içi bölgeler, morfolojik ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak incelenebilir.^{20,23,25} Büyüme gelişim devam ettikçe ağız içi bölgelerde farklı mikroorganizma yaşam alanları gelişmeye başlar. Farklı anatomik, fizyolojik özellikler, oksijen varlığı ve miktarı, besin içeriği, ısı duyarlılığı ve doku bağışıklık yanıtı gibi farklılıklara bağlı olarak bu yaşam alanlarında mikroorganizma grupları farklılaşır. Oral mikroorganizmaların kolonize olacağı bölgeyi veya dokuyu seçmesindeki en önemli faktör yüzey dokusunun özellikleridir ve doku özelliklerine göre bazı türler daha baskın hale gelir. Oral mukozada bulunan yumuşak ve diş yüzeyindeki mine gibi sert dokulara kolonize olabilen mikroorganizma türleri farklılık göstermektedir. Örneğin; *S. mutans* sert doku yüzeylerine kolonize olabilmektedir.^{3,25,47,52,53}

Ağızda bulunan bakterilerin önemli bir virülans faktörü, birbirleriyle koagregasyon yoluyla etkileşime girebilmeleridir. Koagregasyon, bakteriler için fiziksel bir etkileşim yolu olup, genetik özelliklerine göre birbiri ile aynı yapıdaki hücreler arasında gelişen etkileşimi tanımlamaktadır. Koagregasyon çiftinden birisi reseptör genelde polisakkarit yani karbonhidrat yapısında ve tamamlayıcı özellikte olan diğeri de adezin protein yapısında olup, genetik olarak birbirinden farklı olan bu iki molekülün birbirine yapışmasını ifade etmektedir. Bakteri hücrelerinin koagregasyonu ilk olarak 1970 yılında bakteri plağında görülmüştür. Koagregasyon etkileşimleri, biyofilm tabakanın gelişimine iki şekilde yardımcı olmaktadır. Birinci yol, her bir bakteri hücrelerinin gelişen biyofilimde bulunan farklı

genetikteki hücreleri tanınması ve hücrelere adezyonu; ikincisi ise, koagreasyon sonucu gelişen biyofilme geç kolonize olan bakterilerin adezyonu şeklindedir.^{40,48,52,54}

Diş yüzeyinde oluşan biyofilm tabakanın ana bileşenleri (kuru ağırlığın %10-20) glukoz, (kuru ağırlığın %1-2) fruktan ve (kuru maddenin %40) proteinlerdir. Ayrıca farklı seviyedeki yağ, kalsiyum, magnezyum, flor ve fosfor içeriğinden dolayı da tükürükten farklılık gösterir. Hücresel olarak %80 su içerir.⁵¹ Dental biyofilmin yapısı heterojendir ve mikroorganizma kitlelerinin aralarında bakterilere difüzyon yoluyla besin ulaştıran kanalcıklar bulunmaktadır. Bu kanalcıklar sayesinde, biyofilmde bulunan bakteriler tarafından üretilen maddeler biyofilm içerisinde korunurlar. Bu yüzden farklı bakteri türleri arasındaki metabolik etkileşimlerin tetiklenmemesini sağlarlar.^{46,51} Biyofilmin ağısı yapısında bulunan boşluklar içerisinde polisakkarit, protein, glikoprotein ve lipid yapısında organik maddeler bulunur. Ayrıca, dişeti oluşu sıvısından gelen albümin ve tükürükten gelen glikoproteinler de dental plakta bulunurlar. Tükürükteki aglütininler ile bakteriler arasında ve aynı zamanda mikroorganizmalar arasında meydana gelen etkileşimler, kolonizasyonu başlatan hücrelerden oluşan dil pası oluşumuna neden olabilir. *Actinomyces*, *Streptococcus*, *Lactobacillus* ve *Candida* türleri bu kolonizasyonu başlatarak biyofilm oluşturabilen mikroorganizmalardır.^{48,52,53,55,56}

Biyofilm içerisinde bulunan inorganik bileşen olarak minerallerden sodyum, potasyum, flor, kalsiyum ve fosfat yüksek oranda bulunur. Kaynakları tükürük olduğu için, tükürük kanallarına yakın yerlerde biyofilm içerisindeki mineral oranı yükseleceğinden, oluşan dental plak sertleşmeye başlar. Örneğin, alt çenede bulunan ön keser dişlerin dil tarafındaki yüzeyinde veya üst çene büyük azı dişlerin yanak tarafındaki yüzeylerinde biriken dental plak, ağız içerisindeki diğer bölgelere göre daha kısa zaman içerisinde sertleşmektedir. Sistemik hastalığı bulunan bireylerde oluşan biyofilm tabakalarının içeriği ve oluşum süresi değişkenlik göstermektedir. Sağlıklı bireylerde, iki saatte oluşan biyofilm tabakasında çoğunlukla *Actinomyces* türleri bulunmaktadır. *Streptococcus oralis* ve *Streptococcus mitis* ise altı saat sonrasında çoğunlukta bulunmaktadır. Geç kolonize olan türler ise *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Eubacterium* türleri, *Treponema* türleri ve *Porphyromonas gingivalis*'dir. *F. nucleatum* erken ve geç kolonize olan türler arasında bağlantı sağlamaktadır. Biyofilm tabaka olgunlaştıkça geç kolonize olan bakteri türlerinin sayısı artmaktadır. Biyofilm oluşumu sırasında gerçekleşen bakteri kolonizasyonu, bakteriler arası mutualist ilişkiye bağlı olarak artabilmektedir.

Örneğin, yapılan deneysel çalışmalarda, *Actinomyces naeslundii*'nin tükürük içerisinde kendi başına çoğalamadığı ancak *S. oralis* ile koagregasyonu sonucunda biyofilm tabaka oluşturabildiği gösterilmiştir.^{5,6,40,55,57-59}

Erken veya diğer adıyla birincil kolonize olan bakteriler birbirleriyle koagregasyon yapabilirken, geç veya ikincil kolonize olan bakterilerle yapamazlar. Örneğin, geç kolonize olan bakterilerden *P. gingivalis*, dişeti hastalıklarına neden olan önemli bir periodontal patojen olup, erken kolonize olan *Streptococcus gordonii* ile koagregasyon yapabilir. *S. gordonii* ile *F. nucleatum* koagregasyon yapabilir ancak geç kolonize olan *A. actinomycetemcomitans* ile yapamaz. Geç kolonize olan bakteriler birbirleriyle koagregasyon yapamazken, *F. nucleatum* ile koagregasyon yapabilirler. *F. nucleatum* erken ve geç kolonize olan bakteriler arasında köprü görevi yapar, hatta geç kolonize olan birçok bakteri *F. nucleatum* yoksa biyofilm tabakaya katılamaz. Dental plak üzerinde bulunan anaerob bakterilerden *P. gingivalis*, *F. nucleatum* ile koagregasyon yapamazsa dental plakta yaşayamaz. Bakterilerin koagregasyon yapabilmeleri klinikte karşılaşılan bazı durumların nedenini de açıklamaktadır. Örneğin, diş çürüğünün birincil etkeni olan *S. mutans*'in erişkinlerde periodontitis durumunda görülmemesi *P. gingivalis*'in *S. mutans*'a bağlanamayıp *S. gordonii*'ye bağlanması ile açıklanabilmektedir.^{54,58-60}

1.2.2. Dental plak oluşumu

Dental plak yani diş yüzeyinde biriken plak genelde üç adımda oluşmaktadır. İlk adımda, düzenli fırçalama olmaması, yapısal bozukluk veya şeker ağırlıklı diyet tüketimi gibi bir nedenden dolayı dişin dış yüzeyinde pelikül tabaka birikmektedir. Ardından, diş fırçalamanın halen devam etmemesi ile pelikül tabaka üzerine bakterilerin adezyonu gerçekleştikten sonra, son olarak da bakteriler kolonize olduğu zaman dental plak oluşmuş olur. Pelikül tabaka oluşumundan kısa bir süre sonra, tabaka üzerinde birbirlerine bağlı mikroorganizmalar kümeler halinde büyümeye başlamakta ve bu kümeler de birbirleriyle birleşip mikro kolonileri ve bakteriyel kolonileri, daha sonra da biyofilm tabakasını oluşturmaktadır.^{40,55}

Biyofilm tabakaya ilk kolonize olan mikroorganizmalar gram pozitif koklardan *Streptococcus sanguinis* ve *S. gordonii*'dir. Bu aşamada, tabakaya kolonize olmuş bu bakteriler arasında iç bağlantılar oluşur. Aslında ağızda bulunan tüm bakteriler, hücreler arası etkileşimi sağlayan yüzey moleküllerine sahiptir. Hücreler arası etkileşim sürecinde, en

spesifik olarak bakterilerin hücre yüzeylerinde bulunan protein ve karbonhidrat moleküllerinin stereokimyasal etkileşimi ve daha az spesifik olarak hidrofobik, elektrostatik ve Van der Waals kuvvetler kaynaklı etkileşimleri gerçekleşmektedir.^{52,53,58-60}

Pelikül tabaka oluşumunu takiben, diş yüzeyi mikroorganizmalar için uygun hale gelmeye başlar ve 24 saat sonunda erken (primer) kolonizasyon gerçekleşir. Primer kolonizasyonda fakültatif anaerob gram pozitif koklar yerleşirken, *S. sanguinis* yüksek oranda bulunur. Biyofilmde bulunan mikroorganizmaların artması için gram pozitif basiller de ortama gelir ve en son gram negatif basillerin gelmesi ile dental plak organize olur. İlk kez 1683 yılında, Leeuwenhoek tarafından mikroskop altında dental plaktaki mikroorganizmaların varlığı gösterilmiştir. 1924 yılında J.K. Clarke tarafından bir çocuğun diş çürüğünden *Streptococcus* izole edilmiş ve *S. mutans* olarak isimlendirilmiştir. 1960'lı yıllarda ise, deney hayvanlarındaki diş çürüğünün bulaşıcı, enfeksiyöz bir hastalık olduğu gösterilmiştir.^{11,45,52,58,59}

Yapılan mikrobiyoloji çalışmalarında, 1 gram plakta yaklaşık yüz milyar bakteri bulunduğu fakat plakta bulunan tüm türlerin henüz bilinmediği bildirilmiştir. Ayrıca, dental plakta bulunan bakteriler çeşitli olup aşağı yukarı 500'den yüzden fazla bakteri çeşidi bulunmaktadır.^{20,23,25} Dental plak ve dişeti komşuluğuna bağlı olarak dişetinin üzerinde ve dişetinin altında bulunan dental plak şeklinde olarak ayrılabilir. Ayrıca, dişetinin üzerinde biriken dental plak genelde dişeti marjın kısmında lokalize olduğundan marjinal plak da denilmektedir. Dişetinin altında bulunan dental plak ise dişeti cebi içerisinde bulunmaktadır.^{40,55}

Dişetinin üzerinde ve altında bulunan dental plak içerisinde bakteri türleri farklılık göstermektedir. Dişetinin üzerindeki dental plakta bulunan bakteriler arasında çoğunlukla gram pozitif koklar bulunurken, gram negatif koklar ve spiroketler de bulunabilmektedir. Dişetinin üzerindeki plak genelde üst üste yığılmış, birikmiş katmanlar olarak görünmektedir. Dişetinin altındaki plakta ise, dişeti cebi içerisinde bulunan kan ve dişeti oluğu sıvısı kaynaklı ve redoks potansiyeli de düşük olduğundan anaerob bakteriler çoğunlukta bulunmaktadır. Dişetinin altındaki plağın ilk tabakasında farklı tipte biyofilmlere neden olurlar. Biyofilm olgunlaşmasını, sonraki bakterilerin toplanmasını ve büyümesini takip eder. Yedi gün sonra *Streptococcus* bakterilerinin sayısı azalırken *F. nucleatum*'un sayısı artar ve 3 hafta sonra ise dişeti altındaki plak morfolojik olarak dişeti üzerindeki plağa benzemeye başlar.^{5,40,41,54,58-63}

Dişeti üzerindeki biyofilmin mimarisinde dört katman ayırt edilebilir. Biyofilmin ilk katmanı, üst katmandaki hücrelere göre daha az floresans sergileyen hücrelerden oluşur. Bu *Actinomyces* türlerinin varlığını gösterir. Bu katmanda fizyolojik olarak aktif olmayan veya ölü hücreler de bulunabilir. Ara katmanda, floresansı *F. nucleatum* ve *Tannerella* türlerini çoğunlukla da *Tannerella forsythia*'yı gösteren, iğ şeklinde birçok hücre bulunur. Biyofilmin üçüncü katmanı ve ara katman esas olarak *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* adı verilen ve esas olarak gram negatif bakteriler *Tannerella*, *Prevotella* ve *Bacteroides* türlerinden oluşan bir bakteri kümesinden oluşur. Üst biyofilm katmanının yapısına yönelik yapılan araştırmalar, spiroketlerin çok sayıda kolonize olduğunu göstermiştir. Dişeti altındaki biyofilmden daha heterojen olan dişeti üzerindeki biyofilmdir. Dişeti üzerindeki ve altındaki biyofilmdaki bakteri tür ve oranları değişse de *S. mutans* her iki biyofilimde de ortak bulunan ve biyofilm tabakanın ana patojeni olarak bilinen bakteridir.^{41,59,61}

1.3. *Streptococcus mutans*

S. mutans genelde insanlarda oral mikrobiyotada bulunan gram pozitif, fakültatif anaerop bir bakteridir. Mikroorganizma ilk kez dental biyofilmden izole edilmiş ve 1924 yılında Clarke tarafından tanımlanmıştır.⁶⁴⁻⁶⁶ Gram pozitif bakterilerden olduğu için Gram boyaması ile koyu mavi veya mor renkte görünmektedir.^{8,40} Ağız içerisindeki sert doku bölgesi olan dişler üzerinde kolonize olarak en sık diş çürüğü oluşumunda rol oynayan *S. mutans*, bakteriyel infektif endokardit ve bakteriyemiye de neden olduğundan ciddi sistemik sorunlara neden olan fırsatçı patojen mutans grubu streptokokların başında gelmektedir.^{8,55,67}

1.3.1. Dental biyofilm oluşumunda *Streptococcus mutans*'ın rolü

S. mutans ile ağız boşluğundaki diğer mikroorganizmalar arasında meydana gelen etkileşimler, biyofilm oluşumunun hem gelişimine hem de inhibisyonuna katkıda bulunabilir. Bu mücadelede sentetik ürünlerin yanı sıra probiyotikler ve spesifik antimikrobiyal proteinler gibi doğal ürünlerin potansiyelinden yararlanmak önemlidir. Bu maddeler, yapay olarak üretilmiş numunelere kıyasla önemli ölçüde daha az sayıda yan etki gösterir ve belirli çevresel koşullar altında kullanıma uygundur. Bu da ürünlerin yüksek düzeydeki aktivitesinin uzun süre boyunca korunmasına olanak tanır.^{41,45,54}

Ağız boşluğunda kolonize olan mikroorganizmalar arasındaki etkileşimler, biyofilm gelişimini etkileyen ardışık ana faktörlerdir.^{63,68,69} Mikroorganizmalar arasında meydana

gelen etkileşimler bu sürecin hem hızlanmasına hem de engellenmesine neden olabilir. Dolayısıyla *S. mutans*'ın virülansı yalnızca ağız boşluğunun çevresel koşullarına değil, aynı zamanda bakteriyel floranın bileşimine de bağlıdır. Diş çürüğünün etiyolojik faktörlerinden biri olarak *S. mutans* ile fizyolojik floranın bileşenleri, örneğin *S. oralis*, *S. sanguinis* veya *Lactobacillus casei* arasındaki etkileşimlerin analizi, ikili kültürlerin yapılmasıyla mümkün olmuştur.^{45,46,63}

Kreikemeyer ve arkadaşları⁷⁰ biyofilm yapısını anlamaya yönelik yaptıkları çalışmalarında *Streptococcus*'un patojenite belirteçlerinin bakteri yüzeyinde gözlenen pilus benzeri yapıdaki uzun filamen yapılarının keşfi ile bağlantılı olduğunu bildirmişlerdir. Bu yapılar patojen *Streptococcus* türlerinin biyofilm oluşturmalarının yanı sıra konak hücre ile dokularına bağlanmasında anahtar rol oynayan adeziv özellikler de göstermektedir. Çalışma, *Streptococcus pyogenes*'in tanımlanan pilusunun bakterinin adezyonundan ve konak hücre yüzeylerinde mikro koloni oluşumundan sorumlu olduğunu ve özellikle insan tükürüğü etkisiyle agregasyonunu göstermiştir. *Streptococcus agalactiae*'nin patojenitesinde, bu yapıların bağlanma ve epitel bariyeri geçmek gibi konak hücreler ile etkileşime girdiği gösterilmiştir. Aynı zamanda biyofilm benzeri yapıdaki bakteri kümelenmesinden de sorumludur. *Streptococcus pneumoniae*'nin neden olduğu hastalık patogeneğinde *Streptococcus* türlerinde olduğu gibi adezyon ve kolonizasyon süreçlerinde etkin olduğu gösterilmiş ve pilus oluşma ihtimalinin *Streptococcus* türlerinden düşük (%30'dan az) olduğu belirtilmiştir.⁷¹

S. mutans izolatlarının biyofilm oluşturma yeteneğinin insan ağız ortamına kolonize olan diğer *Streptococcus* türlerinden daha fazla olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır.⁷² Biyofilm oluşturan *S. mutans* hücrelerine odaklanan çalışmalar, biyofilm oluşturan ve planktonik kültürlerle karşılaştırıldığında bazı proteinlerin farklı bir ifade sergilediğini göstermiştir.⁷³ Biyofilm oluşturan hücrelerin artmış virülansı planktonik kültürlerle kıyaslanınca düşük pH'a artmış toleransla ilişkilendirilmiştir.⁵¹

Ağız boşluğundaki biyofilmler diş minesini, diş kökleri veya dental implantların yüzeyine tutunabilen bakteri suşlarının oluşturduğu üç boyutlu yapıya sahiptir. Bu bakteri suşları ekzopolisakkarit matriks içine gömülüdür ve bu biyofilmlerin yapısında 700'den fazla bakteri türü bulunduğu bildirilmiştir.^{61,74,75} Ekzopolisakkarit matriksin yapısı ve bileşimi, ağız boşluğundaki mevcut koşullar ve zaman içindeki değişim ile belirlenir. Böylece ekzopolisakkarit matriks, biyofilmin fiziksel ve biyokimyasal özelliklerini

etkiler.^{51,76} Ekzopolisakkarit matriksin birinci kaynağı glukoztransferaz ve fruktotransferaz, süktroz ve nişasta hidrolitleri ile etkileşim ürünleridir. Polisakkarit matriks içerisindeki ekzopolimerler stabil yapıyı oluşturur ve bakteri hücrelerinin bağlanmasını sağlar.^{51,76,77}

Biyofilm oluşum süreci tükürük pelikülünün dış yüzeyini kaplaması ile başlar.^{51,75} Bu pelikül yapı, prolinden zengin proteinler, amilaz, lizozom, histatin, peroksidaz, müsin, lipoteikoik asit ve glukoziltransferaz gibi bakteriyel bileşenlerin oluşturduğu tükürükte bulunan bileşenler tarafından oluşturulur ve özellikle sonradan kazanılan mine pelikülüne absorbe edilir.^{51,53,78} Sonradan kazanılan mine pelikülü, ağız boşluğunda kolonize olmuş mikroorganizmaların indüklediği biyofilm oluşumunun temelini oluşturur.^{53,78}

1.3.2. *Streptococcus mutans*'ın kolonizasyon mekanizması

S. mutans hücreleri ve onların çökeltileri, pelikül ile süktroz bağımlı ve süktroz bağımsız olmak üzere 2 mekanizma ile birleşebilir.^{61,63,79} Plak oluşumunda süktroz bağımlı mekanizma temelinde glukoziltransferaz ve *S. mutans* ile glukan bağlayan proteinlerin birleşimi şeklinde etki gösterir.^{51,53,63,80} Glukoziltransferaz, dental plak gelişiminde kritik rol oynar. Süktrozdan glukan oluşumundan sorumludur ve sentezlenen glukankar sayesinde, mikroorganizmaların birbirine ve dış yüzeyine bakteri adezyonunu sağlar. Bu süreç sayesinde de biyofilmin temelini oluşturan mikro koloniler oluşur. Glukoziltransferazın 3 tipinin (B, C, D) her biri biyofilm oluşumunda benzer rol oynadığından dolayı birinde ya da hepsinde sorun görülmesi biyofilm oluşum sürecinde aksaklık yaratabilir.⁸⁰

Klinik olarak glukoziltransferaz yaklaşık 1 dakika gibi kısa bir sürede tükürük pelikülü ile kaplanmış minenin hidroksiapatit yüzeyine absorbe olur. Glukoziltransferaz-B, birincil olarak çözünmeyen glukandan zengin α -1,3 zincirlerini sentezleyen diğer *S. mutans* bakterileri ile etkileşimden ve bu etkileşim sonucunda biyofilm yapısını oluşturan fazla farklılaşmış mikro kolonilerin oluşumundan sorumludur.^{53,81} Çevredeki glukoz varlığında aktivitesi anlamlı derecede artar ancak bu ender görülen bir durumdur. Glukoziltransferaz-D ağırlıklı olarak çözünebilir, hızlı metabolize olan polisakkaritleri oluşturur ve glukoziltransferaz-B için primer gibi davranır.^{51,82}

Glukoziltransferaz-S enzimi kendi glukoziltransferaz enzimini sentezleyemeyen bakterilerde, diğer bakteri hücrelerine bağlanabilme yeteneğini sağlar. Bundan dolayı, glukoziltransferaz-S ve mikroorganizmalar arasında gelişen kooperasyon bakteri hücrelerinin stabil bağlarla güçlü bir şekilde dış yüzeyine bağlanabilmesini sağlar.^{51,76,82}

Glukoziltransferaz enzimleri, tükürük bileşenleri ile etkileşime girer. Bu enzimlerden, amilaz, aktiviteyi ve hidroksiapatit emilimini engeller; lizozom, glukoziltransferaz-B aktivitesini azaltır fakat enzimler tarafından oluşturulan glukanların karakterini etkilemez; peroksidaz, tüm glukoziltransferaz enzimlerinin aktivitesini inhibe eder.^{51,53}

Sükroz bağımsız mekanizma *S. mutans*'ın virülansı ile ilgili değil tamamen adezyonu ile ilgilidir. Adezyonun ikinci mekanizması olarak kabul edilen sükroz bağımsız mekanizma, *S. mutans* ve sonradan kazanılan mine pelikülü arasındaki adeziv partiküllerle etkileşimi sağlamaktadır. Biyofilm oluşum sürecinde, tükürük aglütininleri yüzey bakteriyel adezinler kadar önemli rol oynar.^{40,79,83} Tükürükte bulunan aglütininler *S. mutans*'ın adezyon ve agregasyon sürecine bakteri hücre duvarında bulunan ve spaP geni tarafından kodlanan I/II antijen ile etkileşim sayesinde dahil olur.^{63,79,83} Bu sürecin, komplike biyofilm yapısındaki *S. mutans*'ın yaşamına yönelik, ana sürücü kuvvet olduğu kabul edilmektedir. Sonuçlar, tükürük aglütininlerinin yokluğunda daha az tatmin edici bir sürecin yanı sıra, *S. mutans*'ın yapışma ve biyofilm oluşumunun başlangıç aşamasının tükürük aglütininleri ve diğer tükürük proteinlerinden yüksek moleküler kütleli müsin veya asidik prolin açısından zengin proteinler tarafından uyarılabileceğini göstermiştir.^{40,79,84} Bu nedenle, biyofilm oluşumunu engellemeyi amaçlayan tedaviler, bu mekanizmalara göre yönlendirilmelidir.⁸⁵

Diş yüzeyinde biriken mikrobiyal biyofilm kaynaklı en sık gelişen ağız hastalıkları diş çürüğü ve periodontal hastalıklardır. Tüm faktörler ve çevresel koşullar, çeşitli mikroorganizma türleri için yeterli bir oral mikrobiyal yaşam alanı sağlamaktadır. Bu hastalıkların tedavisine yönelik yapılması planlanan tüm dental ve sistemik tedavilerin başında diş yüzeylerinde oluşan dental plağın uzaklaştırılması gelmektedir. Biyofilm tabakanın oluşumunun önlenmesi için de diş fırçalama alışkanlığının kazandırılması ve antiseptik etki yaratmak amacı ile diş macunu ve gargaraların kullanılması rutinde tavsiye edilmektedir. Ancak, son yıllarda diş çürüklerinin önlenmesi için daha kolay, farmakolojik olmayan önlemlerin etkinliği araştırılmaktadır. Bunların başında da probiyotikler gelmektedir.^{48,59,75,86}

Gelişmekte olan ülkelerde en önemli ağız sağlığı problemi diş çürükleridir. Diş kayıplarının önlenmesi için bu çürüklerin tedavisinin yanı sıra bu çürüklerin oluşmadan önlenmesi de çok önemlidir. Son yıllarda, farmakolojik ürünlerin yanında özellikle beslenme ürünlerinin modifikasyonu ve çürük oluşumunu engelleyecek besinlerin tüketimi ile bu

çürüklere neden olan ağız içi patojenlerin kolonizasyonunun azaltılması sayesinde çürük gelişiminin engellenmesi özellikle çocukluk çağında önem kazanmaktadır.^{86,87}

1.4. Probiyotikler

1.4.1. Probiyotiklerin tarihsel gelişimi

Dünya genelinde insanlar, eski dönemlerden beri beslenme amacıyla fermente süt ürünlerini kullanmaktadır. Tarihi belgelere göre, eski Yunan medeniyetleri ve Roma’da peynir ve fermente süt, çocuklarda ve hastaların konvelesan dönemlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.^{1,88} Bu nedenle en eski probiyotik, fermente süttten alınan mikroorganizmalar şeklinde kabul edilmektedir. Probiyotik kavramı, 1908 yılında Nobel ödüllü, Elie Metchnikoff’un Kafkas halkının ve Bulgar köylülerinin uzun yıllar yaşamaları ile yoğurt tüketimi arasında bağlantı kurması ve bu durumu ağız yoluyla alınan laktobasillerin patojen bakterilerin yerlerini almalarına bağlamıştır.^{1,89,90} Metchnikoff ekşi süt demek olan yoğurtta bulunan yararlı mikroorganizmaların insan ömrünü uzattığını “The Prolongation of Life” adlı kitabında anlatmış ve kitabın basımı ile probiyotiklere duyulan ilgi artmıştır.^{1,91} 1917 yılında Alman Prof. Dr. Alfred Nissle, şigella salgını sırasında hastalanmayan Alman askerlerinin gaita örneklerinden elde ettiği *Escherichia coli*’yi salmonella ve şigelladan hastalanan bireyleri tedavi etmek için kullanmış ve olumlu sonuçlar elde etmiştir. Tedavi amaçlı ilk probiyotik kullanımı olarak tarihe geçen bu suş, daha sonra *Escherichia coli* Nissle 1917 adını almıştır. Bu olay sayesinde bağırsak florasında bulunan aerop ve anaerop mikroorganizmaların rolü de anlaşılmaya başlanmıştır.⁹²

Probiyotik terimi 1960’lı yıllarda ilk kez Lilly ve Stillwell tarafından kullanılmıştır. İlk probiyotik tanımlaması ise 1974 yılında bağırsağın mikrobiyal dengesini sağlamaya yardımcı organizma veya madde şeklinde yapılmış fakat zaman içinde tanımı farklılaşmıştır. 1998 yılında, probiyotik tanımlamasını sağlığa faydalı, canlı bakteriler veya bu bakterileri içeren gıdalar şeklinde, 2002 yılında ise bu tanım sağlığa yararlı mikrobiyal hücre preparatları şeklinde değişmiştir.¹⁻⁴

Probiyotik terimi için literatürde çeşitli tanımlar bulunmaktadır. Son 50 yılda kullanılan terimler Tablo 1’de gösterilmektedir.² Probiyotik kavramı Yunanca’da ‘için’ anlamına gelen ‘pro’ ve ‘yaşam’ anlamına gelen ‘bios’ birleşimi olan ‘yaşam için’ anlamına gelmektedir.^{2,93-95} Probiyotik terimi ilk kavrandığı zamanlarda yaşamı yok eden anlamına

gelen antibiyotik terimine karşı bir terim olarak ortaya atılmıştır. Ancak, günümüzde probiyotik yerine dost bakteriler veya iyi bakteriler isimleri de kullanılmaktadır.⁸⁶

Zaman içerisinde değişen probiyotik tanımı “yeterli miktarda alındığında konakçının bağırsaklarında mikrobiyal dengeyi sağlayarak sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalar” olarak yapılmış fakat cansız mikroorganizmalar, biyoaktif bakteri bileşenleri, proteinler, polisakkaritler, DNA ve genetiği modifiye edilmiş mikroorganizmalar bu tanıma dahil edilmediğinden alimenter farmabiyotik teriminin kullanılması da bir dönem gündeme gelmiştir.^{1,3,89,96-99}

Tablo 1.1. Probiyotikler için yıllar içerisinde yapılmış tanımlamalar

Yıl	Yazar adı	Tanım
1953	Kollath	Probiyotikler bitkisel besinlerde bulunan vitaminler, aromatik bileşikler, enzimler ve yaşamsal işlevlerimizde rolü olan diğer bileşiklerdir.
1954	Vergin	Probiyotikler antibiyotiklerin karşıtıdır.
1955	Kolb	Antibiyotiklerin istenmeyen etkileri probiyotikler ile önlenabilir.
1965	Lily ve Stillwell	Bir mikroorganizma tarafından salgılanan, bir başka mikroorganizmanın çoğalmasını uyaran bileşiktir.
1971	Sperti	Mikroorganizmaların çoğalmasını artıran doku ekstraktlarıdır.
1973	Fuji ve Cook	Konakçıda enfeksiyonlara direnci artıran fakat in-vitro olarak mikroorganizmaların çoğalmasını inhibe etmeyen bileşiklerdir.
1974	Parker	Bağırsaklarda mikrobiyal dengenin sağlanmasına katkısı olan mikroorganizma veya bileşiklerdir.
1992	Fuller	Mikrobiyal dengeyi sağlayarak konakçı hayvanın sağlığını olumlu etkileyen, canlı mikroorganizma içeren beslenme desteğidir.
1992	Havenaar ve Huis Int’Veld	Bir insan veya hayvana uygulandığında endojen floranın özelliklerini geliştirerek sağlığı üzerinde olumlu etkileri olan canlı bir mikroorganizma veya çeşitli mikroorganizmaların karışımıdır.
1996	Salminen	Konakçının sağlığını ve beslenme durumunu olumlu etkileyen kültüre süt ürünleri veya canlı kültüre mikroorganizmalardır.

1996	Schaffsma	Temel besleyici özelliklerinin ötesinde yeterli miktarda alındığında sağlık üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikroorganizmalardır.
1999	Salminen, Ouwehand Benno ve Lee	Konakçının sağlığı ve iyi olma hali üzerinde olumlu etkileri olan canlı mikrobiyal hücre preparatları veya hücre bileşenleridir.
2001	Schrezenmeir ve de Vrese	Konakçının bir kompartmanında bulunan mikroflorayı değiştirerek (implantasyon veya kolonizasyonla) konakçıda olumlu etkiler yapan canlı ve belirli mikroorganizmaları yeterli miktarda içeren bir ürün veya preparattır.
2002	GTÖ/DSÖ	Yeterli miktarda alındığında konakçının sağlığına olumlu katkıları olan canlı mikroorganizmalardır.

1.4.2. Probiyotik tanımı ve genel özellikleri

Hastalıkları iyileştirmek veya bağışıklık sistemini desteklemek amacıyla canlı mikroorganizmaların kullanılması fikri 20. yüzyılın başlarında ortaya atılmıştır. Günümüzde ise probiyotikler, ek olarak veya gıdaların içinde bulunan, canlılığını devam ettiren ve sayısını koruyan, konağın mikrobiyotasını olumlu yönde değiştiren ve konak dokunun sağlığını iyileştiren ürünler şeklinde tanımlanmaktadır. Probiyotikler, potansiyel olarak faydalı mikroorganizma içeren diyet takviyeleri olduğundan konakçı sağlığına faydalıdır. Bu nedenle bakteriyoterapi amacıyla da kullanılmaktadırlar. Zaman içerisinde tanımı sürekli değişiklik göstermesine rağmen bir mikroorganizmanın ideal probiyotik tanımı altında kabul edilebilmesi için bazı genel özelliklere sahip olması beklenmektedir. Bu genel özellikler:^{1,86,92,93,95}

- Mikroorganizmanın canlı olması,
- Normal mikroflora üzerinde olumsuz etki bırakan patojen bakterileri etkilemesi, yani yararlı olması,
- Konak için risk taşıması yani patojen veya virülen özellikte olmaması,
- Gastrointestinal sistemde yaşayabilme ve metabolize olabilme özelliği,
- Kullanılacağı konakçı kaynaklı olması,
- Uygun koşullar sağlandığında üretim ve depolama süreci içinde stabil ve canlı kalabilmesi,
- Düşük asit düzeylerine dayanabilme ve ağız içi mikroflorada genetik stabilite sağlayabilmesi,

- Başka bir ortamda ürememesi,
- İnvazyon yapmaması ve
- Karsinojenik potansiyel göstermemesidir.

Ayrıca, her probiyotikte olması istenen ancak zorunlu olmayan özellikler de bulunmaktadır. Bunlar: ⁸⁸⁻⁹¹

- Asidik ortam ve safra tuzlarına dirençli olması,
- Mukoza yüzeyine tutunabilmesi,
- Gastrointestinal sistemde geçici kolonizasyonu,
- Doğal flora adaptasyonu ve denge sağlamaı,
- Antibiyotiklere duyarlı olması,
- Antimikrobiyal maddeler üretebilmesi,
- Güvenilir şekilde besinlere eklenebilmesi ve
- Klinik etkinliğinin kanıtlanmış olmasıdır.

Örneğin, *Streptococcus thermophilus* asidik pH ve safra tuzlarına dirençli olmamasına rağmen gastrointestinal sistemde laktaz salgılayarak probiyotik mikroorganizmalardan beklenen etkiyi sağlayabilen yararlı mikroorganizmalardandır. Ayrıca, probiyotik olarak tanımlanacak bakteri, laboratuvar ortamda tamamen izole edilmiş olmalı, antibiyotik direnç spektrumu karakterize edilmeli, metabolik ve hemolitik aktiviteleri, toksin üretebilme becerileri, immün sistemi baskılanmış hayvan modeline etkileri ve insanlardaki yan etki profilleri tamamen tanımlanarak klinik etkinliği kanıtlanmış olmalıdır. ⁸⁸⁻⁹¹

Probiyotiklerin etkin kullanımı düşünüldüğünde, probiyotik olarak seçilecek mikroorganizma ve hazırlanan farmasötik formundan beklenen bazı spesifik özellikler bulunmaktadır. Seçilen farmasötik formun probiyotik mikroorganizmanın özelliklerini desteklemesi veya artırması beklenmektedir. Mikroorganizmanın stabil yapısını koruması yani üretimi sonrasında canlılığını devam ettirebilmesi, fajlara dirençli olmasından dolayı bakteriyofajlar tarafından genetik materyalinin değişiklik göstermemesi, ürün içinde canlı kalabilmesi, damakta kötü tat bırakmaması, oksijene dirençli olması ve liyofilize preparat haline getirilebilmesi de istenilen özellikler arasında sayılabilir. ^{90,97,100} Probiyotiklerin çoğu gastrointestinal kanalın alt bölgelerinde sürekli kolonize olmaz, en yoğun kolonizasyon gösteren suşlar bile alındıktan 1-2 hafta sonra gaitadan izole edilebilir. Bu yüzden, kolonizasyonun sağlanabilmesi için probiyotiklerin düzenli kullanımı gereklidir. ¹⁰¹

Probiyotik olarak bir suşun tercih edilmesinde ise; mikroflora içinde kolay tanımlanması, uzun süreli etki gösterebilmesi için konak dokuda geçici de olsa kolonize olabilmesi, konak dokuda sistemik toksisite, immünolojik duyarlılığa ve mikroorganizmaların direnç geliştirmesine neden olmaması şeklinde özetlenebilmektedir.⁸⁹

1.4.3. Probiyotik mikroorganizmalar

Probiyotik mikroorganizmalar bakteri veya maya türlerinden olabilir. Probiyotik olarak kullanılan çoğu mikroorganizma laktik asit üreten bakteri grubundandır. Bu mikroorganizmaların çoğu *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* ailelerinden ve bir mantar olan *Saccharomyces boulardii*'dir.^{1,92,102} Başlıcaları *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus delbrueckii*, *S. thermophilus*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium subtilis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *E. coli* Nissle 1917 ve *S. boulardii*'dir. Bu probiyotik mikroorganizmaların genel sağlık üzerindeki etkileri Tablo 2'de özetlenmiştir. Bu mikroorganizmalar arasından en çok araştırılan ve etkinliği kabul edilmiş mikroorganizmalar *L. rhamnosus* GG, *Saccharomyces cerevisiae boulardii*, *Lactobacillus casei shirota* ve *Bifidobacterium animalis*'dir. *Escherichia* ve *Enterococcus* türlerinin de probiyotik olarak kullanımı bildirilmiştir.^{1,88-91,101}

Tablo 1.2. En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmaların genel sağlık üzerindeki etkileri

Mikroorganizmalar	Sağlık üzerindeki etkileri
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	İnek sütü ve rotavirüslerin mukoza defekti yaratma etkisini azaltır. Rotavirüslerin neden olduğu ishal, seyahat ishalleri ve antibiyotik ilişkili ishal süresini kısaltabilir. İmmün yanıtı güçlendirir. İnek sütü ilişkili atopik egzama önleme ve tedavisinde, vajinozis ve vajinit tedavisinde kullanılır.
<i>Lactobacillus casei</i>	İshal şiddet ve süresini azaltır. Gastrointestinal kanalda immün sistemi stimüle eder. Crohn hastalığı semptomlarını hafifletir. Güçlü antimikrobiyal özelliklere sahiptir.
<i>Lactobacillus casei</i> Shirota	Bakteri ve virüslere bağlı ishalleri önler. Laktoz intoleransı, rotavirüs ve <i>Clostridium difficile</i> ishalleri ve antibiyotik ilişkili ishallerde en etkili mikroorganizmadır.

<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Laktik asit salgılayarak bağırsak lümeninde pH düşürür, <i>Salmonella</i> ve <i>E. coli</i> gibi patojenlerin çoğalmasına engel olur. Antikor yanıtı ve serokonversiyon hızını artırır. Nekrotizan enterokolit gelişimini önlemede, radyasyon enteritlerinde, vajinozis ve vajinit tedavisinde kullanılır.
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	<i>Helicobacter pylori</i> yoğunluğu, inflamasyon ve gastrit aktivitesini azaltır. İmmün yanıtı güçlendirir.
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Enzim aktivitelerini azaltarak karsinojenik maddelerin ortaya çıkışını engelleyen kısa zincirli yağ asitleri üretir. İrritabl bağırsak sendromunda etkilidir. İmmün yanıtı güçlendirir.
<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	Antibiyotik ilişkili ishallerin önlenmesinde etkilidir.
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Akut çocukluk ishallerinin tedavisinde, vajinozis ve vajinitlerde kullanılır.
<i>Bifidobacterium breve</i>	Anti-rotavirüs IgA ve anti-influenza virüs antikorlarını artırarak humoral immün sistemi aktive eder.
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	İshal sıklığını azaltır. Serokonversiyon hızı ve antikor yanıtı artırır. Nekrotizan enterokolit gelişimini önlemede etkindir.
<i>Bifidobacterium infantis</i>	İshal ve kabızlığı önler. İrritabl bağırsak sendromunda kullanılır.
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Normal motilite sağlar. Çocuk ve erişkinlerde akut ishal riskini azaltır. İrritabl bağırsak sendromunda kullanılır.
<i>Lactobacillus lactis</i>	İmmün yanıtı güçlendirir. İnek sütü ilişkili atopik egzama önleme ve tedavisinde etkilidir.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Seyahat ishallerini ve patojenlere bağlı kolit ve enterokolit gelişimini önler.
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Antibiyotik ilişkili ishal gelişme riski ve süresini azaltır.

1.4.3.1. *Lactobacillus* türleri

Spor oluşturmayan anaerop veya mikroaerofilik gram pozitif basillerdir.⁸ Ağız boşluğundan, genelde diş plağı ve dilden izole edilebilir. Kültürü yapılabilen toplam mikrofloranın %1'den azını oluştururlar. Dişlerin kron ve kök kısımlarının en dış yüzeyleri olan mine ve sement yüzeylerindeki çürüklerden izole edilebilirler. Oral mikrobiyotanın önemli bir çoğunluğunu *Lactobacillus* türleri oluştururken, patojen özellik gösteren tipleri olduğu gibi probiyotik özellik gösteren tipleri de bulunmaktadır. Oral mikrobiyotada en fazla bulunan türler *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *Lactobacillus brevis* ve *L. casei* 'dir. Yenidoğanda *L. acidophilus* bulunurken bebek büyüdükçe oral floradaki miktarı 2 yaşa kadar sürekli azalır.⁴⁰

Oral mikrobiyotada kolonize olabilen patojen türlerinden, *L. acidophilus* ve *L. casei* diş yüzeyinde biriken dental plaktan izole edilirken tükürük, dil ve dişeti oluklarından ender izole edilmektedir. Derin çürüklerden ve enfekte kök kanallarından ise *L. fermentum* izole edilmektedir. Ayrıca, *L. salivarius*'un da *S. mutans* kolonizasyonu üzerine etkisini değerlendiren çalışmalarda, *S. mutans* sayısı üzerinde hem azaltıcı hem de artırıcı etki gösterebildiği yani hem patojen hem probiyotik etkinliği olduğu bildirilmiştir.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Gastrointestinal sistemde bulunan zorunlu heterofermentatif özellikteki *L. reuteri* ile yapılan çalışmalarda ise *S. mutans*'ın oral dokularda kolonizasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Bu yüzden de diş çürüğünü azaltma amacıyla kullanılması tavsiye edilen probiyotik mikroorganizmalardan birisidir.^{103,106-108}

1.4.3.2. *Streptococcus salivarius*

Streptococcus salivarius gram pozitif, fakültatif anaerop laktik asit üreten bakterilerdendir. Dental plakta genellikle zincirler halinde ürediği görülmektedir.⁸ *S. salivarius*, insanların ağız boşluğunda ve üst solunum yollarında doğumdan sadece birkaç saat sonra kolonize olarak patojen bakterilerin kolonizasyonunu önlemede bağışıklık sistemine yardımcı olur. *Salivarius* grubu streptokoklardan olan *S. salivarius* oral mukozada yaygın olarak bulunmakla beraber dil ve tükürükteki normal mikrobiyota elemanlarındanır. Genelde sağlıklı bölgelerde bulunmakla beraber nadiren fırsatçı patojen olarak kabul edilir. Örneğin, nütropeni olan bireylerde sepsise neden olduğunu gösteren olgular bulunmaktadır.⁴⁰

Oral mikrobiyotada bulunan *S. salivarius*, *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. oralis* ve *S. sanguinis* gibi streptokok grubu diğer oral mikrobiyota türlerine benzer şekilde alkolü asetaldehite metabolize ederek karyojenik bakteri gibi davranabilir.¹⁰⁹ Normal şartlarda, doğal oral mikrobiyotanın baskın bir üyesi olan *S. salivarius*'un obezite görülen çocuklarda az sayıda bulunduğu bildirilmiştir. Mutualist oral bakterilerden olan *S. salivarius*, probiyotik mikroorganizma olarak kullanımı az araştırılmış olmasına rağmen yapılan araştırmalarda umut verici sonuçlar vermekte ve ileri araştırmalarda kullanılması tavsiye edilmektedir..^{5,110}

S. salivarius K12, ağız boşluğunun mikrobiyal ekolojisinde erken dönemde kolonize olan ve dil üzerinden izole edilebilen bir türdür. Ağız sağlığı için özel olarak geliştirilen ilk probiyotik olan *S. salivarius* K12, uzun yıllardır A grubu streptokok farenjit ve ağız kokusuna karşı oral probiyotik olarak tavsiye edilmektedir. *S. salivarius* K12 içeren tablet

şeklindeki oral probiyotik 2011 yılında A.B.D. Gıda ve İlaç İdaresi'nden BLIS K12™ firma adıyla onay almıştır.^{111,112} K12 suşunun, insan ve hayvan modellerinde yapılan deneylerde, bakteriyosinler grubundan salivarisin A ve B üreterek antibakteriyel ajan gibi davrandığı bu nedenle de probiyotik mikroorganizma sayılması gerektiği bildirilmiştir.¹¹³⁻¹¹⁶

Ağız sağlığına yönelik yapılan araştırmalar sırasında *S. salivarius* M18 suşunun da probiyotik etkinliği fark edildiğinden geliştirilen ikinci probiyotik de *S. salivarius* M18 (BLIS M18™) olmuştur. *S. salivarius* M18'in kullanıldığı klinik çalışmada, M18'in belirli *S. mutans* suşlarının in-vitro büyümesini inhibe ettiği ve sayılarını azalttığı bildirilmiştir.^{113,116,117} Ancak şimdiye kadar çok az sayıda çalışma ile *S. salivarius* suşlarının probiyotik özellikleri değerlendirilmiştir. *S. salivarius*'a yönelik yapılan taramalar sırasında çürüksüz bir çocuğun diş plağından *S. salivarius* LAB813 suşu izole edilmiş bu nedenle K12 ve M18 dışında probiyotik özellikte suşların varlığının araştırılması önerilmektedir.^{110,116,118}

1.4.4. Probiyotiklerin etki mekanizmaları

Probiyotiklerin etki mekanizmaları net bilinmemekle beraber en sık kullanılan probiyotik mikroorganizmaların etki mekanizmaları üzerinde durulmaktadır. Probiyotiklerin savunma ve koruma işlevlerini yerine getirmesinde farklı mekanizmalar rol oynamaktadır. Örneğin; bağırsak lümenindeki besinler, yer ve mukozaya tutunma için patojen bakteriler ile yarışır. Bu yarış sırasında probiyotik mikroorganizmalar müsin yapımını artırarak patojenlerin bağırsak epiteline zarar vermesini engeller. Bu sayede hücre geçirgenliğini azaltarak bağırsak epitelinin bariyer işlevini güçlendirir. Defensin gibi antimikrobiyal peptitlerin salgılanması da mukoza bariyerinin güçlenmesine yardımcı olur.^{1,4} Prokarsinojen madde üretiminde rolü olan enzimlerin aktivitesini inhibe eder, ksenobiyotiklerin parçalanmasını sağlar. Probiyotiklerin etki mekanizması bu yollardan birisi olabileceği gibi birden fazlası da olabilir. Etki mekanizmaları kullanılan probiyotik mikroorganizmanın türüne, özelliklerine ve hedef bölgeye çok bağlıdır.^{1,2,98}

Probiyotiklerin bağırsak fonksiyonları üzerine etkileri gıdaların sindirimini kolaylaştırmak (örneğin; laktoz intoleransında) ve su ile elektrolit Emilimini artırmak (örneğin; ishalde) şeklindedir.^{2,3,92} Bu etkileri de, probiyotiklerin etki mekanizmalarından olan fiziksel bariyer oluşturma görevi paraselüler geçirgenliğin dengelenmesi, mukozanın trofik fonksiyonunun yeniden oluşturulması, viskoelastik mukus bariyerinin şekillendirilmesiyle sağlamaktadır. Fonksiyonel bariyer görevi ise intestinal epitelyal

lenfositlerin ve immünglobulin oluşturan hücrelerin ve inflamasyondan sorumlu medyatörlerin salınmasıyla sağlanmaktadır. Probiyotikler, lamina propriadaki immünglobulin A (IgA) üreten hücrelerin yapımını artırarak salgısal IgA salgılamaktadır. Bu antikorlar, bakteri ve bakteri antijenlerine bağlanarak epitel dokuya kolonizasyonu engellemekte ve bu sayede bağırsak homeostazını desteklemektedir. Örneğin, Rotavirüs'e bağlı diyare görülen çocuklara *B. bifidum* ve *S. thermophilus* içeren probiyotikler verildiğinde hızlı bir IgA ve immünglobulin M serokonversiyonu gözlenmiştir. Ayrıca, endüstriyel olarak, fermente süt ürünlerinin üretiminde kullanılan laktobasiller de β -galaktozidaz enzimi ile süt ürünlerindeki laktoz konsantrasyonunu azaltarak sindirimi kolaylaştırır.^{1,17,98}

Probiyotiklerin etki mekanizmalarından birisi de bağışık yanıtı düzenlemesidir. Daha önce yapılan hayvan çalışmalarında, probiyotiklerin lenfosit ve makrofajlar üzerindeki fagositik aktivitesini artırarak bağışıklık sistemini güçlendirdiği bildirilmiştir.^{14,17,44} Probiyotiklerin etki mekanizması genel olarak bağırsak mikrobiyotası üzerinde çalışılmıştır. Bu etki mekanizmaları bağırsak mikrobiyotasını düzenler ve stabilize eder. Bazı probiyotikler bağırsak inflamatuvar yanıtını, epitel hücreler üzerinde apoptotik olmayan etki yaparak inhibe eder. Bu yüzden, probiyotikler ilk savunma mekanizması olan doğal öldürücü hücre aktivitesini artırır. Bazı laktobasil suşları dendritik hücrelerin maturasyonunu da uyarabilir. Ayrıca, bazı probiyotiklerin doğrudan immün düzenleyici etkileri vardır ve Immünglobulin E yapımını baskılayarak alerji aracılı yanıtları düzenlerler. Kolit ve irritabl bağırsak sendromu da dahil çeşitli proinflamatuvar hastalıklarda interferon- γ , TNF- α , IL-10 ve IL-12 yapımını azaltabilir. IgA ve salgısal IgA yapımını artırarak humoral immüniteyi güçlendirir. Fagositoz ve doğal öldürücü hücre aktivitesini, hücre aracılı immünite ve patojenlere karşı özgül immün yanıtları artırır.¹²²⁻¹²⁴

Probiyotiklerin laktik asit üretimi ile patojen mikroorganizmalara karşı sağladığı savunma mekanizmaları:

- Lümenin asiditesini düşürmek,
- Besin kaynakları için rekabet etmek,
- Epitel hücrelerindeki β -defensin yapımını artırarak patojen mikroorganizmaların çoğalmasını engellemek,
- Antimikrobiyal mikrosin, hidrojen peroksit ve serbest radikaller üretmek şeklindedir.

En sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar olan *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri laktik asit, asetik asit ve propiyonik asit üreterek bağırsak lümenindeki asiditeyi düşürerek patojen bakterilerin üremesini baskılar ve bağırsak mikrobiyotasında denge kurulmasını sağlar. Ancak genellikle probiyotiklerin etki göstermesi sırasında birden fazla mekanizmanın rol oynadığı kabul edilmektedir.¹²³⁻¹²⁵ Bu mekanizmaların, farklı probiyotiklere ve kullanılan suşlara göre farklılık gösterdiği, buna bağlı olarak etkinliğinin de kullanılan miktar ve taşınma yoluna göre de değiştiği bildirilmiştir. Bu yüzden, bir probiyotik bakterinin etki mekanizmasının tüm probiyotik mikroorganizmalarda olması beklenemez, türe özgü araştırmalar yapılması gereklidir.^{92,125}

Lactobacillus grubundaki bazı probiyotik mikroorganizmalar (örneğin *L. plantarum*) karbonhidratlar özellikle mannoz aracılığıyla yüzeye tutunmaktadır. *E. coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella*, *Pseudomonas* ve *Vibrio cholerae* da aynı reseptörleri kullandığından, bu grup probiyotikler reseptörlere bağlanırken yarışmalarının enfeksiyonların önlenmesinde etkili yollardan birisi olduğu düşünülmektedir. Ayrıca, goblet hücrelerinden salınan ve koruyucu bir mekanizma olan müsin salınımını MUC2 ve MUC3 mRNA ekspresyonunu uyarak artıran *L. plantarum*, bu sayede patojen *E. coli* O157:H7'nin bağırsaklara tutunmasını önleyebilmektedir. Bundan dolayı *E. coli*'yi ayırt edip konak dokuyu veya bölgeyi zararlı etkilerinden koruyup ve tolerans gösterebilmektedir.⁹²

Bazı probiyotik mikroorganizmaların (*B. longum* ve *Bacteroides thetaiotamicron*) etki gösterebilmesi için kolon mikrobiyotasına kalıcı olarak kolonize olması gerekirken bazılarının (*L. casei* ve *B. animalis*) etki göstermesi için geçici bir süre için, kolonize olmadan mikrobiyotayla etkileşmesi yeterlidir.^{92,125,126} Probiyotikler hidrojen peroksit, organik asit, bakteriyosin ve biyosüpfektan üretir ki, bu postbiyotikler bazı patojen mikroorganizmalar üzerinde toksik etki yaratabilir.¹²² Örneğin *L. rhamnosus* GG salgıladığı düşük molekül ağırlıklı madde sayesinde çok sayıda gram pozitif, gram negatif, fakültatif anaerop ve anaerop bakterileri inhibe eder. Ayrıca, *S. boulardii* de *C. difficile* enfeksiyonlarında salınan A ve B toksinlerinin toksisitesini azaltabilen bir proteaz üretir.¹²³

Probiyotiklerin kanıtlanmış etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:^{86,92,97}

- Tutunma bölgeleri ve besinler için patojen mikroorganizmalar ile rekabet,
- Mikrobiyal toksinlerin etkisinin inhibisyonu,

- IgA yapımının stimülasyonu,
- Bağırsak mukozasına trofik etki,
- Epitel yüzeyinde asiditeyi devam ettirme,
- Patojen bakteri ve mantarlar için antagonist olan hidrojen peroksit üretimi,
- Antimikrobiyal mikrosin üretimi,
- Epitelyum hücreleri için enerji kaynağı olan maddeler üretme,
- İmmün sistemi uyarıcı etkisi,
- Enfeksiyonlara karşı mukoza direncinin devamlılığının sağlanması ve
- Karsinojen ve mutajen üretiminin azaltılması olarak gruplanabilmektedir.

1.4.5. Probiyotiklerin oral mikrobiyotaya kolonizasyonu

Probiyotik etki mekanizmaları tam olarak anlaşılmamakla birlikte bölgesel olarak kümelenme, rekabetçi inhibisyon ve bakteriyel üretiminin yanı sıra sistemik olarak da bağışıklık sistemi temelli yollara dayandığı düşünülmektedir.¹¹⁹ Benzer şekilde, ağız hastalıklarından diş çürüğünü azaltmak için ağız boşluğunun mikrobiyotasını değiştirmede özellikle *S. mutans* seviyesinin düşürülmesinde başarılı bulunmuştur. Ayrıca, biyofilm oluşumu sırasında da *Lactobacillus* türü probiyotikler eklendiğinde *S. mutans*'ın kolonizasyonu şiddetle inhibe edilmiştir.¹²⁰

Probiyotiklerin *S. mutans* eliminasyonundaki etkinliği incelendiğinde genel olarak dental plak ile etkileşime girdiği ve birçok etki mekanizması ile *S. mutans* sayısını azaltabildiği görülmüştür. Probiyotikler, dental plak ile doğrudan etkileşime girerek oral mikrobiyotada bulunan mikroorganizmaları proteinlere bağlayarak etkisiz hale getirebilmektedir. Plak üzerindeki bakteri yapışma yerleri için patojen bakterilerle yarışarak plağın yapısını ve ekosistemini değiştirebilmektedir. Diş yüzeyinde koruyucu bir astar görevi gören kendi biyofilm tabakalarını oluşturarak patojen bakterilerin diş üzerinde kolonizasyonunu engelleyebilmektedir. Bakteri üremesi için gerekli substratı tüketir ve ortama üretilen kimyasallar ile ağız içerisinde bulunan bakterilerin çoğalmasını inhibe edebilmektedir. Probiyotiklerin etki mekanizması kapsamında, ürettikleri organik asitler, hidrojen peroksit ve bakteriyosinler patojen bakterilere karşı antimikrobiyal etki göstererek direkt yoldan yarar sağlayabilmekte, dolaylı yoldan ise sistemik bağışıklık yanıtını modüle ederek etki göstermektedirler. Ayrıca, ağız içi lokal immüniteyi arttırmak, mukozal geçirgenliği düzenlemek ve serbest elektronları nötralize ederek plak oluşumunu da

engelleyebilmektedirler. Yani, antioksidan olarak etki ettiği gibi antioksidan da üretebilmektedir.¹²⁰

Mikrobiyota ve mukoza, mukus ile mukozal engeli oluşturur ki bu yapı lümende bulunan immünolojik veya patojenik potansiyel taşıyan tüm faktörlere karşı en önemli savunma sistemidir. Epitel dokusu, mikrobiyotaya ait organik besin kalıntıları ve salgıları (tükürük, gastrik ve pankreatik salgılar, safra, bağırsak salgıları) özgül bağırsak ilişkili lenfoid dokudan ayırmaktadır. Ancak, mikrobiyotada meydana gelen değişimler enfeksiyon, inflamatuvar ve alerjik hastalıklar ve immünolojik sorunların gelişmesine de neden olmaktadır. Bundan dolayı, bağırsak ilişkili olan veya olmayan çok sayıda hastalığın bağırsak mukozası savunma sistemindeki aksaklıklardan kaynaklandığı varsayılmaktadır. Bu hastalıklar arasında astım, egzama, alerjik rinit gibi atopik hastalıklar ve multipl skleroz, tip 1 diyabet ve kronik inflamatuvar bağırsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıklar sayılabilir. Bağırsıklık sisteminin gelişiminde genetik alt yapı da önemli etkenlerden biridir.

Mikrofloranın değerinin anlaşılmasının ardından sağlıklı olma durumunun devamlılığını sağlamak için probiyotik mikroorganizmaların kullanımının ne derecede etkin olabileceği araştırılmaktadır. Canlı ve cansız probiyotik bakterilerinin yararlı ve zararlı etkilerinin araştırılması ile probiyotiklerin ikili (dual) etkileri olduğu sonucuna varılmıştır. Canlı mikroorganizmalar mikrobiyota ve bağırsıklık yanıtı, cansız hücre bileşenleri ise anti-inflamatuvar yanıtı etkilemektedir. Cansız hücre miktarındaki değişiklik, canlı probiyotiklere olan yanıt değişkenliğini açıklamaktadır. Canlı olmayan probiyotik ürünlerinin güvenli ve daha uzun raf ömrüne sahip olmaları gibi avantajları vardır.^{1,4,63,121}

1.4.6. Probiyotiklerin uygulanma şekilleri

Probiyotik mikroorganizmalar doğal olarak vücut içerisinde bulunabildikleri gibi dışardan da bir takviye ürün ya da yiyecek içerisinde de alınabilir. Fonksiyonel gıdalarla birleştirilebilir, karıştırılabilir veya bu gıdaların içerisinde doğal olarak bulunabilirler.¹ Probiyotik mikroorganizmalar tedavi edici olarak tavsiye edilebildikleri gibi destek tedavi amacıyla da kullanılabilirler. Buradaki amaç, probiyotiklerin de diğer ilaçlar gibi maksimum etki gösterebilecekleri formlarda kullanılmasıdır. Probiyotiklerin kullanım şekilleri, süt ve süt ürünlerine eklenerek kullanıldıklarında etkilerinin arttığı veya daha uzun süreli olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.^{87,106,126} Piyasada en sık görülen probiyotiklere ait farmasötik şekiller tablet, kapsül, damla ve saşe formlarıdır. Tablet ve kapsül formları oral yolla

alınarak, saşe ve damla formunda olanlar ise yiyeceklere eklenerek kullanılmaları önerilmektedir.^{111,129-133} Ayrıca, çalışmalarda probiyotik mikroorganizmaların etkinliğinin artırılması için mukoza ile temasının artması gerektiği vurgulanmış ve hatta Çağlar ve arkadaşları emziklere probiyotik mikroorganizma içeren pastilleri yerleştirerek çalışma yapmışlardır.¹³² Literatürde yapılan diğer çalışmalarda da dondurmaya, sakıza, gargaraya probiyotik mikroorganizma eklenerek de etkinlikleri değerlendirilmiştir.^{106,127,128}

1.4.7. Probiyotiklerin kullanım alanları

Probiyotikler esas olarak gastrointestinal hastalıkların destek tedavisinde kullanılır. Probiyotik mikroorganizmalar, özellikle sindirim sisteminde kolonize olarak sistemde bulunan patojen mikroorganizmaların adezyonunu ve kolonizasyonunu çeşitli mekanizmalarla engellemektedir.^{1,2,87-90,92}

İnsanlarda, gastrointestinal sistemde yer alan bakteri popülasyonu ileri derecede karmaşıktır. Gastrointestinal sistem mikrobiyotasında bulunan mikroorganizmaların çoğu faydalıdır, ancak bazıları zararlıdır. Son yıllarda kullanımı hızla artan ve bazı beslenme maddelerinde bulunan prebiyotikler, bu yararlı bakterilerin zararlı olanlara kıyasla büyümesini destekleyebilir. Prebiyotik kavramı esas olarak, bağırsak mikrobiyotasının modülasyonu yoluyla konakçı sağlığını iyileştirmek için farklı bir mekanizma ile de olsa probiyotik ile aynı amaca sahiptir. Prebiyotikler genellikle kolondaki köklü bir veya birkaç bakteri türünün üremesini veya aktivitesini seçici bir şekilde uyatarak konakçıyı yararlı bir şekilde etkileyen sindirilebilir gıda bileşenleri olarak tanımlanır ve bu şekilde konakçının sağlık durumunu iyileştirir. Prebiyotikler inülin, frukto-oligosakkaritler ve laktüloz gibi faydalı bakterilerin üremesini destekleyen insanlar tarafından sindirilemeyen gıda maddeleridir.^{134,135}

Bir besinin veya bileşenin prebiyotik olarak tanımlanabilmesi için mide ve pankreasta bulunan sindirim sistemi enzimlerine dirençli olmasının yanı sıra fermente olarak seçici ya da kalıcı biçimde bir veya birden çok bakteri türünün çoğalmasını sağlaması gerekmektedir. Probiyotikler ise bağırsak mikrobiyotasının dengesini sağlayan, sindirim sistemine yararlı ve canlı bakterilerin eklendiği gıdalar olarak tanımlanmaktadır. İnsan sağlığına yararlı, canlı bakteriler olan probiyotikler diyare, Crohn hastalığı, bazı kalp damar hastalıkları, kanserler, ürogenital ve orofaringeal enfeksiyonların rutin tedavisinde güvenle kullanılmaktadır. Probiyotik kullanımı çocuklardaki enfeksiyöz diyare vakalarında (akut

enfeksiyöz ve antibiyotik ilişkili diyare), turist diyaresinde, yenidoğanda nekrotizan enterokolitte, *Helicobacter pylori* enfeksiyonunda, solunum yolu enfeksiyonlarında, kulak burun boğaz enfeksiyonlarında, idrar yolu enfeksiyonlarında, vajinal enfeksiyonlarda ve ciddi hastalıklar sonucu gelişen komplikasyonlarında, besin duyarlılıkları ve alerjilerde, *C. difficile* enfeksiyonunda, astım tedavisinde, diş çürüklerini önlemede ve hepatit tedavisinde kullanılabilmektedir.^{3,92,127,137}

Probiyotiklerin gastrointestinal sistem üzerindeki olumlu etkisinin kanıtlanması üzerine oral mikrobiyotada sebep olduğu değişiklikler de araştırılmaktadır. Ağız boşluğunda bulunan patojen mikroorganizmaların uzaklaştırılması nedeniyle bakteriyoterapi yaklaşımları arasında sayılabilmektedir. Bu yüzden probiyotiklerin oral patojenleri uzaklaştırırken doğal mikrobiyotayı etkilememesinden dolayı enfeksiyonla mücadelede önemli bir yaklaşım olabileceği de öne sürülmektedir. Bu nedenle son yıllarda, probiyotikler ağız sağlığını geliştirmek için bir tedavi veya destek ajan olarak kullanımı araştırılmaktadır.^{127,136}

Probiyotiklerin oral mikrobiyota üzerindeki etkisine yönelik, dental biyofilmin kaldırılması üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bu yüzden, dental biyofilmin neden olduğu ağız hastalıklarından periodontal hastalık ve diş çürüğünü önlemede probiyotiklerin etkisi değerlendirilmiştir. Sadece çürük riskinin azaltılmasında değil, periodontal hastalıkların ve ağız kokusunun (halitozis) önlenmesinde de oldukça faydalı olan bu canlı ilaçların etkinliği, karyojenik ve periodontal bakterilerin kolonizasyonunu azaltma, besin için yarış, plak kompozisyonunu değiştirme, pH farklılıkları ve oral mukozada bağışıklık yanıtını artırması gibi birçok olaya bağlanmaktadır. Ağız hastalıkları üzerinde probiyotiklerin etkisi çalışmalarla gösterilirken, etkin olması için kullanılması gereken mikroorganizma türü, verilmesi veya kullanılması gereken süre ve doz, bırakıldıktan sonra probiyotik kolonizasyonunun ve karyojenik bakteriler üzerindeki etkinin ne süre ile devam edeceği de halen araştırılmaktadır.^{87,134,135}

1.4.7.1. Periodontal hastalıklara etkisi

Periodontitis, sert ve yumuşak dokuları kapsayan, dokular üzerinde mikrobiyal kolonizasyon yapan (invaze olan veya olmayan), konak dokuda inflamatuvar ve immün yanıt oluşturan çok faktörlü bir dişeti hastalığıdır. Diş ve çevresindeki destek dokularının tamamını etkileyebilen, alveolar kemik üzerinde yıkım etkisi gösteren progresif bir dişeti

hastalığı olan periodontitis ile ilişkili asıl patojen mikroorganizmalar *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* ve *A. actinomycetemcomitans*'tır. Bu bakteriler dişeti altına kolonizasyon, bağışıklık sistemine direnç, konak dokunun bağışıklık sisteminden kaçabilme ve doku yıkımı geliştirebilme gibi virülans özelliklerine sahiptir.^{138,139}

Hastalığın patogeneğinde rol oynayan lokal doku bileşenlerinin karmaşası bakteriler, bakteriyel ürünler ve konak yanıt mekanizmalarının etkileşimi sonucu gelişmektedir. Son yıllarda, periodontal hastalıkların tedavisi veya hastalık yönetimi amacıyla antibiyotikler veya antimikrobiyal ilaçlar kullanılmaktadır. Ancak, probiyotiklerin genel sağlık üzerindeki olumlu sonuçları periodontal hastalıkların tedavisinde de kullanılmaları konusunda cesaretlendirmiştir. Periodontal hastalığın birinci nedeni olan plak ve diş taşı oluşumu probiyotiklerin kullanımı ile önlenemediğinden tedavi amacıyla da araştırmalar devam etmektedir. Bu araştırmaların sonuçlarına göre, probiyotik mikroorganizmaların yumuşak ve sert doku yüzeylerine kolonizasyonu ile dental biyofilm oluşumu engellenmekte böylece biyofilm organize dental plağa dönüşmemektedir. Ayrıca, probiyotikler ürettikleri antioksidanlar ile mineral oluşumunu sağlayan serbest elektronları nötralize ederek de dental plak oluşumunu engelleyebilirler.^{120,135,138}

1.4.7.2. Diş çürüğüne etkisi

Gelişmekte olan ülkelerde en önemli ağız sağlığı problemi diş çürükleridir. Diş kayıplarının önlenmesi için bu çürüklerin tedavisinin yanı sıra çürüklerin oluşmadan önlenmesi çok daha önemlidir. Son yıllarda, farmakolojik ürünlerin yanında özellikle beslenme ürünlerinin modifikasyonu ve çürük oluşumunu engelleyecek besinlerin tüketimi ile ağız içi patojenlerin kolonizasyonunun azaltılması sayesinde çürük gelişiminin engellenmesi özellikle çocukluk çağında önem kazanmıştır.^{9,40,55,56,120}

İnsanlarda oral mukozada, yenidoğan döneminden itibaren birçok mikroorganizma kolonize olmaya başlamaktadır. Bu mikroorganizmalar, ağız içi ortama ve çevresel koşullara bağlı olarak diş yüzeylerine ve dişeti epiteline tutunurlar. İmmün sistem bu kolonizasyonu devamlı izleyerek bu bakterilerin lokal dokulara invazyonuna engel olsa da diş plağı içinde kolonizasyonuna engel olamaz. Bu yüzden diş plağı yapısını oluşturan biyofilm tabaka ve oluşumuna neden olan mikroorganizmaların hedef alındığı bir çözüm arayışına girilmiştir.

Ancak, çözüm bulunabilmesi için öncelikle çürük gelişim mekanizmasının net şekilde anlaşılması gerekmektedir.

Dental biyofilmin diş yüzeyinde oluşması ile diş sert dokularının demineralizasyonu yani yıkımı başlamaktadır. Demineralizasyonun zaman içerisinde devam etmesi sonucu gelişen ve dejeneratif bir hastalık olan diş çürüğü, temel olarak dört ana faktörü içeren çok etkenli bir hastalıktır. Bu etkenler:

- Bakteriler,
- Şekerler,
- Predispozan faktörler ve
- Zamandır.^{40,55,61}

Diş çürükleri gelişiminde etken olarak sayılan en önemli patojen bakteri *S. mutans*'tır. Bu bakteri diyetle alınan şekeri hızlıca metabolize ederek asit oluşturur ve ağız içi pH'ın düşmesine neden olur.^{63,68} Farklı karyojenik bakteri türleri, fermente edilebilir karbonhidratlardan zengin bir diyet ve ana madde içindeki bileşenler arasındaki etkileşim ile diş ve tükürük yapısındaki farklılıklar demineralizasyon sürecinde farklılıklara neden olabilir. Çürük gelişiminin ilk aşaması olan demineralizasyonu sağlayan organik asit üretimi konak, bakteri ve besin üçlüsünün zaman içerisindeki etkileşimi sonucunda gerçekleşmektedir. Çürük lezyonunun başlaması ve ilerlemesi için her üç elemanın da bulunması gerekirken, bu sürecin durdurulması için de en az bir faktörün ortadan kaldırılmasının yeterli olduğu görüşü kabul edilmektedir.⁸⁷

Ayrıca, tükürükte bulunan birçok bakteri türü arasından *S. mutans* ilk olarak diş çürüğünün gelişimi için en önemli patojen olarak görülmektedir. Bu yüzden, önleyici ajanların etki mekanizması, başta *S. mutans* olmak üzere oral karyojenik bakterilerin kolonizasyonunu engellemeyi hedef alarak, diş çürüklerinin gelişimini önleyebilmektedir.^{63,68} *Lactobacillus* türleri de diş çürümesinin ilerlemesinde önemli bir role sahiptir. *S. mutans*'ın virülansının başlıca nedenleri asidojenik özelliği, asidik ortamlarda hayatta kalabilme, biyofilm oluşturabilme ve diş yüzeyindeki sert dokulara yapışabilme yeteneğidir. Ayrıca, tükürükte bulunan birçok bakteri türü arasından *S. mutans* ilk olarak diş çürüğünün gelişimi için en önemli patojen olarak görülmektedir.⁸⁶

Probiyotikler, farmakolojik olmayan ve son yıllarda çürük önlemede etkinliği araştırılan ürünlerdir. Tanımları gereği gıdalarla birlikte alınan ve belirli miktarda

alındıklarında kolonize oldukları bölgenin mikrobiyotasını dengeleyip konak dokunun sağlığını olumlu yönde etkileyen canlı mikroorganizmalardır.⁸⁷ Diş çürüğünü engelleme veya yavaşlatmada probiyotiklerin olumlu etkilerinin olabilmesi için diş yüzeyine bağlanma ve mikrobiyotaya kolonize olabilmeleri gereklidir. Karyojenik bakterilerle yarışmalı ve onlara zarar vererek proliferasyonlarını ve kolonizasyonlarını engellemelidir. Böylece, probiyotik bakteriler şeker metabolizmasını da etkileyerek organik asit üretimini azaltarak ortamın pH'sını yükseltebilmelidir.¹³⁹

Diş çürüğü ciddi bir ağız sağlığı sorunudur. Bu sorunun çözülmesi için çoğu zaman yüksek maliyet gerektiren dental tedaviler yapılmaktadır. Ancak, dental tedavilerin tamamlanmasının ardından bile ağız mikrobiyotasında artmış *S. mutans* ve *Lactobacillus*'lar olduğu için kısa süre içerisinde çürüklerin tekrarladığı görülmektedir. Bu yüzden karyojenik bakterileri hedef alan önleyici tedaviler ve tedavi ajanları geliştirilmeye çalışılmaktadır. Bu noktada probiyotik mikroorganizmalar diş yüzeyine karyojenik özellikteki patojen bakteriler yerine bağlanabildiklerinden çürük oluşumunu başlamadan bitirebilmektedirler. Ancak, etkin probiyotiğin bulunması için çalışmalar halen devam etmektedir. Son yıllarda, araştırmaları devam eden ve oral probiyotik olarak tanımlanan *S. salivarius* K12'nin karyojenik patojenler üzerindeki etkinliği halen araştırılmaktadır.

Çalışmanın birincil amacı karyojenik diyet sonrası değişen oral mikrobiyotada *S. salivarius* K12 diye bilinen oral probiyotiğin kullanımının *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerinin sayısı üzerindeki etkisinin gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu ile değerlendirilmesidir. Ayrıca, kullanılan probiyotik bırakıldıktan sonra da benzer etkinin sürüp sürdürmediğinin değerlendirilmesi de çalışmanın ikincil amacını oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasının hipotezi ise oral probiyotik kullanan ve kullanmayan gruplarda *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerinin sayısının benzer seviyede etkilenmesi üzerine kurulmuştur.



2. GEREÇ ve YÖNTEM

2.1. Etik onay

Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı'na 13/12/2011 tarihli ve 28141 sayılı Resmî Gazete'de yayımlanan 'Deneysel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik' maddeleri uyarınca hayvan deneyleri sırasında etik kurallar uygulanmıştır.¹⁴⁰ Ayrıca, bu çalışma için gerekli onaylar üniversitemiz Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan (Proje numarası: DA 22/24) 11.08.2022 tarihinde alınmıştır. (EK-1)

2.2. Ön istatistiksel analiz

Çalışmaya 0.06 etki büyüklüğü, 0.05 Tip 1 hata olasılığı ve %90 güç düzeyinde her gruba 8 olmak üzere toplam 32 (n=8) adet sıçan dahil edilmiştir. (EK-2)

2.3. Çalışma tasarımı

Çalışma randomize, kontrollü, takip süreli ve kesitsel tasarlanmış bir hayvan çalışması şeklindedir. Çalışmaya dahil edilen deney hayvanlarına *S. salivarius* K12 içerikli oral probiyotik ve karyojenik diyet uygulanması sonucunda *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerinin sayılarındaki değişim gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR) ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Çalışmanın akış şeması Resim 1'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil edilen sıçanlar rastgele 4 gruba dağıtılmıştır. Bu gruplar:

Grup 1: Probiyotik ve karyojenik diyet uygulanan grup (Deney grubu)

Grup 2: Probiyotik uygulanmayan ve karyojenik diyet uygulanan grup (Deney grubu)

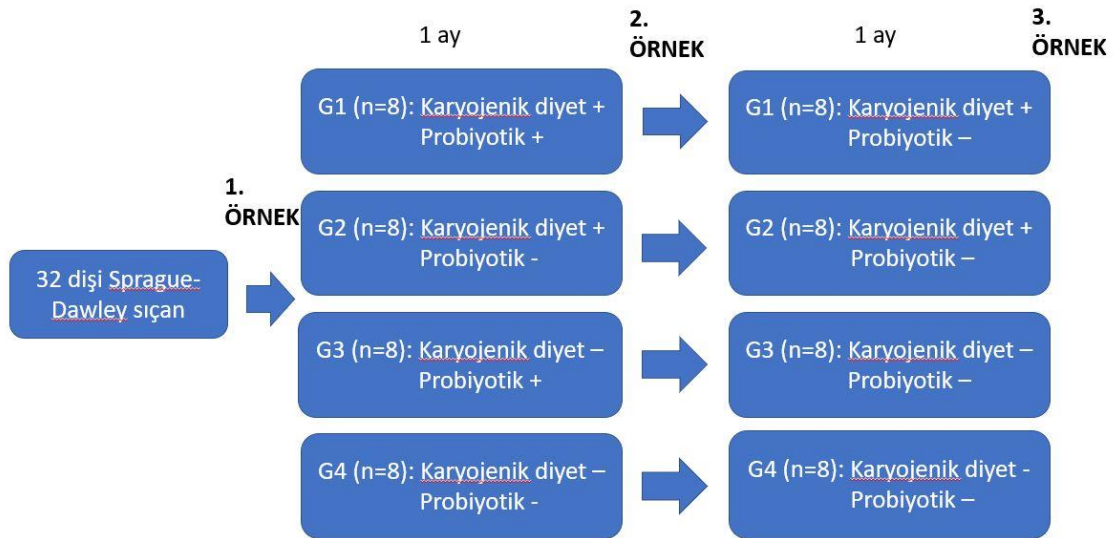
Grup 3: Probiyotik uygulanan ve karyojenik diyet uygulanmayan grup (Deney grubu)

Grup 4: Probiyotik ve karyojenik diyet uygulanmayan grup (Kontrol grubu)

2.4. Deney hayvanları hazırlanması

Çalışmaya dahil edilen 32 adet sıçan, 3-5 aylık dişi Sprague-Dawley türündendir. Çalışmaya dahil edilen sıçanlar 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık döngüsü olan, iyi havalandırılmış, %40 - %60 rölatif nem oranına ve 20-24 °C ortam sıcaklığına sahip odalarda barındırılmıştır. Ayrıca, dahil edilen sıçanların benzer miktarda su içip ve yem tüketebilmeleri için her kafeste 4 sıçan olacak şekilde dağılımları yapılmıştır (Resim 2). Kafeslerin üzerine probiyotik ve karyojenik diyet uygulanması ve uygulanmamasına göre G1, G2, G3 ve G4 grupları sırasıyla A-B, C-D, E-F ve G-H harfleriyle kodlama (Resim 3a) ve her sıçanın kuyrukları boyanarak numaralandırılmaları (Resim 3b) yapılmıştır. Tüm kafesler 12 saat gece ve 12 saat gündüz olacak şekilde düzenleme yapılmış odaya yerleştirilmiş ve benzer beslenme, ses ve bakım şekilleri uygulanmıştır.

Şekil 2.1. Çalışmanın akış şeması, grupların dağılımı ve örnek alım zamanları



Şekil 2.2. Sıçanların tutulduğu kafeslerin görseli, üst rafta karyojenik diyet ve alt rafta standart diyet uygulanan gruplar



Şekil 2.3. (a) Kafeslerin kodlandığı harflerin yazılı olduğu kartlar; (b) sıçanların numaralandırılmasını gösteren kuyruk boyaması



2.5. Karyojenik beslenme

Çalışmaya dahil edilen sıçanlar, karyojenik diyet uygulanan (Grup 1 ve Grup 2) ve uygulanmayan (Grup 3 ve Grup 4) şeklinde randomize olarak iki gruba (n=16) dağıtılmıştır. Karyojenik diyet ile beslenecek gruptaki sıçanlarda, dişler üzerinde biyofilm tabakası oluşumunu sağlamak için sükroz ağırlıklı diyet kullanılması literatürde önerilmektedir.^{127,141-143} Ayrıca, sıçanlar kemirgen özelliklerinden dolayı pelet yapısındaki yemi daha rahat tükettiklerinden pelet şeklinde yem hazırlanmıştır (Resim 2). Karyojenik diyet kullanmayan gruplar ise standart yemlerine devam etmişlerdir. Bu çalışmada dişler üzerinde biyofilm tabakası oluşumunu sağlayabilmek için kullanılan sükroz ağırlıklı diyet (Arden Araştırma & Deney, Ankara, Türkiye) %41 sükroz, %10 protein (%5.8 kazein, %5.8 soya), %5 yağ, bazı mineral (kalsiyum, fosfor, klor, bakır, çinko, manganez) ve vitaminlerini (D-vitamini, E-vitamini) içermektedir.¹⁴¹ Karyojenik diyet uygulanan gruplar 660 gr yem ve standart diyet uygulanan gruplar 1000 gr yem ile diyetle başlatılıp, yemleri bittikçe yenilenmiştir.

2.6. Probiyotik kullanımı

Karyojenik diyet uygulanması (Grup 1 ve Grup 2) ve uygulanmaması (Grup 3 ve Grup 4) şeklinde ikiye ayrılan deney hayvanları randomize şekilde probiyotik kullanan (Grup 1 ve Grup 3) ve kullanmayan (Grup 2 ve Grup 4) olacak şekilde her biri ikişer gruba dağıtılmıştır. Probiyotik olarak 10^9 koloni oluşturan birim *S. salivarius* K12 içeren oral probiyotik (Baptoblis® Oral Probiyotik, Enafarma, İstanbul, Türkiye) kullanılmıştır. Probiyotik kullanım süresi boyunca probiyotik kullanan gruplara, içerisinde 1×10^9 koloni oluşturan birim *S. salivarius* K12 bulunan su hazırlanmıştır. Bu gruplara, her sıçan için birer adet probiyotik tablet çözünmüş 100 µl solüsyon, her gün suları yerine verilerek içmeleri sağlanmıştır.¹⁴⁴ Probiyotik kullanan gruplarda (Grup 1 ve Grup 3) 1 ay boyunca probiyotik kullanılmıştır. Probiyotik tabletin çözündüğü içme suyu, şişeler içerisinde her kafes için ayrı ayrı hazırlanmış ve her gün yenilenmiştir (Resim 4a). Her kafese 4 sıçan için yerleştirilen ölçekli şişeden sıçanlar istedikleri zaman su içerek probiyotik mikroorganizmalara 24 saat boyunca maruz bırakılmıştır. Resim 4b’de görüldüğü gibi sıçanlar şişeden su içmiştir.

Şekil 2.4. (a) Sıçanlara içirilen probiyotik tabletlerin çözündürüldüğü su; (b) Sıçanların su içme şekli



2.7. Deney hayvanlarından ağız içi örnek alımı

Çalışmaya dahil edilen tüm deney hayvanları ($n=32$) karyojenik diyet uygulanan ve uygulanmayan şeklinde rastgele iki gruba ($n=16$) ayrıldıktan sonra probiyotik uygulanan ve uygulanmayan şeklinde yine rastgele alt gruplara ($n=8$) ayrılmıştır. Böylece 4 grup ($n=8$) şeklinde yürütülen çalışmadaki tüm deney hayvanları 2 ay süre ile takip edilmiştir. Tüm deney hayvanlarından henüz diyet ve probiyotik kullanımı başlanmadan önce ilk (T_0) ağız örnekleri, 1 aylık takip süresi sonunda (probiyotik kullanımı bırakıldıktan sonra ertesi gün) ikinci (T_1) ağız örnekleri ve son olarak da 2 aylık takip süresinin sonunda üçüncü (T_2) ağız örnekleri alınmıştır.

Çalışmaya dahil edilen sıçanlardan pipetaj yöntemi ile ağız içi örnekler toplanmıştır. Ağız içi örnek alınırken 100 μ l steril serum fizyolojik ağız içerisine verilerek pipetaj yöntemi ile ağız içi örnek alınmıştır. Mikropipet (Resim 5a) veya pastör pipeti ile alınan en az 200 μ l ağız içi örnekler steril, plastik, kapaklı ve ölçekli mikrosantrifüj tüpleri (Resim 5b) içerisinde toplanarak mikrobiyoloji laboratuvarında -80°C 'de saklanmıştır.

Şekil 2.5. (a) Sıçanlardan mikropipet aracılığı ile ağız içi örnek alımı; (b) Steril mikrosantrifüj tüpüne toplanmış bir sıçandan alınmış ağız içi örnek



2.8. Mikrobiyolojik analiz

Her gruba dahil edilen sıçanlar 2 ay süre ile takip edilmiş ve takip süresi boyunca, her sıçandan 3 kere ağız içi örnek alınmıştır. Pipetaj yöntemi ile her deney hayvanından alınan 200µl ağız içi örnekteki *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerine ait nükleik asit miktarlarının ayrı ayrı nicel olarak belirlenmesi için gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR) yöntemi kullanılmıştır. Steril mikrosantrifüj tüpü içerisinde -80°C’de saklanan ağız içi örneklerden deoksiriboz nükleik asit (DNA) izolasyonu yapılarak kPZR analizine kadar -20°C’de muhafaza edilmiştir.

2.8.1. DNA izolasyonu

Tüm deney süreci boyunca toplanan 96 adet tükürük örneğinden DNA izolasyonları yapılırken firma önerisi doğrultusunda (GeneMATRIX Tissue & Bacterial DNA Purification Kit, EURx Ltd., Gdansk, Polonya) izlenen adımlar şu şekildedir:

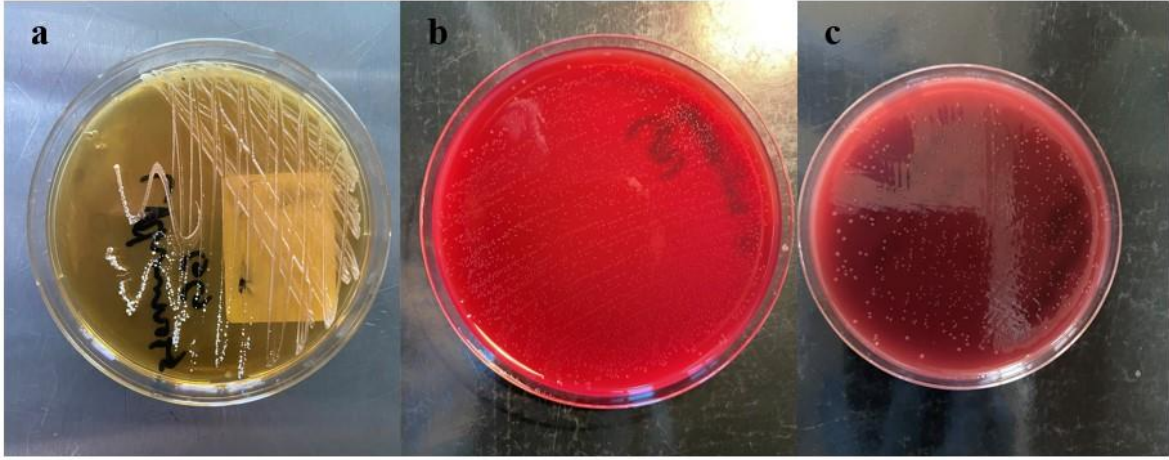
- 15000 x g devirde santrifüj yapıldı ve 100µl kalacak şekilde süpernatant atıldı.
- 300µl 'Lyse BG' tampon, 50µl BL tampon ve 2µl Ribonükleaz A karışıma eklendi, 3 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 37°C'de 15 dakika inkübe edildi.
- 20µl Proteinaz K çözünmüş hücrelere eklendi ve 3 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 56°C'de 30 dakika inkübasyon yapıldı.
- 350µl 'Sol T' tampon eklendi, 3 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 56°C'de 5 dakika inkübe edildi.
- 15 saniye vorteks ile karıştırıldı.
- 1 dakika 12000 x g santrifüj yapıldı.
- 600µl süpernatant DNA bağlayan 'spin-column' yerleştirilmiş toplama tüpüne aktarıldı.
- DNA bağlayan 'spin-column' 1 dakika 11000 x g santrifüj yapıldı.
- 'Spin-column' daki sıvı boşaltıldı ve tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- Kalan süpernatant toplama tüpüne yerleştirilmiş DNA bağlayan 'spin-column' aktarıldı ve tüm lizat rezinden geçene kadar 2 dakika 11000 x g santrifüj tekrarlandı.
- DNA bağlayan 'spin-column' daki sıvı boşaltıldı ve tekrar toplama tüpüne yerleştirildi.
- 500µl 'Walsh TX1' tampon eklendi ve 1 dakika 11000 x g santrifüj yapıldı.
- DNA bağlayan 'spin-column' daki sıvı boşaltıldı, tekrar toplama tüpüne tekrar yerleştirildi.
- 500µl 'Walsh TX2' tampon eklendi, 1 dakika 11000 x g santrifüj ardından, 1 dakika 11000 x g 'spin-down' yapıldı.
- DNA bağlayan 'spin-column' yeni toplama tüpüne (1.5-2ml) yerleştirildi ve 50µl 'Elution' tampon eklendi.
- DNA bağlayan 'spin-column' yerleştirilen toplama tüpü oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi.
- 1 dakika 11000 x g santrifüj yapıldı.

- ‘Spin-column’ atıldı, toplama tüpünün kapağı kapatıldı ve DNA analizi öncesinde -20°C’de saklandı.

2.8.2. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPZR)

DNA izolasyonları yapılan tüm örneklerde *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerine ait nükleik asit miktarlarını belirlemeye yönelik kPZR analizleri yapılarak hedef mikroorganizmaların klinik örneklerdeki sayıları belirlenmiştir. Bu aşamada, tür ve cins düzeyinde spesifik olarak dizayn edilmiş primer dizileri kullanılmıştır. Kantitasyon için standart suşlarla hazırlanmış 10^2 ile 10^8 konsantrasyonlardaki bakteri süspansiyonlarından elde edilen DNA’lar kullanılarak kPZR analizleri optimize edilerek standart eğriler oluşturulmuştur. Bu amaçla, MALDI-TOF MS ile identifikasyonu yapılmış *S. mutans* ATCC 35668, *S. salivarius* subsp. *salivarius* ve *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 standart suşları kullanılmıştır. Önceden laboratuvarımızda bulunan ve %5 ‘skim-milk’ içerisinde -20°C’de derin dondurucuda muhafaza edilen izolat stokları çözündürülerek *S. mutans* ve *S. salivarius* subsp. *salivarius* kanlı agar besiyerine ve *Lactobacillus rhamnosus* GG triptik soy agara tek koloni ekimi yapılmış ve ekim yapılan plaklar 35-37°C’de 2 gün (24-48saat) inkübasyona (EN500, İnkübatör, Nüve, Ankara, Türkiye) bırakılmıştır. Yeterli üreme olduğu görülen taze plaklardan her standart bakteri için (Resim 6a-c) tek kullanımlık steril öze ile 1-2 koloni alınıp 1.5×10^8 koloni oluşturan birim / ml değerinde olduğu kabul edilen 0.5 McFarland (Nefelometre Cihazı, BD PhoenixSpec, Becton Dickinson Şirketi, Maryland, A.B.D.) bulanıklık standardında hazırlanan bakteri süspansiyonu elde edilmiş ve 10^2 ile 10^8 konsantrasyonları arasında dilüsyonları hazırlanmıştır.

Şekil 2.6. (a) *Lactobacillus rhamnosus* GG; (b) *Streptococcus salivarius* subsp. *salivarius*; (c) *Streptococcus mutans* ekilmiş plaklar



Bu süreç boyunca, kPZR analizi sırasında kullanılacak olan *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerine özgü primer ve prob tasarımları yapılmış ve üretilmiştir. *Lactobacillus* türlerine yönelik değerlendirme yapılırken *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *Lactobacillus paracasei*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerine özgü primer dizileri yapılmıştır. Gerçek zamanlı kPZR analizinde kullanılan primer dizileri şu şekildedir:

- *S. salivarius*-F ACT GTA GCC CTC CAT GCT GT
- *S. salivarius*-R GAA TCA GGT TGT GAY AAA AGA AG
- *S. mutans*-F GGA CGA CGT AGG CAG AAT AC
- *S. mutans*-R GCT TAG CTG AAA TTG CTG AAG A
- *Lactobacillus*-F CAR ATC ATC ATG CCC CTT AT
- *Lactobacillus*-R ACT AGC GAT TCC GAC TTC RT

Ağız içi örneklerden elde edilen DNA izolatlarındaki DNA konsantrasyonu NanoDrop 2000/2000C (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, A.B.D.) ile ölçülüp ve kPZR analizine başlanmıştır. Tüm örnekler için gerçek zamanlı kPZR analizi sırasında çalışılacak bakteriye özgü ‘primer-F’, ‘primer-R’, prob ve ‘grade’ su karışımları Tablo 3’de gösterildiği şekilde hazırlanmıştır. Kontaminasyonun önlenmesi için PZR karışımları biyogüvenlik kabini (UVC/T-M-AR DNA/RNA UV - Cleaner Box, Biosan, Riga, Letonya) içerisinde hazırlanmıştır (Resim 7a).

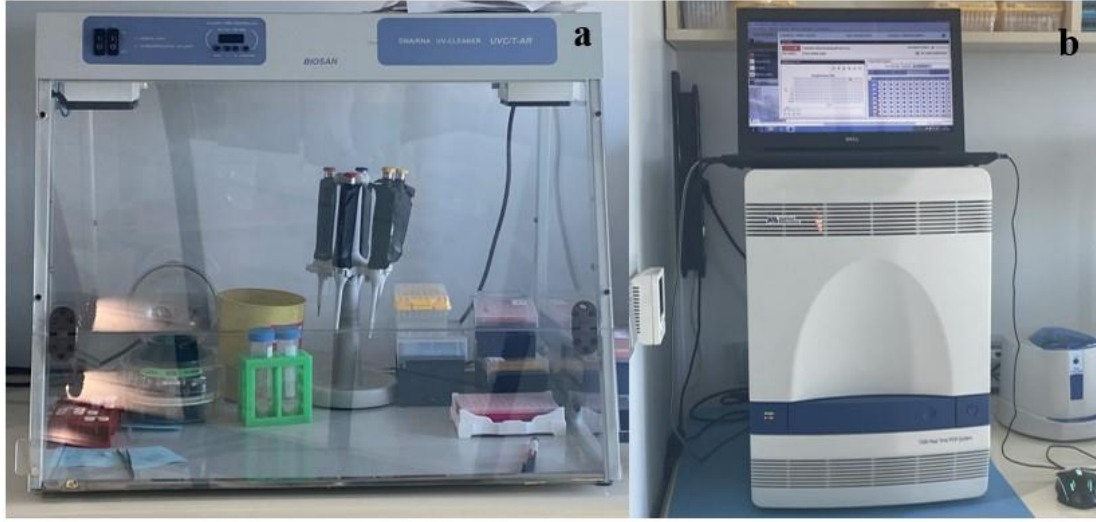
Tablo 2.1. Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyon karışımı (1X)

Bileşen	Stok Konsantrasyon	Reaksiyon Konsantrasyon	Bir reaksiyon için
kPZR 5x Prob-karışımı	5X	1X	4.0 µl
Primer-F	10 µM	0.3 µM	0.6 µl
Primer-R	10 µM	0.3 µM	0.6 µl
Prob	10 µM	0.3 µM	0.6 µl
DNA			5 µl
PZR 'grade su' ile 20 µl'ye tamamlanır			9.20 µl

Gerçek zamanlı kPZR reaksiyonları Applied Biosystems-ABI 7500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, A.B.D.) cihazında yapılmıştır (Resim 7b). Cihazın sıcaklık döngüleri, 1-döngü 95°C 15 dakika, 40-döngü 95°C 15 saniye ve 60°C 1 dakika şeklinde ayarlanmıştır. 96'lık mikroplakta her kuyucuğa 15µl PZR karışımı, 5µl bakteri DNA'sı dağıtılmış ve standart örnekler de dahil tüm reaksiyonlar 2 tekrarlı olarak çalışılmıştır.

PZR karışımlarının hazırlanma ve kuyucuklara dağıtma işlemleri kabin içerisinde soğuk blokta gerçekleştirilmiştir. 'TaqMan' problemlerinin kullanıldığı gerçek zamanlı kPZR işlemi tamamlandıktan sonra, örneklerin amplifikasyon eğrisi analizi yapılmıştır. Tüm örnekler için ayrı ayrı yapılan amplifikasyon eğrisi analizi, Applied Biosystems-ABI 7500 (v2.3, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, A.B.D.) yazılımında yapılmıştır.

Şekil 2.7. (a) kPZR analizi sırasında PZR karışımlarının hazırlandığı biyogüvenlik kabini; (b) Gerçek zamanlı kPZR analizi sırasında kullanılan cihaz



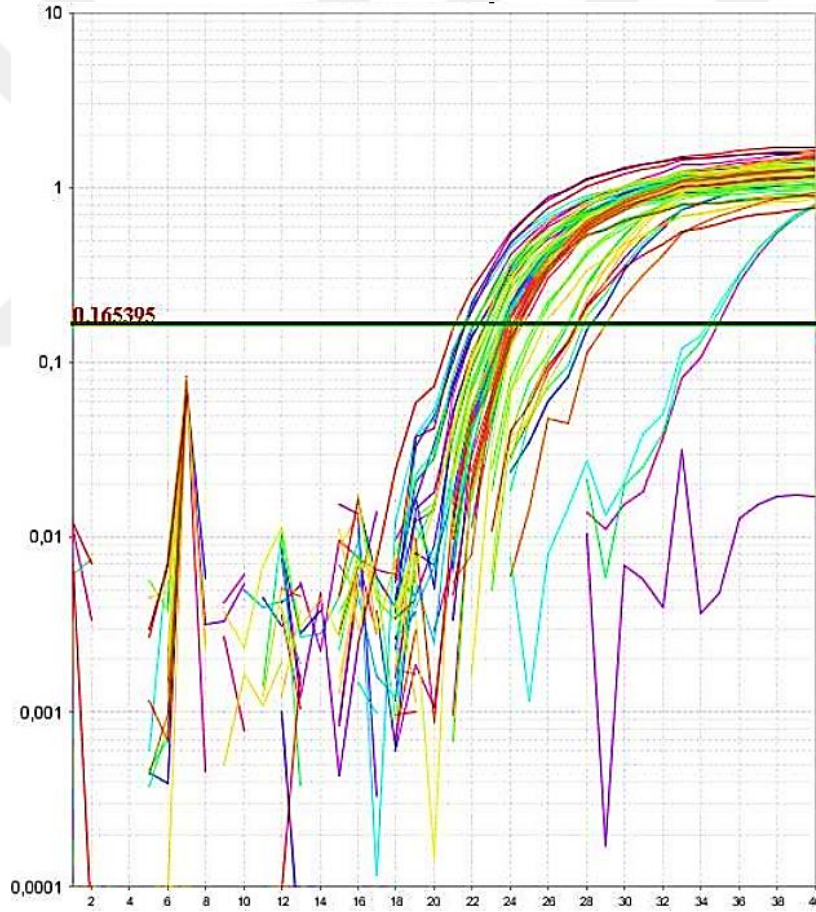
2.9. İstatistiksel Analiz

Gerçek zamanlı kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu sonucunda elde edilen veriler ‘Sosyal Bilimler İçin İstatistik Programı’ (Statistical Package for the Social Sciences – SPSS V. 22, IBM, New York, A.B.D.) ile analiz edilmiştir. Her grup için minimum, maksimum, aralık, ortalama ve 42abul42rd sapma değerleri tanımlayıcı istatistik olarak verilmiştir. Verilerin normal dağılımları Shapiro-Wilk testi ile değerlendirilmiş ve normal dağılım gösterenler parametrik, göstermeyenler parametrik olmayan testler ile analiz edilmiştir. *Lactobacillus* türlerinin sayısını gösteren veriler, normal dağılıma uygunluk göstermediği için gruplar arası karşılaştırma parametrik olmayan testlerden ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi ile değerlendirilmiştir. *S. salivarius* verilerinin gruplar arası karşılaştırılmasında, gruplar normal dağılıma uygunluk göstermediği için parametrik olmayan testlerden ‘Kruskal-Wallis’ varyans analizi ile test yapılmıştır. *S. salivarius* verilerinin grup içi değerlendirilmesinde ise G1 grubu için parametrik olmayan testlerden ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi ve normal dağılıma uygunluk gösteren G3 grubu için de parametrik testlerden Bağımlı Örneklem T-testi ile istatistiksel analizi yapılmıştır. Takip sürelerine bağlı ikili karşılaştırma sonuçlarının p- değerlerine ‘Bonferroni’ düzeltmesi yapılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ olarak 42abul edilmiştir. *S. mutans* verileri nicel olarak belirlenen amplifikasyon eğrisinin altında olduğundan “0” olarak 42abul edilmiştir. Bu nedenle gruplar arası ve grup içi zamana bağlı farklılık istatistiksel analiz testleri ile değerlendirilememiştir.

3. BULGULAR

Otuz iki sıçanın dahil edildiği bu tez çalışmasında, dahil edilen tüm deney hayvanları 4 gruba dağıtılmıştır. Her deney hayvanından çalışmaya başlamadan önce (T0), 1 aylık takip dönemi (T1) ve 2 aylık takip dönemi (T2) sonunda olmak üzere, üçer ağız içi örnek alınarak toplam 96 örnek çalışma kapsamında analiz edilmiştir. Her örnekteki *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerinin miktarları kPZR ile elde edilmiştir. Gerçek zamanlı kPZR analiz sonucunda elde edilen amplifikasyon eğrileri *Lactobacillus* türleri, *S. salivarius* ve *S. mutans* için sırasıyla Resim 8, Resim 9 ve Resim 10’da gösterilmektedir.

Şekil 3.1. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde *Lactobacillus* türlerinin nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi



Grup 1 (G1), Grup 2 (G2), Grup 3 (G3) ve Grup 4 (G4) için T0, T1 ve T2 dönemlerinde alınan tüm örneklerdeki *Lactobacillus* türlerinin miktarlarına yönelik minimum, maksimum, aralık, ortalama, standart sapma değerleri ve aralarındaki istatistiksel fark düzeyi Tablo 4’de verilmiştir. Elde edilen veriler ‘Shapiro-Wilk’ testi ile değerlendirildiğinde normal dağılım

göstermedikleri için parametrik olmayan testlerden ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi ile test edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda T0 ($p=0.131$; $p \geq 0.05$), T1 ($p=0.676$; $p \geq 0.05$) ve T2 ($p=0.435$; $p \geq 0.05$) dönemlerinde alınan örneklerde gruplar arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Her grubun kendi içerisinde zamana bağlı değişimi istatistiksel olarak değerlendirildiğinde, her gruba ait veriler normal dağılıma uygun olmadığı için parametrik olmayan testlerden ‘Friedman’ sıralamalı iki yönlü varyans analizi ile test edilmiş ve G1 ($p=0.430$; $p \geq 0.05$), G2 ($p=0.325$; $p \geq 0.05$), G3 ($p=0.882$; $p \geq 0.05$) ve G4 ($p=0.368$; $p \geq 0.05$) için farklı takip sürelerinde alınan örnekler arasında *Lactobacillus* sayısı açısından istatistiksel fark görülmemiştir. İstatistiksel analizler sonucunda elde edilen sonuçlar G1, G2, G3 ve G4 grupları için sırasıyla Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7 ve Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Tüm örneklerdeki *Lactobacillus* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılma sonuçları

<i>Lactobacillus</i> türleri	n	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	32	4.28×10^6	8.49×10^9	8.48×10^8	7.28×10^8	1.81×10^9	$p=0.131$
T1	31	8.70×10^6	8.53×10^9	8.52×10^9	8.06×10^8	2.20×10^9	$p=0.676$
T2	30	8.52×10^6	4.34×10^9	4.33×10^9	4.16×10^8	1.13×10^9	$p=0.435$

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo 3.2. Grup 1 örneklerindeki *Lactobacillus* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>Lactobacillus</i> türleri	n	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	2.05×10^7	4.71×10^9	4.70×10^9	1.73×10^9	2.11×10^9	$p=0.430$
T1	8	1.13×10^7	4.20×10^9	4.20×10^9	5.99×10^8	1.46×10^9	
T2	6	1.10×10^7	3.54×10^8	3.43×10^8	7.65×10^7	1.36×10^8	

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo 3.3. Grup 2 örneklerindeki *Lactobacillus* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>Lactobacillus</i> türleri	n	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	2.06×10^7	1.24×10^9	1.22×10^9	2.81×10^8	4.16×10^8	p=0.325
T1	8	9.72×10^6	9.85×10^7	8.87×10^7	5.45×10^7	3.44×10^8	
T2	8	9.06×10^6	2.57×10^9	2.56×10^9	6.08×10^8	1.01×10^9	

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

Tablo 3.4. Grup 3 örneklerindeki *Lactobacillus* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>Lactobacillus</i> türleri	n	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	5.19×10^6	8.49×10^9	8.48×10^9	1.10×10^9	2.99×10^9	p=0.882
T1	8	8.52×10^6	4.34×10^9	4.33×10^9	8.19×10^8	1.59×10^9	
T2	8	1.16×10^7	8.53×10^9	8.52×10^9	2.23×10^9	3.87×10^9	

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

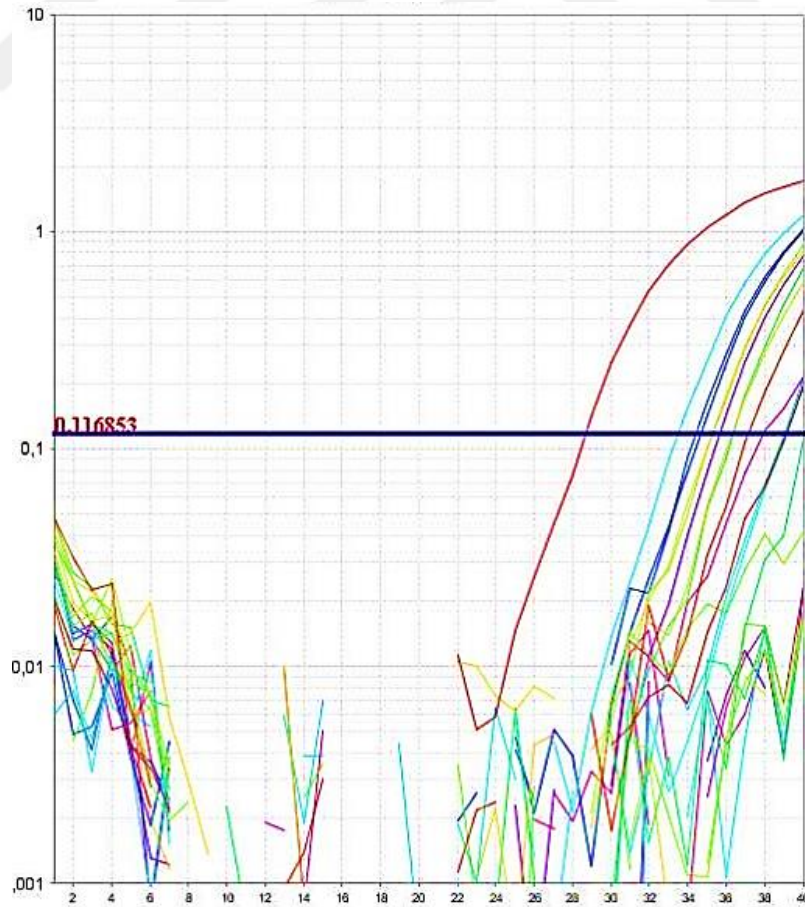
Tablo 3.5. Grup 4 örneklerindeki *Lactobacillus* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>Lactobacillus</i> türleri	n	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	4.28×10^6	6.03×10^8	5.99×10^8	1.44×10^8	2.09×10^8	p=0.368
T1	7	1.67×10^7	9.84×10^7	8.16×10^7	5.29×10^7	2.66×10^7	
T2	8	7.70×10^6	8.12×10^7	7.25×10^7	2.77×10^7	2.60×10^7	

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p < 0.05$ olarak kabul edildi.

S. salivarius'a ait kPZR analizinde kullanılan amplifikasyon eğrisi Resim 9'da gösterilmektedir. G1, G2, G3 ve G4 için T0, T1 ve T2 dönemlerinde alınan tüm örneklerdeki *S. salivarius* koloni sayılarına yönelik minimum, maksimum, aralık, ortalama ve standart sapmayı içeren tanımlayıcı istatistik değerleri Tablo 9'da verilmiştir. Elde edilen veriler 'Shapiro-Wilk' testi ile değerlendirildiğinde normal dağılım göstermedikleri için parametrik olmayan testlerden 'Kruskal-Wallis' varyans analizi ile test edilmiştir. İstatistiksel analiz sonucunda T0 ($p=1$; $p \geq 0.05$) döneminde alınan tüm örneklerde saptanan koloni sayıları açısından istatistiksel fark görülmezken T1 ($p < 0.05$) ve T2 ($p < 0.05$) dönemlerinde alınan tüm örneklerde saptanan koloni sayısı açısından gruplar arasında istatistiksel fark görülmüştür. T1 ve T2 döneminde toplanan verilerin gruplar arası karşılaştırılması Tablo 10'da gösterilmiştir. Bu verilere göre G1-G2 ($p=0.002$; $p < 0.05$), G1-G4 ($p=0.002$; $p < 0.05$), G2-G3 ($p=0.001$; $p < 0.05$) ve G3-G4 ($p=0.001$; $p < 0.05$) arasında istatistiksel fark görülürken, G1-G3 ($p=1$; $p \geq 0.05$) ve G2-G4 ($p=1$; $p \geq 0.05$) arasında istatistiksel fark görülmemiştir.

Şekil 3.2. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde *S. salivarius*'a ait nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi



Tablo 3.6. Tüm örneklerdeki *S. salivarius* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılma sonuçları

<i>S. salivarius</i>	N	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	32	0	0	0	0	0	p=1
T1	32	0	8.78×10^9	8.78×10^9	9.45×10^8	2.03×10^9	p<0.05*
T2	32	0	8.84×10^9	8.84×10^9	1.08×10^9	1.91×10^9	p<0.05*

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma; Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi. p<0.05 olan değerler * ile gösterildi.

Tablo 3.7. *S. salivarius* koloni sayılarının her zaman aralığı için gruplar arası karşılaştırılmasına yönelik istatistiksel analiz sonuçları

İkili grup karşılaştırması	T1	T2
G1-G2	0.002*	0.002*
G1-G3	1.000	1.000
G1-G4	0.002*	0.002*
G2-G3	0.001*	0.001*
G2-G4	1.000	1.000
G3-G4	0.001*	0.001*

p-değerleri Bonferroni düzeltmesi ile uyarlanmış değerlerdir. İstatistiksel anlamlılık p<0.05 olarak kabul edildi. p<0.05 olan değerler * ile gösterildi. *S. salivarius* -T0 tüm gruplarda 0 değerinde olduğu için p=1 şeklinde elde edildiğinden gruplar arası karşılaştırma yapılamamıştır.

S. salivarius sadece G1 ve G3 gruplarında kolonize olduğundan, öncelikle G1 ve G3 gruplarındaki veriler Shapiro-Wilk testi ile normal dağılıma uygunluk açısından değerlendirilmiştir. G1'deki *S. salivarius* verileri normal dağılıma uygun olmadığı için parametrik olmayan testlerden 'Friedman' sıralamalı iki yönlü varyans analizi testi ile değerlendirilmiş ve T0-T1 (p=0.018; p<0.05) ve T0-T2 (p=0.003; p<0.05) için farklı takip

sürelerinde alınan örnekler arasında istatistiksel fark görülürken, T1-T2 ($p=1$; $p\geq 0.05$) örnekleri arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Bu veriler Tablo 11’de gösterilmiştir. G3’teki *S. salivarius* verileri Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildiğinde normal dağılıma uygun olduğu için Bağımlı Örneklem T-testi ile analiz edilmiştir. G3’teki *S. salivarius* miktarının zamana bağlı değişiminin istatistiksel analizi için yapılan ikili karşılaştırma sonucunda T0-T1 ($p=0.03$; $p<0.05$) ve T0-T2 ($p=0.043$; $p<0.05$) arasında istatistiksel fark görülürken, T1-T2 ($p=0.448$; $p\geq 0.05$) arasında istatistiksel fark görülmemiştir. Bu istatistiksel veriler Tablo 12’de gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Grup 1 örneklerindeki *S. salivarius* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>S. salivarius</i>	N	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	0	0	0	0	0	T0-T1: $p=0.018^*$
T1	8	3.91×10^6	8.78×10^9	8.77×10^9	2.34×10^9	3.38×10^9	T0-T2: $p= 0.003^*$
T2	8	6.18×10^8	4.73×10^9	4.11×10^9	1.79×10^9	1.38×10^9	T1-T2: $p= 1$

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi. $p<0.05$ olan değerler * ile gösterildi.

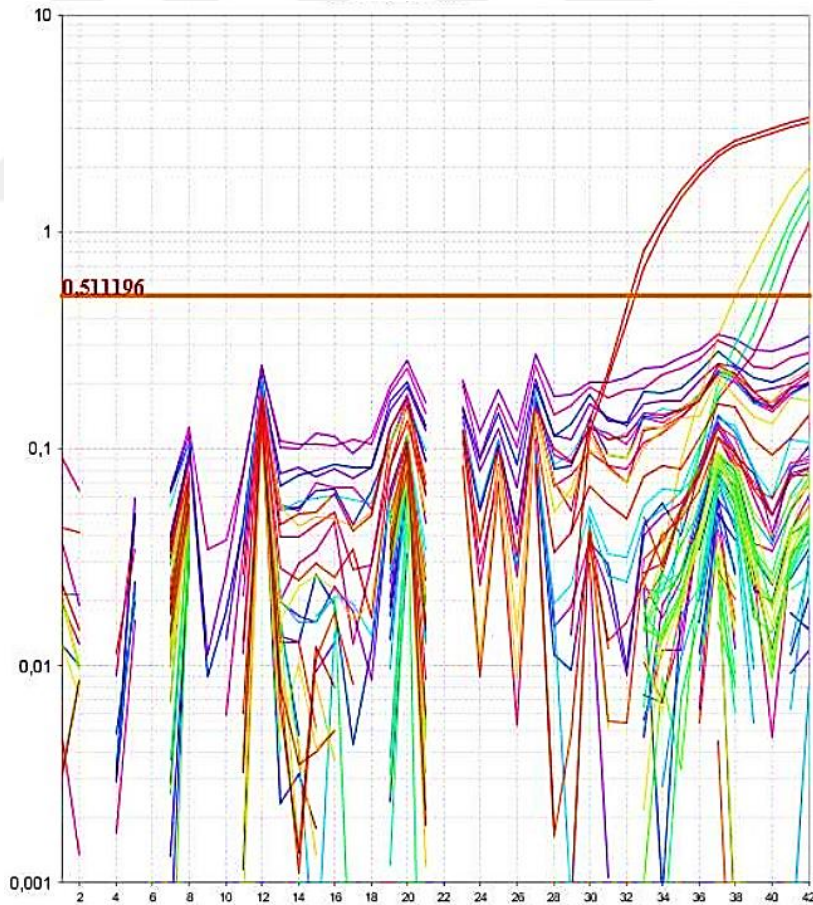
Tablo 3.9. Grup 3 örneklerindeki *S. salivarius* koloni sayıları açısından tanımlayıcı istatistik verileri ve grup içi istatistiksel analiz sonuçları

<i>S. salivarius</i>	N	Min	Maks	Aralık	Ort	Ss	p-değeri
T0	8	0	0	0	0	0	T0-T1: $p=0.03^*$
T1	8	8×10^6	4.10×10^9	4.09×10^9	1.44×10^9	1.50×10^9	T0-T2: $p=0.043^*$
T2	8	6.77×10^7	8.84×10^9	8.77×10^9	2.54×10^9	2.91×10^9	T1-T2: $p=0.448$

Min: Minimum, Maks: Maksimum, Ort: Ortalama, Ss: Standart sapma, Aralık: Minimum ve maksimum değerler arası fark; İstatistiksel anlamlılık $p<0.05$ olarak kabul edildi. $p<0.05$ olan değerler * ile gösterildi.

S. mutans'ın gerçek zamanlı kPZR ile analizinde, her bir örnekteki *S. mutans*'a ait nükleik asitlerin yeterince amplifiye olmadığı ve eşik değerin altında kaldığı Resim 10'da gösterilmektedir. Resim 10'da gösterilen grafikte her döngüde ΔR_n değişimi ile amplifikasyon eğrisinin ilişkisi gösterilmektedir. Örneklerdeki *S. mutans*'a ait amplifiye olan DNA miktarlarının "0.511196" ile gösterilen eşik çizgisinin altında kaldığı, farklı döngülerde artış gösterdiği ancak yeterince artmadığından yarattığı bu floresan düzeylerinin florometre ile algılanamadığı görülmüştür. Bu nedenle, *S. mutans* verileri nicel olarak belirlenen sınırın altında olduğundan "0" olarak elde edilmiştir. Bu sonuç *S. mutans*'ın kolonize olmadığını göstermektedir. Her grup için aynı veri elde edildiği için gruplar arası ve grup içi zamana bağlı farklılık açısından istatistiksel analiz testleri ile değerlendirilememiştir.

Şekil 3.3. Tüm örneklerin kPZR ile analizinde *S. mutans*'a ait nükleik asit miktarlarının amplifikasyon sonrası eşik seviye ile ilişkisi



4. TARTIŞMA

Diş çürüğü, ana patojen olarak bakterilerin rol oynadığı ve başta karbonhidrat içeren ürünlerin tüketimi olmak üzere birçok faktörün de etkisiyle diş yüzeyindeki sert dokuların kronik ve progresif yıkımına neden olabilen en yaygın, bulaşıcı ağız hastalığıdır. Çürükler, çocuklardan yaşlılara kadar her yaşta ortaya çıkabilen geniş bir yelpazeye ve yüksek insidansa sahiptir. Çocukluk özellikle bebeklik döneminde karşılaşılan erken çocukluk çağı çürükleri en zararlı olanıdır ve çene yüz bölgesi büyüme ve gelişimini olumsuz etkiler. Bu nedenle Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya genelinde okul öncesi çocuklar arasında yaygın bir halk sağlığı sorunu haline gelmiştir.^{5,145,146}

Diş çürüğü görülme sıklığını etkileyen, oral mikrobiyotadaki karyojenite özelliği taşıyan patojen mikroorganizmalar başta olmak üzere birçok faktör vardır.^{145,146} Bu faktörler, yüksek şeker içeriği, zayıf oral hijyen, tükürük akışında ve içeriğinde değişim, yetersiz florür alımı, karyojenite özelliği taşıyan bakteri sayısında artış, immünolojik sorunlar ve genetikdir. Tüm bu faktörler oral mikrobiyotada dengesizliğe neden olur.¹²⁷ Bu dengesizliğin kısır döngü şeklinde devam etmesi ile artan asidite, diş yüzeyinde sert doku kaybına neden olur ve diş çürüğü gelişmeye başlar. Diş yüzeyinde mikro düzeyde başlayan yıkım, zaman içerisinde de ilerleyerek dişte harabiyete yol açar.¹⁴⁷ Dişte madde kaybını önlemek için bu dinamik süreci en başta önlemek, uygulanabilecek en kolay yollardan birisidir ve bu amaçla kullanılabilecek yöntem ve ajan arayışı devam etmektedir.

Dental biyofilm oral mikrobiyotada yer alan mikroorganizmalar ile patojen mikroorganizmalardan oluşan komplike yapıya sahip mikrobiyal tabakadır. Diş çürüğünde yıkım mekanizmasını başlatan ana faktör diş yüzeyinde biriken biyofilm tabakadır. Diş yüzeyinden biyofilm tabakanın kaldırılması mekanik temizlik ve koruyucu veya önleyici ajanların kullanımıyla sağlanabilmektedir. Bu ajanlar antibakteriyel özellik gösteren, diş yüzeyinde yıkım anlamına gelen demineralizasyonu engelleyen veya diş yüzeyinden uzaklaşan minerallerin geri kazandırılması anlamına gelen remineralizasyonu artırma potansiyeline sahip olmalıdır.^{147,148} Bu özelliklere sahip diş hekimliğinde en sık kullanılan koruyucu ajan florür, topikal uygulanabilen ve altın standart olarak kabul edilen bir ajandır.^{134,135} Ancak tartışmalı toksik özelliği nedeniyle alternatif koruyucu ajan arayışı devam etmektedir. Farmakolojik ajanlardan gittikçe uzaklaşıldığı bu dönemde, farmakolojik olmayan ürünler devreye girmektedir. Bu amaçla halen çalışmaları devam eden probiyotik

mikroorganizma içeren gıdaların ve takviye ürünlerin de koruyucu ajan olarak etkinliği araştırılmaktadır.^{134,135,149}

Probiyotikler, konakçının sağlığına faydalı, yeterli sayıda canlı mikroorganizmayı içeren gıda bileşenleridir. Yoğurt gibi uzun yıllardan beri yaygın olarak kullanılan fermente süt ürünlerinde bulunurlar ve özellikle bağırsak mikrobiyal sağlığını iyileştirmeleriyle bilinirler. Gastrointestinal sistemde hastalıkları tedavi etmek ve önlemek için en sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalar *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleridir. Probiyotik bakteriler bağırsak kanalında uygun pH'ı korur ve laktik asit ile bakteriyosin üreterek potansiyel patojenlerin de kolonizasyonunu engeller.¹⁵⁰ Probiyotik mikroorganizmaların, belirgin zararları ve yan etkileri olmadığından uzun yıllardır güvenle kullanılmaktadırlar. Bu yüzden de patojenik ve toksik olmadıkları kabul edilmektedir.

Piyasada en fazla bulunan takviye ürünlerde de *Bifidobacterium* ve *Lactobacillus* türleri bulunmaktadır. Ancak bazı *Lactobacillus* türlerinin diş çürüğünün gelişimiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir.¹⁵⁰ Diş çürüğü söz konusu olduğunda dişler üzerinde biriken biyofilm tabakanın oluşumunu engellemek için çok sayıda mikroorganizma türü denenmektedir. Bu nedenle, dental biyofilm oluşumunu önleyecek ideal probiyotik mikroorganizmayı bulmak adına farmakolojik olmayan ürünler geliştirilmeye devam etmektedir.

Ağız boşluğunda probiyotik tedavisine yönelik yaklaşımlar, zararsız bakterilerin, patojen mikroorganizmaların kolonize olacağı yüzeyde veya biyofilmde kolonize olabileceği hipotezine dayanmaktadır.^{150,151} Etkinin suşa özgü olduğunu vurgulamak önemlidir. Farklı suşlar farklı etkiler gösterebildiği için bir probiyotik suşun etkileri genelleştirilmemelidir.^{150,152,153} Oral mikrobiyotaya ve dental biyofilm oluşumu düşünüldüğünde de probiyotiklerin beklenen etki mekanizması, probiyotik mikroorganizmalar olan yararlı bakterilerin zararlı bakterilerin önüne geçmesi ve onların kolonizasyonunu engellemesidir. Ayrıca, ortamın asiditesini nötrlemesi ve laktik asit üreten sağlıklı fermente süt ürünleri kullanımı ile diyetin de modifiye edilmesi ile dental biyofilm oluşumu sekteye uğratılabilir.

Her bireyin mikrobiyotası benzersiz olduğundan bireylerdeki probiyotik etkisini tahmin etmek zordur. Probiyotik bakteriler ortak mikrobiyotayla farklı şekillerde etkileşime girer; ancak etki mekanizmaları hala tam olarak anlaşılamamıştır ve bunlarla ilgili çalışmaların çoğu in-vitro ve hayvanlar üzerindedir.¹⁵⁰ Bu nedenlerle probiyotik

alışmalarında etkinliğin net şekilde değerlendirilebilmesi için standart diyet ve ortamın sağlanması önemlidir. Bu yüzden bu tez çalışmasında diyet ve ortamın standardize edildiği hayvan deneyleri çalışması tercih edilerek probiyotik etkinliğinin sadece kullanılan probiyotiğe bağlı değişimi araştırılmıştır.

Son birkaç yıldır *S. salivarius* suşlarının probiyotik mikroorganizma olarak etkinliği araştırılmaktadır. *S. salivarius* K12 suşunu içeren oral probiyotik, tablet formunda üretilmiş ve takviye ajan olarak çalışmaları devam etmektedir. Bu nedenle bu tez çalışmasında, henüz literatürde hayvan çalışması bulunmayan *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma içeren tabletin sıçanların oral mikrobiyotasında oluşan dental biyofilm üzerindeki etkinliği değerlendirilmiştir. Bu çalışmanın birincil amacı *S. salivarius* K12'nin karyojenik diyet varlığında etkinliğinin değerlendirilmesidir. Amaç kapsamında, karyojenik diyet nedeniyle oluşan dental biyofilmin başlıca etkeni olan *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerine etkisini değerlendirilmesi ve ileride yapılacak klinik çalışmalar için nc sonuçlar oluşturmasıdır. Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların etkinliğinin ve bırakıldıktan sonra oral mikrobiyotadaki değişiminin değerlendirilmesi de çalışmanın ikincil amacını oluşturmaktadır.

Oral mikrobiyotanın yiyecek ve içeceklerin etkisiyle olumlu ve olumsuz yönde değişiklik gösterdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bu noktada olumlu yönde etki söz konusu olduğunda en fazla ne çıkanlar laktik asit üreten bakterilerin rahatlıkla üreyebildiği gıdalardır. Bunların başında yoğurt, kefir gibi süt ürünleri gelirken probiyotik mikroorganizmaların süt ve süt ürünleri ile tüketildiğinde etkisinin arttığı yine çalışmalarla gösterilmiştir.^{87,106,126,129} Ayrıca, probiyotik mikroorganizmaların mukozayla temasının hangi formda olduğu da temas süresini etkilemektedir.^{106,127,128} Bu yüzden, probiyotik mikroorganizmaların tablet ve kapsül oral yolla alınarak, saşe ve damla şeklinde yiyeceklere özellikle süt ve süt ürünlerine katılarak alınmaları tavsiye edilmektedir. Bu da fermente süt ürünlerindeki laktik asit miktarını artırmanın yanı sıra bireye veya endikasyona uygun formdaki mikroorganizmanın alınması etkiyi de artırmaktadır.^{87,111,129-134} örneğin, oral mukozada etki beklenildiği durumda çiğneme tabletleri tercih edilirken, bebeklerde çiğneme fonksiyonu yeterince olamayacağından damla formu kullanıldığında oral kolonizasyonunun fazla olduğu bildirilmiştir. Probiyotik mikroorganizmaların miktarında kayıp olmadan alınması amaçlandığından farklı formlarda üretilmektedirler. Ancak, yapılan çalışmalarda form değişikliğinin etkisine dair tartışmalı sonuçlar bulunmaktadır.^{131,134,154}

Montalto ve arkadaşları kapsül veya likit formunda alınan probiyotik mikroorganizmaların *S. mutans* üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, kapsül veya likit şeklindeki farklı kullanım formlarının modifiye edilmesinin *S. mutans* miktarında önemli bir değişiklik göstermediğini bildirmişlerdir.¹³¹ Temas zamanını uzatarak *S. mutans* kolonizasyonunu önlemek amacıyla Çağlar ve arkadaşları bebek ve küçük çocukların kullandıkları emziklere probiyotik mikroorganizma içeren pastilleri yerleştirmişler ve bu emziklerden probiyotik salınımı yaparak tükürükteki *S. mutans* sayısını önemli derecede azalttığı sonucuna varmışlardır.¹³²

Sonuç olarak yukarıda bahsedilen çalışmalarda, süt ve süt ürünleri, sakız veya tablet içerisine eklenen probiyotik mikroorganizmaların günlük tüketiminin, tükürük içerisindeki *S. mutans* sayısı üzerinde olumlu, olumsuz ve nötr şeklinde farklı etkiler gösterdiği bildirilmiştir.^{106,131,132} Ayrıca, dental plak ve probiyotikler arasında temas zamanı kısa olduğu durumlarda aktivitelerinin zayıf olduğu ve probiyotiklerin oral dokularla temas süresi uzun tutulabilirse, dental biyofilm inhibisyonu üzerindeki aktivitelerinin daha etkin ve devamlı olabileceği de vurgulanmıştır.^{87,111,129-134} Wang ve arkadaşları *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma içeren tabletlerin 100µl suda çözündürerek 1×10^9 *S. salivarius* K12 içeren suyu içen farelerde mukozit tedavisinde etkinliğini değerlendirmiştir.¹⁴⁴ Bu tez çalışmasında da sıçanlara hazırlanan probiyotik mikroorganizma içeren su, Wang ve arkadaşlarının tarifine göre hazırlanmış ve her sıçan için 100µl suda 1 probiyotik tablet çözündürülerek kafeslere konulan su miktarı ayarlanmıştır.

Tüm bu nedenlerle, insanlarda özellikle çocuklarda yapılan çalışmalarda günlük diyet standardize edilemediğinden, çalışma sonunda artan veya azalan probiyotik mikroorganizmaların sayısının neye bağlı değiştiğini, alınan probiyotik mikroorganizma miktarının yeterli olup olmadığını veya diyetin etkisini net şekilde açıklamak mümkün değildir. Özellikle oral mikrobiyotada gibi çok sayıda mikroorganizmanın bulunduğu ve çevreden çok etkilenen karışık ortam düşünüldüğünde, dış yüzeyinde oluşan mikrobiyal çeşitliliği olan biyofilm tabakanın eliminasyonu için gereken probiyotik mikroorganizmanın türü, dozu, kullanım sıklığı ve kullanım formu gibi faktörlerin öğrenilmesi koruyucu uygulama aşamasında çok önemli bir adım olacaktır. Bu nedenlerden dolayı bu tez çalışmasında, standardize diyet ve yaşam ortamı sağlanabildiğinden hayvan deneyleri yapılarak *S. salivarius* K12 probiyotiklerinin etkisi değerlendirilmiştir. Bu sayede deney hayvanları probiyotik mikroorganizma sayısını artıran diyet ürünleri kullanmadığından, oral mikrobiyotada kolonize olan probiyotik mikroorganizmaların probiyotik tabletten

geldiği savına dayanılarak sonuçlar değerlendirilmiştir. Ayrıca, deney hayvanlarından alınan ilk örneklerde de *S. salivarius* K12 bulunmaması da standart diyetlerinde bu probiyotik mikroorganizmaya maruz kalmadıklarını göstermiştir. Bu nedenle 1 aylık kontrollerde artmış olan *S. salivarius* K12 seviyesinin suda çözündürülerek kullanılan probiyotik tablet kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır. Bu noktalar bu tez çalışmasının başlıca amacı olan *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma sayısının değişimini tarafsız standart şartlarda gösterdiğinden çalışmanın güçlü yönlerini yansıtmaktadır.

Mikroorganizmaların genetik manipülasyonu ile transgenik hayvanların geliştirilmesi, hastalık veya klinik durumları taklit edebilen uygun modellerin kullanımını büyük ölçüde kolaylaştırmakta ve yeni tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesini sağlamaktadır. Deney hayvanları arasından en çok tercih edilen kemirgen modeli, çok yönlü çalışma tasarımlarına izin vererek, insanlarda bulunan ağız ortamını taklit edebilecek deneysel prosedürlere olanak tanımaktadır. Ağız hastalıklarından çürük gelişimine yönelik çalışmalar hayvanlar üzerinde değerlendirildiğinde, deney hayvanı seçimi, seçilen hayvanın yaşı, cinsiyeti, kafeslenmesi, diyeti ve hayvana özel yaklaşımlara dikkat edilerek çalışmanın kurgulanması gerekmektedir.^{127,155}

Deney hayvanı seçimine yönelik yapılan araştırmalarda Sprague-Dawley, Wistar, Long-Ewans ve Osborn Mendel türlerinin en yaygın kullanılan sıçan türleri olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Sıçanların türlerine göre farklılaşan beslenme düzenlerinden dolayı her suş farklı seviyelerde çürük geliştirebilse de tüm suşlarda çürük lezyonları gelişebildiği gösterilmiştir.^{44,127} Hayvanlarda cinsiyete bağlı farklılığın değerlendirildiği deneysel çalışmalarda, erkek sıçanlarda dişilerden daha fazla çürük lezyonu geliştiği ve bunun da erkeklerin dişilerden daha sık beslenmesine bağlanabileceği bildirilmiştir.^{127,158} Kafeslenme açısından değerlendirildiğinde de erkek ve dişilerin aynı kafese yerleştirilmesi üreme artışına neden olacağından çalışma sonuçları etkilenmektedir. Bu yüzden, çalışma sonuçları üzerinde oluşabilecek etkinin ortadan kalkması için erkek ve dişilerin ayrı kafeslenmesini veya tek cinsiyet tercih edilerek çalışmanın yürütülmesi tavsiye edilmektedir.^{155,158}

Bu tez çalışmasında birçok çalışmada olduğu gibi Sprague-Dawley sıçan türü dahil edilmiştir. Ayrıca, cinsiyete bağlı farklılıkların sonuçları etkilememesi için deneye dahil edilen tüm sıçanların cinsiyeti dişi olarak tercih edilmiştir. Böylece, cinsiyete bağlı sonuçlarda doğabilecek farklılıkların önüne geçilmeye çalışılmıştır. Ayrıca, diyetin de büyük önem taşıdığı bu çalışmada kafeste bulunan her hayvanın benzer yem ve sıvı alabilmesi için

sıçanlar kafeslere dörderli yerleştirilmiş ve her birinin günlük alımlarına yetecek düzeyde yem ve sıvı konulmuştur.

Fitzgerald ve arkadaşlarının yaptıkları hayvan çalışmasında, diş çürüğü gelişiminde yaşın etkisi değerlendirilmiş, 21-22 günlükken çürük siklusuna maruz bırakılmaları gerektiği, 28 günlükten daha yaşlılarda %90 civarında çürük gelişiminde düşüş gerçekleştiği bildirilmiştir.¹⁵⁹ Hayvan deneylerinde çürük oluşumunda yaşın etkisini değerlendiren yazarlar bu durumu sıçanlarda ve farelerde laktasyon döneminin henüz bitmemiş olmasına ve beslenme ile çevrenin etkisiyle gelişecek olan oral mikrobiyotalarının çeşitliliğinin henüz artmamış, komplike forma geçmemiş olmasına bağlamışlardır.^{127,159,160} Pekkala ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, laktasyon dönemi alınan sükrozun diş çürüğü gelişimi üzerinde etkisini göstermiş, sükrozun dentin gelişim dönemlerinde gerçekleşen mineralizasyon ve apozisyon olaylarında mineralizasyonu baskılayarak kalitesiz dentin oluşumu sağladığını bu nedenle gelişen diş çürüğünün yapısal anomaliye veya sükroza kesin olarak bağlanamayacağını bildirmişlerdir.¹⁴¹ Başka bir çalışmada ise sığır sütü ile beslenen sıçanlarda 14-24 haftalık dönemlerinde çürük gelişimi açısından değerlendirilmiş ve çürük görülmediği bildirilmiştir. Araştırmacılar sıçanlarda çürük gelişmemesini sükroz içermeyen yem ile beslenmelerine bağlamış ve sıçanlarda oral mikrobiyotanın yaşam ortamı ve yem içeriğine bağlı değiştiğini vurgulamışlardır.¹⁶¹ Sonuç olarak, literatürde ağız hastalıklarını sıçanlar üzerinde değerlendiren çalışmalarda, yaş dönemleri farklı olsa da çürük lezyonlarının gelişmesini karyojenik diyet uygulanmasına bağlanmıştır.^{127,159-161}

Yeni doğan sıçanlar dişsiz doğar ve doğum sonrasında süren ön dişler kemirmenin etkisiyle aşınarak sürmeye hayat boyu devam eder. İnsanlarda dişler sürdükçe oral mikrobiyota değiştiği için sıçanlarda da benzer durumun gerçekleşmesi beklenen durumdur. Bu nedenle, dişleri sürmüş olgun sıçanların mikrobiyotasının yeni doğandan daha komplike olduğu tahmin edilmektedir.¹⁵⁵⁻¹⁵⁷ Bu tez çalışmasına dahil edilen sıçanlar 2 aylık takip sürecinde de büyümeye devam edeceğinden büyüme gelişimin etkisini ortadan kaldırmak için 3-5 aylık olgun sıçanlar dahil edilmiştir. Ayrıca, dişler üzerinde biyofilm tabaka oluşması istenilen bir klinik durum olduğundan çalışmaya dahil edilen sıçan grubunun yaş ortalaması benzer tutulmuş ve karyojenik diyet amacıyla sükrozdan zengin yem ile beslenmiştir. Genelde standardizasyonun önemli olduğu belirtilen ve yaş konusunda spesifik bir durum belirtilmeyen hayvan çalışmalarının ileride yapılacak insan çalışmalarına öncü olmasının beklendiği bir gerçektir. Bu durumda insanlardaki oral mikrobiyotanın

komplike yapısını taklit edebilmek için olgun sıçanlar tercih edilip insanlarda elde edilecek sonuçlar ile benzer sonuç elde edilebilmesi amaçlanmıştır.

Sonuç olarak, dahil edilecek deney hayvanlarının özelliklerinin çalışmanın standardizasyonu açısından önemli rol oynadığı bilinmektedir. Standart deney modeli oluşturmak adına aynı yaş, cinsiyet ve türden sıçanların dahil edildiği bu tez çalışmasına 3-5 aylık dişi Sprague-Dawley sıçanlar dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen tüm sıçanların benzer yaşta olması da yaşa bağlı bir etki varsa bunun tüm gruplar üzerinde benzer şekilde sonuçları etkilemesini sağlamıştır. Bu nedenle T0, T1 ve T2 dönemlerinde alınan örneklerden *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerindeki değişim değerlendirilirken aynı tür sıçan, benzer yaş dönemi, aynı cinsiyet, standardize diyet ve yaşam ortamında değerlendirilerek bias ortadan kaldırılmaya çalışılmıştır.

Deneysel tüm çalışmalarda çalışma tasarımı kadar önemli olan diğer bir nokta çalışmanın istatistiksel güç düzeyidir. Gruplar arası karşılaştırma sonuçlarının veya zamana bağlı değişimin kanıtlanmasında sonuçların anlamlı seviyede değerlendirilebilmesi için yeterli güç düzeyinde denek dahil edilmesi gereklidir. Ancak, deney hayvanları kullanılan araştırmalarda sık karşılaşılan bir sorun, geçerli sonuçların çıkarılmasını engelleyen istatistiksel gücün insan çalışmalarına göre daha düşük olmasıdır.^{127,140} Hayvan çalışmalarında kullanılan deney hayvanları için hayvan refahını koruma yönetmeliği gereğince kullanılacak en küçük boyutta deney hayvanının, en az sayıda kullanılması ve en rahat yaşama ortamında yaşatılması gibi prensiplere uyacak şekilde planlanması gerekmektedir.¹⁴⁰ Ayrıca, çalışma sonunda deney hayvanları kurban edildikleri için de gereksiz hayvan telefinin engellenmesi adına az sayıda hayvanla çalışılması ve gereksiz hayvan kullanılmaması hayvan çalışmalarında etik anlayışın en önemli maddesini oluşturmaktadır. Bu tez çalışmasında 0.06 etki büyüklüğü, 0.05 Tip 1 hata olasılığı ve %90 güç düzeyinde her gruba 8 sıçanın dahil edilmiş ve toplam 32 sıçan ile çalışma yürütülmüştür. Ayrıca, bu çalışmanın birincil amacını oluşturan, dental biyofilm üzerinde *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma etkinliğinin değerlendirildiği başka bir hayvan çalışması bulunmadığından en yüksek güç düzeyinde yapılmış çalışma durumundadır.

Dişlerin yüzeyinde biriken mikrobiyal plağın komplike yapısı ve içerdiği çok sayıda patojen mikroorganizmanın yanı sıra çevresinin de etkisiyle diş çürüğü geliştiği kanıtlanmış bir gerçektir. Çevresel faktörlerden en önemlisi ise biyofilm tabakanın oluşması ve mikroorganizma türlerini etkileyen diyet faktörüdür. Sıçanların diş çürüğü araştırmalarına

yönelik ilk kullanımı 1922 yılında McCollum ve arkadaşları tarafından bildirilen ve diş çürüğü gelişiminde diyetin rolünü araştıran çalışmadır. Sıçanlar üzerinde daha önce yapılan diş çürüğü çalışmalarında çoğunlukla diyet ve diyetin sonuçları üzerinde durulmuş ancak mikroorganizmaların oynadığı rol ve etkinlikler pek değerlendirilmemiştir.¹⁶² Kite, Shaw ve Sognnaes tarafından yapılan çalışmada diyetin çürük etiyolojisindeki rolünün belirlenmesi amacıyla beslenme gastrik sondayla yapılmış ve sıçanlarda çürük gelişmediği gösterilmiştir. Bu durum diş çürüğü gelişiminde diyet ve diş yüzeyi arasında ilişki olması gerektiğini göstermiştir.¹⁶³ Başka bir diş çürüğü gelişiminin araştırıldığı çalışmada, Nakfoor ve arkadaşları, diş yüzeyinde gelişen çürükler değerlendirilirken sıklıkla sert diyet kaynaklı mine kırıkları nedeniyle mine lezyonu görüldüğünü gösterdiğinden diş çürük gelişimine şüpheli gözle bakılması gerektiğini bildirmişlerdir. Bu durum diyet standardizasyonunda iyileştirmeyi sağlamış ve yapılan çalışmalarda diş yüzeyinde çürük oluşumunu sağlayan diyet arayışına girilmiştir.¹⁶⁴

Yapılan çalışmalar sonucunda, diş çürüklerinin mikroorganizma yokluğunda gelişmediği gösterilirken diyetin etkisi de kanıtlandığından "karyojenik diyet" terimi kabul edilmiş ve karyojenik diyet ile beslenen hayvanlarda çürük lezyonlarının geliştiği gösterilmiştir.^{165,166} Zaman içerisinde diyet içeriğine yönelik yapılmış çalışmalarda önceleri mısır bazlı diyetler denenirken, sükrozun etkisi ve rolü çok bilinmemekteydi.¹²⁷ Sonraları, mikrobiyal asit oluşumunu sağladığından sükrozun karyojenik olduğu anlaşılmış ve karyojenik diyet denildiğinde akla ilk gelen ve çalışmalarda en sık kullanılan sükroz içeren diyetler araştırılmaya başlanmıştır. Sükroz içeriğine bağlı karyojenite etkisinin farklı olduğu çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁴¹⁻¹⁴³

Holloway ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada farklı sükroz konsantrasyonlarında yem ile beslenen 2 aylık sıçanlarda %83, %67 ve %19 konsantrasyonda sükroz grupları arasında çürük gelişimi açısından istatistiksel fark görülmüştür. Bu farka göre sükroz konsantrasyonu arttıkça çürük sayısı ve derinliğinin arttığı bildirilmiştir.¹⁴² Michalek ve arkadaşları sükroz konsantrasyonunu değerlendirdikleri çalışmalarında, %56 sükroz içeren yem ile beslenen sıçanlarda %51 sükroz içerenlere göre karşılaştırılabilir düzeyde fazla çürük oluşumu görüldüğünü bildirmişlerdir.¹⁴³ Araştırmacılar, bu diyetlerdeki yüksek nişasta seviyelerinin, diyetin yapışkanlığını çok fazla artırmasına ve yüksek miktarda sükrozdan oluşan hücre dışı polisakkarit yapının yerini almasına bağlamaktadır.^{142,143}

Pekkala ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, birinci amaç anne sıçanlarda yüksek şükroz içeren yemlerin uzun dönem etkisini belirlemek için yavrularında dentin apozisyonu ve dentin çürüğü gelişimini değerlendirmek, ikinci amaç ise büyüyen sıçanlarda yüksek şükroz içeren karyojenik diyetin mineral metabolizması üzerine etkisini belirlemektir. Kesitsel planlanan çalışmada karyojenik ve standart yem ile beslenen annelerin laktasyon dönemi bittikten sonra yavrularının da karyojenik ve standart yem ile beslenmesi şeklinde gruplara ayrılmıştır. Standart ve karyojenik yem ile beslenen sıçanların, serum mineral konsantrasyonları arasında anne ve yavru sıçanlarda fark görülmemiştir. Ancak, karyojenik yem ile beslenen grupta, yavrularının idrarlarından atılan fosfor ve sodyum miktarında anlamlı derecede azalma ve kalsiyum miktarında artış görülmüştür. Sürekli karyojenik yem ile beslenen yavrularda sadece anneleri laktasyon döneminde karyojenik yem ile beslenen yavrulara göre anlamlı derecede daha yüksek artış ve azalış görülmüştür. Ayrıca, yavrularda birinci ve ikinci molar dişlerde gelişen çürük lezyonları yüzeyel mine, derin mine, dentin yüzeyinde bulunması ve bulunmaması şeklinde değerlendirilmiştir. Dişler üzerinde gelişen lezyonların değerlendirilmesine göre, birinci molar dişlerde anne ve yavrunun karyojenik yem ile beslenen grupta anne standart yem ile yavru ise karyojenik yem ile beslenen gruptan daha fazla dentine ilerlemiş çürük lezyonu görülürken, ikinci molar dişlerde ise benzer sayıda dentine ilerlemiş çürük lezyonu görülmüştür. Ayrıca, %41 şükroz içeren karyojenik diyetin çürük lezyonu gelişimi üzerine etkisini gösteren bu hayvan çalışmasında, şükrozun anne veya yavru sıçan tarafından tüketilmesi ile çürük lezyonunun kaçınılmaz olduğu gösterilmiştir.¹⁴¹

Sonuç olarak araştırmacılar, diyetteki şükroz içeriğini artırmanın sadece diş çürüğünü değil, sıçanlarda primer dentinogenezis denilen dentin tabakası oluşum mekanizması sırasında gerçekleşen dentin birikimini de azaltarak etki gösterdiğini bildirmişlerdir. Ayrıca, sıçanlarda yüksek şükroz içeren diyetle erken karşılaşmanın çürük gelişimini artırıp dentin apozisyonunu da azaltıcı etki gösterdiği ve karyojenik diyetteki kritik şükroz oranının en az 30-40g/100g arasında olması gerektiği anlaşılmıştır.^{127,141}

Bu nedenle bu tez çalışmasında dental biyofilm gelişimi için gerekli en düşük şükroz konsantrasyonu %41 olduğundan, %41 şükroz içeren karyojenik diyet tercih edilmiştir. %41'den yüksek konsantrasyonda şükroz içeren diyetin tercih edildiği çalışmalarda, bu seviyede şükroz içeren diyet ile çürük lezyonu geliştiği gösterildiğinden daha yüksek reçetelerin kullanımından hayvan refahı nedeniyle kaçınılmıştır. Ayrıca, çürük lezyonları derinleştikçe su ve yem tüketimi sırasında ağrı gelişeceğinden yetersiz beslenme ihtimali de

olduğu bilinmektedir.^{142,143} Bu nedenle, bu tez çalışmasında oral yolla alınan karyojenik diyet ve probiyotik içeren su ile çalışma metodolojisi tasarlandığından ağrı nedeniyle sıçanların yem ve su tüketiminden kaçınmamaları için çürük oluşumuna neden olacak en düşük karyojenik diyet düzeyi yani %41 sükröz içeren karyojenik diyet tercih edilmiştir.

Karyojenite söz konusu olduğunda diyet içeriği, frekansı, konağa bağlı faktörler, ortamda biyofilm oluşumunu inhibe eden ve indükleyen bakterilerin varlığı başta olmak üzere çevresel birçok faktörün etkisi görülmektedir.¹²⁷ Diyetin etkisi kanıtlandıktan sonra yapılan çalışmalarda diyete antibiyotik eklenmesiyle çürük oluşumunun azaldığı görülmüş, bu durum ile çürük gelişiminin bakteri kaynaklı olduğu kanıtlanmıştır. Böylece diş çürüğünün bulaşıcı ve enfeksiyöz bir hastalık olduğu da gösterilmiş ve genel kabul görmüştür.¹⁶⁷

Oral streptokoklar tüm kommensal mikroorganizmaların üçte ikisini oluşturmalarına rağmen, yalnızca mutans grubu streptokoklar diş çürüklerinin oluşmasıyla ilişkilidir.⁴¹ Oral streptokoklar, ağız boşluğundaki dişlerde ve diğer mukozal yüzeylerde koloni oluşturan ilk mikroorganizmalardır. Biyofilm oluşturabilme kabiliyeti nedeniyle de diş yüzeyinde biyofilm oluşumuna neden olan ana patojendir.¹⁶⁸ Oral streptokoklar karşı karşıya kaldıkları çevresel gerilimlere ve mikroorganizma sayısına bağlı olarak adaptif yeteneklerini geliştirirler.⁴¹ Bu adaptasyonu doğrudan veya dolaylı olarak diş yüzeyindeki pelikül tabaka veya biyofilm tabaka içerisindeki proteinlere bağlanarak yaparlar. Ayrıca, bu proteinler streptokokların redoks potansiyelindeki değişimleri, yerel pH'taki farklılıkları ve antimikrobiyallerin toksisitesinden kaynaklanan olası etkilerin hafifletilmesinde önemli bir role sahiptir. Ayrıca, ağızdaki streptokokların normal yaşam periyodu, düşük hücre yoğunluklu planktonik durumdaki büyümeden, önemli ölçüde yüksek hücre yoğunluklu biyofilm ortamına geçişi içerir. Biyofilmler arasında iş birliği ve rekabet şeklindeki çift yözlü etkileşim, ağız mikroflorasının kompozisyonunu tanımlar.^{41,114,168}

İlk olarak 1924 yılında Clarke tarafından insanlardaki çürük lezyonlardan *S. mutans* izole edilmiştir.^{64,65} Zinner ve arkadaşları insanlardan izole edilen bir streptokokun sıçanlarda diş çürüğüne neden olduğunu göstermiştir.⁶⁶ Dental biyofilm oluşumu *S. mutans* ile başlar. Çürük gelişiminin erken evrelerinde *S. mutans* yüksek seviyelerde bulunurken sonraki evrelerde başka mikroorganizmalar artış gösterir. Diğer *Streptococcus* türleri ise sağlıklı mikrobiyota ve sağlıklı dişler ile ilişkilidir.¹²⁷ *S. mutans* asidojenik özelliğinden dolayı çürük başlangıç mekanizması dental plak oluşumu olan demineralizasyonun ilk

adımını başlatan ana etken iken, diğer asidojenik oral mikrobiyota mikroorganizmalarından farkı sükröz ile etkileşime girebilmesidir. *S. mutans*'ın konakçının diyetindeki sükröz, karyojenik biyofilmler üretmek için gerekli olan hücre dışı polisakkaritlere metabolize etme yeteneği dental biyofilm oluşumuna neden olmaktadır.⁶⁷ Çürük olan ve olmayan grupların oral mikrobiyotasındaki *Streptococcus* türlerini değerlendirdiklerinde, çürük var olan grupta *S. mutans*'ın çürük olmayana göre çok daha yüksek olduğunu, çürük olmayan grupta ise *S. gordonii* ve *S. sanguinis* bakterilerinin çürük olan gruba göre sırasıyla 5 ve 2 kat daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir.¹⁴⁵

Sonuç olarak, diş çürüğünün gelişimi, dental biyofilmdeki yalnızca birkaç gram pozitif bakteriye özellikle de ana patojen türleri olduğuna inanılan *S. mutans* ile bazı *Lactobacillus* türlerine bağlanmıştır.⁴¹ Bakteriler dişlerde, hücreler tarafından dışlanan proteinler, polisakkaritler ve DNA'dan oluşan organik matrikslerle paketlenmiş mikro koloniler halinde bulunduğu biyofilm tabaka sayesinde dehidrasyondan, konak savunmasından ve antimikrobiyal ajanlardan korunurlar.^{41,74} Modern moleküler yöntemler, biyofilm ile ilişkili mikroorganizmaları *Bifidobacterium dentium*, *Bifidobacterium adolescentis*, *S. mutans*, *Scardovia wiggisiae*, *Bifidobacterium longum*, *Selenomonas* türleri, *Prevotella* türleri ve *Lactobacillus* türleri şeklinde göstermiştir.⁵ *S. mutans* dışında çürük lezyonlarından izole edilen *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türleri, oral mikrobiyotada ilk yer alam ve en yoğun oranda bulunan türlerdir. Ayrıca, *Lactobacillus* ve *Bifidobacterium* türlerinin dental biyofilmde bulunmasının yanı sıra probiyotik mikroorganizma olarak da etki gösterdikleri birçok çalışma ile gösterilmiştir.^{5,54,59,102,128,169}

Bifidobacterium türleri oral mikrobiyotadaki kommensal bakteri grubu olup çürük ile ilişkisi son yıllarda araştırılmaktadır. *Bifidobacterium* türleri en sık kullanılan probiyotik mikroorganizmalardan da olup oral mikrobiyotadaki kolonizasyonu ve diş çürüğü önlemedeki etkinliği de halen araştırılmaktadır.^{102,129,150} Taipale ve arkadaşları 2 ila 24 aylık bebekler üzerinde yaptığı araştırmada, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 kullanıldıktan sonra kalıcı kolonizasyon tespit edilemediğini yani bu probiyotik mikroorganizmaların diş çürüğü üzerinde olumlu veya olumsuz etkisi olmadığını bildirmiştir.¹⁶⁹ *Bifidobacteria*, *Lactobacillus*'un yanı sıra bağırsak mikrobiyotasında dengenin sağlanabilmesi için sıklıkla tercih edilen diğer probiyotik mikroorganizmadır. Çağlar ve arkadaşları çalışmalarında, genç kişilerde *Bifidobacteria* içeren yoğurdun kısa süreli tüketiminin, tükürükteki *S. mutans* ve *Lactobacillus* sayısı üzerindeki etkisini değerlendirmişler ve sonuçta *Bifidobacterium* içeren yoğurt tüketiminde tükürük *S. mutans*

miktarında anlamlı derecede azalma olduğunu ancak *Lactobacillus* miktarının etkilenmediğini bildirmişlerdir.¹²⁸

Lactobacillus türlerinin probiyotik mikroorganizma olarak kullanıldığı çalışmalarda diş çürüğü üzerindeki etkisine yönelik tartışmalı sonuçlar elde edilmiştir.^{41,103,105,128,131,150} Bazı türler olumlu etki gösterirken bazı türler olumsuz etki göstermiştir.^{41,150} *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LB21, *L. rhamnosus* DSM ve *L. rhamnosus* SP1 probiyotik mikroorganizmalar diş çürüğü üzerinde azaltıcı etki gösterirken *L. paracasei* F19'un etki göstermediği bildirilmiştir. Farklı çalışmalarda değerlendirilen *Lactobacillus* türü probiyotik mikroorganizmalar bu çalışmalarda farklı uygulama formlarında ve farklı aracı besinlerle birlikte kullanılmışlardır.⁴¹

S. mutans'ın yerleşik mikrobiyotadan izole edilen doğal olarak oluşan *Lactobacillus* türleri tarafından inhibe edildiğini gösteren çalışmalar mevcuttur.^{150,154} Anne sütüyle beslenen 4 aylık bebeklerde doğal olarak oluşan *Lactobacillus* izolatları, *S. mutans* ve *Candida albicans* üzerinde gösterdiği büyüme inhibisyonu gözlenirken, çürüksüz kişilerden izole edilen doğal olarak oluşan *Lactobacillus* türleri, çürüklü kişilerden izole edilenlerle karşılaştırıldığında *S. mutans* üzerinde daha büyük bir inhibitör potansiyele sahip olduğu gösterilmiştir.¹⁵⁰

Lactobacillus reuteri insanlarda gastrointestinal kanalda bulunan zorunlu heterofermentatiftir ve 'reuterin' ve 'reutericyclin' gibi geniş spektrum aktiviteli antimikrobiyal ürünler oluşturur.^{107,150} *L. reuteri* DSM 17938 ve *L. reuteri* ATCC PTA 5289'un tükürükteki kalıcılığının değerlendirildiği klinik çalışmada, 62 sağlıklı yetişkinde klorheksidin ile tam ağız antisepsisi sonrasında *S. mutans*'ın yeniden üremesini geciktirip geciktiremeyeceği araştırılmış ve 6 haftalık tedavi süresi boyunca izole edilirken, 3 ve 6 ay sonraki takiplerde yalnızca 3 hastada tespit edildiği bildirilmiştir.¹⁰⁸ Araştırmacılar, yaşamın erken dönemlerinde maruz kalmanın, oral mikrobiyotaya kalıcı olarak dahil edilmesini kolaylaştırabileceği ve çürük ile ilişkili mikrobiyotayı kolonizasyon sırasında değiştirmenin, mikrobiyotanın sağlam bir şekilde yerleştiği sonraki yaşamla karşılaştırıldığında daha kolay olabileceğini öne sürmüştür.^{107,108,150}

Nase ve arkadaşları yaptıkları klinik çalışmada, *L. rhamnosus* GG'nin çürük gelişimini önleyici etkisini *L. rhamnosus* GG eklenen sütün tüketimini 1-6 yaş aralığındaki 594 çocuk üzerinde değerlendirmişler ve sonuçlarına göre özellikle 3-4 yaşlarındaki çocuklarda tükürükteki *S. mutans* sayısının ve dolayısıyla çürük oluşumunun önemli derecede azaldığını

bildirmişlerdir.¹²⁹ Çağlar ve arkadaşlarının yaptığı probiyotik çalışması kesitsel tasarlanmış ve 1 aylık 24 dişli Sprague-Dawley sıçanı tükürükleri *L. reuteri* ve *S. mutans* ile farklı sıralarda inoküle edilip ve 5 ay süre ile *L. reuteri* ve *S. mutans*'ın oral mikrobiyotadaki kolonizasyonu değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *S. mutans* inokülasyonundan önce *L. reuteri* kullanılan grupta *S. mutans* kolonizasyonu görülmezken düzenli kullanım ile *L. reuteri*'nin anlamlı şekilde artış gösterdiği ve bırakıldıktan sonra da zaman içerisinde düştüğü bildirilmiştir. Önce *S. mutans*'ın inoküle edildiği grupta ise, *L. reuteri* inokülasyonu sonrasında *S. mutans* düşüş göstermeye başlamıştır.¹⁰⁷ Bu çalışmalardan elde edilen sonuçlar *L. reuteri*'nin probiyotiklerin oral mikrobiyotada kolonizasyonunu azaltan mekanizması olarak varsayılan diş yüzeyinde önce kolonize olan probiyotik bakterilerin *S. mutans* kolonizasyonuna fırsat bırakmaması olarak yorumlanmıştır.^{107,129}

İnsanlarda dental plak örneklerinden izole edilen bir *L. salivarius* suşunun, geleneksel hamsterlerde düşük düzeyde ve gnotobiyotik sıçanlarda yüksek düzeyde diş çürüğüne neden olduğu rapor edilmiştir.^{103,104} Buna karşılık, son zamanlarda *L. salivarius*'un başka bir suşunun, diş yüzeyindeki tükürük pelikülüne bağlanma kabiliyeti nedeniyle peri-odontopatik bakterilere ve mutans streptokoklara karşı probiyotik etkiye sahip olduğu rapor edilmiştir.¹⁰³ Bakteriyosin ve bakteriyosin benzeri maddelerin üretimini gösteren bazı *L. salivarius* suşları *S. mutans* da dahil olmak üzere çeşitli bakterilerin inhibisyonu ve bakterisidal etkileriyle bağlantılıdır. Hem inhibisyon hem aktivasyon şeklinde etki gösteren *Lactobacillus* suşları streptokoklar ile koagregasyon yapabildiğinden normal oral mikrobiyotanın bir parçası olabilirler.¹⁰³

L. salivarius probiyotik suşunun karyojenitesinin incelendiği başka bir çalışmada, sıçanlar *L. salivarius* ve *S. mutans* ile enfekte edilmiş ve oral mikrobiyotada değişen miktarları ve çürük gelişimleri değerlendirilmiştir. Çalışma kapsamında sadece *L. salivarius*, sadece *S. mutans* ve her ikisiyle de farklı zamanlarda enfekte edilen gruplar arasında her ikisinin kullanıldığı grupta tek başına kullanılanlardan ve sadece *S. mutans* varlığında sadece *L. salivarius*'tan istatistiksel olarak daha fazla dental biyofilm gelişimine neden olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, *L. salivarius*'un 5 gün veya daha uzun süre inoküle edilmesinin dental biyofilm ve diş çürüğü gelişimi açısından istatistiksel fark yaratmadığı da gösterilmiştir.¹⁰³ Sonuç olarak, bu çalışmanın sonuçları, inokülasyon miktarı veya inoküle edilen tür sayısı arttıkça *L. salivarius* LS1952R suşunun diş yüzeylerinde kolonize olamadığı yani koagregasyonun gerçekleşemediğini, *S. mutans*'ın karyojenitesini arttırdığını göstermiştir.¹⁰³

Nishihara ve arkadaşları yaptığı çalışmada *L. salivarius* içeren tabletlerin kullanımı üzerine tükürükteki *Lactobacillus* düzeylerini ve tükürük tamponlama kapasitesini değerlendirmiş ve her ikisinde de anlamlı derecede artış olduğu ve dolayısıyla çürük gelişimine direncin artırılabilirdiği belirtilmiştir.¹⁰⁵ *Lactobacillus* türlerinin probiyotik mikroorganizma ve dental biyofilmde kolonize olabilen patojen mikroorganizma olmasına yönelik çok sayıda türü üzerinde araştırma yapılmıştır. Yukarıda bahsedilen çalışmalar da *Lactobacillus* türlerinin her iki özelliği de gösterme eğilimi olduğunu tekrardan kanıtlar niteliktedir.^{103-105,107,109,129,150} Ancak, *Lactobacillus* türü probiyotik mikroorganizmalarla ilgili ağız sağlığına yönelik çok sayıda çalışma yapılmış olmasına rağmen hala en etkin mikroorganizma arayışı da devam etmektedir.^{10,75,77,103-105,107,108,127,129,131,132}

Oral mikrobiyotada çok fazla türü olan bir cins olduğundan bu tez çalışmasında cins düzeyinde bakılarak genel olarak karyojenik diyet ve probiyotik mikroorganizma kullanımına vereceği tepki anlaşılmaya çalışılmıştır. Bu tez çalışmasında da, deney hayvanlarından henüz karyojenik diyet ve probiyotik kullanımı başlamadan önce alınan ilk örneklerde *Lactobacillus* türlerinin her grupta kolonizasyonu görülmüştür. Bu durum *Lactobacillus* türlerinin sıçanlarda da oral mikrobiyota üyesi olduğunu göstermektedir. Ayrıca, karyojenik diyet ve *S. salivarius* K12 probiyotiğinin uygulanmasının *Lactobacillus* sayısı üzerinde yaratacağı etki de ikinci ve üçüncü örnekler ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Son yıllarda *S. salivarius*'un probiyotik mikroorganizma olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Diş hekimliğinde *S. salivarius*'un probiyotik olarak kullanılan iki ana suşu K12 ve M18'dir.^{24,68,72,133} *S. salivarius* K12'nin oral biyofilm oluşumu üzerinde inhibitör bir etki sağladığı ve *S. salivarius* M18 kullanımının plak indeksini azalttığı ve periodontal sağlık göstergelerini iyileştirdiği gösterilmiştir.^{111-113,115,133,170} *S. salivarius* M18 etkinliği henüz tartışmalı olan ve klinik olarak kolay uygulanabilir bir formu ülkemizde bulunmayan bir probiyotik mikroorganizmadır. *S. salivarius* K12 probiyotik suşlarının halitozis denilen ağız kokusu üzerine etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalar bulunmaktadır.^{111,112,133,170} *S. salivarius* K12 nin halitozis üzerinde etkisinin değerlendirildiği klinik çalışmalar bulunurken dental biyofilm üzerindeki etkisinin değerlendirildiği in-vitro ve in-vivo çalışmalar bulunurken deney hayvanları üzerinde yapılmış çalışma bulunmamaktadır.

He ve arkadaşlarının yaptığı randomize kontrollü klinik çalışmada halitozis varlığı teşhis edilen hastalar, *S. salivarius* K12 probiyotik tabletlerini kullanan ve kullanmayan

bireyler şeklinde iki gruba ayrılarak plak indeksi, kanama varlığı, periodontal cep derinliği gibi periodontal sağlığın klinik belirteçlerini değerlendirmişlerdir. Çalışmanın sonuçları, iki grup arasında bu belirteçler açısından istatistiksel fark görülmediğini göstermiştir. Yazarlar, iki grup arasında istatistiksel fark olmamasını dil sırtında biriken mikroorganizmalar sonucunda gelişen halitozisin, bakteriler uzaklaştırılmadığından probiyotik etkinliğinin az olması şeklinde yorumlamıştır.¹³³

S. salivarius'un bakteriosin (salivarisin A ve salivarisin B) denilen uçucu sülfür bileşiklerini üretmesi ile diğer bakterilerin sayılarını azalttığı bilinmektedir. Bu bakterinin, ağız kokusu oluşumunda rol oynayan bazı bakterilerin temsili suşlarının üremesini inhibe ettiği in-vitro olarak gösterilmiştir.^{111,133,170} *S. salivarius* K12 suşu aynı zamanda ağız mikrobiyotasının önceden var olan üyeleri tarafından salivarisin üretimini çapraz uyararak ağız boşluğundaki seviyelerini de artırabilir. *S. salivarius* K12 içeren sakız veya pastil kullanımının ağız kokusunu önlemek amacıyla kullanılması ile oral mukozadaki sülfür bileşiklerinin seviyesini düşürülebilir. Etki beklenen süre boyunca, probiyotiğin oral mukozaya kolonizasyonu ve diş yüzeylerinde adezyonu amacıyla pastilin veya sakızın her gün yemek sonrasında ya da dişlerini fırçaladıktan sonra her akşam kullanımı tavsiye edilmektedir. Bu nedenle, *S. salivarius* K12 suşu içeren tabletlerin alınması, bazı kötü kokulu oral patojenlerin üremesini baskılayarak faydalı olabilir.^{111,133} Ancak, her probiyotik mikroorganizma farklı etki gösterdiğinden, *S. salivarius* K12 suşlarının da uzun dönem çalışmalarının yapılması gereklidir.^{75,135} Çünkü, kötü ağız kokusu yani halitozis olan hastaların dil sırtındaki mikrobiyal bileşimin, ağız kokusu olmayan kişilere göre daha karmaşık olduğu gösterilmiştir.¹³³

Probiyotik mikroorganizmaların günlük kullanımıyla kısa vadede *S. mutans* düzeylerini değiştirmek mümkündür. Ancak, yaşamın hangi döneminde daha etkin olduğu, hedeflenen yaş grupları, probiyotiklerin en doğru kullanım formu, probiyotik mikroorganizma içeriği ve miktarı gibi faktörlerin etkisinin kolonizasyonu etkilediği kanıtlanmıştır. Bu nedenle, probiyotiklerin çürük azaltıcı potansiyeline ilişkin mevcut zayıf kanıtları desteklemek için daha ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.¹⁵⁰ Probiyotik mikroorganizmaların etkinliğinin değerlendirilmesi için mümkün olan en standart diyet ve ortamın sağlanması gereklidir, bu nedenle bu tez çalışmasında benzer miktarda ve özellikte yem ve su tüketilen deney hayvanları kullanılarak oral mikrobiyotadaki *S. salivarius* kolonizasyonu değerlendirilmiştir. Ayrıca, *S. salivarius* K12 ile ilgili çalışmalarda, dişler üzerinde mikrobiyal çeşitliliği fazla olan biyofilm tabaka üzerindeki probiyotik etkinliği

henüz kanıtlanmadığından bu çalışmada etkinliği hayvan çalışması ile değerlendirilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen sonuçlara göre, *S. salivarius* K12 içeren probiyotik tablet çözünmüş su içilmeden önce alınan ilk örneklerde *S. salivarius* kolonizasyonu görülmediğinden sıçanlarda normal oral mikrobiyota üyesi olmadığı da gösterilmiştir.

S. mutans dental biyofilmden izole edilen ve özellikle erken dönem çocukluk çağı çürüğü etiyojisinde rol oynayan tüm karyojenik mikroorganizmalar içerisinde en baskın ve etken mikroorganizma olduğu için probiyotik mikroorganizmaların *S. mutans* kolonizasyonunu inhibisyonu üzerinde durulmaktadır.^{41,45,79} Sükrozun neden olduğu karyojenik diyet sayesinde diş yüzeylerinde oluşumunu indüklediği dental biyofilm oluşumu sayesinde *S. mutans* sayısının artması olası beklenen bir sonuçtur. Bu nedenle bu tez çalışmasında probiyotik mikroorganizma olarak son yıllarda ortaya atılan *S. salivarius* K12 suşunun dental biyofilm ve diş çürük mekanizmasında ana patojen olarak bilinen *S. mutans* ve *Lactobacillus* türleri üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir.

Bu tez çalışmasında değerlendirilen *S. salivarius*, *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerindeki nicel değişimin dental biyofilm oluşum veya inhibisyon hızı ile ilgili bilgi vermesi beklendiğinden modern mikrobiyolojik analiz yöntemlerinden PZR kullanılmıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu yöntemlerinin birçok alanda güvenle kullanıldığı yıllardır bilinen ve kabul görmüş bir yöntemdir. Ayrıca, diş hekimliği alanında da gerek periodontoloji, endodonti gibi klinik bilimler gerekse oral mikrobiyota çalışmaları, immün ve inflamatuvar belirteçlerin tanımlanması gibi temel bilimler alanında da doğruya çok yakın, hızlı ve duyarlı yöntemlerden kabul edilmektedir.^{5,171}

Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir DNA segmentinin in-vitro şartlarda enzimatik olarak çoğaltılmasını sağlayan DNA amplifikasyonu, hızlı bir yöntemdir. PZR ile DNA amplifikasyonu toplanan örneklerdeki düşük miktarda bulunan bakterilerin saptanmasını sağlar. Bu yüzden örneklerdeki DNA'lar üzerinden araştırma yapılırsa daha kesin sonuçlar elde edilmektedir.^{5,171} Bu amaçla örnek toplanmasından sonra örneklerdeki DNA canlılığının korunması için -80°C'de saklanmış ve DNA izolasyonu yapılmıştır.

DNA izolasyonu toplanan örneklerde bakterilerin hücre duvarının DNA'ya zarar vermeden parçalanmasını sağlamaktadır. Bakteriye DNA izolasyonu için en sık kullanılan yöntemler deterjan, küçük cam baloncuklar kullanılarak vibrasyon ve proteinaz K ile bakteri duvarının parçalanmasıdır. Son yıllarda küçük veya az miktar toplanan örneklerden yeterince

ve çok sayıda DNA elde edebilmek için ticari kitler de kullanılmaktadır.¹⁷¹ Bu çalışmada da proteinaz bazlı ticari kit kullanılarak DNA izolasyonları yapılmıştır.

PZR döngüsünün ilk aşamasında 95°C’de DNA denatüre edilerek tek sarmal haline getirilir. İkinci aşamada çoğaltılmak istenen DNA dizisine özgül iki primer 55-60°C civarında, ilk aşamada ayrılan kalıp DNA tek zincirine bağlanır. Son aşamada ise 72°C’de polimeraz enzimi aktive olarak primerlerin uzamasını sağlar. Bu 3 aşama bir döngüyü oluşturur ve her döngü sonunda DNA parçası iki katına çıkar. Bu döngüler ısı döngü cihazında gerçekleştirilir ve 30 döngü sonunda yaklaşık 10^9 DNA molekülü elde edilebilir. Bu reaksiyonlar sonucunda çoğaltılan DNA bölgeleri agaroz veya poliakrilamid jel elektroforezine tabii tutularak UV ışığı altında görüntülenir.¹⁷¹ Bu PZR yöntemi ile kantitatif DNA miktarı tespit edilemediğinden çalışmamızda daha modern bir PZR yöntemi olan gerçek zamanlı kantitatif sonuç veren PZR yöntemi tercih edilmiştir. Bu yöntemin yeniliği ortama eklenen floresan indikatör boya ile reaksiyon ilerlemesinin eş zamanlı olarak izlenebilmesi ve sonuçta sentezlenen DNA miktarı ile orantılı olarak oluşan floresan sinyal sayesinde kantitatif sonuç elde edilmesidir. Floresan sinyaller sisteme eklenmiş florometre aracılığıyla ölçülür ve standart suşların dilüsyonlarından elde edilen DNA miktarlarından elde edilen bir eğri olan amplifikasyon eğrisi ile karşılaştırılarak örneklerdeki hedef DNA dizi miktarları belirlenir.

Gerçek zamanlı kPZR yöntemi kapalı ve otomatize bir sistem olduğundan daha eski olan konvansiyonel PZR yöntemlerine kıyasla kontaminasyon riski düşük, elektroforeze ihtiyaç duymayan ve daha kısa sürede sonuç veren bir yöntemdir. Gerçek zamanlı kantitatif PZR yönteminin ‘TaqMan’, SYBR-yeşili ve moleküler işaret (‘beacon’) kullanılan formatları bulunmaktadır.^{144,171} Bu formatlar arasından benzer DNA dizilerinin yoğun ve karışık olduğu ağız örneklerinde genelde ‘TaqMan’ kullanıldığından bu tez çalışmasında da ‘TaqMan’ kullanılarak ortaya çıkan floresan sinyaller florometre ile ölçülerek hedef DNA dizilerinin miktarları belirlenmiştir. Bu tez çalışmasında sıçanlardan toplanan ağız örneklerinden izole edilen DNA izolatlarındaki *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerine ait DNA dizi miktarları ‘TaqMan’ format kullanılarak gerçek zamanlı kPZR ile analiz edilmiştir. Analizden elde edilen kantitatif sonuçlar ile karyojenik diyet ve probiyotik kullanımı öncesinde ve sonrasında alınan örneklerdeki *S. mutans*, *S. salivarius* ve *Lactobacillus* türlerinin nicel değerleri karşılaştırılmıştır.

Bu tez çalışmasından elde edilen kPZR sonuçlarının istatistiksel analizi sonucunda, karyojenik diyet uygulanması veya uygulanmaması ile probiyotik uygulanması veya uygulanmaması gibi değişkenlerin aynı anda uygulanmasından dolayı *Lactobacillus* sayısının istatistiksel olarak farklılık göstermediği sonucu elde edilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına bakıldığında, deneyler başlamadan önce alınan ağız içi örneklerde *Lactobacillus* türlerinin bulunması ağız ortamında kommensal olarak bulunabilen türlerden oluşmasından kaynaklanıyor olabilir. Bu tez çalışmasında elde edilen sonuçlara göre tüm gruplarda T0, T1 ve T2 zamanlarına göre *Lactobacillus* türlerinin sayısı değerlendirildiğinde istatistiksel fark olmadığı ancak nicel artış olduğu görülmüştür. *Lactobacillus* türlerinin sayısındaki artışın özellikle Grup 1 ve Grup 2’de görüldüğünden bu durum karyojenik diyet uygulanmasına bağlanabilir. Bu durum, *Lactobacillus* türlerinin organize dental biyofilm varlığında daha fazla görülmesine ve organize dental plak oluşması için karyojenik diyetin 2 ay boyunca devam etmesi nedenlerine bağlanabilir. Ayrıca, karyojenik diyetin uygulanmadığı sadece probiyotik mikroorganizma içeren su tüketilen Grup 3’te *Lactobacillus* sayısındaki artışın Grup 1 ve Grup 2’e göre daha düşük olması da karyojenik diyetin etkisini gösteren diğer bir sonuçtur. *Lactobacillus* türlerinin sayısal artışında gruplar arasında fark olmaması ise sağlıklı oral mikrobiyotada *Lactobacillus* türlerinin varlığına ve cins düzeyinde yapılan değerlendirmeye yani birçok türün bir arada değerlendirilmesine de bağlanabilir.

Ayrıca, *Lactobacillus*'un bağırsak mikrobiyomunda mevcut olduğunda bir probiyotik olarak önerilmesine rağmen, bu cinsin ağız mikrobiyomunda kötü ağız hijyeni ve dolayısıyla diş çürükleri ile ilişkili olduğu bu çalışma ile de gösterilmiştir. Ayrıca, bu tez çalışması kapsamında en sık değerlendirilen *Lactobacillus* türlerine özgü primer dizileri hazırlanmıştır. Bu türler *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *L. casei*, *L. salivarius*, *L. brevis* ve *L. plantarum* türlerine özgü primer dizileri yapılmıştır. *Lactobacillus* mikroorganizmalarının nicel olarak değişiminin değerlendirildiği bu çalışmada *Lactobacillus* geniş kapsamlı bir cins olduğundan ve hem karyojenik diyetten hem probiyotik varlığından kolaylıkla etkilendiğinden yani hem dental plak oluşumu hem de inhibisyonunda rol aldığından literatürde en fazla çalışılan türlerine yönelik değerlendirme yapılmıştır. Kontrol grubu olarak kabul edilen probiyotik ve karyojenik diyet uygulanmayan Grup 4’te ise *Lactobacillus* tür miktarının diğer gruplarla benzer seviyede bulgulanması bu görüşü desteklemektedir. Bu nedenlerle, normal, sağlıklı ve sağlıklı oral mikrobiyota elemanı olan *Lactobacillus* değerlendirilirken tür tayini yapılmasının geniş kapsamlı başka bir çalışmanın konusu olması gerektiği düşünülmektedir.

Lactobacillus türleri ile yapılan çalışmalar, çoğu türünün probiyotik özellikte olduğunu göstermektedir.^{10,75,77,104,107,108,127,129,131,132} Ancak, *Lactobacillus* türlerinin dental biyofilm üzerinde *S. mutans* adezyonundan sonra kolonize olup özellikle derin çürük bulunan ağız ortamında yüksek seviyede bulunduğu da çalışmalarla gösterilmiştir.^{41,103,105,128,131,150} *Lactobacillus* cinsi içinde çok sayıda tür bulunması nedeniyle probiyotik mikroorganizma olan türlerinin dışardan besinlerle özellikle fermente gıdalarla alındığı bilindiğinden ve bu çalışmada bu besinler tüketilmediğinden sadece karyojenik yem tüketildiğinden, karyojenik özellikte olan *Lactobacillus* türlerinin baskın olduğu tahmin edilmektedir.

Oral mikrobiyotada bulunan çok sayıda türü olan *Lactobacillus* türlerinden özellikle *L. salivarius*'un farklı suşlarının çürük oluşumunu hem artırıcı ve hem azaltıcı etkisi olduğu da çalışmalarda gösterilmiştir.¹⁰³⁻¹⁰⁵ Ayrıca, *L. rhamnosus*, *L. reuteri* türlerinin varlığında da *S. mutans* kolonizasyonunun engellendiği gösterilmiştir.^{73,106,108,129,172,173} *Lactobacillus* türlerinin karyojenik diyet varlığında kolonizasyonu artan *S. mutans* üzerindeki etkisinin tartışmalı olduğu çalışmalarla gösterilmiştir.^{41,103,105,128,131,150,172} Bu tez çalışmasında kPZR analizi sırasında *S. mutans* yeterli miktarda DNA amplifikasyonu göstermediğinden amplifikasyon eğrisi denilen eşik eğrisini geçememiş ve florometrenin ölçebileceği düzeyde floresan yayamadığından kolonizasyonunun yok denecek kadar az miktarda olduğu görülmüştür. *S. mutans*'ın yüksek kolonizasyonu karyojenik diyet uygulanan gruplarda (Grup 1 ve Grup 2) beklenmekteydi, bu nedenle *S. mutans*'ın kolonize olmaması Grup 1'de oral probiyotik kullanımına bağlanabilirken, Grup 2'de *Lactobacillus*'un varlığına, bazı türlerinin probiyotik mikroorganizma görevi görmesine ve *S. mutans* öncesi kolonizasyonuna bağlanabilir.

Grup 3 ve Grup 4 gruplarında karyojenik diyet uygulanmayıp, probiyotik mikroorganizma içeren su içirilen ve içirilmeyen deney hayvanları dahil edildiğinden, bu gruplarda *S. mutans*'ın kolonizasyonu beklenmediğinden bu sonuç karyojenik diyet ve *S. mutans* ilişkisini kanıtlamaktadır. Ayrıca, elde edilen kPZR sonuçlarına bakıldığında, *Lactobacillus* cins düzeyinde istatistiksel fark göstermezken, *S. salivarius*'un zamana bağlı değişimlerinde istatistiksel fark görülmüştür. Grup 1'de karyojenik diyet uygulanmasına rağmen başlangıç (T0), 1 ay (T1) ve 2 ay (T2) kontrollerinde alınan örneklerdeki *S. salivarius* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmüştür. *S. salivarius* K12 probiyotik suşu ile inoküle edilen grupta (Grup 1) *S. mutans* varlığının baskılanması daha önce araştırılan probiyotik mikroorganizma ile yapılan probiyotik çalışmalarının sonuçları ile

uyumlu görünmektedir. Bu da *S. salivarius*'un probiyotik mikroorganizmalardan beklenen diş yüzeyinde oluşan biyofilm tabakaya patojenlerin yerine bağlanabilme hipotezini desteklemektedir.

Ayrıca, probiyotik kullanılan ancak karyojenik diyet uygulanmayan grupta (Grup 3) başlangıç (T0), 1 ay (T1) ve 2 ay (T2) kontrollerinde alınan örneklerdeki *S. salivarius* miktarları arasında istatistiksel olarak anlamlı artış görülmesi de *S. salivarius*'un kolonizasyon becerisini göstermektedir. Gruplar arası sonuçlar karşılaştırıldığında, T1 ve T2 için Grup 1 ve Grup 3 sonuçları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı sonuç çıkmaması karyojenik diyet varlığında veya yokluğunda *S. salivarius* kolonizasyonunun etkilenmediği sonucunu vermektedir. Tabii bu kolonizasyonun temelinde yatan mekanizmanın ana nedeninin salınan bakteriyosinler olduğu literatürde bahsedilse de geniş çaplı çalışmalar yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır. *S. salivarius* K12 tabletlerin kullanıldığı randomize kontrollü klinik çalışmada halitozis varlığı tespit edilen hastalarda etkinliği zayıf bulunmasına rağmen bu durum mekanik temizlik yapılmamasına bağlanmıştır.^{133,170} Ancak, dental biyofilm nedeniyle gelişen halitozisin tedavisinde başarısız olduğu gösterilen *S. salivarius* K12 tabletlerinin bu tez çalışmasında sıçanların oral mikrobiyotasındaki kolonizasyonu anlamlı derecede yüksek seviyede bulunmuştur. Bu yüzden, diş yüzeylerinde dental biyofilm bulunan yani oral hijyeni kötü ve diş çürüğü gelişme riski taşıyan bireylerde de denenmesi gerektiğine dair klinik çalışmaların önü açılmış bulunmaktadır.

Bu tez çalışmasının ikincil amacı olan probiyotik etkinliğinin probiyotik bırakıldıktan sonra da devam edip etmediğinin değerlendirilmesi için her iki probiyotik mikroorganizma kullanılan gruplarda (Grup 1 ve Grup 3) elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Sonuçlara bakıldığında, Grup 1 ve Grup 3 gruplarında 1 aylık takip süresi sonunda probiyotik kullanımı bırakılmasına rağmen T0 ve T2 arasında istatistiksel fark olması probiyotik bakteri *S. salivarius* K12'nin oral kolonizasyonunun başarılı olduğunu ve etkinliğinin devam ettiğini göstermektedir. Ancak, Grup 1 grupta istatistiksel olarak anlamlı olmasa da *S. salivarius* miktarındaki düşüş karyojenik diyetin devam etmesine yani patojen mikroorganizmaların artan kolonizasyonuna bağlanabilirken, Grup 3 grupta ise yine istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen *S. salivarius* miktarındaki artış patojenle karşılaşmadığında kolonizasyonunu artırarak devam ettirebilmesi sonucuna varılabilir.

Probiyotiklerin bırakıldıktan sonra etkinliklerinin devamlılığını değerlendiren çalışmalardan, Çağlar ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *L. reuteri* bırakıldıktan sonra

istatistiksel fark olmaksızın düşüş olması kullanım bırakıldıktan sonra da probiyotiklerin oral mikrobiyotada kolonizasyonunun devam ettiğini göstermiştir.¹⁰⁷ Ayrıca, Yli-Knutilla ve arkadaşları, 14 günlük bir deneme süresinde *L. rhamnosus* GG'nin oral kavitede kolonize edilmesini incelemiş ve meyve suyunun bırakılmasından 1 hafta sonraki zaman boyunca sadece geçici olarak tespit edildiğini gözlemlemişlerdir.¹⁷³ Hasslof ve arkadaşları ise *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19 probiyotik mikroorganizmalarının süten kesme sırasında oral mikrobiyotada kolonizasyonunun başladığını ancak, 8 yıl sonra yapılan kontrollerde ne tükürükten ne de dışkıdan izole edilmediklerini de bildirmiştir.¹⁵⁰

Bu çalışmalar oral mikrobiyotadaki probiyotik etkinliğine yönelik farklı sonuçlar verse de çoğunlukla *Lactobacillus* türlerinin kullanılmasını öneren ve probiyotik mikroorganizma bırakıldıktan sonra bile etkinliğin devam ettiği ve koruyucu görevini sürdürdüğünü göstermiştir. Bu bağlamda, bu tez çalışması *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma kullanımına ara verildiğinde bile etkin olduğunu gösteren ilk çalışma olma özelliği taşımaktadır. Bu yüzden *S. salivarius*'un bırakıldıktan sonra etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma olmadığından karşılaştırma yapılamamıştır. Ayrıca, son yıllarda ortaya atılmasına rağmen oral mikrobiyotada yüksek etkinlik göstermesi beklenen, umut vaat eden *S. salivarius* K12 probiyotik mikroorganizma etkinliğinin klinik çalışmalarda değerlendirilmesi gerektiği yönünde olumlu sonuçlar alınmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında standart diyet ve bakteriye gerekli olan yaşama ortamı sağlanarak probiyotik mikroorganizma etkinliğinin gerçek zamanlı kPZR ile analiz edilmesi bu çalışmanın güçlü taraflarındandır. Çalışma tasarımının standardize edilmesinin ardından, sıçanların da gruplara randomize dağıtılması, negatif kontrol grubu ile karşılaştırılması ve gerçek zamanlı kPZR yöntemini uygulayan kişinin deney gruplarından bihaber olması çalışmadaki biasları ortadan kaldırmaktadır. Bu tez çalışmasının önemli bir kısıtlılığı deney hayvanları ile çalışılması ve kemirgenlere özgü karakteristik özelliklerin tam bilinmemesidir. Ancak, Wang ve arkadaşları¹³⁵ yaptıkları çalışmada da *S. salivarius* K12 içeren tabletleri farelerin içme suyuna katarak uyguladığından, bu tez çalışmasında literatür desteğine güvenilerek hareket edilmiştir. Bu çalışmada içme sularında çözdürülen probiyotik mikroorganizma içeren tabletler nedeniyle ilk günlerde su içmekten kaçındıkları fakat sonrasında adapte oldukları gözlemlenmiştir. Bu noktada *S. salivarius* K12 içeren sadece tablet formun olması çalışmanın deney hayvanları üzerinde uygulanırken karşılaşılan kısıtlılık olarak kabul edilebilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında ağız içi tükürük örneklerindeki *S. salivarius*, *S. mutans* ve *Lactobacillus* türlerinin nicel durumları kPZR ile elde edilmiş ve gruplar arası karşılaştırma sonuçlarına göre, *S. salivarius* probiyotik mikroorganizmanın anlamlı şekilde deneklerde kolonize olabildiği ve *S. mutans* kolonizasyonunu önlediği gösterilmiştir. Ayrıca, çok sayıda türü olan *Lactobacillus* cinsinde, istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olmasa bile zaman içerisinde karyojenik diyet uygulanan iki grupta da daha yüksek artış göstermesi dental biyofilmdeki patojen karakterine bağlanabilir. Ayrıca, *S. salivarius* K12 kullanan gruplarda kullanım sonrası yüksek mikroorganizma sayısının devam etmesi koruyucu özelliğinin yüksek olduğunu vurgulamaktadır. Bu sonuçlara bağlı olarak deney hayvanları üzerinde karyojenik diyet uygulanmasına karşın *S. mutans* ve *Lactobacillus* anlamlı artış göstermezken *S. salivarius*'un baskılayıcı etkisi ve diş çürüğünün ana patojeni olarak kabul edilen *S. mutans*'ın kolonizasyonunu inhibe ettiği görülmüştür. Bu nedenle bu hayvan çalışmasından sonraki adım olan, oral mikrobiyotadaki en önemli sağlık sorunu diş çürüğünün ilk nedeni olarak kabul edilen dental biyofilm inhibisyonundaki etkinliğinin değerlendirileceği klinik çalışmalarla da değerlendirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Gerritsen J, Smidt H, Rijkers GT, de Vos WM. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. *Genes Nutr.* 2011;6(3):209-40.
2. Coşkun T. Probiyotikler, Genel Özellikleri ve Etki Mekanizmaları. *Türkiye Klinikleri J Pediatr Sci.* 2012;8(3):1-11.
3. Thomas DW, Greer FR. American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition; American Academy of Pediatrics Section on Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics.* 2010;126(6):1217-31.
4. Gordon JI, Klaenhammer TR. A rendezvous with our microbes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(Suppl 1):4513-5.
5. Gao L, Xu T, Huang G, Jiang S, Gu Y, Chen F. Oral microbiomes: more and more importance in oral cavity and whole body. *Protein Cell.* 2018;9(5):488-500.
6. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
7. Jorth P, Turner KH, Gumus P, Nizam N, Buduneli N, Whiteley M. Metatranscriptomics of the human oral microbiome during health and disease. *mBio.* 2014;5(2):e1012-e1014.
8. Üsküdar Güçlü A. Bölüm 28: Oral Mikrobiyota. In: Başustaoğlu AC, Us D, editors. *Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji.* 1st ed. Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2020. p. 341-9.
9. Philip N, Suneja B, Walsh LJ. Ecological approaches to dental caries prevention: paradigm shift or shibboleth? *Caries Res.* 2018;52(1–2):153-65.
10. Wasfi R, Abd El-Rahman OA, Zafer MM, Ashour HM. Probiotic *Lactobacillus* sp. inhibit growth, biofilm formation and gene expression of caries-inducing *Streptococcus mutans*. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1972-83.
11. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162(2):22-38.
12. Saikaly SK, Saikaly TS, Saikaly LE. Recurrent aphthous ulceration: a review of potential causes and novel treatments. *J Dermatolog Treat.* 2018;29(6):542-52.
13. Blod C, Schlichting N, Schülin S, Suttikus A, Peukert N, Stingu CS, Hirsch C, Elger W, Lacher M, Bühligen U, Mayer S. The oral microbiome-the relevant reservoir for acute pediatric appendicitis? *Int J Colorectal Dis.* 2017;33(2):209-18.

14. Fardini Y, Chung P, Dumm R, Joshi N, Han YW. Transmission of diverse oral bacteria to murine placenta: evidence for the oral microbiome as a potential source of intrauterine infection. *Infect Immun*. 2010;78(4):1789-96.
15. Ling Z, Liu X, Cheng Y, Jiang X, Jiang H, Wang Y, Li L. Decreased diversity of the oral microbiota of patients with Hepatitis B virus-induced chronic liver disease: a pilot project. *Sci Rep*. 2015;5:17098.
16. Peters BA, Wu J, Pei Z, Yang L, Purdue MP, Freedman ND, Jacobs EJ, Gapstur SM, Hayes RB, Ahn J. Oral Microbiome composition reflects prospective risk for esophageal cancers. *Cancer Res*. 2017;77(23):6777-87.
17. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases. *Nutrients*. 2018;10(1):42.
18. Roszyk E, Puszczewicz M. Role of human microbiome and selected bacterial infections in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Reumatologia*. 2017;55(5):242-50.
19. Zarco MF, Vess TJ, Ginsburg GS. The oral microbiome in health and disease and the potential impact on personalized dental medicine. *Oral Dis*. 2012;18(2):109-20.
20. National Institutes of Health. Human Microbiome Project. [Homepage on the Internet]. 2013. Available from: <http://commonfund.nih.gov/hmp/overview>
21. Chen T, Yu WH, Izard J, Baranova OV, Lakshmanan A, Dewhirst FE. The Human Oral Microbiome Database: a web accessible resource for investigating oral microbe taxonomic and genomic information. *Database (Oxford)*. 2010;2010:baq013.
22. Eren AM, Borisy GG, Huse SM, Mark Welch JL. Oligotyping analysis of the human oral microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(28):E2875-E2884.
23. The National Institute of Dental and Craniofacial Research. Human Oral Microbiome Project. [Homepage on the Internet]. 2016. Available from: <https://www.homd.org/download>
24. Butler RR, Soomer-James JT, Frenette M, Pombert JF. Complete genome sequences of two human oral microbiome commensals: *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and *S. salivarius* ATCC 27945. *Genome Announc*. 2017;5(24):e00536-17.
25. Li W, Liang H, Lin X, Hu T, Wu Z, He W, Wang M, Zhang J, Jie Z, Jin X, Xu X, Wang J, Yang H, Zhang W, Kristiansen K, Xiao L, Zou Y. A catalog of bacterial reference genomes from cultivated human oral bacteria. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2023;9(1):45.
26. NIH HMP Working Group. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23.

27. Griffen AL, Beall CJ, Firestone ND, Gross EL, DiFranco JM, Hardman JH, Vriesendorp B, Faust RA, Janies DA, Leys EJ. CORE: a phylogenetically-curated 16S rDNA database of the core oral microbiome. *PLoS One*. 2011;6(4):e19051.
28. Ahn J, Yang L, Paster BJ, Ganly I, Morris L, Pei Z, Hayes RB. Oral microbiome profiles: 16S rRNA pyrosequencing and microarray assay comparison. *PLoS One*. 2011;6(7):e22788.
29. Anukam KC, Agbakoba NR. A comparative study of the oral microbiome compositions of healthy postmenopausal, premenopausal, and prepubertal Nigerian females, using 16s rRNA metagenomics methods. *Niger J Clin Pract*. 2017;20(10):1250.
30. Ogawa T, Hirose Y, Honda-Ogawa M, Sugimoto M, Sasaki S, Kibi M, Kawabata S, Ikebe K, Maeda Y. Composition of salivary microbiota in elderly subjects. *Sci Rep*. 2018;8(1):414.
31. An JY, Darveau R, Kaeberlein M. Oral health in geroscience: animal models and the aging oral cavity. *Geroscience*. 2018;40(1):1-10.
32. Lassalle F, Spagnoletti M, Fumagalli M, Shaw L, Dyble M, Walker C, Thomas MG, Bamberg Migliano A, Balloux F. Oral microbiomes from hunter-gatherers and traditional farmers reveal shifts in commensal balance and pathogen load linked to diet. *Mol Ecol*. 2017;27(1):182-95.
33. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, Bradshaw CJ, Townsend G, Sołtysiak A, Alt KW, Parkhill J, Cooper A. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet*. 2013;45(4):450-5.
34. Brito IL, Yilmaz S, Huang K, Xu L, Jupiter SD, Jenkins AP, Naisilisili W, Tamminen M, Smillie CS, Wortman JR, Birren BW, Xavier RJ, Blainey PC, Singh AK, Gevers D, Alm EJ. Mobile genes in the human microbiome are structured from global to individual scales. *Nature*. 2016;535(7612):435-9.
35. Galvão-Moreira LV, de Andrade CM, de Oliveira JFF, Bomfim MRQ, Figueiredo PMS, Branco-de-Almeida LS. Sex differences in salivary parameters of caries susceptibility in healthy individuals. *Oral Health Prev Dent*. 2017;16(1):71-7.
36. Indrio F, Neu J. The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. *Curr Opin Pediatr*. 2011;23(2):145-50.
37. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, Bokulich NA, Song SJ, Hoashi M, Rivera-Vinas JI, Mendez K, Knight R, Clemente JC.

Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 2016;22:250-3.

38. Kaan AMM, Kahharova D, Zaura E. Acquisition and establishment of the oral microbiota. *Periodontol* 2000. 2021;86(1):123-41.

39. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jimenez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes*. 2013;4(1):17-30.

40. Sakaryalı D. Bölüm 29: Tükürük, Mikrobiyal Biyofilmler, Dental Biyofilm ve Plak Oluşumu. In: Başustaoğlu AC, Us D, editors. *Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji*. 1st ed. Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2020. p. 351-5.

41. Mosaddad SA, Tahmasebi E, Yazdanian A, Rezvani MB, Seifalian A, Yazdanian M, Tebyanian H. Oral microbial biofilms: an update. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2019;38(11):2005-19.

42. Boustedt K, Roswall J, Dahlen G, Dahlgren J, Twetman S. Salivary microflora and mode of delivery: a prospective case control study. *BMC Oral Health*. 2015;15(1):155.

43. Lif Holgerson P, Harnevik L, Hernell O, Tanner AC, Johansson I. Mode of birth delivery affects oral microbiota in infants. *J Dent Res*. 2011;90(10):1183-8.

44. König KG, Larson RH, Guggenheim B. A strain-specific eating pattern as a factor limiting the transmissibility of caries activity in rats. *Arch Oral Biol*. 1969;14(1):91-103.

45. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2014;33(4):499-515.

46. Welin-Neilands J, Svensäter G. Acid tolerance of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(17):5633-8.

47. Yılmaz D. Sağlık ve Hastalıkta Oral Kavite Mikrobiotası. *J Biotechnol and Strategic Health Res*. 2018;2(1):9-21.

48. Berger D, Rakhamimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput*. 2018;7(3):24.

49. Huang L, Xu QA, Liu C, Fan MW, Li YH. Anti-caries DNA vaccine-induced secretory immunoglobulin A antibodies inhibit formation of *Streptococcus mutans* biofilms in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2013;34(2):239-46.

50. Nomura H, Isshiki Y, Sakuda K, Sakuma K, Kondo S. Effects of oakmoss and its components on biofilm formation of *Legionella pneumophila*. *Biol Pharm Bull*. 2013;36(5):833-7.

51. Bowen WH, Koo H. Biology of *Streptococcus mutans* derived glucosyltransferases: role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. *Caries Res.* 2011;45(1):69-86.
52. Diaz PI, Chalmers NI, Rickard AH, Kong C, Milburn CL, Palmer RJ Jr, Kolenbrander PE. Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72(4):2837-48.
53. Hannig M, Joiner A. The structure, function and properties of the acquired pellicle. *Monogr Oral Sci.* 2006;19:29-64.
54. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends Microbiol.* 2003;11(2):94-100.
55. Sakaryalı D. Bölüm 5: Çocuk Hastalarda Beyaz Lezyonların Tedavisinde Güncel Yaklaşımlar. In: Uzel İ, Doğan C, editors. *Güncel Pedodonti Çalışmaları I.* 1st ed. Ankara: Akademisyen Kitabevi; 2019. p. 71-89.
56. Gupta P, Sarkar S, Das B, Bhattacharjee S, Tribedi P. Biofilm, pathogenesis and prevention--a journey to break the wall: a review. *Arch Microbiol.* 2016;198(1):1-15.
57. Kam Hepdeniz Ö, Seçkin Ö. Dinamik Mikrobiyal Bir Yaşam: Oral Biyofilm. *SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Dergisi.* 2017;8(3):47-55.
58. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.* 2004;38:204-11.
59. Marsh PD. Dental plaque as a biofilm and a microbial community – implications for health and disease. *BMC Oral Health.* 2006;6(Suppl 1):S14.
60. Kolenbrander PE. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:413-37.
61. Zijnga V, van Leeuwen MB, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, Harmsen HJ. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PLoS One.* 2010;5(2):e9321.
62. Liu G, Chen F, Cai Y, Chen Z, Luan Q, Yu X. Measuring the subgingival microbiota in periodontitis patients: Comparison of the surface layer and the underlying layers. *Microbiol Immunol.* 2020;64(2):99-112.
63. Wen ZT, Yates D, Ahn SJ, Burne RA. Biofilm formation and virulence expression by *Streptococcus mutans* are altered when grown in dual-species model. *BMC Microbiol.* 2010;10:111.
64. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *Br J Exp Pathol.* 1924;5:141-7.
65. Edwardsson S. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol.* 1968;13(6):637-46.

66. Zinner DD, Aran AP, Jablon JM, Saslaw MS. Experimental caries induced by human streptococci. *J Dent Res.* 1964;43:859-60.
67. Willis JR, Gabaldón T. The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms.* 2020;8(2):308.
68. Ogawa A, Furukawa S, Fujita S, Mitobe J, Kawarai T, Narisawa N, Sekizuka T, Kuroda M, Ochiai K, Ogihara H, Kosono S, Yoneda S, Watanabe H, Morinaga Y, Uematsu H, Senpuku H. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by *Streptococcus salivarius* FruA. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(5):1572-80.
69. Redanz S, Standar K, Podbielski A, Kreikemeyer B. A fivespecies transcriptome array for oral mixed-biofilm studies. *PLoS One.* 2011;6(12):e27827.
70. Kreikemeyer B, Gámez G, Margarit I, Giard JC, Hammerschmidt S, Hartke A, Podbielski A. Genomic organization, structure, regulation and pathogenic role of pilus constituents in major pathogenic *Streptococci* and *Enterococci*. *Int J Med Microbiol.* 2011;301(3):240-51.
71. Bagnoli F, Moschioni M, Donati C, Dimitrovska V, Ferlenghi I, Facciotti C, Muzzi A, Giusti F, Emolo C, Sinisi A, Hilleringmann M, Pansegrau W, Censini S, Rappuoli R, Covacci A, Masignani V, Barocchi MA. A second pilus type in *Streptococcus pneumoniae* is prevalent in emerging serotypes and mediates adhesion to host cells. *J Bacteriol.* 2008;190:5480-92.
72. Tamura S, Yonezawa H, Motegi M, Nakao R, Yoneda S, Watanabe H, Yamazaki T, Senpuku H. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence-stimulating peptide-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2009;24(2):152-61.
73. Svensäter G, Welin J, Wilkins JC, Beighton D, Hamilton IR. Protein expression by planktonic and biofilm cells of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol Lett.* 2001;205(1):139-46.
74. Wang W, Tao R, Tong Z, Ding Y, Kuang R, Zhai S, Liu J, Ni L. Effect of a novel antimicrobial peptide chrysophsin-1 on oral pathogens and *Streptococcus mutans* biofilms. *Peptides.* 2012;33(2):212-9.
75. Kang MS, Oh JS, Lee HC, Lim HS, Lee SW, Yang KH, Choi NK, Kim SM. Inhibitory effect of *Lactobacillus reuteri* on periodontopathic and cariogenic bacteria. *J Microbiol.* 2011;49(2):193-9.

76. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR 3rd, Heydorn A, Koo H. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. *PLoS Pathog.* 2012;8(4):e1002623.
77. Schwab C, Walter J, Tannock GW, Vogel RF, Gänzle MG. Sucrose utilization and impact of sucrose on glycosyltransferase expression in *Lactobacillus reuteri*. *Syst Appl Microbiol.* 2007;30(6):433-43.
78. Siqueira WL, Bakkal M, Xiao Y, Sutton JN, Mendes FM. Quantitative proteomic analysis of the effect of fluoride on the acquired enamel pellicle. *PLoS One.* 2012;7(8):e42204.
79. Ahn SJ, Ahn SJ, Wen ZT, Brady LJ, Burne RA. Characteristics of biofilm formation by *Streptococcus mutans* in the presence of saliva. *Infect Immun.* 2008;76(9):4259-68.
80. Duque C, Stipp RN, Wang B, Smith DJ, Höfling JF, Kuramitsu HK, Duncan MJ, Mattos-Graner RO. Downregulation of GbpB, a component of the VicRK regulon, affects biofilm formation and cell surface characteristics of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.* 2011;79(2):786-96.
81. Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Ooshima T. Biological functions of glucan-binding protein B of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 2007;22(5):289-92.
82. Fujita K, Takashima Y, Inagaki S, Nagayama K, Nomura R, Ardin AC, Grönroos L, Alaluusua S, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Correlation of biological properties with glucan-binding protein B expression profile in *Streptococcus mutans* clinical isolates. *Arch Oral Biol.* 2011;56(3):258-63.
83. Khan AU, Islam B, Khan SN, Akram M. A proteomic approach for exploring biofilm in *Streptococcus mutans*. *Bioinformation.* 2011;5(10):440-5.
84. Ahn SJ, Burne RA. Effects of oxygen on biofilm formation and the AtlA autolysin of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 2007;189(17):6293-302.
85. McLean JS, Fansler SJ, Majors PD, McAteer K, Allen LZ, Shirtliff ME, Lux R, Shi W. Identifying low pH active and lactate-utilizing taxa within oral microbiome communities from healthy children using stable isotope probing techniques. *PLoS One.* 2012;7(3):e32219.
86. Pujia AM, Costacurta M, Fortunato L, Merra G, Cascapera S, Calvani M, Gratteri S. The Probiotics In Dentistry: A Narrative Review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21:1405-12.

87. Ashwin D, Ke V, Taranath M, Ramagoni NK, Nara A, Sarpangala M. Effect of probiotic containing ice-cream on salivary Mutans Streptococci (SMS) levels in children of 6-12 years of age: A randomized controlled double blind study with six months follow up. *J Clin and Diag Res.* 2015;9(2):6-9.
88. Soccol CR, de Souza Vandenberhe LP, Spier MR, Pedroni Medeiros AB, Yamaguishi CT, De Dea Lindner J, Pandey A, Thomaz-Soccol V. The potential of probiotics: a review. *Food Technol Biotechnol.* 2010;48(4):413-34.
89. Figueroa-González I, Quijano G, Ramírez G, Cruz-Guerrero A. Probiotics and prebiotics-- perspectives and challenges. *J Sci Food Agric.* 2011;91(8):1341-8.
90. Senok AC, Ismaeel AY, Botta GA. Probiotics: facts and myths. *Clin Microbiol Infect.* 2005;11(12):958-66.
91. Maity TK, Misra AK. Probiotics and human health: synoptic review. *Afr J Food Agric Nutr Develop.* 2009;9(8):1778-96.
92. Kara A. Probiyotiklerin Enfeksiyon Hastalıklarında Kullanımı. *Turkiye Klinikleri J Pediatr Sci.* 2012;8(3):67-73.
93. Kligler B, Hanaway P, Cohrssen A. Probiotics in children. *Pediatr Clin North Am.* 2007;54(6):949-67.
94. Vasićević T, Shah NP. Probiotics-frommetchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 2008;18(7):714-28.
95. Michail S. Probiotics: past, present, and future perspectives. *Curr Pediatr Rev.* 2008;4(2):96-102.
96. Santosa S, Farnworth E, Jones PJ. Probiotics and their potential health claims. *Nutr Rev.* 2006;64(6):265-74.
97. Adam JK, Odhav B, Naidu KSB. Probiotics: recent understandings and biomedical applications. *Curr Trends Biotechnol Pharm.* 2012;6(1):1-14.
98. Boirivant M, Strober W. The mechanism of action of probiotics. *Curr Opin Gastroenterol.* 2007;23(6):679-92.
99. Shanahan F. Probiotics in perspective. *Gastroenterology.* 2010;139(6):1808-12.
100. Upadhyay N, Moudgal V. Probiotics: a review. *J Clin Outcomes Manage.* 2012;19(2):76-84.
101. Kligler B, Cohrssen A. Probiotics. *Am Fam Physician.* 2008;78(9):1073-8.
102. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, Bouley C, Tondou F, Bommelaer G, Grimaud JC. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens

the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16(3):587-93.

103. Matsumoto M, Tsuji M, Sasaki H, Fujita K, Nomura R, Nakano K, Shintani S, Ooshima T. Cariogenicity of the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* in rats. *Caries Res.* 2005;39(6):479-83.

104. Fitzgerald RJ, Fitzgerald DB, Adams BO, Duany LF. Cariogenicity of human oral lactobacilli in hamsters. *J Dent Res.* 1980;59:832-7.

105. Nishihara T, Suzuki N, Yoneda M, Hirofuji T. Effects of *Lactobacillus salivarius*-containing tablets on caries risk factors: a randomized open-label clinical trial. *BMC Oral Health.* 2014;14:110-7.

106. Nikawa H, Makihira S, Fukushima H, Nishimura H, Ozaki Y, Ishida K, Darmawan S, Hamada T, Hara K, Matsumoto A, Takemoto T, Aimi R. *Lactobacillus reuteri* in bovine milk fermented decreases the oral carriage of mutans streptococci. *Int J Food Microbiol.* 2004;95(2):219-23.

107. Çaglar E, Topcuoglu N, Ozbey H, Sandalli N, Kulekci G. Early Colonization of *Lactobacillus reuteri* after Exposure to Probiotics. *J Clin Pediatr Dent.* 2015;39(4):326-30.

108. Romani Vestman N, Hasslof P, Keller MK, Granström E, Roos S, Twetman S, Stecksén-Blicks C. *Lactobacillus reuteri* influences regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection: a double-blind, randomised controlled trial. *Caries Res.* 2013;47:338-45.

109. Contaldo M, Fusco A, Stiuso P, Lama S, Gravina AG, Itró A, Federico A, Itró A, Dipalma G, Inchingolo F, Serpico R, Donnarumma G. Oral Microbiota and Salivary Levels of Oral Pathogens in Gastro-Intestinal Diseases: Current Knowledge and Exploratory Study. *Microorganisms.* 2021;9(5):1064.

110. Gong SG, Chan Y, Lévesque CM. Complete Genome Sequence of Megaplasmid-Bearing *Streptococcus salivarius* Strain LAB813, Isolated from the Dental Plaque of a Caries-Free Child. *Microbiol Resour Announc.* 2019;8(41):e01092-19.

111. Burton JP, Chilcott CN, Moore CJ, Speiser G, Tagg JR. A preliminary study of the effect of probiotic *Streptococcus salivarius* K12 on oral malodour parameters. *J Appl Microbiol.* 2006;100(4):754-64.

112. Burton JP, Chilcott CN, Tagg JR. The rationale and potential for the reduction of oral malodour using *Streptococcus salivarius* probiotics. *Oral Dis.* 2005;11(Suppl 1):29-31.

113. Burton JP, Drummond BK, Chilcott CN, Tagg JR, Thomson WM, Hale JDF, Wescombe PA. Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of

- dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J Med Microbiol.* 2013;62:875-84.
114. Palmer RJ Jr. Composition and development of oral bacterial communities. *Periodontol.* 2014;64(1):20-39.
115. Kim HJ, Yoo HJ. Inhibitory effects of *Streptococcus salivarius* K12 on formation of cariogenic biofilm. *J Dent Sci.* 2023;18(1):65-72.
116. Gong SG, El-Shennawy S, Choudhary P, Dufour D, Lévesque CM. Antimicrobial activity of probiotic *Streptococcus salivarius* LAB813 on in vitro cariogenic biofilms. *Arch Oral Biol.* 2023;154:105760.
117. Benic GZ, Farella M, Morgan XC, Viswam J, Heng NC, Cannon RD, Mei L. Oral probiotics reduce halitosis in patients wearing orthodontic braces: a randomized, triple-blind, placebo-controlled trial. *J Breath Res.* 2019;13(3):036010.
118. Choudhary P, Kraatz HB, Lévesque CM, Gong SG. Microencapsulation of probiotic *Streptococcus salivarius* LAB813. *ACS Omega.* 2023;8(13):12011–8.
119. Hillman JD, McDonell E, Cramm T, Hillman CH, Zahradnik RT. A spontaneous lactate dehydrogenase deficient mutant of *Streptococcus rattus* for use as a probiotic in the prevention of dental caries. *J Appl Microbiol.* 2009;107:1551-8.
120. Lee SH, Kim YJ. A comparative study of the effect of probiotics on cariogenic biofilm model for preventing dental caries. *Arch Microbiol.* 2014;196(8):601-9.
121. Deshpande G, Rao S, Patole S. Progress in the field of probiotics: year 2011. *Curr Opin Gastroenterol.* 2011;27(1):13-8.
122. Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30(1):61-7.
123. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2001;33 Suppl 2:S17-25.
124. Oksanen PJ, Salminen S, Saxelin M, Hämäläinen P, Ihantola-Vormisto A, Muurasniemi-Isoviita L, Nikkari S, Oksanen T, Pörsti I, Salminen E. Prevention of travellers' diarrhoea by *Lactobacillus* GG. *Ann Med.* 1990;22(1):53-6.

125. Preidis GA, Versalovic J. Targeting the human microbiome with antibiotics, probiotics, and prebiotics: gastroenterology enters the metagenomics era. *Gastroenterology*. 2009;136(6):2015-31.
126. Sonnenburg JL, Chen CT, Gordon JI. Genomic and metabolic studies of the impact of probiotics on a model gut symbiont and host. *PLoS Biol*. 2006;4(12):e413.
127. Bowen WH. Rodent model in caries research. *Odontology*. 2013;101(1):9-14.
128. Caglar E, Sandalli N, Twetman S, Kavaloglu S, Ergeneli S, Selvi S. Effect of yogurt with *Bifidobacterium* DN-173 010 on salivary mutans streptococci and lactobacilli in young adults. *Acta Odontol Scand*. 2005;63:317-20.
129. Näse L, Hatakka K, Savilahti E, Saxelin M, Pönkä A, Poussa T, Korpela R, Meurman JH. Effect of long-term consumption of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* GG, in milk on dental caries and caries risk in children. *Caries Res*. 2001;35(6):412-20.
130. Hedayati-Hajikand T, Lundberg U, Eldh C, Twetman S. Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries – a randomized controlled trial. *BMC Oral Health*. 2015;15:112-7.
131. Montalto M, Vastola M, Marigo L, Covino M, Graziosetto R, Curigliano V, Santoro L, Cuoco L, Manna R, Gasbarrini G. Probiotic treatment increases salivary counts of lactobacilli: a double-blind, randomized, controlled study. *Digestion*. 2004;69(1):53-6.
132. Caglar E, Kuscu OO, Cildir SK, Kuvvetli SS, Sandalli N. A Probiotic Lozenge Administered Medical Device And Its Effect On Salivary Mutans Streptococci And Lactobacilli. *Int J Paediatr Dent*. 2008;18(1):35-9.
133. He L, Yang H, Chen Z, Ouyang X. The Effect of *Streptococcus salivarius* K12 on Halitosis: a Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Trial. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2020;12(4):1321-9.
134. Caglar E, Kargul B, Tanboga I. Bacteriotherapy and probiotics' role on oral health. *Oral Dis*. 2005;11:131-7.
135. Chopra R, Mathur S. Probiotics in dentistry: A boon or sham. *Dental Research Journal*. 2013;10(3):302-6.
136. Anderson MH, Shi W. A Probiotic Approach To Caries Management. *Pediatr Dent*. 2006;28(2):151-3.
137. Wolvers D, Antoine JM, Myllyluoma E, Schrezenmeir J, Szajewska H, Rijkers GT. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: prevention and management of infections by probiotics. *J Nutr*. 2010;140(3):698S-712S.

138. Shiva Manjunant RG. Benefits of live microorganisms (probiotics) in periodontal health. *Int J Contemp J*. 2011;2:97-100.
139. Çetin AR, Karabekiroğlu S, Ünlü N. Probiyotikler ve ağız sağlığına etkileri. *Süleyman Demirel Üniv Diş Hek Fak Derg*. 2011;3(1):19-29.
140. Tarım ve Orman Bakanlığı. Deneyisel ve Diğer Bilimsel Amaçlar İçin Kullanılan Hayvanların Refah ve Korunmasına Dair Yönetmelik [Homepage on the Internet]. 2019. Resmi gazete, Sayı: 30825. Available from: <https://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2019/07/20190708M1-24.htm>
141. Pekkala E, Hietala EL, Puukka M, Larmas M. The effect of sucrose diet of rat dams on the dentine apposition and dental caries of their pups. *Arch Oral Biol*. 2000;45(3):193-200.
142. Holloway PJ, Shaw JH, Sweeney EA. Effects of various sucrose: casein ratios in purified diets on the teeth and supporting structures of rats. *Arch Oral Biol*. 1961;3:185-200.
143. Michalek SM, McGhee JR, Shiota T, Devenyns D. Low sucrose levels promote extensive *Streptococcus mutans*-induced dental caries. *Infect Immun*. 1977;16(2):712-4.
144. Wang Y, Li J, Zhang H, Zheng X, Wang J, Jia X, Peng X, Xie Q, Zou J, Zheng L, Li J, Zhou X, Xu X. Probiotic *Streptococcus salivarius* K12 Alleviates Radiation-Induced Oral Mucositis in Mice. *Front Immunol*. 2021;12:684824.
145. Ma C, Chen F, Zhang Y, Sun X, Tong P, Si Y, Zheng S. Comparison of oral microbial profiles between children with severe early childhood caries and caries-free children using the human oral microbe identification microarray. *PLoS One*. 2015;10(3):e0122075.
146. Jenkinson HF, Lamont RJ. Oral microbial communities in sickness and in health. *Trends Microbiol*. 2005;13(12):589.
147. Anusha RL, Umar D, Basheer B, Baroudi K. The magic of magic bugs in oral cavity: Probiotics. *J Advanced Phar Tech Res*. 2015;6(2):43-7.
148. Deveci C, Ulusu T. Çocuk Diş Hekimliğinde Probiyotikler ve Güncel Yaklaşımlar. *J Pediatr Dent-Special Topics*. 2015;1(3):37-43.
149. Yılmaz M. Prebiyotik ve Probiyotikler. *Güncel Pediatri*. 2004;2:142-5.
150. Hasslöf P, Stecksén-Blicks C. Chapter 10: Probiotic Bacteria and Dental Caries. *Monogr Oral Sci*. 2020;28:99-107.
151. Twetman S, Stecksén-Blicks C. Probiotics and oral health effects in children. *Int J Paediatr Dent*. 2008;18:3-10.
152. Ezendam J, van Loveren H. Probiotics: immunomodulation and evaluation of safety and efficacy. *Nutr Rev*. 2006;64:1-14.

153. Minocha A. Probiotics for preventive health. *Nutr Clin Pract*. 2009;24:227-41.
154. Vestman NR, Timby N, Holgerson PL, Kressirer CA, Claesson R, Domellöf M, Öhman C, Tanner AC, Hernell O, Johansson I. Characterization and in vitro properties of oral lactobacilli in breastfed infants. *BMC Microbiol*. 2013;13:193.
155. Güney Saruhan B, Dereli S. Deney Hayvanlarının Beslenme, Barınma ve Üremesi. *Dicle Üniv Vet Fak Derg*. 2016;1(3):16-21.
156. Geçmez K, Akkoyun HT, Kızıl M, Bayramoğlu Akkoyun M. Some anatomical, physiological, and reproductive characteristics of laboratory animals rat, guinea pig, and rabbit. *Journal of Laboratory Animal Science and Practices*. 2023;3(1):22-7.
157. İde T. Hayvan Modelleri. In: Translation ed. Ide T, Laboratuvar Hayvanları Biliminin Temel İlkeleri Türkçe Çeviri, Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC. Chap 10. Ankara: Medipres Yayınları, Ozkan Matbaacılık, 2003.
158. König KG, Larson RH, Fitzgerald RJ, Muehleman HR. Caries activity of male and female Osborne–Mendel rats in different environments. *Helv Odontol Acta*. 1965;9:115-9.
159. Fitzgerald RJ, Larson RH. Age and caries susceptibility in gnotobiotic rats. *Helv Odontol Acta*. 1967;11(1):49-52.
160. Fitzgerald RJ, König KG. Maturation of dental enamel in germfree and monoinfected Sprague–Dawley rats. *Helv Odontol Acta*. 1968;12(2):55-61.
161. Reynolds EC, Johnson IH. Effect of milk on caries incidence and bacterial composition of dental plaque in the rat. *Arch Oral Biol*. 1981;26(5):445-51.
162. McCollum EV, Simmonds N, Kinney EM, Grieves CJ. The relation of nutrition to tooth development and tooth preservation I A preliminary study of gross maxillary and dental defects in 220 rats on defective and deficient diets. *Johns Hopkins Hosp Bull*. 1922;33:202.
163. Kite OWS, Shaw JH, Sognaes RF. The prevention of experimental tooth decay by tube-feeding. *J Nutr*. 1950;42:89-103.
164. Nakfoor EC, Hunt HR, Hoppert CA. Fracturing of the molar teeth in caries-susceptible and caries-resistant albino rats (*Rattus norvegicus*). *J Dent Res*. 1952;31(1):143-50.
165. Harrison RW. Bacterial flora in experimental dental caries of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1938;39:459-61.
166. Orland FJ, Blayney JR, Harrison RW, Reyniers JA, Trexler PC, Ervin RF, Gordon HA, Wagner M. Experimental caries in germfree rats inoculated with enterococci. *J Am Dent Assoc*. 1955;50(3):259-72.

167. Keyes PHF, Fitzgerald RJ, Jordan HV, White CL. The effect of various drugs on caries and periodontal disease in albino hamsters. *Arch Oral Biol.* 1962;7:159-77.
168. Scoffield JA, Wu H. Oral streptococci and nitrite-mediated interference of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun.* 2015;83(1):101-7.
169. Taipale T, Pienihakkinen K, Salminen S, Jokela J, Söderling E. *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 administration in early childhood: a randomized clinical trial of effects on oral colonization by mutans streptococci and the probiotic. *Caries Res.* 2012;46:69-77.
170. Masdea L, Kulik EM, Hauser-Gerspach I, Ramseier AM, Filippi A, Waltimo T. Antimicrobial activity of *Streptococcus salivarius* K12 on bacteria involved in oral malodour. *Arch Oral Biol.* 2012;57(8):1041-7.
171. Torun ÖY. Bölüm 36: Oral Enfeksiyonlarda Mikrobiyolojik Tanı. In: Başustaoğlu AC, Us D, editors. *Diş Hekimliğinde Mikrobiyoloji*. 1st ed. Ankara: Hipokrat Yayıncılık; 2020. p. 414-27.
172. Simark-Mattsson C, Emilson CG, Hakansson EG, Jacobsson C, Roos K, Holm S. *Lactobacillus*-mediated interference of mutans streptococci in cariesfree vs. caries-active subjects. *Eur J Oral Sci.* 2007;115:308-14.
173. Yli-Knuuttila H, Snäll J, Kari K, Meurman JH. Colonization of *Lactobacillus rhamnosus* GG in the oral cavity. *Oral Microbiol Immunol.* 2006;21:129-31.

EK 1: Proje ve etik kurul onayı

Evrak Tarih ve Sayısı: 11.08.2022-150540



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ Tıp ve Sağlık Bilimleri Araştırma Kurulu

Sayı : E-94603339-604.01.02-150540

Konu : Proje Onayı

11.08.2022

DAĞITIM YERLERİNE

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Ahmet Celal Başustaoglu'nun danışmanlığında Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Tıbbi Mikrobiyoloji Doktora Programı öğrencisi Didem Sakaryalı Uyar'ın sorumluluğunda yürütülecek olan DA22/24 nolu "Streptococcus salivarius K12 kullanımının ağız sağlığına etkisinin değerlendirilmesi" başlıklı araştırma projesi Kurulumuz ve Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulunun 20/05/2022 tarih ve 22/22 sayılı kararı ile uygun görülmüştür. Projenin başlama tarihi ile çalışmanın sunulduğu kongre ve yayımlandığı dergi konusunda Kurulumuza bilgi verilmesini rica ederim.

Not: Çalışma bildiri ve/veya makale haline geldiğinde "Gereç ve Yöntem" bölümüne aşağıdaki ifadelerden uygun olanının eklenmesi gerekmektedir.

— Bu çalışma Başkent Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından onaylanmış (Proje no:...) ve Başkent Üniversitesi Araştırma Fonunca desteklenmiştir.

— This study was approved by Baskent University Ethical Committee for Experimental Research on Animals (Project no:...) and supported by Baskent University Research Fund.

Prof. Dr. Hakan ÖZKARDEŞ
Kurul Başkanı

Dağıtım:
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına



1993

BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ

HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KARARI

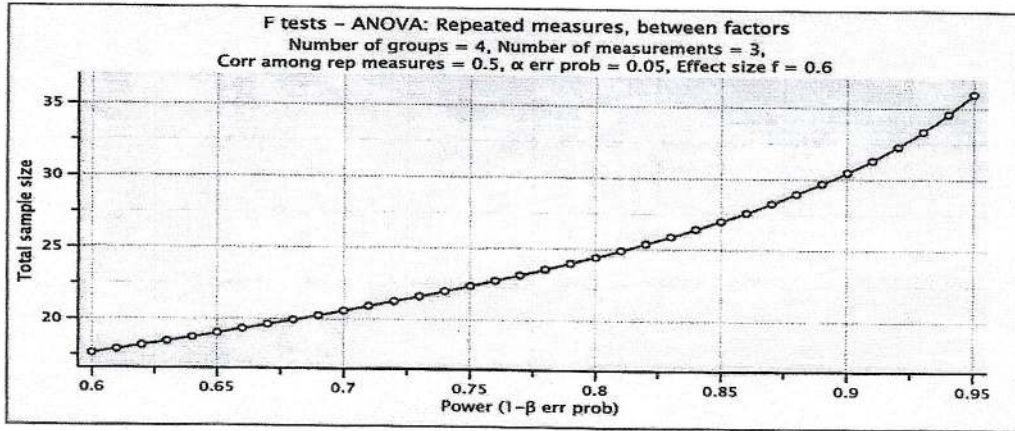
TOPLANTI SAYISI	KARAR SAYISI	KARAR TARİHİ
11	22/22	20/05/2022

Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalında görev yapmakta olan Prof. Dr. Ahmet Celal Başustaoğlu tarafından yürütülecek olan DA22/24 nolu “*Streptococcus salivarius* K12 kullanımının ağız sağlığına etkisinin değerlendirilmesi” başlıklı araştırma projesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu tarafından incelendi ve etik açıdan uygun olduğuna oybirliği ile karar verildi.

F tests – ANOVA: Repeated measures, between factors

Analysis: A priori: Compute required sample size

Input:	Effect size f	= 0.60 (Orta ile büyük arası etki)
	α err prob	= 0.05 (Tip I hata olasılığı)
	Power ($1-\beta$ err prob)	= 0.90 (Güç olasılığı)
	Number of groups	= 4
	Number of measurements	= 3
	Corr among rep measures	= 0.5
Output:	Noncentrality parameter λ	= 17.2800000
	Critical F	= 2.946853
	Numerator df	= 3.0000000
	Denominator df	= 28.0000000
	Total sample size	= 32
	Actual power	= 0.9169824



Araştırma düzenine göre örneklem büyüklüğü ve güç hesaplamasında **G*Power 3.1.3** paket programı kullanılmıştır. Araştırmanın temel hipotezi, "Karyojenik diyet verilen ve verilmeyen deney hayvanlarının kendi içinde de probiyotik kullanımının üç kez ölçüm sonucunda çeşitli parametrelere etkisini" belirlemektir. Bu amaçla varsayımlar sağlandığı takdirde Tekrarlı Ölçümlerde gruplar arası Varyans analizi ile hipotezler test edilecektir. %90 güç, %5 tip I hata olasılığı ile araştırılan etkiyi (Large-medium effect size) ortaya çıkarmak için en az 32deney hayvanı ile çalışılması uygun görülmüştür.