



**PERİOPATOJEN BAKTERİLERİN
KALSİFİKASYON KABİLİYETLERİNİN
İN VİTRO İNCELENMESİ**

Dt. Fatih KARAASLAN

Periodontoloji Anabilim Dalı

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Turgut DEMİR**

Uzmanlık Tezi - 2015

**T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ**

**PERİOPATOJEN BAKTERİLERİN KALSİFİKASYON
KABİLİYETLERİNİNİN İN VİTRO İNCELENMESİ**

Dt. Fatih KARAASLAN

**Periodontoloji Anabilim Dalı
Uzmanlık Tezi**

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Turgut DEMİR**

**ERZURUM
2015**

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	I
ÖZET	II
ABSTRACT.....	III
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	IV
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	VI
TABLolar DİZİNİ	VIII
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Periodontal Hastalık Tanımı	3
2.1.1. Gingivitis	3
2.1.2. Periodontitis	4
2.2. Mikrobiyal Dental Plak.....	5
2.2.1. Biyofilm Kavramı	5
2.2.2. Mikrobiyal Dental Plak Biyofilmi	5
2.2.3. Mikrobiyal Dental Plak Patojenitesi	6
2.3. Diştaşı	8
2.3.1. Diştaşı Tanımı.....	8
2.3.2. Diştaşı Oluşumu.....	9
2.3.3. Diştaşı Patojenitesi.....	12
2.3.4. Diştaşı ve Bakteriler.....	13
2.3.4.1. Streptokoklar.....	14
2.3.4.1.1. Streptococcus mutans	15
2.3.4.1.2. Streptococcus sanguis	15

2.3.4.1.3. Streptococcus gordonii	16
2.3.4.2. Candida albicans	16
2.3.4.3. Corynebacterium matruchotii:	17
2.3.4.4. Periyatojen Bakteriler	18
2.3.4.4.1. Aggregatibacter actinomycetemcomitans	18
2.3.4.4.2. Porphyromonas gingivalis	19
2.3.4.4.3. Fusobacterium nucleatum	19
3. MATERYAL VE METOT.....	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar	21
3.1.2 Kullanılan Standart Bakteri Suşları ve Besiyerleri	22
3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin ve Tampon Sisteminin Hazırlanışı	23
3.2. Metot.....	24
3.2.1.Mikroorganizmaların Temini, Canlandırılması ve İnkübasyonu.....	24
3.2.2. Mineralizasyon Denemelerinin Yapılması	27
3.2.3. Katı Besiyerine Ekim.....	27
3.2.4. Sıvı Besiyerine Ekim	29
3.2.5. Mineral Salt Basal Uygulama Tamponu.....	30
4. BULGULAR.....	32
4.1. Katı Besiyerine Ekim Bulguları.....	32
4.2. Sıvı Besiyerine Ekim Bulguları	36
4.3. Mineral Salt Basal İçeriğine Ait Bulgular	39
5. TARTIŞMA.....	42
5.1. Katı Besiyerine Ekim Sonuçlarının Tartışılması	43
5.2. Sıvı Besiyerine Ekim Sonuçlarının Tartışılması.....	48

5.3. Mineral Salt Basal Uygulama Tampon Sonuçlarının Tartışılması	50
5.4. Sonuç	52
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	54
KAYNAKLAR.....	55
EKLER	77
EK-1. ÖZGEÇMİŞ	77



TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam sürecinde değerli desteğini esirgemeyen, bilgi ve tecrübesinden faydalandığım başta danışman hocam Prof. Dr. Turgut DEMİR olmak üzere;

Tez çalışmalarımı sürdürdüğüm dönemde taleplerimi anlayışla karşılayıp geri çevirmeyen ve desteğini esirgemeyen değerli hocam Anabilim Dalı Başkanımız sayın Prof. Dr. Recep ORBAK’a

Üzerimde birçok emeği bulunan değerli hocalarım sayın Doç. Dr. C. Fatih ÇANAKÇI, sayın Doç. Dr. Alparslan DİLSİZ, sayın Doç. Dr. Taner ARABACI ve sayın Yrd. Doç. Dr. Gülnihal Emrem DOĞAN’a

Tezimin laboratuvar çalışmalarını büyük bir titizlikle gerçekleştiren, bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım hocam sayın Doç. Dr. Özlem BARIŞ’a

Ve bu süreçte yardımlarını esirgemeyen tüm asistan arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Ayrıca, beni sabırla destekleyen sevgili eşim ve aileme tüm içtenliğimle şükranlarımı sunuyorum.

Fatih KARAASLAN

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi’nin 2013/264 nolu projesinden destek alınarak yapılmıştır.

ÖZET

Periopatojen Bakterilerin Kalsifikasyon Kabiliyetlerinin İn Vitro İncelenmesi

Amaç: Bu çalışmanın amacı; diştaşı içerisindeki varlığı daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan bazı periopatojen bakterilerin periodontal hastalığa neden olmalarının yanı sıra diştaşı oluşumunda rol alıp almadıklarının *in vitro* ortamda araştırılmasıdır. Bunun yanı sıra bazı dental plak bakterilerinin diştaşı oluşumunda aktif yada pasif rol alıp almadıklarının belirlenmesi de amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot: Çalışmada *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *C. matruchotii*, *C. albicans*, *S. sanguis*, *S. mutans* ve *S. gordonii* mikroorganizma suşları kullanıldı. Mikroorganizmaların canlandırılması ve inkübasyonu için TSBY, SDA ve BHI besiyerleri hazırlandı. Kalsifikasyon çalışmaları için katı (B-2, B-4, modifiye), sıvı besiyerleri ve MSB uygulama tamponu hazırlandı. Kalsifikasyon yapıp yapmadıkları ışık mikroskobu ve spektrofotometre ile incelendi.

Bulgular: Katı besiyeri bulguları; B-2 besiyerinde *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* ve *C. albicans* kalsifikasyon oluştururken B-4 besiyerinde ise sadece *C. albicans*'ın kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi. Modifiye besiyerinde ise herhangi bir tesbit yapılamadı. Sıvı besiyeri bulguları; *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* ve *C. albicans*'ın kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi. MSB bulguları; *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* ve *C. matruchotii* 'nin kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi.

Sonuç: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii*'nin diştaşı oluşumuna hem aktif hem de pasif, *C. albicans*'ın sadece aktif, *C. matruchotii*'nin ise sadece pasif katılım gösterdiği belirlendi. Periopatojen bakterilerin kalsifikasyon kabiliyetlerinin *in vitro* incelenmesi sonucu *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans* ve *F. nucleatum*'un diştaşı oluşumuna katılmadıkları ortaya konuldu.

Anahtar Kelimeler: Mineralizasyon, diştaşı, periopatojen

ABSTRACT

In Vitro Investigation of Periopathogens Calcification Capabilities

Aim: The purpose of this study is to investigate some periopathogens which determined in dental calculus and cause periodontal diseases in the formation of calculus *in vitro*. In addition some dental plaque bacteria want to be investigated in active or passive role of dental calculus formation.

Material and Method: Strains of *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *C. matruchotii*, *C. albicans*, *S. sanguis*, *S. mutans* and *S. gordonii* used in the study. TSBY, SDA and BHI mediums were prepared. Solid (B-2, B-4, modified), liquid mediums and MSB buffer were prepared for calcification study. Calcification capabilities examined with light microscope and spectrophotometer.

Results: Solid medium findings; we observed that *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* and *C. albicans* created calcification in B-2 medium, in B-4 medium only *C. albicans* calcification was observed. We couldn't made any determination in modified medium. Liquid medium findings; it was observed that *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* and *C. albicans* created calcification. MSB findings; *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* and *C. matruchotii* created calcification.

Conclusion: *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* both actively and passively participate in formation of dental calculus, *C. albicans* only actively participate, *C. matruchotii* was found to passively participate. Result of *in vitro* investigation of periopathogens calcification capabilities, *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum* were found to not participate in the formation of dental calculus.

Key Words: Mineralization, dental calculus, periopathogen

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A. actinomycetemcomitans	:Aggregatibacter actinomycetemcomitans
A. viscosus	: Actinomyces viscosus
ATCC	:The American Type Culture Collection
BHI	:Brain Heart Infusion
C. albicans	:Candida albicans
C. matruchotii	:Corynebacterium matruchotii
C. rectus	: Campylobacter rectus
CaCl ₂	: Kalsiyum klorür
CPLX	:Kalsiyum-Fosfolipid-Fosfat kompleks
DOS	: Dişeti Oluğu Sıvısı
DPCD	:Dikalsiyum Fosfat Dihidrat
F. nucleatum	:Fusobacterium nucleatum
g	: Gram
HAP	:Hidroksiapatit
LM	: Işık mikroskobu
MDP	: Mikrobiyal Dental Plak
MSB	:Mineral Salt Basal
nm	: Nanometre
OCP	:Oktokalsiyum Fosfat
P. gingivalis	:Porphyromonas gingivalis
P. intermedia	:Provetella intermedia
S. gordonii	:Streptococcus gordonii
S. mutans	: Streptococcus mutans
S. salivarius	:Streptococcus salivarius

S. sanguis	:Streptococcus sanguis
S. sobrinus	:Streptococcus sobrinus
SDA	:Sabouraud-2 % Dextrose Agar
T	: Transmitans
T. denticola	:Treponema denticola
T. forsythia	:Tannerella forsythia
TSBY	:Trypticase Soy Broth withYeast extract
WHT	:Magnezyum Whitlockite



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Anaerobik jar ve kit sistemi (Oxoid AN 0035A)	25
Şekil 3.2. Etüv (BİNDER)	26
Şekil 3.3. Katı besiyerine ekim yapılmış mikroorganizmaların görünümü.....	28
Şekil 3.4. Steril Kabin (ESCO Clas II Biohazard)	28
Şekil 3.5a. Sıvı besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizmaların görünümü	29
Şekil 3.5b. Sıvı besiyerine ekim yapılmış periopatojenlerin görünümü	29
Şekil 3.6. McFarland Standartları.....	30
Şekil 4.1. <i>C. matruchotii</i> 'nin B-2 besiyerindeki görünümü. Herhangi bir kristalizasyon gözlenmemektedir. (10×10 LM).....	33
Şekil 4.2. <i>C. matruchotii</i> 'nin modifiye besiyerindeki görünümü. Herhangi bir kristalizasyon gözlenmemektedir. (40×10 LM).....	33
Şekil 4.3. <i>S. mutans</i> 'in B-2 besiyerinde oluşturduğu yıldız şeklindeki kalsifiye alan (10×10 LM).....	34
Şekil 4.4. <i>S. gordonii</i> 'nin B-2 besiyeri içerisinde oluşturduğu kalsifiye alan (10×10 LM).....	34
Şekil 4.5. <i>S. sanguis</i> 'in B-2 besiyeri içerisinde oluşturduğu kalsifiye alan (10×10 LM).....	35
Şekil 4.6. <i>C. albicans</i> 'in B-4 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM). 35	
Şekil 4.7. <i>C. albicans</i> 'in B-2 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM). 36	
Şekil 4.8. <i>C. albicans</i> 'in sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM).....	37
Şekil 4.9. <i>S. mutans</i> 'in sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM).. 37	
Şekil 4.10. <i>S. gordonii</i> 'nin sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM).....	38

Şekil 4.11. *S. sanguis*'in sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri

(100×10 LM)..... 38

Şekil 4.12. MSB içerisindeki her bir mikroorganizmanın görünümü 40



TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan her bir bakteri suşu ve standart besiyeri.....	22
Tablo 3.2. Mikroorganizma örneklerinin ATCC ve aksesyon kodları.....	27
Tablo 4.1. Katı besiyerine ekim bulguları.....	32
Tablo 4.2. Sıvı besiyerine ekim bulguları	36
Tablo 4.3. MSB içeriğine ait bulgular.....	39
Tablo 4.4. MSB içerisine uygulanan mikroorganizmaların spektrofotometre bulguları	41

1. GİRİŞ

Periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde primer etyolojik faktör dental plaktır. Dental plağın mineralize olarak kalsifiye depozit şekline dönüşmesiyle diştaşı meydana gelmektedir.¹ Diştaşlarının yüzeyi metabolik olarak aktif mikroorganizma katmanı ile kaplıdır ve yapısında bulunan non-mineralize alanlar periopatojen bakterilerin virülans faktörlerinin dışarıya salınımına olanak sağlamaktadır.^{2, 3} Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diştaşı ile periodontal hastalık arasında güçlü bir korelasyon olduğu belirtilmiştir.^{4, 5} Bunun nedeni diştaşının dokuya zarar verebilen, toksik ürünleri absorbe edebilen ve bakteriyel tutulumu kolaylaştıran pürüzlü yapısıdır.⁶

Diştaşı oluşumunun organik matriksin mineralize olmasıyla meydana geldiği belirtilse de kalsifikasyon için gerekli fiziksel şartların bakteriler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Şöyle ki; dental plak içerisindeki bakteriler lokal pH seviyesini yükseltmekte, pH yükselince de kalsiyum-fosfat iyonları fiziksel olarak çökelmektedir. Diştaşı oluşumunda kalsifikasyonun bazı canlı bakteri kolonileri içinde başladığı ve bu bakterilerin kolayca mineralize olduğu, kalsifiye olmayan bakterilerin ise mineralize doku içerisinde zamanla dejenere olduğu belirtilmiştir.⁷ Bakteriyel mineralizasyon ile ilgili ilk çalışma *Corynebacterium matruchotii* (*C. matruchotii*) üzerinde yapılmış ve hücre membranında bulunan fosfolipid sayesinde apatit oluşturduğu belirlenmiştir.^{8,9}

Mikrobiyal dental plak (MDP) bakterileri ile yapılan çalışmalar ise yüksek yoğunlukta iyon içeren ortamlarda yapılmış ve bu nedenle sınırlı kalmıştır. Bu çalışmalar neticesinde actinomycesler, stafilokoklar ve streptokokların bakteriyel mineralizasyona katıldıkları tesbit edilmiştir.¹⁰⁻¹³ *Streptococcus salivarius* (*S. salivarius*) ve *Streptococcus sanguis* (*S. sanguis*) üzerinde yapılan *in vitro* deneyde ise bu bakterilerin pH yükselmesine neden olarak kalsifikasyona katıldığı belirtilmiştir.³

Diştaşı oluşumunda bakterilerin etkileri araştırılmış olmasına rağmen kesin ve açıklayıcı bilgilere ulaşılamamaktadır. Özellikle diştaşı oluşumuna katılan ve diştaşı içerisinde bulunan bakterilerin kalsifikasyon mekanizmasında görev yapıp yapmadıkları bilinmemektedir. Friskopp, supragingival diştaşında hakim olan filamentöz bakterilerin kalsifikasyona engel olduğunu belirtmiştir.¹⁴ Jepsen ve ark. ise diştaşı oluşumunda bakteri varlığının gerekli olduğunu, bakterilerin salgılamış oldukları laktat dehidrogenaz, alkalın fosfataz ve asit fosfataz gibi enzimler aracılığıyla diştaşı oluşumunda aktif rol oynadıklarını belirtmişlerdir.¹⁵ Diştaşının mikroorganizma içeriğini belirlemeye yönelik yapılan çalışmalarda belirtilen plak bakterilerinin yanı sıra periopatojen bakterilere de rastlanmıştır.^{3, 16} Subgingival diştaşında *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*), *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) ve *Treponema denticola* (*T. denticola*) belirlenmiştir.¹⁶ Bu bilgiler ışığında çalışmanın amacı; diştaşları üzerinde yapılan çalışmalarda diştaşında belirlenen bazı periopatojen bakterilerin ve plak oluşumunda görev alan bazı mikroorganizmaların *in vitro* ortamda kalsifikasyon oluşumuna katılıp katılmadıklarının belirlenmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Periodontal Hastalık Tanımı

Periodontal hastalıklar, bakteriyel plağa bağlı gelişen ve dişi çevreleyen dokularda enflamasyona neden olan enfeksiyöz hastalıklardır.¹⁷ Periodontal hastalıkların oluşumunda asıl etken mikrobiyal dental plakdır,^{18, 19} bunun yanı sıra çevresel, genetik ve konak faktörlerinin de etkileri vardır.²⁰

Periodontal hastalıklar oldukça yüksek prevelansa sahiptirler ve dünya popülasyonunun %90'ını etkilemektedirler.²¹ Gingivitis ve periodontitis en sık görülen periodontal hastalıklardır. Enflamasyon sadece gingival dokuyu etkilerse gingivitis, alttaki bağ doku, periodontal ligament ve kemiğe yayıldığında ise periodontitis olarak tanımlanır.^{19, 22, 23}

2.1.1.Gingivitis

Gingivitis, ataşman kaybı olmaksızın dişeti iltihabı ile karakterize bir hastalıktır. Klinik semptomları; dişetinde renk ve form değişikliği, ödem ve sondalamada kanamadır.²⁴⁻²⁶ Yapılan epidemiyolojik çalışmalar sonucu gingivitisin her yaş grubunda görüldüğü rapor edilmiştir.²⁷

Gingivitiste ataşman ve kemik kaybı gözlenmez ve hastalık genellikle ağrısızdır.²⁸ İltihabın seyrine göre akut, rekürrent ve kronik olarak tanımlanabilir. Ağız etkilediği bölgeye göre lokalize ve generalize olarak görülebilir. Ayrıca dişetinin etkilenen kısmına göre papiller, marjinal ve diffüz olarak adlandırılır.²⁹

Gingivitisin etyolojisindeki ana etkenin MDP olduğu deneysel ve epidemiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir.^{30, 31} Hastalığın tedavisi mekanik yöntemlerle veya kimyasal antimikrobiyal ajanların kullanılması ile plağın azaltılmasına ve ortadan kaldırılmasına bağlıdır.^{32, 33}

Haffajee, MDP ile gingival enflamasyon arasında çok güçlü bir ilişki olduğunu belirtmiştir.³⁴ Pattanaporn ve Navia, diştaşı oluşumu ile gingivitis ve plak arasında yüksek bir korelasyon olduğunu, periodontal sağlık için diştaşı ve plak oluşumunun önlenmesi gerektiğini bildirmişlerdir.³⁵

2.1.2. Periodontitis

Periodontitis, diş destek dokularının enflamasyonu ve yıkımı ile karakterize olan enflamatuvar bir hastalıktır.³⁶ Klinik olarak dişetinde renk değişikliği, stiplinglerin kaybolması, dişeti kanaması, kemik kaybı ve periodontal cep oluşumu gözlenir.²⁰ Hastalığın ilerlemiş olduğu durumlarda kök ve furkasyonun açığa çıkması, dişlerde mobilitate, yer değiştirme ve kayıp gözlenmektedir.³⁷

Periodontitisin en yaygın formları kronik ve agresif periodontitistir. Kronik periodontitisin şiddeti plak ve diştaşı miktarıyla ilişkiliyken agresif periodontitiste doku yıkımının hız ve şiddeti mikrobiyal yük miktarıyla paralellik göstermemektedir.³⁸ Kronik periodontitisin ilerleme hızı bireyden bireye, aynı bireyde bölgeden bölgeye ve dönemden döneme farklılık göstermekle beraber yavaş seyirlidir.^{23,8,23} Agresif periodontitiste ise hızlı gelişen ataşman ve alveol kemik kaybı gözlenmektedir. Kronik periodontitisin görüldüğü bölgelerde plak birikiminin fazla olduğu ve plağın kişisel oral hijyen uygulamaları ile uzaklaştırılmasının güç olduğu rapor edilmiştir.^{8,23} Agresif periodontitiste ise plağın kantitesinin sınırlı olduğu ancak kalitatif olarak artmış *A. actinomycetemcomitans* ve *P. gingivalis* seviyelerine rastlandığı belirtilmiştir.³⁹

Periodontitis'in primer etyolojik faktörü MDP'dir.^{29,30} Restorasyonlar, dişin anatomik yapısı, çürük, kök rezorbsiyonları ve diştaşı gibi plak birikimini kolaylaştıran veya etkisini arttıran lokal faktörlerinde periodontitisin etyolojisinde öneme sahip olduğu vurgulanmıştır.^{40, 41} Bunun yanı sıra Diabetes Mellitus,^{42, 43} AIDS,⁴⁴ Osteoporoz^{45, 46} ve Down's Sendromu^{47, 48} gibi konak cevabını modifiye eden sistemik

hastalıklar da periodontal hastalığın başlaması ve ilerlemesinde etkilidir. Periodontitis patogeneğinde kabul edilen görüş MDP içerisinde bulunan mikroorganizmaların periodontal dokuları uyarak konak cevabını başlattıkları, böylece doku yıkımına neden olan enzim salınımını uyarak indirekt doku yıkımına neden oldukları yönündedir.⁴⁹

2.2.Mikrobiyal Dental Plak

2.2.1.Biyofilm Kavramı

İntersellüler matriks ile çevrili; birbirlerine, herhangi bir yüzeye veya ara yüzeylere tutunmuş bakteri topluluğudur.⁵⁰ Biyofilmler bir bütün olarak hayatta kalmaya adapte olan ekolojik topluluklar olarak tanımlanmaktadır. Biyofilmler ilkel bir dolaşım sistemine sahiptirler ve yüksek pH, oksijen ve besin içeren gelişmiş bir yapı oluştururlar.^{50, 51} Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar planktonik benzerleriyle kıyaslandığında antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençlidirler.^{52, 53}

2.2.2.Mikrobiyal Dental Plak Biyofilmi

MDP, konak ve mikroorganizmalar tarafından salgılanan polimerler tarafından oluşturulan ve ekstrasellüler matriksin dış yüzeyine tutunması ile meydana gelen 500-600 farklı türde mikroorganizma barındıran bir biyofilm tabakasıdır.^{54, 55} MDP içerisinde mycoplasma, protozoa ve virüsler gibi bakteriyel olmayan mikroorganizmalar da vardır.⁵⁶ Ayrıca içerisinde endotel hücreleri, makrofaj ve lökositlerde bulunmaktadır.⁵⁷

MDP bulunduğu konuma göre supragingival ve subgingival plak olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Supragingival plak dişeti kenarının koronalinde yer alırken subgingival plak ise dişeti kenarının apikalinde ve periodontal cep içerisinde yer alır.

Dental plağın gelişimi üç aşamada gerçekleşir. Birinci aşama pelikl tabakasının oluşmasıyla başlar. Pelikl tabakası ağız hijyen uygulamalarını takip eden birkaç saat

içerisinde diş yüzeyinde tükürük ve dişeti oluğu sıvısı (DOS) bileşenleri, hücre döküntüleri, protein ve glikoproteinlerden oluşur.⁵⁸

Yumuşak dokular sürekli olarak yenilediği ve yüzey kısımları döküldüğü için bakteriler kolonizasyon gösteremezler. Ancak diş yüzeyinde böyle bir yenilenme ve dökülme söz konusu olmadığı için pelikül bakterilerin tutunacağı ve MDP'yi oluşturacakları bir yapı görevi görür. Pelikül yüzeyinde bakterilerin tutulumunu kolaylaştıran özelleşmiş reseptörler de bulunmaktadır.⁵⁹

İkinci aşama bakterilerin diş yüzeyinde kolonize olmaya başladıkları başlangıç kolonizasyon sürecidir. Pelikül içerisinde bir kaç saat içinde *Actinomyces viscosus* (*A. viscosus*), *S. sanguis* gibi Gram pozitif, fakültatif bakteriler görülmeye başlar. Zamanla bakteriler sayısal ve çeşit olarak artarlar ve bir biyofilm oluştururlar. Biyofilm içerisinde başlangıçta Gram pozitif aerob flora baskın iken zamanla Gram negatif anaerob flora üstünlük kazanır.⁵⁸

Dental plak formasyonunun son aşaması sekonder kolonizasyon ve plak olgunlaşmasıdır. Sekonder olarak kolonize olan bakteriler temiz diş yüzeyi veya pelikula tutunamayan ancak biyofilmi oluşturan bakterilere tutunabilen ve patojenitesi yüksek olan *P. gingivalis*, *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *T. denticola*, *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*), *A. actinomycetemcomitans* ve *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*)'dır.^{58, 60} Bu olaya koagregasyon denilmektedir. Koagregasyon, bir bakteri tarafından üretilen protein yapıdaki adezinin bir başka bakterinin yüzeyinde bulunan reseptör ile olan karşılıklı ilişkisine dayanır. Bu işlem stereokimyasal, elektrostatik, van der Waals ve hidrofobik kuvvetler aracılığıyla gerçekleşir.⁶¹

2.2.3.Mikrobiyal Dental Plak Patojenitesi

Miller tarafından öne sürülen non-spesifik plak hipotezine göre MDP içerisinde var olan tüm bakteriler eşit oranda periodontal hastalığa neden olmakta ve hastalık

şiddeti ile MDP arasında pozitif ilişki vardır.⁶² Bu hipoteze göre plak miktarı ve plağa bağlı oluşan ürünler arttıkça periodontal hastalık gelişmektedir. Dental plak ve diştasının yoğun olarak bulunduğu bireylerde gingivitis geliştiği fakat gingivitisin her zaman periodontitise dönüşmediği gözlenmiştir. Ayrıca periodontitis teşhisi konulan bireylerde periodontitisin şiddeti de ağzın her yerinde aynı değildir, bazı bölgelerde şiddetli bir yıkım varken bazı bölgelerde ise yıkım gözlenmemektedir. Bu bulgular MDP'nin değişik patojenik potansiyellere sahip olduğunu düşündürmektedir. Bundan dolayı Walter Loesche spesifik plak hipotezini ortaya atmıştır. Spesifik plak hipotezine göre hastalığın bir takım spesifik mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğu ve hastalığın şiddetinin de bu mikroorganizmaların sahip oldukları virülans faktörlerine bağlı olduğu ileri sürülmüştür.⁶³ Bununla birlikte günümüzde periodontal hastalıkların tedavisi için yapılan çoğu işlemlerde non-spesifik plak hipotezine dayanarak dental plak ve ürünlerinin tamamını ortadan kaldırmaya ve plak birikimini azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır.⁵⁷

Dental plak primer olarak mikroorganizmalardan oluşmaktadır. Bir gram dental plak, içerisinde 10^{11} bakteri içerir.^{54, 55} Periodontal sağlık ve hastalık durumlarında MDP'nin mikroorganizma içeriğinin farklı olduğu gösterilmiştir. Periodontal olarak sağlıklı bireylerde birbirine yakın oranlarda gram pozitif ve fakültatif anaerob mikroorganizmalar ile az miktarda spiroket ve hareketli çomaklar bulunmaktadır. Hastalık durumunda ise gram negatif, zorunlu anaerob ve hareketli mikroorganizmaların oranında belirgin artış gözlenmektedir.⁶⁴⁻⁶⁶

Supragingival plağın gingivitise, subgingival plağın ise periodontitise neden olduğu belirtilmektedir.⁶⁷⁻⁶⁹ Periodontitis gelişmesinde en etkili mikroorganizmaların dental plak içerisindeki *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*,

T. forsythia, *P. intermedia* ve *Compylobacter rectus* (*C. rectus*) olduğu bildirilmektedir.⁷⁰⁻⁷²

2.3. Diştaşı

2.3.1. Diştaşı Tanımı

Diştaşı, MDP'nin minareelize olması ve kalsifiye bir depozit şekline dönüşmesiyle meydana gelmektedir.^{73, 74} Diştaşı, dişeti kenarına göre supragingival ve subgingival olmak üzere ikiye ayrılır. Supragingival diştaşı dişeti kenarının koronalinde lokalize olurken subgingival diştaşı ise dişeti kenarının apikalinde veya periodontal cep içerisinde lokalize olur.

Diştaşının yaklaşık %12'sini organik içerikler (karbonhidrat, protein, lipid parçacıkları, çeşitli cansız mikroorganizmalar) oluşturur. İnorganik komponentleri ise temelde kalsiyum, fosfat, az miktarda magnezyum ve karbonattır.⁷⁵

Subgingival ve supragingival diştaşında kalsiyum fosfatın dört değişik tipi farklı oranlarda bulunmaktadır. Bunlar;

- 1.DPCD, brushit veya dikalsiyum fosfat dihidrat, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- 2.OCP, oktokalsiyum fosfat, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_5\text{H}_2\text{O}$
- 3.WHT, magnezyum whitlockite, $(\text{Ca}, \text{Mg})_3(\text{PO}_4)_2$
- 4.HAP, hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$

HAP ve OCP supragingival diştaşında daha yoğun olarak bulunurken WHT ise subgingival diştaşında daha yoğundur.^{76, 77}

Subgingival diştaşı siyahımtırak gri renkte ve diş yüzeyine sıkı bir şekilde yapışmış iken supragingival diştaşı ise beyazımtırak sarı renktedir ve dişe gevşekçe yapışmıştır. Subgingival diştaşı daha çok dişlerin interproksimal ve lingual yüzeylerinde bulunurken, supragingival diştaşı ise büyük tükürük bezlerinin ağız içerisine açıldığı bölgelerde bulunur.⁷⁸ Friskopp ve Isacson yapmış olduğu çalışmada supragingival

diştaşının kalsifiye olmayan alanların varlığından dolayı heterojen kalsifikasyon gösterdiğini, subgingival diştaşının ise daha homojen bir kalsifiye yapıya sahip olduğunu belirtmişlerdir.⁷⁹

2.3.2.Diştaşı Oluşumu

Diştaşı; mineralize olmayan bakteriyel tabaka ile çevrili ve kalsiyum fosfat mineral tuzlarından meydana gelen kalsifiye plaktır. Dental plak, depositlerin mineralizasyonu için gerekli olan organik matriksin varlığını sağlayarak diştaşı oluşumu için ana zemini oluşturur.

İlk mineralizasyonun profilaksiyi takip eden bir kaç gün içinde başladığına dair bilgiler mevcuttur.⁶⁵ Muhlemann ve Schroeder plak içerisinde kristal formasyonunun profilaksiden sonraki 38 saat içerisinde başladığını ve tamamen kalsifiye plağın ise 12 gün içerisinde oluştuğunu belirtmişlerdir.⁸⁰ Her ne kadar plak ve kristal formasyonu kısa sürede gerçekleşse de olgun bir diştaşı oluşumu için aylar hatta yıllar gerekebilmektedir.⁸¹

Dental plağın mineralizasyon prosesi iki aşamada meydana gelmektedir. Birincisi kristal taneciklerinin çekirdeklenmesi ve oluşması, ikinci ise bu taneciklerin büyümesi ve olgunlaşmasıdır. Kalsiyum ve fosfat taneciklerinin oluşması sonucu homojen veya heterojen bir kristal yapı oluşmaktadır. Homojen kristal yapı heterojen yapıya göre daha fazla enerji ve kalsiyum-fosfat konsantrasyonuna ihtiyaç duymaktadır. Bu nedenle sadece *in vitro* ortamlarda homojen kalsifiye yapı oluşturulabilir.⁸² Heterojen kristal yapı ise biyolojik kalsifikasyon proseslerinde görülmektedir.

Supragingival diştaşı oluşumu için gerekli olan inorganik iyonların ana kaynağı tükürüktür. Diştaşı oluşumu ile ilgili ilk teoriler kalsiyum ve fosfat iyonlarındaki lokal artışların mineral çökmesine neden olduğu ve diştaşı oluşumunu başlattığı yönündedir. Kalsiyum ve fosfat iyonlarındaki artış nedenlerini açıklayan teoriler ise

şöyle sıralanabilir: Birinci teori; tükürük pH'sındaki artış kalsiyum fosfat iyonlarının çökmesine neden olur. pH yükselmesi ise karbondioksit kaybı, dental plak bakterilerinin amonyak oluşturması ya da proteinleri denatüre etmesi sonucu oluşmaktadır. İkinci teori; tükürükteki kolloidal proteinlerin kalsiyum ve fosfat iyonlarına bağlanmasıyla aşırı doymuş bir solüsyon oluşturması prensibine dayanmaktadır. Tükürükteki fizyolojik durgunluk ile beraber bu kolloidal proteinler aşırı doymuş solüsyondan dışarı çıkarlar ve aşırı doymuş solüsyondaki kalsiyum fosfat tuzlarının çökmesine neden olurlar. Üçüncü teori; diştaşının dental plaktan salgılanan fosfataz enzimi ile bakteri veya deskuamatif epitel hücrelerinin tükürükteki organik fosfatı hidrolize etmesi sonucu artan serbest fosfat iyonlarının çökmesiyle oluştuğunu desteklemektedir. Dördüncü teori ise dental plaktaki kok, filamentöz mikroorganizmalar, makrofaj, lökosit ve deskuamatif epitel hücrelerinden salgılanan esteraz enzimi sonucu oluşan serbest yağ asitlerinin kalsiyum ve magnezyum ile birleşerek kalsiyum fosfat tuzlarının oluşması esasına dayanmaktadır.⁸³ Son dönemde ileri sürülen farklı bir teori ise organik moleküllerin minerallerin birikmesi için bir şablon oluşturduğu⁸⁴ veya plak tarafından oluşturulan mineralizasyon inhibitörlerini engellediği yönündedir.^{85, 86}

İlk teorileri destekleyen ve plak içerisindeki pH artışının diştaşı oluşumu için ana etken olduğuna dair çalışmalar da mevcuttur. Kleinberg ve Jenkins %85 vakada plak içerisindeki pH'nın tükürükten daha yüksek olduğunu bulmuşlardır.⁸⁷ Driessens ve Verbeeck lokal pH artışının diştaşı oluşumu ile ilişkili olduğunu bildirmişlerdir.⁷¹

Subgingival diştaşı oluşumu da supragingival diştaşı oluşumuna benzemektedir ancak kristal oluşumu ve büyümesi için gerekli olan inorganik iyonların ana kaynağı DOS'dur. DOS artışı inflamasyon varlığında görülür ve yapısında kalsiyum, fosfat ve protein içerir.^{88,89}

Günümüzde diştaşı oluşumunda geçerli hipotez dental plağın mineralizasyonunda kalsiyum tuzlarının depozisyonu ve kristalleşmesi için gerekli fiziksel şartların bakteriler tarafından oluşturulduğudur. Diştaşı oluşum sureci dental plak içerisindeki mikroorganizmaların mevcudiyeti ile devam eder. Lipoteikoik asit ve proteinler gibi bakteriyel ve hüresel elementlerin kalsifikasyon surecinde önemli rolleri olduğu düşnlmektedir.⁹⁰ Actinomycesler, stafilokoklar ve streptokoklar üreyi parçalayarak amonyak oluştururlar ve amonyak CO₂ ile birleşerek pH'ı yükseltmektedir. pH yükselince ortamda bulunan kalsiyum ve fosfat iyonları çöker ve diştaşı kalsifikasyonu başlar.¹⁰⁻¹³

Supragingival diştaşında subgingival diştaşından farklı olarak içerisinde kok ve rod şeklinde bakterilerin yerleştiği mineralize olmayan kanal ve lakünler bulunmaktadır. Bu nedenle subgingival diştaşı supragingival diştaşına göre daha uniform bir mineralizasyon göstermektedir.³ Friskopp supragingival diştaşında bulunan non-mineralize alanları iki şekilde izah etmektedir. Birincisi; supragingival diştaşında baskın olan filamentöz bakteriler mineralizasyonu inhibe etme özelliğine sahiptir, bu da non-mineralize alanların oluşmasına neden olmaktadır. İkincisi; değişik kalsifikasyon kapasitelerine sahip olan farklı bakteri kolonileri supragingival diştaşında dağınık olarak bulunmaktadır. Kalsifikasyon dental plağın yüzeyinden başlamakta buna bağlı olarak da derin tabakalarda kalsifikasyon için yeterli madde tedarik edilememektedir.¹⁴

Plak ve diştaşı arasındaki ilişkiyi inceleyen çalışmalarda bakterilerin diştaşı oluşumu üzerindeki etkileri araştırılmıştır.^{10-12, 91} çalışmalar sonucunda bakterilerin diştaşı oluşumunda önemli rol oynadığı ortaya konmuş ancak diştaşı oluşumuna aktif mineralizasyon veya pasif mineralizasyondan hangisiyle katkı sağladığı tam olarak açıklanamamıştır.¹¹ Aktif mineralizasyon; mikroorganizmanın hücre membran yapısından veya oluşturduğu metabolitlerden dolayı kalsifikasyonun oluşmasına olanak

sağlayan bir ortamın oluşması ve mineralizasyonun görülmesidir. Pasif mineralizasyon ise hücre komponentlerinden herhangi bir tanesinin mikroorganizma canlı veya cansız olsa da mineralizasyon göstermesi şeklinde açıklanmaktadır.⁹²⁻⁹⁴

Diştaşı oluşumunda bakteriyel mineralizasyon mekanizmasını belirlemeye yönelik ilk çalışmalar *C. matruchotii* üzerinde yapılmıştır ve içerisinde bulunan fosfolipidlerin apatit oluşturduğu ortaya konmuştur.^{8,9} *S. salivarius* ve *S. sanguis*'in üre ve amonyak oluşturan arginine deaminase aktivitesiyle pH'nın yükselmesine neden oldukları tesbit edilmiştir.³ Bakteriyel mineralizasyonu açıklamaya çalışan araştırmalar kristal taneciklerinin intermikrobiyal matrikste görüldüğünü ve bakteri dış duvarlarına doğru apozisyon göstererek büyüdüğünü daha sonra da bakterilerarası matriksin mineralize olduğunu ve nihayetinde bakterilerin mineralize olmaya başladığını belirtmişlerdir.^{7, 95, 96} Dental plak bakterileri dışında diğer ekosistemlerde de bakterilerin mineralizasyona katıldıkları ve kalsiyum kristalleri oluşturdukları yönünde çalışmalar mevcuttur. Yapılan bir çalışmada mağaralardan elde edilen izolatların *in vitro* olarak aerobik koşullarda koloni içinde ve bağımsız olarak mineralizasyona katıldığı saptanmıştır.⁹⁷

2.3.3.Diştaşı Patojenitesi

Diştaşı periodontal hastalığın başlaması, ilerlemesi ve kronik seyri ile ilişkilidir.⁹⁸ Diştaşı varlığı oral hijyen uygulamalarını zorlaştırmakta ve bu durum plak oluşumu ve formasyonunu hızlandırarak periodontal hastalığa neden olmaktadır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda diştaşı ile periodontal hastalık arasında güçlü bir korelasyon olduğu bulunmuştur.^{4, 5}

Diştaşı dokuya zarar verebilen ve toksik ürünleri absorbe edebilen poröz bir yapıya sahiptir.⁶ Bu yapısı periopatojenlerin virülans faktörlerinin ekspresyonu için uygun bir ortam oluşturmaktadır. Ayrıca diştaşı varlığı oral hijyen uygulamalarını

güçleştirerek plak retansiyon faktörü olarak davranmakta ve patojenik plağın büyümesine neden olmaktadır.⁹⁹

Orta ve şiddetli periodontitisli hastalardan alınan supragingival diştaşlarında canlı aerobik ve anaerobik bakteriler bulunmuştur.³ Subgingival diştaşında ise *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. denticola* gibi periopatojen mikroorganizmalar belirlenmiştir.¹⁶ *P. gingivalis*'in ürettiği kompleks lipidler subgingival diştaşından elde edilen lipid özlerinde bulunmuştur.^{100, 101} Sidaway subgingival ve supragingival diştaşlarından elde ettiği örneklerde bakteri varlığını tesbit etmiştir.¹⁰² Friskopp subgingival diştaşı yüzeyinin metabolik olarak aktif kok, rod ve filamentöz bakteriler ile supragingival diştaşı yüzeyinin ise filamentöz bakteriler ile kaplı olduğunu belirtmiştir.² Clerehugh ve Lennon periodontitisli bireylerde yapmış oldukları çalışmada subgingival diştaşı varlığı ile ataşman kaybı arasında çok güçlü bir ilişki olduğunu bildirmişlerdir.¹⁰³ Bir diğer çalışmada Christersson ve ark. subgingival diştaşı formasyonunu kronik enflamatuvar periodontal hastalık oluşumu ile ilişkilendirmişlerdir.¹⁰⁴

Diştaşının formasyonunun önlenmesi ve uzaklaştırılması periodontal sağlık açısından önemlidir. Çünkü diştaşı daima mineralize olmayan, canlı ve metabolik olarak aktif bir mikroorganizma tabakası ile kaplıdır.

2.3.4. Diştaşı ve Bakteriler

Dental plağın mineralizasyonunda kalsiyum iyonlarının depozisyonu ve kristalleşme için gerekli fiziksel şartların bakteriler tarafından oluşturulduğu düşünülmektedir. Friskopp ve Hammarstrom kalsifikasyonun filamentöz bakteriler arasında başladığını ve filamentöz bakterilerin kalsifikasyon için uygun bir intermikrobiyal alan oluşturarak diştaşı oluşumunu desteklediğini belirtmişlerdir.² Bu durum bize filamentöz bakteriden zengin olan supragingival diştaşı oluşumunun neden

hızlı olduğunu, bakterinin daha az olduğu subgingival diştaşı oluşumunun neden yavaş olduğunu açıklayabilir.² Clerehugh ve ark. ataşman kaybı ve yoğun subgingival diştaşı olan bireylerde yapmış oldukları çalışmada hastalıklı sahalarda yüksek miktarda *P. gingivalis* varlığı saptamışlardır.¹⁰⁵ Diğer bir çalışmada subgingival diştaşı olan bireylerde motil rod, toplam motil mikroorganizmalar ve siyah pigmente anaerobik rodların subgingival diştaşı olmayan bireylere göre daha fazla olduğu belirtilmiştir.¹⁰⁶ Howell¹⁰⁷ ve Sidaway¹⁰² ise olgun subgingival diştaşından anaerobik rodları izole etmişlerdir.

Subgingival diştaşı bakterilerin adezyonu için ideal bir ortam sağladığı ve yapısında bulunan lakün ve kanallar içerisinde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* bulunduğu belirtilmiştir.¹⁶ Demir ve ark. hastalardan elde ettikleri diştaşı örneklerini inceledikleri çalışmada *S. mutans*, *S. sanguis* ve *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) ve diğer bazı streptokok türlerinin kalsifikasyon yeteneğine sahip olduğunu tesbit etmişlerdir.¹⁰⁸ Clayton ve Fox insan ve hayvanlardan elde ettikleri diştaşları içerisinde bakteriler dışında kandida varlığını da göstermişlerdir.¹⁰⁹

Diştaşı içerisinde bulunan bakteriler birbirleri ile ilişki içerisinde. Gibbons siyah pigmente anaerobik rodların dental plağa adezyon ve kolonizasyonunun actinomyces ve streptokokların varlığında arttığı belirtmiştir.¹¹⁰ Socransky ve ark. ise anaerobik rodlar ile actinomyces ve streptokoklar arasında negatif bir ilişki olduğunu belirtmişlerdir.¹¹¹

2.3.4.1. Streptokoklar

Streptokoklar ağız florasının büyük kısmını oluşturmaktadırlar. Mikrofloranın supragingival plakta %28'ini, dişeti oluğunda %29'unu ve tükürükte %46'sını kapsamaktadırlar.¹¹² Streptokoklar Gram pozitif olup genellikle hareketsizdirler ve

endosporları yoktur.¹¹³ Streptokokların çoğu kanlı agarda hemoliz yaparlar, bir çok suş alfa, beta ve gamma olmak üzere üç tip hemolizi de gösterir.¹¹²

Streptokoklar hareketsiz yapılara tutunabilme özelliğine sahiptirler.^{114, 115} Streptokoklar fizikokimyasal etkileşim kuvvetleri ile diş yüzeyine ilk adezyonu gerçekleştirerek biyofilmin oluşması için ilk basamak görevini üstlenirler.¹¹⁶ Ritz ve ark. plak oluşumunda dominant öncü bakterilerin streptokoklar olduğunu sonrasında bunlara aktinomiçeslerin eklendiğini ve plağın yüksek miktarda gram negatif anaerob mikroorganizmaların da adezyonuyla olgunlaştığını belirtmişlerdir.¹¹⁷

Çalışmada kullanılan streptokok türleri;

2.3.4.1.1. *Streptococcus mutans*

Streptococcus mutans (*S. mutans*) 1924 yılında Clarke tarafından çürük dişlerden izole edilmiştir.¹¹⁸ *S. mutans* hareketsiz, katalaz negatif ve gram pozitif bir koktur. Kanlı agarda, anerobik şartlar altında beyaz veya gri renkte, oldukça sert ve yapışkan koloniler oluşturur. Laboratuvar ortamında optimum üreme ısı 37°C'dir.¹¹⁹

S. mutans, sukrozdan glikoziltransferaz enzim sayesinde suda çözünebilen ve çözünemeyen ekstrasellüler polisakkarit üretir. Bu polisakkaritlerden glukon ve mutan diş yüzeyine bağlanır ve dental biyofilm oluşumuna katkıda bulunur. Bu polisakkaritler *S. mutans*'ın diş mine yüzeyine bağlanmasında ve ağızda sert doku yüzeylerine kolonizasyonunda çok büyük öneme sahiptirler. *S. mutans* ayrıca intrasellüler polisakkarit sentezi yapar ve karbonhidrat rezervi gibi davranır. Bu durum karbonhidrat alımı olmadığında mevcut rezervin kullanılarak asit oluşumuna neden olması açısından önemlidir.¹¹⁹⁻¹²¹

2.3.4.1.2. *Streptococcus sanguis*

S. sanguis, gerçek yaşam alanı dental plak olan hidrofobik, gram pozitif ve α hemolitik streptokoktur.¹²²

S. sanguis direkt olarak diş yüzeyine bağlanır ve diğer bakterilerin kolonizasyonuna olanak sağlar. Bu durum dental plak oluşumuna neden olarak periodontal problemlere ve diş çürüklerine neden olur.^{122, 123}

Dental plak içerisinde *S. mutans* ve *S. sanguis* arasındaki etkileşim besin varlığı ve pH gibi çevresel faktörlerden etkilenmektedir. *S. sanguis* tarafından üretilen hidrojen peroksit *S. mutans*'ın üremesini azaltmaktadır.¹²⁴

2.3.4.1.3. *Streptococcus gordonii*

S. gordonii insan orofaringeal mukozası ile diş yüzeylerinin normal florasında bulunan ve diş yüzeylerinde biyofilm tabakasının oluşmasına öncülük eden bir mikroorganizmadır.^{125, 126} *S. gordonii* ayrıca kalp kapakcıklarını tutarak enfektif endokarditin oluşmasına neden olan bakterilerden biridir.^{127, 128}

Bir çok bakteri türü dental biyofilmin oluşumuna katılmaktadır. *S. gordonii* biyofilm oluşumunda erken kolonize olanlardan iken *S. mutans* ve *Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*) ise geç kolonize olan streptokoklardır.¹²⁹ *S. gordonii* diş yüzeyindeki tükürüğün oluşturduğu pelikula siyalik asit aracılığıyla veya tükürüğün yapısındaki α amilaz aracılığıyla bağlanmaktadır.^{130, 131}

S. gordonii, sukrozdan ekstrasellüler polisakkarit olan glukani ve fruktanı üreten glukoziltransferaz enzimi ile fruktoziltransferaz enziminin oluşumunu sağlamaktadır. Bu ekstrasellüler polisakkaritler plak için kısa dönem rezervuar görevinin yanında diş yüzeyine bakteri adezyonunda da görev almaktadırlar.^{132, 133}

2.3.4.2. *Candida albicans*

Candida albicans (*C. albicans*) hem sağlıklı hemde sistemik olarak hastalıklı bireylerin oral florasında bulunan ve bir çok hastalığa neden olan fırsatçı bir mikroorganizmadır.¹³⁴

C. albicans diğer mantarlara kıyasla ağız mukozasına en iyi tutunandır. Statherin, *C. albicans*'ın diş sert dokularına ve yanak mukozasına bağlanmasını sağlar. Statherin bloke edildiğinde diş yüzeyine bağlanma %93, yanak mukozasına bağlanma ise %43 oranında azalır.¹³⁵⁻¹³⁷ *C. albicans*'ın canlı ve cansız yüzeyler üzerinde oluşturduğu biyofilm tabakası; maya hücreleri, yalancı-gerçek hifli hücreler gibi birçok hücre tipinin karışımından ve protein-polisakkarit bileşiminden oluşan ekstrasellüler matriksden oluşur. Biofilm oluşumuna katılan bu kandida türleri antimikrobiyal ajanlara karşı dirençlidir.^{138, 139}

C. albicans'ın diş sert dokularına bağlanarak biyofilm tabakası oluşturması periodontal hastalık açısından incelenmiştir. Slots ve ark. periodontitisli bireylerde tedaviye rağmen yıkımın devam etmesine neden olan mikrobiyal ajanların tesbiti için yaptıkları çalışmada 500 periodontitisli bireyden 84 tanesinin subgingival florasında mantar tesbit etmişlerdir. Tesbit edilen mantarın %83.3'ünün *C. albicans* olduğunu saptamışlardır.¹⁴⁰

Reynauld ve ark. 126 hastanın 14'ünde periodontal cep bölgesinde *C. albicans* varlığı saptamışlardır.¹⁴¹ Jarvensivu ve ark. kemik ve ataşman kaybı bulunan 25 bireyinden 4 tanesinin dişeti dokusunda *C. albicans* varlığı saptamışlardır.¹⁴²

2.3.4.3. *Corynebacterium matruchotii*:

C. matruchotii, diştışı formasyonu ve intrasellüler mineralizasyon ile ilişkilendirilen ve insan oral kavitesinde bulunan bir mikroorganizmadır.^{143, 144} *C. matruchotii* mısır koçanını andıran ve birbiriyle ilişkili spesifik morfolojik ünitelerden oluşmaktadır.¹⁴⁵

Bakteriyel mineralizasyon ile ilgili çalışma *C. matruchotii* üzerinde yapılmış ve hücre membranında bulunan fosfolipid sayesinde apatit oluşturduğu belirlenmiştir.^{8,9} Ennever ve ark. yapmış oldukları çalışmada 20 günlük hücre kültürlerinde apatit

kristallerinin hücre içerisinde çökelmiş olduğunu göstermişlerdir.¹⁴⁶ Takazoe ve Nakamura *C. matruchotii* yapısındaki metakromatik granülleri ve intrasellüler kalsifikasyonu tanımlamışlar ve bu granüllerin başlıca polimetafosfat olduğunu belirtmişlerdir.¹⁴⁴

2.3.4.4.Periopatojen Bakteriler

Ağız boşluğu vücudun antijenlere en açık bölgelerinden biridir. Ağız boşluğunda 500'den fazla, periodontal ceplerde ise 300'den fazla bakteri türü bulunmaktadır. Bakteri türünün bu kadar fazla olmasına rağmen bunların sadece küçük bir kısmı periodontal hastalıkta rol oynadığı düşünülmektedir.¹⁴⁷ *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *P. intermedia*, *F. nucleatum* ve *T. denticola*'nın periodontitisin gelişmesinde en etkili olan bakteriler olduğu bildirilmiştir.^{18, 148-150}

Çalışmada kullanılan periopatojen bakteriler;

2.3.4.4.1.Aggregatibacter actinomycetemcomitans

A. actinomycetemcomitans ilk olarak 1912 yılında Alman mikrobiyolog Klinger tarafından belirtilmiştir. Daha önceden *Actinobacillus actinomycetemcomitans* olarak bilinen bakteri günümüzde *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* olarak tanımlanmıştır.¹⁵¹ *A. actinomycetemcomitans* gram negatif basil morfolojisinde kapnofilik, fakültatif anaerob bir bakteridir.⁶³

A. actinomycetemcomitans için birincil yerleşim yeri insan ve hayvanların subgingival bölgeleri olarak gösterilmiştir. İnsan yerleşimi olarak normal popülasyonun %36'sının diş plağı, periodontal cep ve yanak mukozasında bulunur.^{152, 153}

A. actinomycetemcomitans'ın virülans faktörleri; fimbria, lökotoxin, endotoksin, kollejenaz, fibroblast inhibe eden faktör ve tripsin benzeri proteolitik enzimlerdir.⁶³

A. actinomycetemcomitans'ın hızlı periodontal yıkım izlenen kronik periodontitis ve agresif periodontitis hastalarının plak örneklerinde yüksek oranda kolonize olduğu mikrobiyolojik çalışmalarla gösterilmiştir.^{39, 154, 155} Ayrıca endokardit, troid bezi apseleri ve beyin apsisi gibi oral olmayan enfeksiyonlarda da etkili olduğu rapor edilmiştir.^{156,}

157

2.3.4.4.2. *Porphyromonas gingivalis*

P. gingivalis gram negatif, zorunlu anerob ve kokobasil morfolojiye sahiptir ve kanlı agarda kahverenginden siyaha giden renkte koloni oluşturur.¹⁵⁰

P. gingivalis' in ana yerleşim yeri subgingival sulkustur¹⁵⁸ ve fimA ve rgp genlerine sahiptir ki bu genler periodontitis oluşumunda önemli rol oynarlar.¹⁵⁹ İnsan ve hayvanlarda yapılan çalışmalar sonucu *P. gingivalis* agresif periodontal patojen olarak kabul edilmektedir.¹⁵⁰

P. gingivalis, konağın makromoleküllerini ve hücrelerini etkileyen çok sayıda proteolitik enzim salgılama özelliğine sahiptir.¹⁶⁰ Bunlardan bir tanesi virülansında önemli bir rol oynayan gingipain adı verilen tripsin-benzeri proteazdır. Bu proteaz bireyin normal fizyolojisinde vardır ve *P. gingivalis*'e bağlı gelişen doku yıkımında konak proteinlerini denatürasyonunu yaparak immün yanıtı modifiye etmektedir.¹⁶¹

P. gingivalis yıkımla karakterize periodontal hastalıkta oldukça yüksek oranda belirlenmiştir.¹⁵⁰ Ayrıca peritonsiller apse¹⁶² ve pulmoner enfeksiyonlarda¹⁶³ da varlığı gösterilmiştir.

2.3.4.4.3. *Fusobacterium nucleatum*

F. nucleatum Bacteroidaceae familyasında yer alan fırsatçı bir mikroorganizmadır.¹⁶⁴ Anaerob, hareketsiz, spor oluşturmeyen, düz veya hafif kıvrık, bazen de fusiform görünümünde basilllerdir.¹⁶⁵ *F. nucleatum*, sinüzit, akciğer apseleri, osteomyelit ve periodontal hastalıklardan sorumludur. *F. nucleatum* ağız içerisinde

gram pozitif koklar ile corn-cob yapısını oluşturur ve bakteriler arasında köprü görevi görür.¹⁶⁶

F. nucleatum anaerobik olmasına rağmen %6 oksijen varlığında canlılığını devam ettirebilmektedir. Ana metabolit ürünü glukoz ve peptonu fermente etmesi sonucu oluşan bütirik asittir.¹⁶⁵

F. nucleatum periodontal yıkımın görüldüğü bölgelerde sık rastlanan bir mikroorganizmadır.¹⁶⁷ Yapılan bir çok çalışmada *F. nucleatum*'un periodontitisli bireylerde en sık ve en fazla rastlanan bakteri olduğu belirtilmiştir.^{117, 168}



3.MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

Çalışma esnasında kullanılan alet ve cihazlar:

Hassas Terazî(METTLER Toledo Al 204): Kimyasalların tartımı amacıyla kullanıldı.

Steril Kabin(ESCO Clas II Biohazard): Steril ortamın sağlanması amacıyla kullanıldı.

pH Metre(INOLAB WTW Series pH 730): Besiyeri ve çözeltilerin pH'larının ayarlanması amacıyla kullanıldı.

Buz Dolabı(BEKO-BK 9551-NF): Kimyasalların ve örneklerin saklanması amacıyla kullanıldı.

Derin Dondurucu(NUAIRE -86°C): İzolatların stok kültürlerinin saklanması amacıyla kullanıldı.

Soğutmalı, Çalkalamalı Etüv(ZHICHENG ZHWY-200B): Mikroorganizmaların üretilmesi amacıyla kullanıldı.

Etüv(WiseCube): Mikroorganizmaların üretilmesi amacıyla kullanıldı.

Otoklav(HIRAYAMA Z-AT-HV-50): Besiyeri ve çözeltilerin sterilizasyonunda kullanıldı.

Saf Su Cihazı(GFL 2004): Gereken saf su ihtiyacını sağlamak için kullanıldı.

Anaerobik jar ve kit sistemi (Oxoid AN 0035A): Gereken anaerobik ortamı sağlamak için kullanıldı.

Spektrofotometre (T80+ UV/VIS Shimadzu Spectrometer): Mikroorganizmaların solusyon içerisinde oluşturduğu kalsifikasyon derecesini tesbit etmek için kullanıldı.

3.1.2 Kullanılan Standart Bakteri Suşları ve Besiyerleri

Çalışmada kullanılan mikroorganizma suşlarının bir kısmı uluslararası kültür koleksiyonu olan ATCC (The American Type Culture Collection-Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A)'den ve bir kısmı da Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edildi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan her bir bakteri suşu ve standart besiyeri

Bakteri suşları	Kullanılan Standart Besiyeri	Zenginleştiriciler (Lt ⁻¹)
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ¹ <i>Fusobacterium nucleatum</i> ¹	TSBY (Trypticase Soy Broth with Yeast extract)	50 ml/L koyun kanı 5 mg/L hemin
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ¹	TSBY	0,5 mg/L menadione
<i>Corynebacterium matruchotii</i> ¹	BHI (Brain Heart Infusion)	50 ml/L koyun kanı 5 mg/L hemin 2 g/L sodyum format 4.1g/L disodyum fumarat 10 g/L maya ekstraktı
<i>Streptococcus mutans</i> ² <i>Streptococcus sanguis</i> ² <i>Streptococcus gordonii</i> ²	TSBY	50 ml/L koyun kanı 5 mg/L hemin
<i>Candida albicans</i> ¹	SDA	

¹: ATCC (The American Type Culture Collection-Georgetown University, Bacteria Department, Washington, U.S.A)'den temin edilen bakteri suşları

²: Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edilen bakteri suşları

3.1.3. Çalışmada Kullanılan Besiyerlerinin ve Tampon Sisteminin Hazırlanışı

Besiyeri hazırlanması; kullanılan cam erlenin hacmi hazırlanması düşünülen besiyeri hacminin iki katı olacak şekilde seçimi yapıldı. Daha sonra besiyerinin hazırlanması için seçilen cam erlenler iyi bir şekilde temizlenip kurulandı. 0.0001g duyarlılıktaki terazi kullanılarak herbir madde tartıldı ve cam erlen içerisine konuldu. Steril su ilave edildi ve homojen bir görüntü elde edilene kadar karıştırıldı. Bu şekilde hazırlanan besiyeri zaman kaybetmeden otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi. Bu işlem tamamlandıktan sonra besiyeri soğumaya bırakıldı. 45-50°C’de el yakmayacak şekilde soğutulan besiyeri steril kabin içerisinde petri kaplarına yaklaşık 20 ml olacak şekilde paylaştırıldı.

Trypticase Soy Broth with Yeast extract(TSBY): 250 ml besiyeri için; 7,5 g trypticase soy broth ve 0,75 g yeast extract bileşimi steril su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi.

Brain Heart Infusion(BHI): 250 ml besiyeri için 13 g brain heart infusion agar, 0,5 g sodyum format, 1,025 g disodyum fumarat ve 2,5 g yeast extract steril su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi.

Sabouraud-2 % Dextrose Agar(SDA): 250 ml besiyeri için; 2,5 g special peptone, 5 g glukoz, 4 g agar steril su içerisine ilave edildi. Besiyeri otoklavda 121°C’de 20 dk steril edildi. 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

B-4 besiyeri¹⁶⁹: 0,25 g kalsiyum asetat, 0,4 g maya özütü, 1 g glukoz ve 1,8 g agar karışımı 100 ml saf su içerisine ilave edildi. pH 7.2’ ye ayarlandı ve besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C’ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.

B-2 besiyeri: 2 g kazein, 0,5 g glukoz, 6 g tris, 0,5 g maya özütü, 0,75 g kalsiyum asetat ve 7,5 g agar karışımı 500 ml saf su içerisine ilave edildi. pH 7.4'e ayarlandı ve besiyeri otoklavda steril edildi. 45-50°C'ye kadar soğutulduktan sonra steril petrilere dökülerek katılaşmaya bırakıldı.⁹⁷

Sıvı besiyeri: Sıvı besiyeri B-2 besiyerine agarın katılmaması sonucu elde edildi. Besiyeri hazırlandıktan sonra otoklavda steril edildi ve plastik erlene aktarıldı.

Modifiye besiyeri: Standart besiyerlerinin 3/4' lük kısmına %0,15-%0,25 oranında kalsiyum asetat katılarak oluşturuldu.

Mineral Salt BasalUygulama Tamponu(MSB): 1 litre saf su içerisine 0,75 g dipotasyum fosfat (K_2HPO_4), 0,2 g monopotasyum fosfat (KH_2PO_4) ve 0,09 g magnezyum sülfat ($MgSO_4$) ilave edilmesiyle oluşturuldu. Bu içeriğin pH'sı 7.0 olarak ayarlandı ve 0.22 µm'lik filtreler aracılığıyla steril edildi.⁹³

3.2. Metot

3.2.1.Mikroorganizmaların Temini, Canlandırılması ve İnkübasyonu

P. gingivalis, *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *C. matruchotii* ve *C. albicans* suşları ticari olarak uluslararası kültür koleksiyonu olan ATCC' den sağlandı. *S. sanguis*, *S. mutans* ve *S. gordonii* ise Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Moleküler Biyoloji Laboratuvarından temin edildi (Tablo 3.2.).

P. gingivalis, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *A. actinomycetemcomitans* ve *F. nucleatum* için TSBY besiyeri hazırlandı. *C. matruchotii* için BHI ve *C. albicans* için ise SDA besiyerleri hazırlandı (Tablo 3.1.).

S. mutans, *S. sanguis*, *S. gordonii*, *A. actinomycetemcomitans* ve *F. nucleatum* için TSBY besiyerine zenginleştirici olarak 50 ml/L koyun kanı ve 5 mg/L hemin ilave edildi. *P. gingivalis* için zenginleştirici olarak 0,5 mg/L menadione kullanıldı.

C. matruchotii için BHI besiyerine zenginleştirici olarak 50 ml/L koyun kanı, 5 mg/L hemin, 2 g/L sodyum format, 4.1 g/L disodyum fumarat ve 10 g/L maya ekstratı kullanıldı.

Besiyerleri günlük ve taze olarak hazırlandı ve ekim işlemi yapılınca kadar oda ısısında muhafaza edildi. Anaerob ortamın sağlanması amacıyla anaerobik jar sistemi kullanıldı (Şekil 3.1.). Jar içerisine anaerob ortamı sağlamak için sodyum bikarbonat ve sodyum borohidrat karışımı içeren özel bir paket yerleştirildi (Oxoid Anaero Gen3.5L AN0035A). Paketin ağzı anaerob kavanoz içinde açıldı ve içerisine birkaç ml su ilave edildi ve kapak kapatıldı. Paket içerisindeki kimyasal reaksiyon sonucu hidrojen ve karbondioksit gazları oluştu. Kavanozun kapağında bulunan palladium katalist peletler açığa çıkan hidrojen ile kavanoz içerisinde var olan oksijenin birleşerek su oluşturmasını sağladı. Böylece oksijen ortamdan su olarak uzaklaştırıldı.



Şekil 3.1. Anaerobik jar ve kit sistemi (Oxoid AN 0035A)

ATCC'den ticari olarak temin edilen liyofilize (dondurulmuş-kurutulmuş) bakteri suşları üzerine steril serum fizyolojik eklenerek süspanse edildi. Steril pipet kullanılarak süspanse haldeki bakteri suşu besiyerine aktarıldı. Anaerobik şartlar altında 37°C 48 saat

etüvde inkübasyon işlemi yapıldı. İnkübasyon sonrası besiyerinde oluşan koloniler incelendi. Gelişen kolonilerden bir öze dolusu kültür alındı. Besiyerini içeren petri kabı sol elin ayası içerisine yerleştirildi ve sol elin baş ve işaret parmağı aracılığıyla petrinin kapağı açıldı. Uç kısmında bakteri örneği olan öze, açılan bu aralıktan yerleştirilerek besiyerine temas ettirildi ve birkaç mm çapında yayma işlemi yapıldı. Daha sonra bu öze aracılığıyla yayılma alanından başlayarak çizgi ekimine geçildi. Çizgi ekimi birbirini 90 derece açıyla kesen bölgeler oluşturacak şekilde yapıldı. Ekim yapılmış petri kabı anaerobik şartlar altında etüvde 37°C'de 48 saat inkübe edildi.



Şekil 3.2.Etüv(WiseCube)

Bu işlemler sırasında hiçbir şekilde incelenen örneğe ve aktarma yapılan steril besiyerine sterilize edilmemiş öze daldırılmadı. Aktarma işlemi tamamlandıktan sonra, öze alevde tutularak steril edildi. Tüm işlemler steril kabin içerisinde aseptik şartlar altında yapıldı.

Anaerob ortam *C. albicans* hariç tüm mikroorganizmaların canlandırılması ve inkübasyonu için sağlandı. *C. albicans* için yapılan işlemler normal aerob ortam olan laboratuvar ortamında yapıldı.

Canlandırma ve gelişmesi sağlanan bakteriler mineralizasyon denemeleri yapılncaya kadar %15-18 gliserol içeren ortamda -78 °C de muhafaza edildi.

Tablo 3.2. Mikroorganizma örneklerinin ATCC ve aksesyon kodları

No:	Bakterinin adı	Kodu
1	<i>Porphyromonas gingivalis</i>	ATCC 33277
2	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	ATCC 33387
3	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586
4	<i>Streptococcus sangius</i>	KC628751
5	<i>Streptococcus mutans</i>	KC505240
6	<i>Streptococcus gordonii</i>	KC628750
7	<i>Corynebacterium matruchotii</i>	ATCC 14266
8	<i>Candida albicans</i>	ATCC 10231

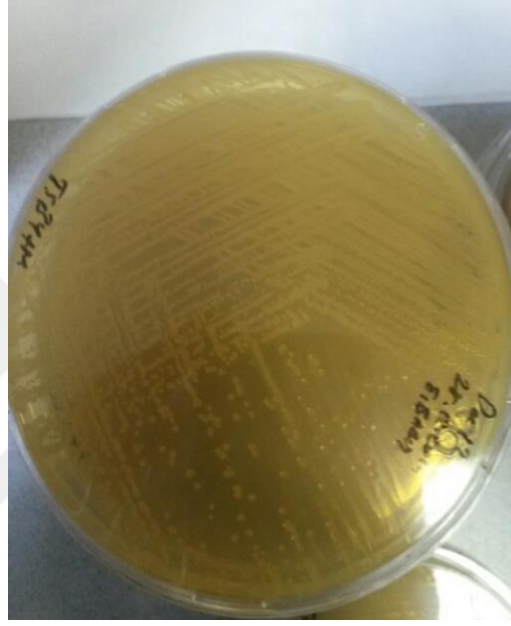
3.2.2. Mineralizasyon Denemelerinin Yapılması

Canlandırılıp inkübasyonu yapılan her bir mikroorganizmanın katı ve sıvı besiyerlerine ekimi ile mineral salt basal tamponu içerisine uygulaması yapıldı.

3.2.3. Katı Besiyerine Ekim

Hazırlanan mikroorganizmaların her biri B-4, B-2 ve standart besiyerlerinin modifiye edilmesi ile oluşan katı besiyerlerine ekimi yapıldı. Modifiye besiyeri standart besiyerlerinin 3/4' lük kısmına %0,15-%0,25 oranında kalsiyum asetat katılarak oluşturuldu. Besiyerlerinde saf kültür olarak geliştirilen mikroorganizmalar steril öze

ucu ile alınarak katı besiyerine ekimleri yapıldı. Bu işlem her üç katı besiyeri için tekrarlandı. Çizgi ekim yapıldıktan sonra anaerobik ortamda 37°C de inkübe edildi. İnkübasyonun 3., 5., 7., 14., 28. ve 40. günlerinde petri plaklarında kristal oluşturanlar ışık mikroskobu (LM) altında tesbit edildi. Tüm işlemler steril kabin içerisinde aseptik şartlar altında yapıldı. *C. albicans* için yapılan işlemler normal aerob ortam olan laboratuvar ortamında yapıldı.



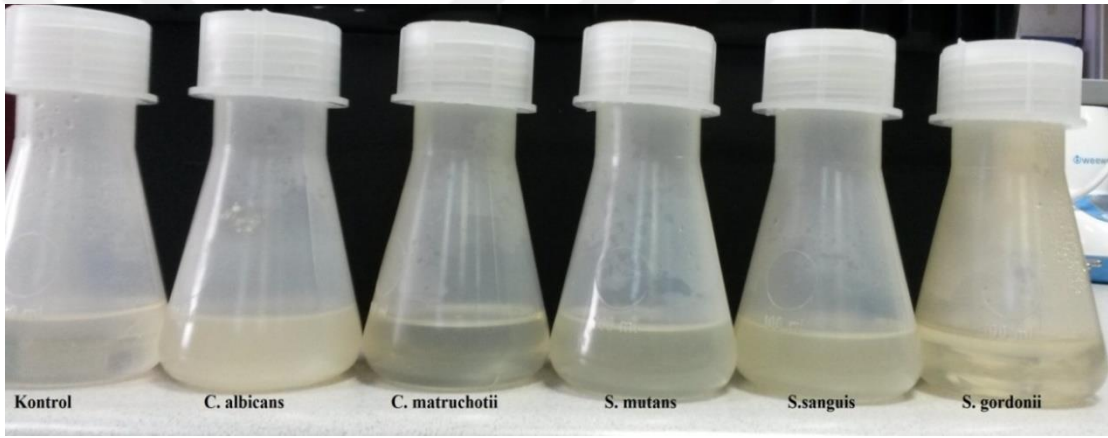
Şekil 3.3. Katı besiyerine ekim yapılmış mikroorganizmaların görünümü



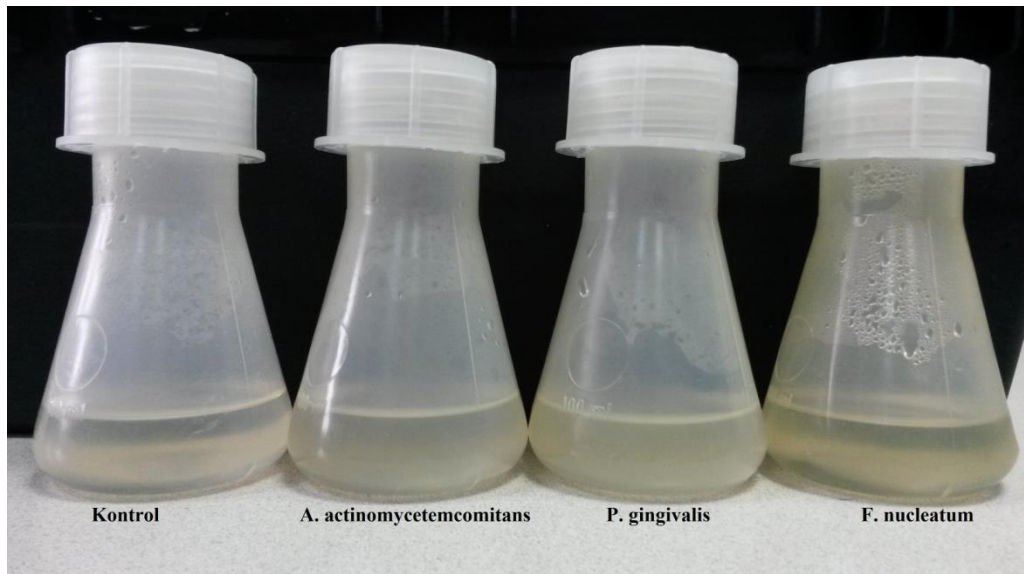
Şekil 3.4. Steril Kabin (ESCO Clas II Biohazard)

3.2.4. Sıvı Besiyerine Ekim

Besiyerleri içerisinde steril öze ucu ile mikroorganizmanın çoğaldığı koloniye temas ettirildi ve sürerek bir miktar örnek alındı. Sol ele ekimin yapılacağı besiyeriyi içeren erlen alındı ve sağ elin serçe parmağı ile erlenin ağzındaki kapak açıldı. Öze ile alınan örnek erlen içerisindeki besiyerine bırakıldı. İnkübasyonun 10., 20. ve 40. günlerinde sıvı besiyerinden steril pipetler aracılığıyla alınan örnekler lam üzerine yayıldı ve ışık mikroskobu altında incelendi. Bu işlem kristal tanecikleri görülene kadar devam edildi. Tüm işlemler steril kabin içerisinde aseptik şartlar altında yapıldı.



Şekil 3.5a. Sıvı besiyerine ekimi yapılmış mikroorganizmaların görünümü



Şekil 3.5b. Sıvı besiyerine ekim yapılmış periopatojenlerin görünümü

3.2.5. Mineral Salt Basal Uygulama Tamponu

Hazırlanan MSB içeriğinden 9 ml alındı ve içerisinde işlem yapılacak mikroorganizma McFarland Standard I (Şekil 3.6.) referans alınarak ilave edildi ve süspansiyon oluşturuldu. Hazırlanan süspansiyona hacim 10 ml olacak şekilde tekrar MSB içeriği ilave edildi.

Hazırlanan içeriğe stok solusyonundan otomatik pipetler aracılığıyla damla damla 140 g/l CaCl_2 (kalsiyum klorür) toplam hacim 12 ml olana kadar ilave edildi. Damla damla ilave esnasında çökelme olup olmadığı gözlemlendi ve kesin sonuçlar için 24 saat beklendi. Tüm işlemler aseptik şartlar altında ve steril kabin içerisinde yapıldı.

Kontrol grubu oluşturmak amacıyla 10 ml MSB içeriğine herhangi bir mikroorganizma ilave etmeden 2 ml 140 g/l CaCl_2 ilave edildi.



Şekil 3.6. McFarland Standartları

MSB içerisinde oluşan kalsifikasyonu kişisel gözlemden arındırıp sayısal değerler elde etmek için spektrofotometre kullanıldı. Spektrofotometrede 540 nanometre (nm) dalga boyunda % transmitans alındı. Transmitans olarak çözeltiye giren ışığın yüzde kaçının çözeltiden çıktığı gösterildi. Kontrol grubunu kör kabul ederek tüm solusyonlardaki bulanıklık derecesini yani kalsifikasyon miktarları değerlendirildi.

Kalsifikasyon miktarı solusyon içerisindeki partikül miktarı ile orantılı olduğundan, solüsyon içerisinde ne kadar partikül var ise içerisinde geçen ışık miktarı o kadar az olacağından kişisel gözlem hatasını ortadan kaldırıldı.



4.BULGULAR

4.1. Katı Besiyerine Ekim Bulguları

Katı besiyerine ekim bulguları Tablo 4.1’de gösterilmiştir.

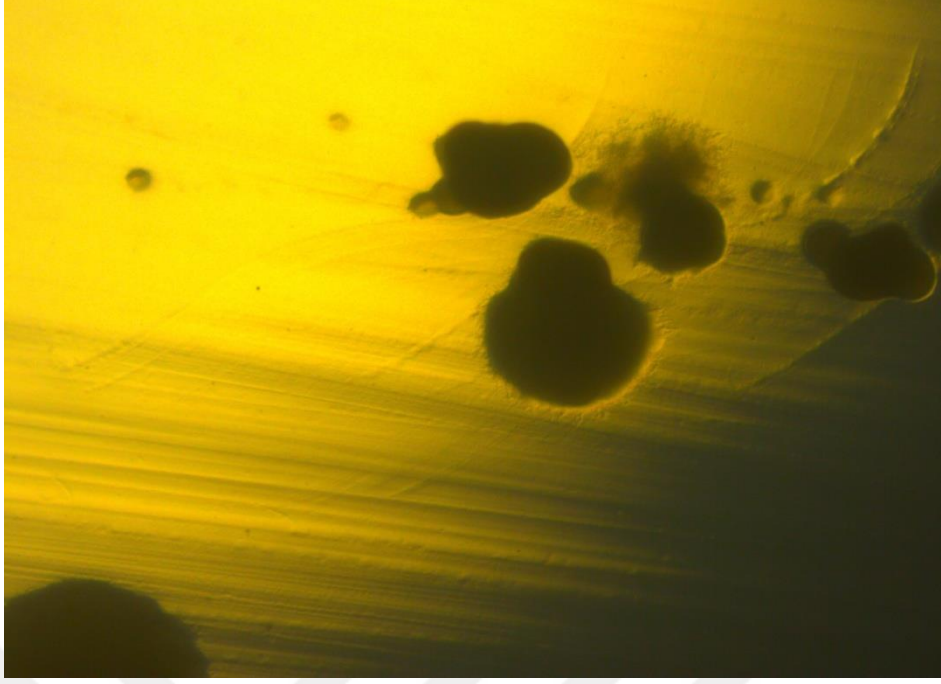
Tablo 4.1. Katı besiyerine ekim bulguları

No:	Bakterinin adı	B-2 besiyeri	B-4 besiyeri	Modifiye besiyeri
1	<i>P. gingivalis</i>	-	-	*
2	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-	-	*
3	<i>F. nucleatum</i>	-	-	*
4	<i>S. sangius</i>	+	-	*
5	<i>S. mutans</i>	+	-	*
6	<i>S. gordonii</i>	+	-	*
7	<i>C. matruchotii</i>	-	-	*
8	<i>C. albicans</i>	+	+	*

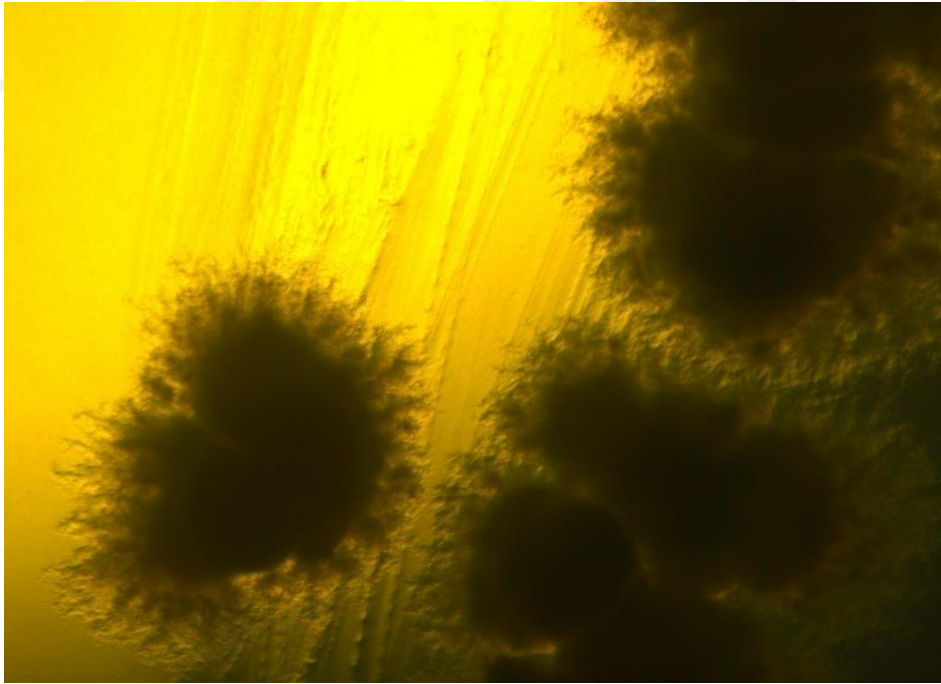
+ : mineralizasyon gözlemlendi
- : mineralizasyon gözlenmedi
* : gözlem yapılamadı.

B-2 ve B-4 besiyerlerine ekim işlemi yapıldıktan sonraki 3., 5., 7., 14., 28. ve 40. günlerinde yapılan kontrollerde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *C. matruchotii*’nin (Şekil 4.1. ve Şekil 4.2.) kristal oluşturmadığı, *S. mutans* (Şekil 4.3.), *S. gordonii* (Şekil 4.4.), *S. sanguis*’in (Şekil 4.5.) sadece B-2 besiyerinde, *C. albicans*’ın (Şekil 4.6 ve Şekil 4.7.) ise hem B-2 hem de B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi.

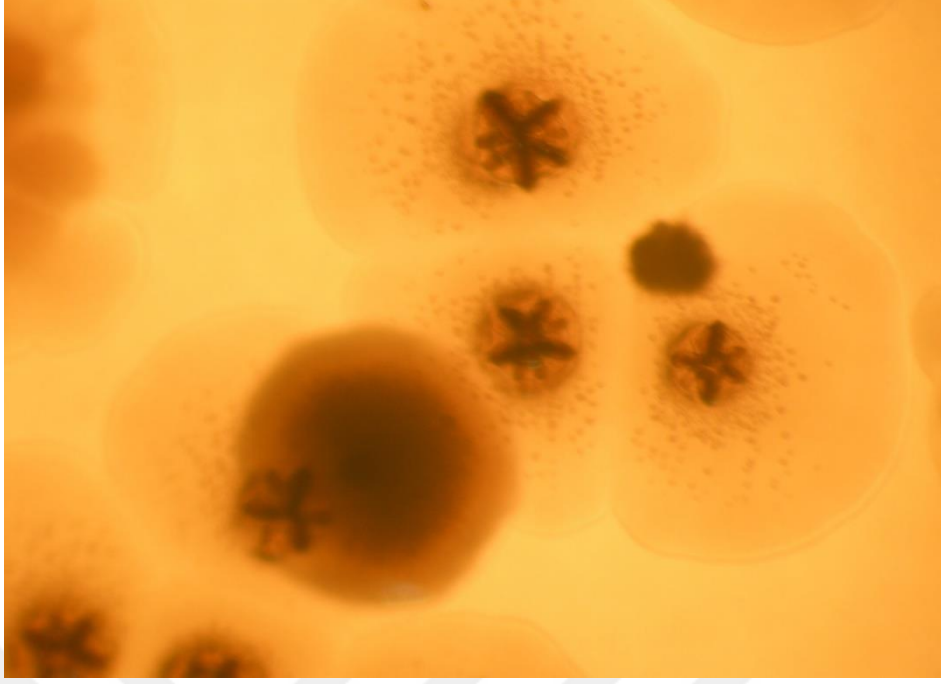
Modifiye besiyerinde ise ekimi yapılan tüm mikroorganizmaların zenginleştirici olarak kullanılan kan ve heminden dolayı ışık mikroskobu altında herhangi bir tesbit yapılamadı.



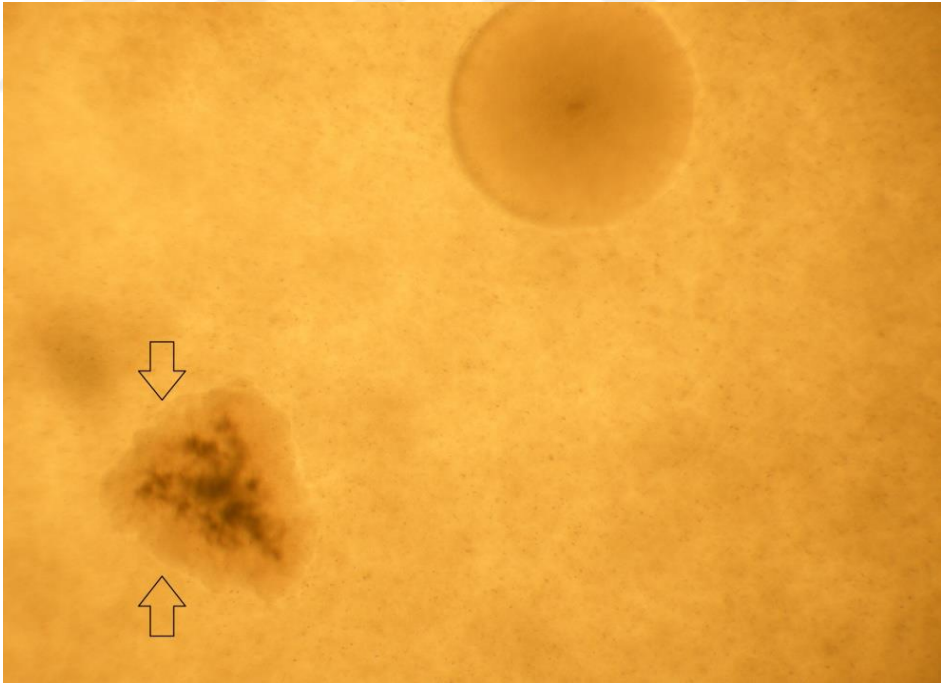
Şekil 4.1. *C. matruchotii*'nin B-2 besiyerindeki görünümü. Herhangi bir kristalizasyon gözlenmemektedir. (10×10 LM)



Şekil 4.2. *C. matruchotii*'nin modifiye besiyerindeki görünümü. Herhangi bir kristalizasyon gözlenmemektedir. (40×10 LM)



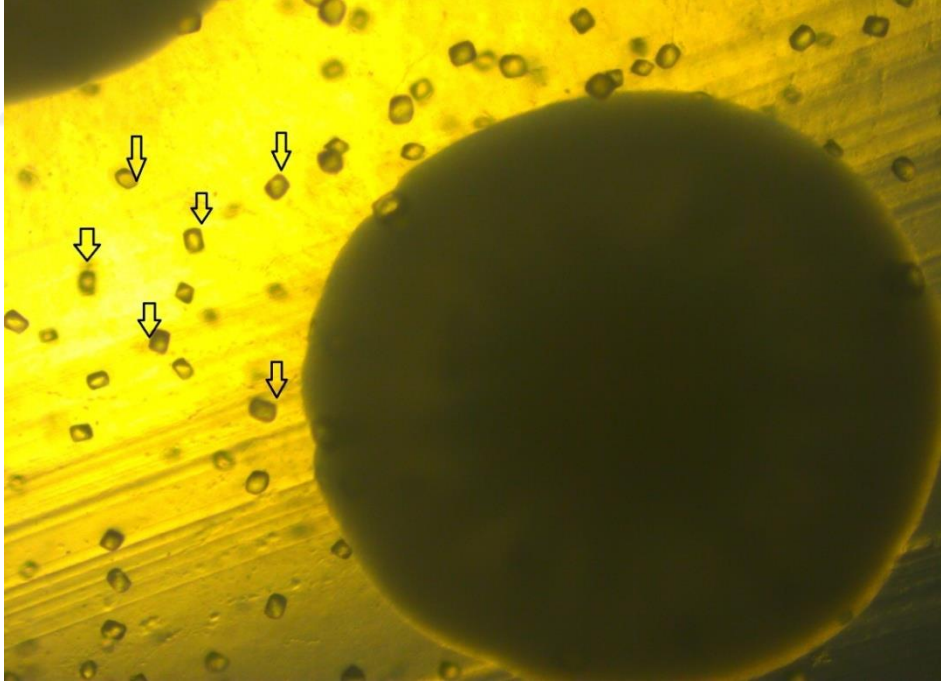
Şekil 4.3. *S. mutans*'ın B-2 besiyerinde oluşturduğu yıldız şeklindeki kalsifiye alan (10×10 LM)



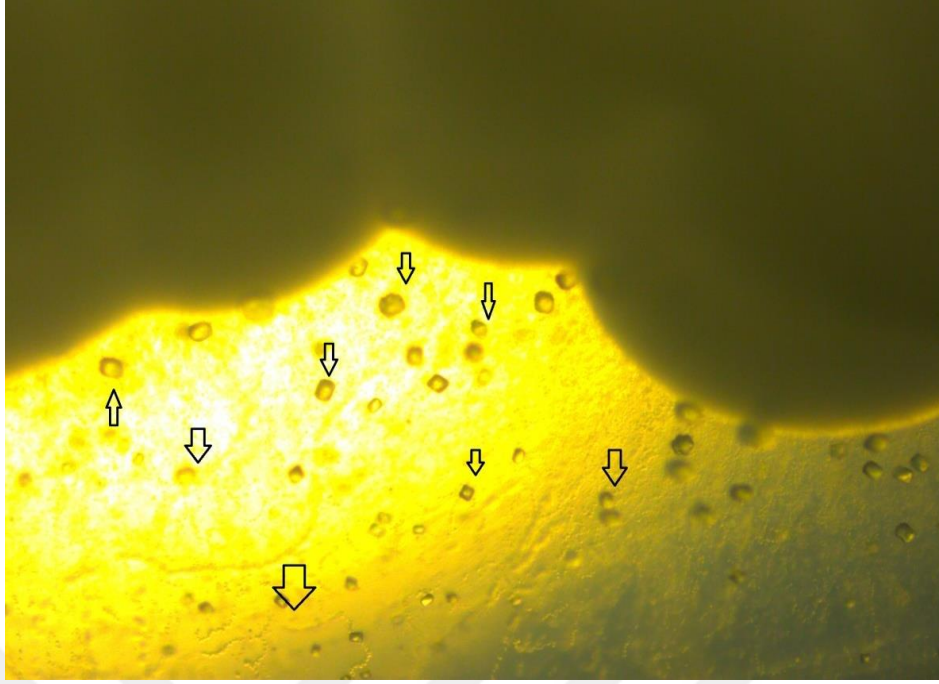
Şekil 4.4. *S. gordonii*'nin B-2 besiyeri içerisinde oluşturduğu kalsifiye alan(10×10 LM)



Şekil 4.5. *S. sanguis* 'in B-2 besiyeri içerisinde oluşturduğu kalsifiye alan (10×10 LM)



Şekil 4.6. *C. albicans* 'ın B-4 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM)



Şekil 4.7. *C. albicans*'ın B-2 besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (40×10 LM)

4.2. Sıvı Besiyerine Ekim Bulguları

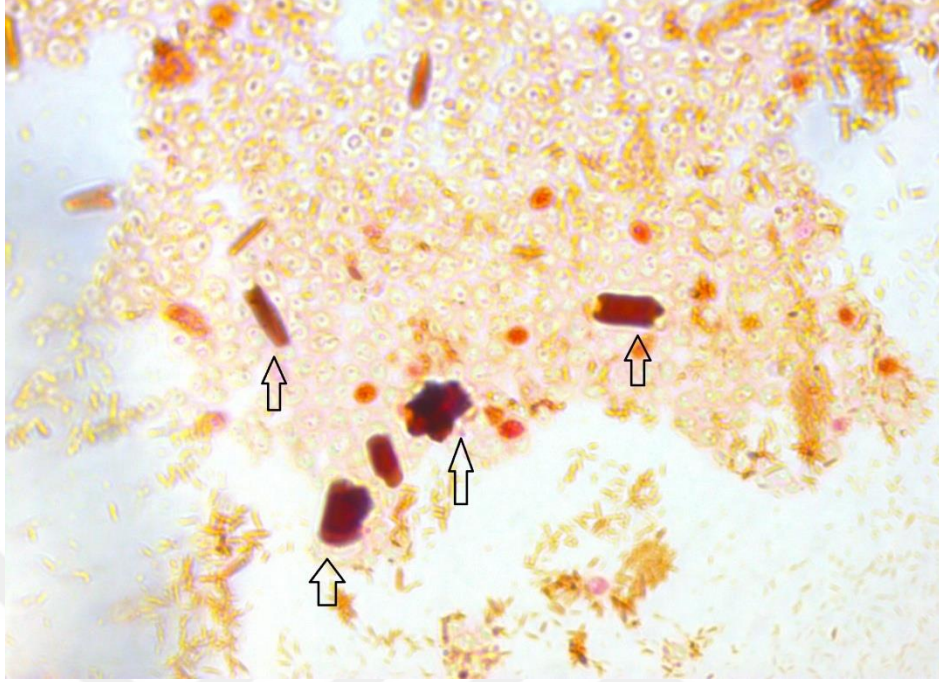
Sıvı besiyerine ekim bulguları Tablo 4.2'de gösterilmiştir

Tablo 4.2. Sıvı besiyerine ekim bulguları

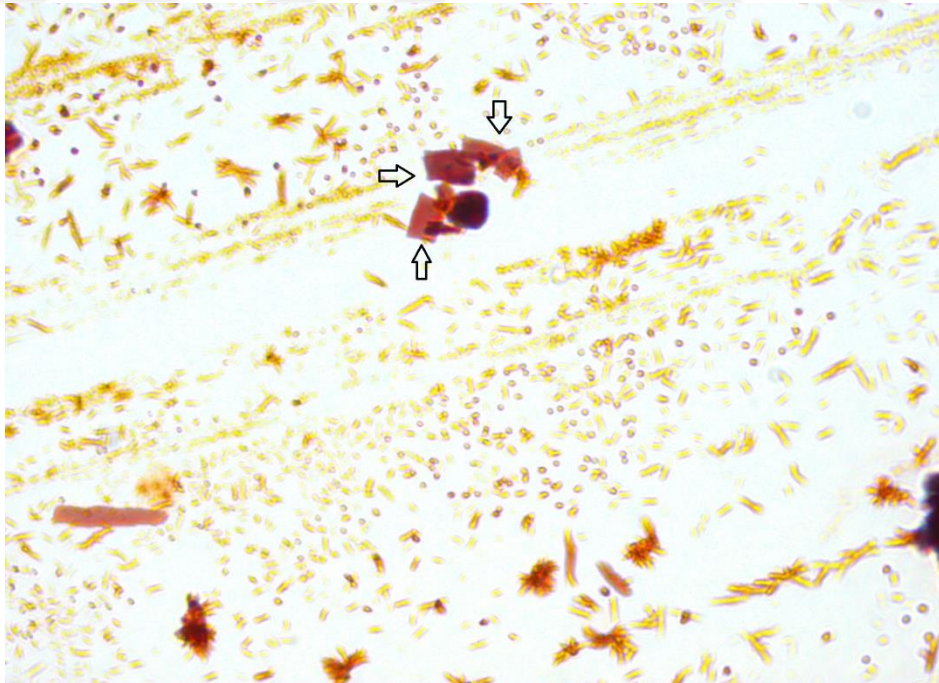
No:	Bakterinin adı	B-2 besiyeri(sıvı)
1	<i>P. gingivalis</i>	-
2	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-
3	<i>F. nucleatum</i>	-
4	<i>S. sanguis</i>	+
5	<i>S. mutans</i>	+
6	<i>C. matruchotii</i>	-
7	<i>S. gordonii</i>	+
8	<i>C. albicans</i>	+

+ : mineralizasyon gözlemlendi
 - : mineralizasyon gözlemlenmedi

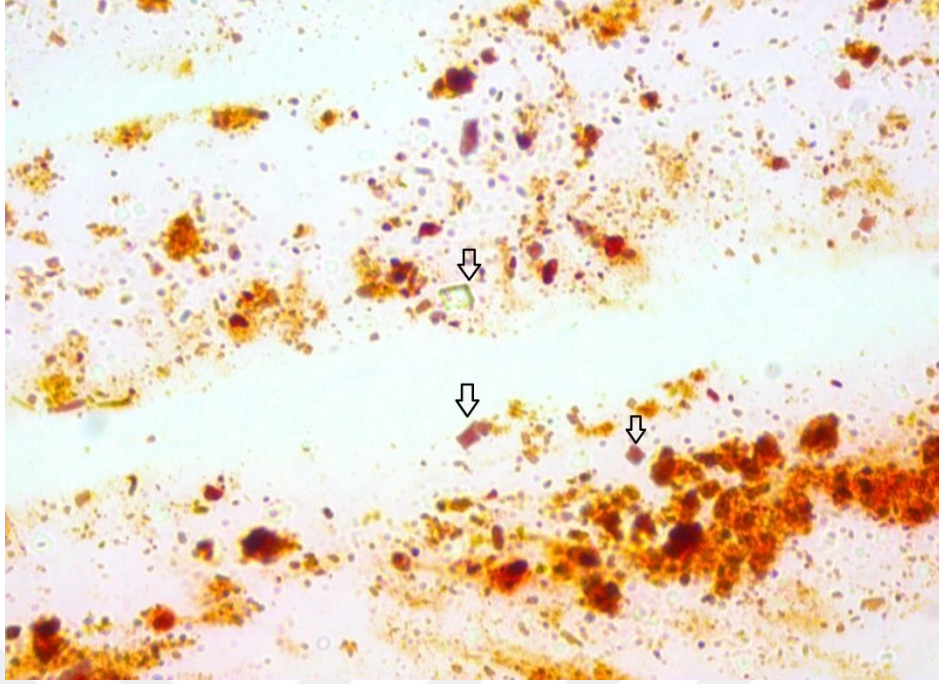
Sıvı besiyerine ekim için B-2 besiyerinin sıvı hali kullanıldı. Ekimi takip eden 10., 20. ve 40. günlerde yapılan incelemelerde *C. albicans* (Şekil 4.8.), *S. mutans* (Şekil 4.9.), *S. gordonii* (Şekil 4.10.) ve *S. sanguis*'in (Şekil 4.11.) kalsifikasyon oluşturduğu diğer mikroorganizmaların ise kalsifikasyon oluşturmadığı gözlemlendi.



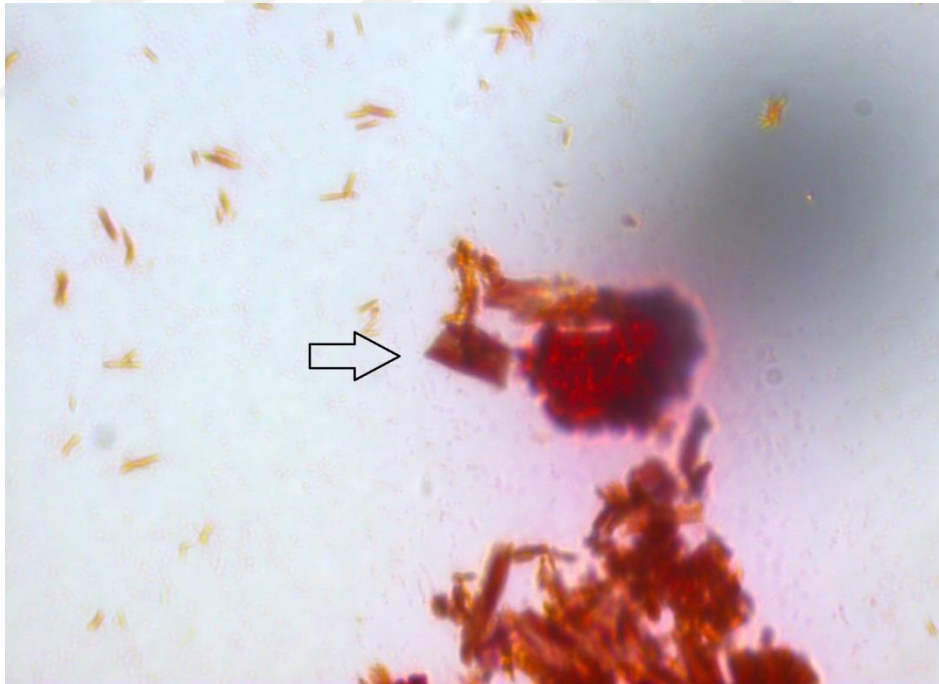
Şekil 4.8. *C. albicans*'ın sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM)



Şekil 4.9. *S. mutans*'ın sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM)



Şekil 4.10. *S. gordonii*'nin sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM)



Şekil 4.11. *S. sanguis*'in sıvı besiyerinde oluşturduğu kristal tanecikleri (100×10 LM)

4.3. Mineral Salt Basalİçeriğine Ait Bulgular

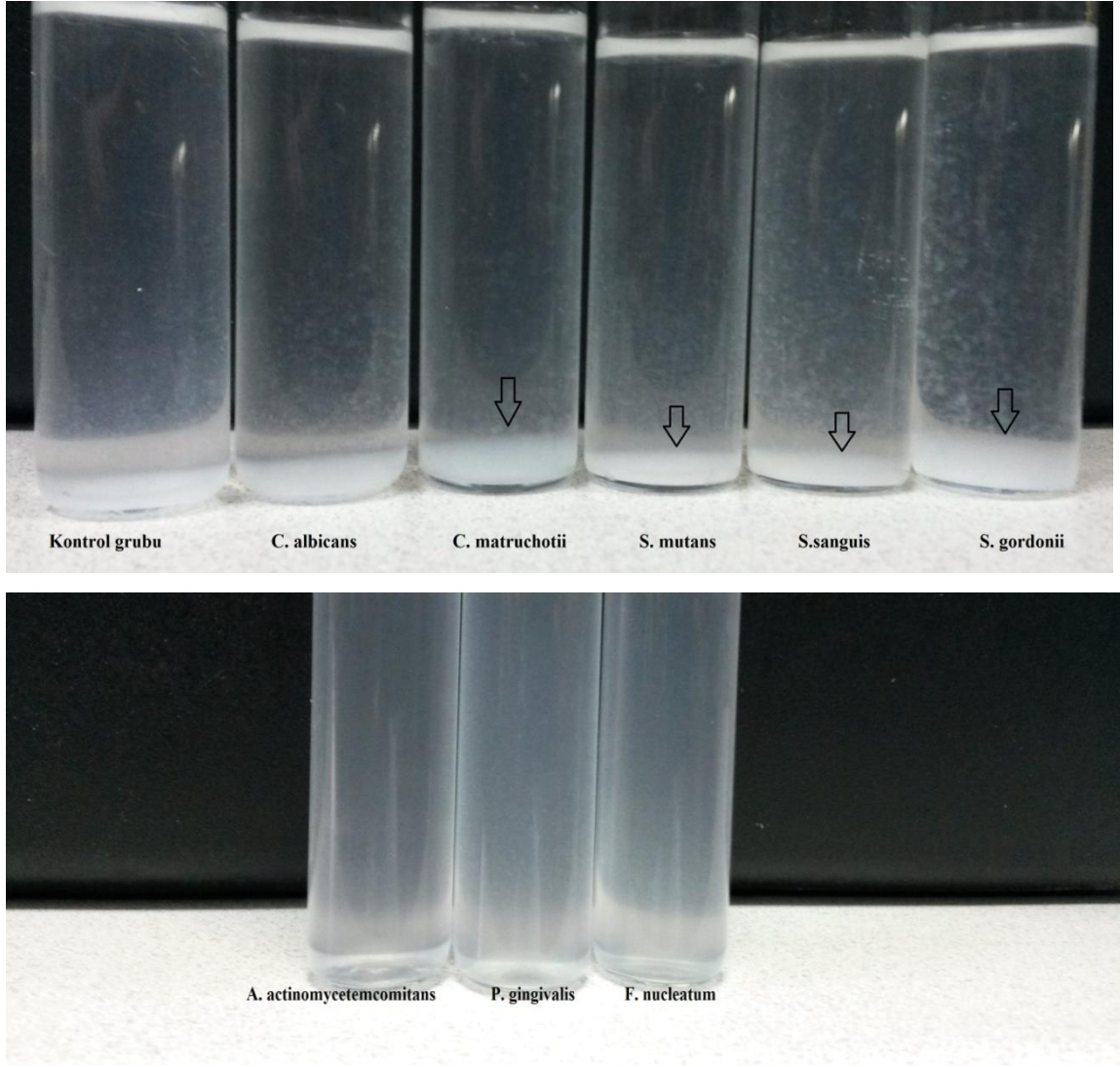
MSB içeriğine ait bulgular Tablo 4.3’de gösterilmiştir

Tablo 4.3. MSB içeriğine ait bulgular

No:	Bakterinin adı	MSB
1	<i>P. gingivalis</i>	-
2	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	-
3	<i>F. nucleatum</i>	-
4	<i>S. sanguis</i>	+
5	<i>S. mutans</i>	+
6	<i>S. gordonii</i>	+
7	<i>C. matruchotii</i>	+
8	<i>C. albicans</i>	-

+ : mineralizasyon gözlemlendi
-: mineralizasyon gözlenmedi

MSB içeriğine CaCl_2 eklendiğinde *C. matruchotii*, *S. mutans*, *S. sanguis* ve *S. gordonii* bulunan solusyonlar kontrol grubuna göre yoğun mineralizasyon gösterdi. *C. albicans*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* içeren solusyonlar ise kontrol grubuna göre mineralizasyon göstermedi (Şekil 4.12.).



Şekil 4.12. MSB içerisindeki her bir mikroorganizmanın görünümü (Mineralizasyon gösteren mikroorganizmalar↓ ile gösterildi).

MSB içerisinde kalsifikasyon gösteren mikroorganizmaların kontrol grubuna ve kalsifikasyon oluşturmeyen mikroorganizmalara göre transmitansının daha düşük olduğu gösterildi (Tablo 4.4).

Kalsifikasyon oluşturmeyen mikroorganizmaların transmitansının kontrol grubuna göre ufak miktarda düşük olmasının nedeni; kontrol solusyonu içerisinde herhangi bir mikroorganizmanın bulunmaması, kalsifikasyon gözlenmeyen solusyonlar da ise mikroorganizma varlığının solusyona giren ışınların ufak bir kısmını tutmasından ileri gelmektedir (Tablo 4.4).

Tablo 4.4. MSB içerisine uygulanan mikroorganizmaların spektrofotometre bulguları

No:	Bakterinin adı	540nm %T
1	Kontrol	99.9
2	<i>A. actinomycetemcomitans</i>	99.7
3	<i>F. nucleatum</i>	99.4
4	<i>P. gingivalis</i>	99.1
5	<i>C. albicans</i>	98.8
6	<i>S. gordonii</i>	94.5
7	<i>C. matruchotii</i>	71.6
8	<i>S. sanguis</i>	61.1
9	<i>S. mutans</i>	53.4

5. TARTIŞMA

Periodontal hastalığın oluşumu ve ilerlemesinde primer etyolojik faktör dental plaktır. Dental plağın minarelize olmasıyla diştaşı oluşmaktadır. Diştaşı yapısında bulunan non-mineralize ada ve kanallar sistemi nedeniyle poröz bir yapıya sahiptir. Bu poröz yapısı sayesinde bakteriyel tutumu kolaylaştırır ve bakterilerin oluşturduğu toksik ürünlerin periodontal bölgeye salınımına neden olarak periodontal hastalığın gelişmesinde predispozan faktör olarak görev yapar.^{3, 6}

Diştaşı ile periodontal hastalık arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çok sayıda cross-sectional ve longitudinal çalışma mevcuttur.^{99, 104, 170-173} Bu çalışmalarda periodontal hastalığın tedavisinde diştaşı formasyonunun önlenmesi ve uzaklaştırılmasının gerekliliği üzerinde durulmuştur. Bunun nedeni ise diştaşının daima mineralize olmayan, canlı ve metabolik olarak aktif bir bakteri tabakası ile çevrili olmasıdır.¹⁷⁴

Diştaşı formasyonu temelde dental plağın elimine edilmemesi sonucu tükürük ve dişeti oluğu sıvısı esaslı amorf materyal ve mikroorganizma içerikli organik matriks üzerine kalsiyum fosfat kristallerinin çökmesi sonucu oluşur.¹⁷⁵ Diştaşı formasyonu alkali ortam varlığında tükürükte bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının çökelmeye başlaması ve mineral formunu almasıyla gerçekleşir. Bu çökme, ortamda bulunan bakterilerin alkali şartları geliştirmesiyle ve plak içerisinde var olan mineralizasyon çekirdekleriyle artarak devam eder.^{175, 176} Alkali şartları geliştiren bakterilerin kristalizasyon ve mineralizasyonda rol alarak diştaşı oluşumuna katkı sağladığı ve periodontal hastalıklar için risk oluşturduğu düşünülmektedir.

Diştaşı oluşumu ile ilgili çalışmaların bir çoğu diştaşı ile plak arasındaki ilişkiyi ve bu yolla bakterilerin diştaşı oluşumundaki rollerini açıklamaya çalışmıştır.^{10, 12, 73, 74} Tükürük içeriğinde bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının mineralizasyonu üzerinde duran çalışmalar da mevcuttur.^{3, 7, 11, 82, 177} İster plak oluşumu, ister tükürük içeriğinde

bulunan kalsiyum ve fosfat iyonlarının çökelmesindeki rolü dikkate alınsın bakterilerin diştaşı oluşumunda önemli olduğu bilinmektedir.¹¹

Diştaşı oluşum mekanizması üzerine yapılan çalışmalar bakterilerin rolüne dikkat çekmiş ama bu ilişkiyi tam olarak açıklayamamıştır. Bakterilerin diştaşı oluşumuna katılıp katılmadığı yönünde yapılan çalışmalar sınırlıdır ve daha çok bakterilerin pasif katılımını göstermeye yöneliktir.⁸⁻¹²

Bu tez çalışmasında, dental plak oluşumuna katılan bazı mikroorganizmalar ile diştaşı içerisindeki kanal ve lakünlerde belirlenmiş bazı periopatojen bakterilerin *in vitro* ortamda kalsifikasyon oluşumuna katılıp katılmadıklarının belirlenmesi amaçlandı. Ayrıca periopatojen bakterilerin periodontal hastalığın oluşmasına direkt olarak katkıda bulunmalarının yanı sıra diştaşı oluşumunda da rol alıp almadığı incelendi. Bu doğrultuda; dental plak oluşumunda ve yapısında bulunan *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* ile periodontal hastalık oluşumunda etken olan *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* araştırıldı. Araştırmamıza ayrıca periodontitisli bölgelerden izole edilen *C. albicans* ve oral bakteriyel kalsifikasyon çalışmalarının ilk defa yapıldığı *C. matruchotii* de dahil edildi. Periopatojenlerin dışında diğer bakterilerin kullanılma nedeni çalışmadaki besiyerlerinin kalsifikasyon kabiliyetlerini ve güvenilirliğini test etmek içindir.

In vitro kalsifikasyon çalışmamız katı (B-2, B-4, modifiye), sıvı (B-2 sıvı) besiyerleri ve MSB uygulama tamponu olmak üzere üç ayrı ortamda yapılmıştır.

5.1. Katı Besiyerine Ekim Sonuçlarının Tartışılması

Araştırmamızda mikroorganizmaların kalsifikasyon yapıp yapmadıklarının belirlenmesi için değişik besiyerleri kullanıldı. Boquet ve ark. 1973 yılında mikroorganizmalar üzerinde yapılan kalsifikasyon çalışmalarında uyguladıkları daha sonra da bir çok araştırmacı tarafından da kullanılan B-4 besiyeri bunlardan ilkiydi.^{169, 178}

B-4 besiyeri ile yapılan çalışmalar sonucu bu besiyerinin modifiye edilmesi ile hazırlanan B-2 besiyerini kullanma gereği hissedilmiştir.^{163,164} B-4 besiyerini modifiye ederek elde edilen B-2 besiyerini kullanma nedenimiz mikroorganizmaları geliştirmek ve kalsifikasyon gözlemi yapabileceğimiz bir ortam oluşumunu sağlamaktır. B-4 ve B-2 besiyerinin yanı sıra inkubasyon için kullanılan standart besiyerlerinin 3/4' lk kısmına mikroorganizmaların kalsifikasyon oluşturabileceği uygun ortam oluşturmak amacıyla %0,15-%0,25 oranında kalsiyum asetat katılarak modifiye besiyeri oluşturuldu. Araştırmamız üç farklı katı besiyeri kullanılması yönüyle diğer tüm *in vitro* kalsifikasyon araştırmalarından üstünlük göstermektedir. Diş hekimliğinde ise bu besiyerleri kullanılarak herhangi bir kalsifikasyon araştırması yapılmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen mikroorganizmaların *in vitro* ortamda kalsifikasyon oluşumuna katılıp katılmadığı incelendiğinde; B-4 besiyerinde *C. albicans*'ın B-2 besiyerinde ise *S. mutans*, *S. gordonii*, *S. sanguis* ve *C. albicans*'ın kalsifikasyon oluşturduğu gözlendi. Modifiye besiyerinde ise herhangi bir kalsifikasyon odağı tesbit edilemedi.

B-4 besiyerinde sadece bir mikroorganizmanın kalsifikasyon gösterip B-2 besiyerinde ise dört tanesinin kalsifikasyon göstermesi besiyeri içeriğine bağlanabilir. Bunun nedeni B-2 besiyeri içerisinde besleyici faktörlerin daha fazla olması ve B-4 besiyerinde azot ile mikroorganizmanın kullanabileceği indirgenmiş ortamların oldukça az olmasıdır. şyleki; B-4 besiyerinde karbon kaynağı olarak B-2 besiyerinden daha fazla miktarda glikoz bulunur. Ancak B-2 besiyerinde kuvvetli bir azot kaynağı olan kazein oldukça yüksek miktarda bulunmaktadır. Azot kaynaklarının besleyici nitelikleri daha fazla olduğundan B-2 besiyeri mikroorganizmalar için daha elverişli bir ortamdır.

Bir diğer nokta ise besiyerlerinin pH'ları arasındaki farktır. Çalışmalarda standart olarak kullanılan B-4 besiyerinin pH'sı 7.2 iken B-2 besiyerinin pH'sı 7.4'tür.

Bu pH farkının mikroorganizmalarda kalsifikasyon kabiliyeti oluşturmayaacağı sadece kalsifikasyonun daha hızlı oluşmasına etki edebileceği düşünülmektedir.

Periodontal enflamasyonun tipik bulgusu olarak kabul edilen kanama, çiğneme ve fırçalama gibi mekanik uyarılarla bazen de spontan olarak oluşmaktadır. Bu bağlamda hastalıklı periodontal dokuları taklit etmek için modifiye besiyeri içerisinde zenginleştirici olarak kan ve hemin ilave edildi. Modifiye besiyerinde incelenen tüm mikroorganizmalarda herhangi bir kalsifikasyon odağı tesbit edilemedi. Bunun nedeni zenginleştirici olarak kullanılan kan ve heminin yeterli ışık geçirgenliği sağlamayıp mikroskop altında mikroorganizmalara dair oluşumları görmemizi engellemesidir. Sonuç olarak modifiye besiyerinde kalsifikasyon ya oluşmadı ya da oluşsa bile mikroskop altında tesbit edilemedi.

Yapılan literatür taramasında streptokok türleri ile diştaşı oluşumu arasındaki ilişkiyi ortaya koyan çalışmalar mevcuttur. Demir ve ark. hastalardan elde edilen diştaşı örneklerini inceledikleri çalışmada *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* ve diğer bazı streptokokların kalsifikasyon kabiliyetine sahip olduklarını bulmuşlardır.¹⁰⁸ Streckfuss ve ark. *S. mutans*'in 5 serotipi, *S. sanguis*'in 2 serotipinin *in vitro* ortamda kalsifikasyon yaptığını gözlemlemişlerdir.¹⁷⁹ Souchay ve ark. *S. mutans*'in *in vitro* ortamda intrastoplazmik kalsifikasyon gösterdiğini belirtmişlerdir.¹⁸⁰ Bu bulgular bizim çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Bakterilerin kalsifikasyon oluşturma mekanizmaları incelediğinde *S. sanguis*'in üre ve amonyak bileşiklerini oluşturan arginin deaminaz ve üre üreterek dental plağın pH'sının yükselmesini sağladığı böylece ortamda bulunan kalsiyum iyonlarının çökelediği iddia edilmektedir.¹⁷⁷ *S. mutans* ise genellikle çürük bölgelerinden izole edilen ve pH'nın düşmesine neden olan bir bakteridir. Souchay ve ark. *S. mutans* üzerinde yaptıkları çalışmada stoplazma içerisinde kalsifikasyon odaklarının oluştuğunu ve daha

sonrada hücre duvarının mineralizasyonunu takiben kalsifikasyonun ekstrasellüler alanda başladığını bildirmektedirler.¹⁸⁰ Biz, *S. mutans* ve *S. gordonii*'nin ya hücre yapısı içerisinde bulunan bir organik molekülün ya da metabolizmaları sonucu ürettikleri moleküllerin kalsifikasyon açısından önem teşkil edebileceğini düşünmekteyiz. Bu bakterilerin ürettiği CO₂ ortamda bulunan kalsiyumasetattan asetatin ayrılması ile serbest iyon haline gelen kalsiyum ile bağlanarak kalsiyumkarbonat oluşumuna neden olabilir.

C. albicans'ın periodontal hastalığın patogenezindeki rolü tam olarak bilinmemekle birlikte bir çok araştırmada hastalıklı bireylerde varlığı tesbit edilmiştir.^{141, 181-184} Ayrıca Clayton ve Fox insan ve hayvanlardan elde ettiği dıştaşı örneklerinde kandida varlığını saptamışlardır.¹⁰⁹ Literatür doğrultusunda araştırmamızda periodontitisin etyolojik faktörlerinden biri olan dıştaşının oluşumuna *C. albicans*'ın katılıp katılmadığının incelenmesi amaçlandı. Bu amaçla *C. albicans* B-2, B-4 ve modifiye besiyerlerine ekildi. B-2 ve B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon odakları görülürken, modifiye besiyerinde ise herhangi bir kalsifikasyon odağı tesbit edilemedi.

Bizim çalışmamızla paralellik gösteren bir çalışmada *in vitro* ortamda *C. albicans*'ın uygun koşullar altında intrasellüler kalsifikasyon yaptığı ortaya konmuştur.¹⁸⁵ Ancak bu çalışma incelendiğinde herhangi bir besiyerinden ve ekimin yapıldığı koşullardan bahsedilmemektedir.

C. albicans'ın hem B-2 hemde B-4 besiyerlerinde kalsifikasyon göstermesi iki sebebe bağlanabilir. Bunlardan birincisi *C. albicans*'ın fizyolojik uç durumlara iyi bir uyum kapasitesine sahip olması, diğeri ise ortamda glikoz ve iki değerlikli iyon (Ca⁺²) varlığında biyofilm oluşturma kapasitesinin artmasıdır.¹⁸⁶ *C. albicans* zorlu şartlar altında canlılığını sürdürebilen ve biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek bir

mikroorganizmadır. Bu bilgiler doğrultusunda *C. albicans*'ın hem kendi organik yapısının, hem de oluşturduğu biyofilm yapının minerallerin birikmesi için şablon görevi gördüğü ve kalsifikasyon oluşturduğu düşünülebilir.

C. matruchotii ise insan oral kavitesinde bulunan ve diştaşı oluşumu ile ilişkilendirilen ilk mikroorganizmadır.^{143, 144} *In vitro* ortamda kalsifikasyon yaptığı ve kalsiyum hidroksit oluşturma yeteneğine sahip olduğu belirtilmiştir.¹⁸⁷

Bu bilgiler doğrultusunda *C. matruchotii* üzerinde *in vitro* kalsifikasyon denemesi için B-2, B-4 ve modifiye besiyerlerine ekimi yapıldı. Üç katı besiyerinde de herhangi bir kalsifikasyon tesbit edilemedi.

Ennever ve ark. *C. matruchotii* hücre kültürlerinde kalsifikasyon oluştuğunu göstermişlerdir.¹⁸⁸ Boyan ve Boskey ise ilgili bakterinin kalsiyum-fosfolipid-fosfat kompleksi (CPLX) oluşturarak kalsifikasyona neden olduğunu belirtmişlerdir.¹⁸⁹ Yapılan bu çalışmalarda *C. matruchotii* sadece kalsiyum bulunan ortama ilave edilmiş ve bakterinin kalsifikasyon oluşturduğu tesbit edilmiştir. Takazoe ve ark. göre ise sadece canlılığını kaybeden *C. matruchotii* kalsifiye olabilmektedir.¹⁹⁰ Lie ve Selving intrastoplazmik dejenerasyonun *C. matruchotii* kalsifikasyonundan önceki basamak olduğunu belirtmişlerdir.¹⁹¹ İlgili bakterinin tüm stoplazmik alanının kalsifiye olduğu ve interbakteriyel kalsifikasyon gösterdiği ortaya konmuştur.¹⁹⁰

C. matruchotii'nin kalsifikasyon gösterdiği çalışmalar incelendiğinde bakterinin sadece kalsiyum bulunan ortama yerleştirildiği, bu ortamın da canlılığını sağlayabileceği bir besiyeri olmadığı görülmüştür. *C. matruchotii*'nin canlılığını idame ettiremeyip dejenere olarak kalsifiye olduğu düşünülmektedir.¹⁹⁰ Çalışmamızda *C. matruchotii* içerik olarak zengin besiyerlerine ekilmiş ve bakteri canlılığını devam ettirmiştir. Bundan dolayı çalışılan besiyerlerinde bakteri dejenere olmayıp, canlılığını

yitirmemiş ve kalsifiye olmamıştır. Kalsifikasyon görülen diğer çalışmalarla uyumsuz olması bu şekilde açıklanmaktadır.

Yüksek miktarda diştaşı olan bireylerde, sağlıklı bireylere nazaran daha yüksek ve belirgin ölçüde *P. gingivalis* tesbit etmiştir.¹⁰⁵ Ayrıca *P. gingivalis* tarafından üretilen kompleks lipidler subgingival diştaşından elde edilen lipid ekstratlarında bulunmuştur.^{100, 101} Brown ve ark. ağız içerisinde diştaşı olan bireylerde yüksek oranda *A. actinomycetemcomitans* varlığı saptamışlardır.¹⁰⁶ Yapılan bir diğer çalışmada subgingival diştaşı içerisinde *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *T. denticola* tesbit edilmiştir.¹⁶

Bu bilgiler doğrultusunda periopatojenlerden olan *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum*'un periodontal hastalığın oluşumunun yanı sıra, hastalığın predispozan faktörü olan diştaşı oluşumuna da katılıp katılmadığının incelenmesi amacıyla *in vitro* ortamda B-2, B-4 ve modifiye besiyerlerine ekimleri yapıldı. Ekim yapılan besiyerlerinde ilgili bakterilere ait herhangi bir kalsifikasyon odağına rastlanmadı.

Periopatojen bakterilerin kalsifikasyon oluşumuna katılıp katılmadığı yönünde yapılan literatür araştırmasında herhangi bir veriye ulaşılamamıştır. Bizim yaptığımız çalışma periopatojen bakterilerin katı besiyeri içerisinde *in vitro* kalsifikasyonunu inceleyen ilk çalışmadır ve ilgili bakterilerin kalsifikasyon oluşumunda herhangi bir etkileri olmadığı ortaya konmuştur.

5.2.Sıvı Besiyerine Ekim Sonuçlarının Tartışılması

Katı besiyerine ekim sonuçları incelendiğinde bir kısım mikroorganizmanın kalsifikasyon gösterdiği halde bir kısmının göstermemesi sonucu sıvı besiyerine ihtiyaç duyuldu. Bu ihtiyacın altında yatan ana etken subgingival diştaşı oluşumu için kalsiyum-fosfat iyon kaynağı olarak DOS'un kullanılmasıdır. Bu doğrultuda

mikroorganizmaların *in vitro* kalsifikasyon kabiliyetlerini araştırmak amacıyla enflamasyonun başlamasıyla eksudatif sıvı halini alan dişeti oluğu sıvısına benzer ortam elde etmek için mikroorganizmaların sıvı besiyerine ekimi yapıldı. Sıvı besiyeri olarak sadece B-2 besiyeri kullanıldı. Bunun nedeni B-2 besiyerinde mikroorganizmalar için gerekli olan besleyici faktörlerin daha yüksek miktarda bulunması ve katı besiyeri ekim sonuçlarının B-2 besiyerinde pozitif sonuç vermesidir.

S. mutans, *S. sanguis*, *S. gordonii* ve *C. albicans*'ın ekimi takiben yapılan incelemelerde katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de kalsifikasyon oluşturduğu gözlemlendi. Bu mikroorganizmaların sıvı besiyerinde oluşturdukları kalsifikasyon odakları katı besiyerindekilerden daha küçük boyutta ve daha az miktardadır. Katı besiyerinde mikroorganizma kolonisinden ekstrasellüler ortama diffüze olan moleküller koloniye belli bir mesafede veya koloniler arasında kristal oluşmasını teşvik etmektedir. Sıvı ortamda ise ortama salgılanan moleküller tüm sıvı içerisine dağıldığından dolayı konsantrasyon katıya nazaran daha düşük olmaktadır. Bundan dolayı kristalizasyon katı besiyerine göre biraz daha geç ve zayıf bir şekilde ortaya çıkmaktadır. Sıvı besiyerinde kristallerin daha küçük olması besiyeri içeriğine bağlanamaz çünkü her iki besiyeri içerisindeki iyon yoğunluğu açısından aynıdır. Sıvı besiyerinde, sadece besiyerinin katılaşması için gerekli olan agar kullanılmamıştır.

Çalışmamızda *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de kalsifikasyon oluşturmamıştır. Bu konu ile ilgili yapılan literatür incelemesinde herhangi bir veriye ulaşamadı.

C. matruchotii katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de herhangi bir kalsifikasyon göstermedi. Bunun nedeni katı besiyerinde olduğu gibi sıvı besiyerinde de bakterinin canlılığını devam ettirebilmesi için tüm şartların uygun olmasından dolayı dejenere olmayıp, canlılığını yitirmemesi ve nihayetinde kalsifiye olmamasıdır.

Yaptığımız çalışma ilgili mikroorganizmaların sıvı besiyeri içerisinde *in vitro* kalsifikasyonunu inceleyen ilk çalışmadır.

5.3.Mineral Salt Basal Uygulama Tampon Sonuçlarının Tartışılması

MSB nanopartikül sentezinde kullanılan özel bir tampondur sistemidir.¹⁹² İçeriği dipotasyum fosfat ve monopotasyum fosfat kullanılarak oluşturulan bir fosfat tamponu ile magnezyum sülfattan oluşmaktadır.¹⁹² MSB'yi kullanmamızın nedeni pH stabilitesi sağlayan iyi bir tampon olması ve içerisinde bulunan sülfat ve fosfatın kalsiyum ile birleşerek partikül oluşturmastır. Doygun kalsiyum çözeltisi oluşturmak için CaCl_2 kullanmamızın nedeni ise CaCl_2 'nin sıvı ortamda iyi çözülmesi ve Ca^{+2} oluşturabilmesidir. MSB içerisine ilave edilen CaCl_2 miktarı toplam hacmin %20'sinden fazla olmayacak şekilde yapılmasındaki ana etken doyumluğun aşırı bir şekilde arttırılmayıp kendi kendine çökmesinin önüne geçmektir.

MSB içerisinde bulunan sülfat ve fosfat ile mikroorganizma faaliyetleri sonucu oluşan CO_2 ortamda bulunan mikroorganizmanın herhangi bir kalsifikasyon kabiliyetinin olması durumunda kalsiyum fosfat, kalsiyum sülfat ve kalsiyum karbonat olarak çökelti oluşturmaktadır. Bu doğrultuda MSB'yi mikroorganizma varlığının doyum kalsiyum bulunan ortamda kalsifikasyona katkısını araştırmak amacıyla kullandık.

McFarland Standardı; baryum klorür ile sülfirik asidin karıştırılması sonucu oluşan baryum sülfat ortamda opak renkli bir bulanıklık oluşturur. Herhangi bir besiyerinde üretilen mikroorganizmalarda aynı renkte bir bulanıklık meydana getirmektedirler. Çalışmamızda hazırladığımız MSB besiyerine McFarland Standard I'in rengine ulaşınca kadar mikroorganizma ilave edildi. Standart I'i kullanmamızın nedeni hazırlanmasının kolay olması ve diğer standartlara göre bulanıklık derecesinin az olmasıdır. Standart II, III ve IV daha bulanık bir görüntüye

sahiptir ve mikroorganizmaların kalsifikasyon oluşturup oluşturmadığını gözlemlememizi zorlaştırmaktadır.

MSB içerisine doygun kalsiyum çözeltisi oluşturmak için CaCl_2 ilave edilerek yapılan bu çalışmada *C. matruchotii*, *S. mutans*, *S. sanguis* ve *S. gordonii*'nin kontrol grubuna göre daha yüksek miktarda kalsifikasyon oluşturduğu görüldü.

C. matruchotii katı ve sıvı besiyerinde kalsifikasyon oluşturmadığı halde MSB içerisinde kalsifikasyon gösterdi. *C. matruchotii*'nin kalsifikasyon oluşturmasında hücre membranında bulunan asidik fosfolipidler anahtar rol oynamaktadır. Asidik fosfolipidler fizyolojik pH koşullarında negatif yüke sahiptirler ve amfipatiktirler.¹⁹³ Bu negatif yüklerisayesinde kalsiyumu bağlayabilirler. Kalsiyum, membran yapısında bulunan fosfolipid molekülüne elektrostatik kuvvet ile bağlanır. Bu bağlantı kalsiyum ve fosfat iyonlarının etkileşimini kolaylaştırmaktadır.¹⁹⁴ İnorganik fosfatın kalsiyum ile bağlanması sonucu CPLX oluşur. Oluşan bu komplekse yeterli miktarda kalsiyum ve fosfat varlığında apatit depozisyonu devam eder ve bakteri kalsifiye olmaya başlar. *C. matruchotii*'nin hücre membranında başlayan kalsifikasyonun mikroorganizmanın tamamında görülebilmesi için bakterinin dejenere olup canlılığını kaybetmesi gerekmektedir. Katı ve sıvı besiyerlerinde bakterinin canlılığını idame ettirebileceği bol miktarda besiyeri mevcut olduğundan dolayı her ne kadar hücre membranında kalsifikasyon başlasa da bakteri tamamen dejenere olup kalsifiye olmadığı için katı ve sıvı besiyerinde ışık mikroskobu altında herhangi bir kalsifikasyon tesbit edilmedi. MSB içerisinde ise hücre membranındaki fosfolipidlerin oluşturduğu CPLX ortamda bulunan Ca^{+2} varlığı nedeniyle büyüdü. Bunun sonucunda MSB ortamında askıda kalan mikroorganizma CPLX'in oluşması ve büyümesi nedeniyle zemine ökeldi ve kalsifiye odak olarak tesbit edildi.

S. mutans, *S. gordonii* ve *S. sanguis* hem katı ve sıvı besiyerinde hem de MSB içerisinde kalsifikasyon gösterdi. Katı ve sıvı besiyerinde olduğu gibi MSB içerisinde de bu mikroorganizmaların hücre yapısında bulunan molekülün ortamda serbest halde bulunan Ca^{+2} 'ye bağlanarak çökelediği ve kalsifikasyon oluşturduğu düşünülebilir.

A. actinomycetemcomitans, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum* ise hem katı ve sıvı besiyerinde hem de MSB içerisinde herhangi bir kalsifikasyon göstermedi. Bu bakterilerin kalsifikasyon yapmadığı, diştaşı içerisindeki kanal ve lakünler içerisine sekonder yerleşim gösterdiği düşünülebilir.

C. albicans katı ve sıvı besiyerinde kalsifikasyon oluşturduğu halde MSB içerisinde herhangi bir kalsifikasyon göstermedi. *C. albicans* katı ve sıvı besiyerinde herhangi bir organik moleküle tutunarak kalsifikasyon çekirdeği oluşturup kristal oluşturabildiği halde MSB içerisinde tutunabileceği bir organik molekül olmadığından kalsifikasyon oluşturamamıştır. Organik moleküle tutunma hem mikroorganizma için hem de mikroorganizmanın kalsifikasyon çekirdeği oluşturabilmesi açısından önemlidir.

5.4. Sonuç

Diş taşı kalsifiye yapıya sahiptir ve oluşumu multifaktöriyel, kompleks bir süreci içerir.⁹⁴ Diştaşı oluşumunda mikroorganizmaların rolü tam olarak bilinmemekle birlikte kalsifikasyon odaklarının oluşmasında rol aldığı düşünülmektedir. Mikroorganizmaların diştaşı oluşumundaki rolünün ise aktif mi yoksa pasif mi olduğu bilinmemektedir. Bu doğrultuda çalışmamızda incelenen mikroorganizmaların aktif mineralizasyonunu tesbit etmek için katı ve sıvı besiyerlerine ekimleri yapıldı. Pasif mineralizasyonun tesbiti için ise MSB tamponu kullanıldı.

S. mutans, *S. sanguis* ve *S. gordonii* dental plak oluşumunda rol almalarının yanı sıra diştaşı oluşumuna da hem aktif hem de pasif olarak katıldıkları gösterildi.

C. albicans'ın da diştaşı oluşumuna aktif olarak katıldığı belirlendi. *C. albicans* periodontal hastalıklı bireylerde izole edilmesine rağmen periodontal hastalıktaki rolü tam olarak bilinmemektedir. İlgili mikroorganizmanın diştaşı oluşumunda aktif rol alarak periodontal hastalığın ortaya çıkışında rol oynadığı düşünülebilir.

Yaptığımız araştırmada *C. matruchotii*'nin sadece pasif mineralizasyona neden olduğu belirlenmiştir. İlgili bakteri tek başına diştaşı oluşturamamakta, oluşan diştaşı içerisindeki kanal ve lakünlere yerleşerek dejenerasyonu sonucu diştaşı oluşumuna pasif olarak katkı sağlamaktadır.

Çalışmaya dahil edilen periopatojen bakteriler (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) diştaşı oluşumuna aktif ya da pasif olarak katılmamışlardır. Bu sonuca göre bu bakteriler diştaşı oluşumu esnasında diştaşı içerisindeki kanal ve lakünlere yerleşmektedir. Bu yapılar içerisinde canlılığını sürdüren bakteriler diştaşı içerisinden toksinlerini komşu periodontal dokulara yaymaktadırlar. Kanal ve lakün içerisinde canlılığını sürdüremeyip dejenere olan bakteriler ise dejenerasyonları sonucu ortaya çıkan lipopolisakkarit gibi toksinler yumuşak dokulara sızmaktadır. Diştaşı oluşumunda rol almayan bu patojenler diştaşı içerisinde ister canlı ister cansız olarak yer alsın ortama toksinlerini salmakta ve periodontitise varan enfeksiyonlara neden olmaktadır.

Diştaşı oluşumundaki etkili faktörlerin ve mekanizmaların anlaşılması periodontal hastalığın tedavisinde yeni yaklaşımların ve tedavi seçeneklerinin belirlenmesi açısından önemlidir.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

1. Çalışmaya dahil edilen streptokok türleri (*S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii*) B-2, sıvı besiyeri ve MSB uygulama tamponu içerisinde kalsifikasyon gösterdi.
2. *C. albicans* B-2, B-4 ve sıvı besiyerinde kalsifikasyon oluştururken MSB uygulama tamponu içerisinde herhangi bir kalsifikasyon oluşturmadi.
3. *C. matruchotii* katı ve sıvı besiyerlerinde kalsifikasyon oluşturmazken MSB uygulama tamponu içerisinde kalsifikasyon oluşturd.
4. Çalışmaya dahil edilen periopatojen bakteriler (*A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum*) katı, sıvı besiyerlerinde ve MSB uygulama tamponu içerisinde kalsifikasyon oluşturmadi.
5. *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. gordonii* diştaşı oluşumuna hem aktif hem de pasif, *C. albicans*'ın aktif, *C. matruchotii*'nin ise pasif olarak katıldığı ortaya konuldu. *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* ve *F. nucleatum*'un ise diştaşı oluşumuna katılmadığı belirlendi.
6. Bu çalışma ile bakteriyel teorinin diştaşı oluşumundaki etkisi ortaya konmuştur. Bakteriyel kalsifikasyon mekanizmasının anlaşılması ve kalsifikasyona katılan diğer bakterilerin belirlenmesi için ileri tetkiklere ve araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. Mandel ID. Biochemical aspects of calculus formation. II. Comparative studies of saliva in heavy and light calculus formers. *Journal of Periodontal Research*,1974, 9: 211-221.
2. Friskopp J, Hammarstrom LA. Comparative, scanning electron microscopic study of supragingival and subgingival calculus. *Journal of Periodontology*,1980, 51:553-562.
3. Tan B, Gillam DG, Mordan NJ, Galgut PN. A preliminary investigation into the ultrastructure of dental calculus and associated bacteria. *Journal of Clinial Periodontology*,2004, 31:364-369.
4. Lilienthal B, Amerena V, Gregory G. An epidemiological study of chronic periodontal disease. *Archives of Oral Biology*,1965, 10:553-566.
5. Ramfjord SP. The periodontal status of boys 11-17 years old in Bombay,India. *Journal of Periodontology*, 1961, 32:45-53.
6. White DJ. Dental calculus: recent insights into occurrence, formation, prevention, removal and oral health effects of supragingival and subgingival deposits. *European Journal of Oral Sciences*,1997, 105:508-522.
7. Mandel ID, Levy BM. Studies on salivary calculus. I. Histochemical and chemical investigations of supra- and subgingival calculus. *Oral Surgery Oral MedicineOral Pathology Oral Radiology*,1957, 10:874-884.
8. Ennever J. Intracellular calcification by oral filamentous microorganism. *Journal of Periodontology*, 1960, 31:304-307.
9. Vogel JJ, Ennever J. The role of a lipoprotein in the intracellular hydroxyapatite formation in *Bacterionema matruchotii*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*,1971, 78: 218-222.

10. Moorer WR, Ten Cate JM, Buijs JF. Calcification of a cariogenic Streptococcus and of Corynebacterium (Bacterionema) matruchotii. *Journal of Dental Research*,1993, 72:1021-1026.
11. Jin Y, Yip HK. Supragingival calculus: formation and control. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*,2002, 13:426-441.
12. Rose RK, Dibdin GH, Shellis RP. A quantitative study of calcium binding and aggregation in selected oral bacteria. *Journal of Dental Research*,1993, 72:78-84.
13. Kakei M, Nakahara H, Kumegawa M, Yoshikawa M, Kunii S. Demonstration of the central dark line in crystals of dental calculus. *Biochimica et Biophysica Acta*,2000, 1524: 189-195.
14. Friskopp J. Ultrastructure of nondecalcified supragingival and subgingival calculus. *Journal of Periodontology*, 1983, 54:542-550.
15. Jepsen S, Deschner J, Braun A, Schwarz F, Eberhard J. Calculus removal and the prevention of its formation. *Periodontology 2000*,2011, 55:167-188.
16. Calabrese N, Galgut P, Mordan N. Identification of Actinobacillus actinomycetemcomitans, Treponema denticola and Porphyromonas gingivalis within human dental calculus: a pilot investigation. *Journal of International Academy of Periodontology*,2007, 9:118-128.
17. Loesche WJ, Grossman NS. Periodontal disease as a specific, albeit chronic, infection: diagnosis and treatment. *Clinical Microbiology Reviews*,2001, 14:727-752.
18. Eick S, Pfister W. Comparison of microbial cultivation and a commercial PCR based method for detection of periodontopathogenic species in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*,2002, 29:638-644.

19. Nonnenmacher C, Mutters R, de Jacoby LF. Microbiological characteristics of subgingival microbiota in adult periodontitis, localized juvenile periodontitis and rapidly progressive periodontitis subjects. *Clinical Microbiology and Infection*,2001, 7: 213-217.
20. Armitage GC. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*,1999, 4:1-6.
21. Pihlstrom BL, Michalowicz BS, Johnson NW. Periodontal diseases. *The Lancet*,2005, 366:1809-1820.
22. Kinane DF, Peterson M, Stathopoulou PG. Environmental and other modifying factors of the periodontal diseases. *Periodontology 2000*,2006, 40:107-119.
23. Flemming TF. Periodontitis. *Annals of Periodontology*, 1994,4: 32-37.
24. Nagy R, Novak MJ. Chronic Periodontitis. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 9th ed. Philadelphia,W.B. Saunders Company, 2002:398-402
25. Williams RC. Periodontal disease. *The New England Journal of Medicine*,1990, 322: 373-382.
26. Meitner SW, Zander HA, Iker HP, Polson AM. Identification of inflamed gingival surfaces. *Journal of Clinical Periodontology*,1979, 6:93-97.
27. Bhat M. Periodontal health of 14-17-year-old US schoolchildren. *Journal of Public Health Dentistry*,1991, 51:5-11.
28. Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontology 2000*,1993, 2: 57-71.
29. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Annals of Periodontology*, 1999, 4:7-19.

30. Loe H, Theilade E, Jensen SB. Experimental Gingivitis in Man. *Journal of Periodontology*,1965, 36:177-187.
31. Page RC. Gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*,1986, 13:345-359.
32. Tatakis DN, Trombelli L. Modulation of clinical expression of plaque-induced gingivitis. I. Background review and rationale. *Journal of Clinical Periodontology*,2004, 31: 229-238.
33. Bosman CW, Powell RN. The reversal of localized experimental gingivitis. A comparison between mechanical toothbrushing procedures and 0.2% chlorhexidine mouthrinse. *Journal of Clinical Periodontology*,1977, 4:161-172.
34. Haffajee AD, Cugini MA, Tanner A, Pollack RP, Smith C, Kent RL, Socransky SS. Subgingival microbiota in healthy, well-maintained elder and periodontitis subjects. *Journal of Clinical Periodontology*,1998, 25:346-353.
35. Pattanaporn K, Navia JM. The relationship of dental calculus to caries, gingivitis, and selected salivary factors in 11- to 13-year-old children in Chiang Mai, Thailand. *Journal of Periodontology*,1998, 69:955-961.
36. Taylor GW. Bidirectional interrelationships between diabetes and periodontal diseases: an epidemiologic perspective. *Annals of Periodontology*,2001, 6:99-112.
37. Lindhe J, Kinane DE. Chronic Periodontitis. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (eds). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford, Blackwell Publishing Company, 2003:209-214.
38. Tonetti MS, Mombelli A. Early-onset periodontitis. *Annals of Periodontology*,1999, 4:39-53.
39. Armitage GC. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontology 2000*,2010, 53:70-88.

40. Haffajee AD, Socransky SS. Microbiology of periodontal diseases: introduction. *Periodontology 2000*,2005, 38:9-12.
41. Tanner AC, Kent R, Kanasi E, Lu SC, Paster BJ, Sonis ST, Murray LA, Van Dyke TE. Clinical characteristics and microbiota of progressing slight chronic periodontitis in adults. *Journal of Clinical Periodontology*,2007, 34: 917-930.
42. Lamster IB, Lalla E. Periodontal disease and diabetes mellitus: discussion, conclusions, and recommendations. *Annals of Periodontology*,2001, 6:146-149.
43. Taylor GW, Burt BA, Becker MP, Genco RJ, Shlossman M, Knowler WC, Pettitt DJ. Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *Journal of Periodontology*,1998, 69: 76-83.
44. Lamster IB, Grbic JT, Bucklan RS, Mitchell-Lewis D, Reynolds HS, Zambon JJ. Epidemiology and diagnosis of HIV-associated periodontal diseases. *Oral Diseases*,1997, 3: 141-148.
45. Reddy MS. Osteoporosis and periodontitis: discussion, conclusions, and recommendations. *Annals of Periodontology*,2001, 6:214-217.
46. Wactawski-Wende J. Periodontal diseases and osteoporosis: association and mechanisms. *Annals of Periodontology*,2001, 6:197-208.
47. Amano A, Kishima T, Akiyama S, Nakagawa I, Hamada S, Morisaki I. Relationship of periodontopathic bacteria with early-onset periodontitis in Down's syndrome. *Journal of Periodontology*,2001, 72:368-373.
48. Kinane DF. Periodontitis modified by systemic factors. *Annals of Periodontology*,1999, 4:54-64.
49. Dennison DK, Van Dyke TE. The acute inflammatory response and the role of phagocytic cells in periodontal health and disease. *Periodontology 2000*,1997, 14:54-78.

50. Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *Journal of Bacteriology*,1994, 176:2137-2142.
51. Page RC, Offenbacher S, Schroeder HE, Seymour GJ, Kornman KS. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions. *Periodontology 2000*,1997, 14:216-248.
52. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*,1998, 9:54-85.
53. Feres M, Haffajee AD, Goncalves C, Allard KA, Som S, Smith C, Goodson JM, Socransky SS. Systemic doxycycline administration in the treatment of periodontal infections (II). Effect on antibiotic resistance of subgingival species. *Journal of Clinical Periodontology*,1999, 26:784-792.
54. Cullinan MP, Westerman B, Hamlet SM, Palmer JE, Faddy MJ, Lang NP, Seymour GJ. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *Journal of Clinical Periodontology*,2001, 28:1137-1144.
55. Kang BY, Choi YK, Choi WH, Kim KT, Choi SS, Kim K, Ha NJ. Two polymorphisms of interleukin-4 gene in Korean adult periodontitis. *Archives of Pharmacal Research*,2003, 26:482-486.
56. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiology and Immunology*,2000, 15:15-18.
57. Haake SK, Nisengard R, Newman MG, Sanz M. Periodontal microbiology. In:Newman MG, Takei HH, Carranza FA (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 9th ed. Philadelphia,W.B. Saunders Company, 2002:96-112.

58. Marsh PD, Bradshaw DJ. Dental plaque as a biofilm. *Journal of Industrial Microbiology*,1995, 15:169-175.
59. Carranza FA. Clinical diagnosis. In: Newman MG, Takei HH, Carranza FA (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 8th ed. Philadelphia,W.B. Saunders Company, 1996:432-454.
60. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. *Periodontology* 2000,2010, 52: 38-52.
61. Darveau RP, Tanner A, Page RC. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontology* 2000,1997, 14:12-32.
62. Gold SI. Periodontics. The past. Microbiology. Part (III). *Journal of Clinical Periodontology*, 1985, 12:257-269.
63. Socransky SS, Haffajee, A.D. Microbiology of Periodontal Disease. In: Lindhe J, Karring T, Lang NP (eds). *Clinical Periodontology and Implant Dentistry*, 4th ed. Oxford, Blackwell Publishing Company, 2003:106-139.
64. Tanner A, Kent R, Maiden MF, Taubman MA. Clinical, microbiological and immunological profile of healthy, gingivitis and putative active periodontal subjects. *Journal of Periodontal Research*,1996, 31:195-204.
65. Riviere GR, Smith KS, Tzagaroulaki E, Kay SL, Zhu X, DeRouen TA, Adams DF. Periodontal status and detection frequency of bacteria at sites of periodontal health and gingivitis. *Journal of Periodontology*,1996, 67:109-115.
66. Gmur R, Strub JR, Guggenheim B. Prevalence of *Bacteroides forsythus* and *Bacteroides gingivalis* in subgingival plaque of prosthodontically treated patients on short recall. *Journal of Periodontal Research*,1989, 24:113-120.

67. Saglie FR, Marfany A, Camargo P. Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *Journal of Periodontology*,1988, 59: 259-265.
68. Listgarten MA. Structure of the microbial flora associated with periodontal health and disease in man. A light and electron microscopic study. *Journal of Periodontology*,1976, 47: 1-18.
69. Newman HN. The approximal apical border of plaque on children's teeth. II. Adhesion, interbacterial connections and carbohydrate metabolism. *Journal of Periodontology*,1979, 50:568-576.
70. Dzink JL, Socransky SS, Haffajee AD. The predominant cultivable microbiota of active and inactive lesions of destructive periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*,1988, 15:316-323.
71. Christersson LA, Zambon JJ, Genco RJ. Dental bacterial plaques. Nature and role in periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*,1991, 18:441-446.
72. Slots J, Listgarten MA. *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*,1988, 15:85-93.
73. Mandel ID. Biochemical aspects of calculus formation. I. Comparative studies of plaque in heavy and light calculus formers. *Journal of Periodontal Research*,1974, 9: 10-7.
74. Mandel ID. Calculus update: prevalence, pathogenicity and prevention. *The Journal of American Dental Association*,1995, 126:573-580.
75. Ataoğlu T, Gürsel M. *Periodontoloji*, 3. Baskı. Konya, Damla Ofset,1999:122-123.

76. Sundberg M, Friskopp J. Crystallography of supragingival and subgingival human dental calculus. *Scandinavian Journal of Dental Research*,1985, 93:30-38.
77. Gron P, Van Campen GJ, Lindstrom I. Human dental calculus. Inorganic chemical and crystallographic composition. *Archieves of Oral Biology*,1967, 12:829-837.
78. Seibert JL, Lindhe J. Esthetics and Periodontal Therapy. In: Lindhe J (ed). *Texbook of Clinial Periodontology*, 2nd ed. Copenhagen,Munksgaard, 1989:477-514.
79. Friskopp J, Isacsson G. A quantitative microradiographic study of mineral content of supragingival and subgingival dental calculus. *Scandinavian Journal of Dental Research*,1984, 92:25-32.
80. Muehlemann HR, Schroeder HE. Dynamics of Supragingival Calculus Formation. *Advances in Oral Biology*,1964, 1:175-203.
81. Schroeder HE, Bambauer HU. Stages of calcium phosphate crystallisation during calculus formation. *Archieves of Oral Biology*,1966, 11:1-14.
82. Sherman BS, Sobel AE. Differentiating between nucleation and crystal growth in mineralizing tissues and macromolecules. *Archieves of Oral Biology*,1965, 10:323-342.
83. Hincrichs JE. The Role of Dental Calculus and Other Local Predisposing Factors. In: Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA (eds). *Carranza's Clinical Periodontology*, 11th ed. New York, Saunders Company, 2012: 217-231.
84. Leach SA. Release and Breakdown of Sialic Acid from Human Salivary Mucin and Its Role in the Formation of Dental Plaque. *Nature*,1963, 199: 486-487.

85. Driessens F, Verbeeck RMH. Possible pathways of mineralization of dental plaque. In:ten Cate JM (eds). *Recent advances in the study of dental calculus*. Oxford, IRL Press, 1989:7-17.
86. Moreno EC, Aoba T, Gaffar A, Physical chemistry of calculus formation. In:ten Cate JM (eds). *Recent advances in the study of dental calculus*. Oxford, IRL Press, 1989:129-130.
87. Kleinberg I, Jenkins GN. The Ph of Dental Plaques in the Different Areas of the Mouth before and after Meals and Their Relationship to the Ph and Rate of Flow of Resting Saliva. *Archives of Oral Biology*,1964, 9:493-516.
88. Loe H, Holm-Pedersen P. Absence and Presence of Fluid from Normal and Inflamed Gingiva. *Periodontics*,1965, 149:171-177.
89. Krasse B, Egelberg J. The relative proportions of sodium, potassium and calcium in gingival pocket fluid. *Acta Odontologica Scandinavica*,1962, 20:143-152.
90. Nancollas GH, Johnsson MA. Calculus formation and inhibition. *Advances in Dental Research*,1994, 8:307-311.
91. Bartels HA. Bacterial growth and crystal formation: a possible factor in calculus formation. *Journal of Dental Research*,1950, 29:436-439.
92. Kornak U. Animal models with pathological mineralization phenotypes. *Joint Bone Spine*,2011, 78:561-567.
93. Ho AM, Johnson MD, Kingsley DM. Role of the mouse ank gene in control of tissue calcification and arthritis. *Science*,2000, 289:265-270.
94. Kirsch T. Biomineralization an active or passive process? *Connective Tissue Research*,2012, 53:438-445.
95. Theilade J. Electron Microscopic Study of Calculus Attachment to Smooth Surfaces. *Acta Odontologica Scandinavica*,1964, 22:379-387.

96. Schroeder HE. Saliva Viscosity and Calculus Formation in Man. *Archives of Oral Biology*,1964, 9:65-74.
97. Barış Ö. Erzurum ilindeki mağaralarda damlataşı oluşumunda etkili bakterilerin izolasyonu, karakterizasyonu ve tanısı. Fen Bilimleri Enstitüsü,Biyoloji Anabilim Dalı. Doktora Tezi, Erzurum: Atatürk Üniversitesi, 2009.
98. Roberts-Harry EA, Clerehugh V. Subgingival calculus: where are we now? A comparative review. *Journal of Dentistry*,2000, 28:93-102.
99. Clerehugh V, Abdeia R, Hull PS. The effect of subgingival calculus on the validity of clinical probing measurements. *Journal of Dentistry*,1996, 24:329-333.
100. Nichols FC, Levinbook H, Shnaydman M, Goldschmidt J. Prostaglandin E2 secretion from gingival fibroblasts treated with interleukin-1beta: effects of lipid extracts from *Porphyromonas gingivalis* or calculus. *Journal of Periodontal Research*,2001, 36:142-152.
101. Nichols FC, Rojanasomsith K. *Porphyromonas gingivalis* lipids and diseased dental tissues. *Oral Microbiology and Immunology*,2006, 21:84-92.
102. Sidaway DA. A microbiological study of dental calculus. I. The microbial flora of mature calculus. *Journal of Periodontal Research*,1978, 13:349-359.
103. Clerehugh V, Lennon MA. A two-year longitudinal study of early periodontitis in 14- to 16-year-old schoolchildren. *Community Dental Health*,1986, 3:135-141.
104. Christersson LA, Grossi SG, Dunford RG, Machtei EE, Genco RJ. Dental plaque and calculus: risk indicators for their formation. *Journal of Dental Research*,1992, 71:1425-1430.
105. Clerehugh V, Seymour GJ, Bird PS, Cullinan M, Drucker DB, Worthington HV. The detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas*

- gingivalis and Prevotella intermedia using an ELISA in an adolescent population with early periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 1997, 24:57-64.
106. Brown CM, Hancock EB, O'Leary TJ, Miller CH, Sheldrake MA. A microbiological comparison of young adults based on relative amounts of subgingival calculus. *Journal of Periodontology*, 1991, 62:591-597.
107. Howell A, Jr. Rizzo A, Paul F. Cultivable Bacteria in Developing and Mature Human Dental Calculus. *Archives of Oral Biology*, 1965, 10:307-313.
108. Demir T, Barış Ö, Zor E. Investigation of in vitro mineral forming bacterial isolates from subgingival calculus. *Archives of Clinical Experimental Surgery*, 2014, 3:153-160.
109. Clayton YM, Fox EC. Investigations into the mycology of dental calculus in town-dwellers, agricultural workers and grazing animals. *Journal of Periodontology*, 1973, 44: 281-285.
110. Gibbons RJ. Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*, 1984, 63:378-385.
111. Socransky SS, Haffajee AD, Dzink JL, Hillman JD. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. *Oral Microbiology and Immunology*, 1988, 3:1-7.
112. Marsh PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *Journal of Dental Research*, 1992, 71:1431-1438.
113. Erganiş O, Öztürk A. *Oral Mikrobiyoloji Ve İmmünoloji*. 1. Baskı. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevi, 2003:91-103.
114. Busscher HJ, Weerkamp AH, van der Mei HC, van Pelt AW, de Jong HP, Arends J. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its

- relevance for adhesion. *Applied and Environmental Microbiology*,1984, 48:980-983.
115. Van Pelt AW, Weerkamp AH, Uyen MH, Busscher HJ, De Jong HP, Arends J. Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Applied Environmental Microbiology*,1985, 49: 1270-1275.
116. Van Loosdrecht MC, Lyklema J, Norde W, Zehnder AJ. Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews*,1990, 54:75-87.
117. Ritz HL. Microbial population shifts in developing human dental plaque. *Archives of Oral Biology*,1967, 12:1561-1568.
118. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*,1924:141-147.
119. Whiley RA, Beighton D. Current classification of the oral streptococci. *Oral Microbiology and Immunology*,1998, 13:195-216.
120. Coykendall AL. Genetic heterogeneity in *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*,1971, 106:192-196.
121. Clarke JK. On the bacterial factor in the aetiology of dental caries. *British Journal of Experimental Pathology*, 1994, 5:141-147.
122. Xu P, Alves JM, Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki LS, Manque P, Ge X, Serrano MG, Puiu D, Hendricks S, Wang Y, Chaplin MD, Akan D, Paik S, Peterson DL, Macrina FL, Buck GA. Genome of the opportunistic pathogen *Streptococcus sanguinis*. *Journal of Bacteriology*,2007, 189:3166-3175.
123. Paik S, Senty L, Das S, Noe JC, Munro CL, Kitten T. Identification of virulence determinants for endocarditis in *Streptococcus sanguinis* by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity*,2005, 73:6064-6074.

124. Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *Journal of Bacteriology*,2005, 187:7193-7203.
125. Gibbons RJ, Etherden I, Moreno EC. Association of neuraminidase-sensitive receptors and putative hydrophobic interactions with high-affinity binding sites for *Streptococcus sanguis* C5 in salivary pellicles. *Infection and Immunity*,1983, 42:1006-1012.
126. Gibbons RJ, Etherden I, Moreno EC. Contribution of stereochemical interactions in the adhesion of *Streptococcus sanguis* C5 to experimental pellicles. *Journal of DentalResearch*,1985, 64:96-101.
127. Baddour LM, Christensen GD, Lowrance JH, Simpson WA. Pathogenesis of experimental endocarditis. *Reviews of Infectious Diseases*,1989, 11:452-463.
128. Baddour LM. Virulence factors among gram-positive bacteria in experimental endocarditis. *Infection and Immunity*,1994, 62:2143-2148.
129. Marsh PD. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dental Clinics of North America*1999, 43:599-614.
130. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Role of sialic acid in the kinetics of *Streptococcus sanguis* adhesion to artificial pellicle. *Infection and Immunity*,1987, 55:1552-1557.
131. Scannapieco FA, Torres GI, Levine MJ. Salivary amylase promotes adhesion of oral streptococci to hydroxyapatite. *Journal of Dental Research*,1995, 74:1360-1366.
132. Sutherland IW. Biofilm matrix polymers role in adhesion. *Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease*,1999:49-62.

133. Burne RA. Oral ecological disaster: the role of short term extracellular storage polysaccharides. *Cariology for the Nineties*,1991: 351-364.
134. Scully C, el-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*,1994, 5:125-157.
135. Al-Karaawi ZM, Manfredi M, Waugh AC, McCullough MJ, Jorge J, Scully C, Porter SR. Molecular characterization of Candida spp. isolated from the oral cavities of patients from diverse clinical settings. *Oral Microbiology and Immunology*,2002, 17:44-49.
136. Hermann P, Berek Z, Nagy G, Kamotsay K, Rozgonyi F. [Molecular pathogenesis of oral candidiasis (candidosis)]. *Orvosi Hetilap*,2001, 142:2621-2625.
137. Baillie GS, Douglas LJ. Matrix polymers of Candida biofilms and their possible role in biofilm resistance to antifungal agents. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*,2000, 46: 397-403.
138. Douglas LJ. Candida biofilms and their role in infection. *Trends in Microbiology*,2003, 11:30-36.
139. Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL, Wickes BL. The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in Candida albicans. *FEMS Microbiology Letters*,2002, 214:95-100.
140. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonads in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*,1988, 3: 47-52.
141. Reynaud AH, Nygaard-Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *Journal of Clinical Periodontology*,2001, 28:860-864.

142. Jarvensivu A, Hietanen J, Rautemaa R, Sorsa T, Richardson M. Candida yeasts in chronic periodontitis tissues and subgingival microbial biofilms in vivo. *Oral Diseases*,2004, 10: 106-112.
143. Takazoe I, Itoyama T. Analytical electron microscopy of *Bacterionema matruchotii* calcification. *Journal of Dental Research*,1980, 59:1090-1094.
144. Takazoe I, Nakamura T. The Relation between Metachromatic Granules and Intracellular Calcification of *Bacterionema Matruchotii*. *Bulletin of Tokyo Dental College*,1965, 35:29-42.
145. Jones SJ. A special relationship between spherical and filamentous microorganisms in mature human dental plaque. *Archieves of Oral Biology*,1972, 17:613-616.
146. Ennever J, Vogel JJ, Streckfuss JL. Synthetic medium for calcification of *Bacterionema matruchotii*. *Journal of Dental Research*,1971, 50:1327-1330.
147. Moore WE, Moore LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmeister JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *Journal of Clinical Periodontology*,1991, 18:729-739.
148. Haffajee AD, Teles RP, Socransky SS. Association of *Eubacterium nodatum* and *Treponema denticola* with human periodontitis lesions. *Oral Microbiology and Immunology*,2006, 21:269-282.
149. Jervoe-Storm PM, Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative periodontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Periodontology*,2005, 32: 778-783.
150. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella*

- forsythensis in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of Clinical Periodontology*, 2004, 31:1034-1047.
151. Lauritsen NN, Kilian M. Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor- dependent and V factor-independent isolates. *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 2006, 56: 2135-2146.
 152. Asikainen S, Chen C. Oral ecology and person-to-person transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology 2000*, 1999, 20:65-81.
 153. Slots J, Reynolds HS, Genco RJ. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation. *Infection and Immunity*, 1980, 29:1013-1020.
 154. Henderson B, Ward JM, Ready D. *Aggregatibacter* (*Actinobacillus*) *actinomycetemcomitans*: a triple A* periodontopathogen? *Periodontology 2000*, 2010, 54:78-105.
 155. Zambon JJ. Periodontal diseases: microbial factors. *Annals of Periodontology*, 1996, 1:879-925.
 156. Van Winkelhoff AJ, Slots J. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in nonoral infections. *Periodontology 2000*, 1999, 20:122-135.

157. Grand A, Laye JM, Etienne J, Pernot F, Durand de Gevigney G, Delahaye F, Touboul P, Froment A. [Infectious endocarditis induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. 8 new cases]. *Archives des Maladies du Coeur et des Vaisseaux*, 1994, 87: 721-1729.
158. Saiki K, Gomi T, Konishi K. Deletion and purification studies to elucidate the structure of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin. *Journal of Biochemistry*, 2004, 136:335-342.
159. Kuramitsu HK. Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*, 2003, 14:331-344.
160. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. In vitro models of tissue penetration and destruction by *Porphyromonas gingivalis*. *Infection and Immunity*, 2004, 72:4689-4698.
161. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontology 2000*, 2000, 24:153-192.
162. Jousimies-Somer H, Savolainen S, Makitie A, Ylikoski J. Bacteriologic findings in peritonsillar abscesses in young adults. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 16: 92-298.
163. Marina M, Strong CA, Civen R, Molitoris E, Finegold SM. Bacteriology of anaerobic pleuropulmonary infections: preliminary report. *Clinical Infectious Diseases*, 1993, 16:256-262.
164. Bennett KW, Eley A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *Journal of Medical Microbiology*, 1993, 39:246-254.

165. Bolstad AI, Jensen HB, Bakken V. Taxonomy, biology, and periodontal aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clinical Microbiology Reviews*,1996, 9:55-71.
166. Duncan MJ. Genomics of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*,2003, 14:175-187.
167. Brook I, Walker RI. The relationship between *Fusobacterium* species and other flora in mixed infection. *Journal of Medical Microbiology*,1986, 21:93-100.
168. Dzink JL, Tanner AC, Haffajee AD, Socransky SS. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. *Journal of Clinical Periodontology*,1985, 12: 648-659.
169. Boquet E, Boronat, A. and Ramos-Cormenzana, A. Production of Calcite (Calcium Carbonate) Crystals by Soil Bacteria is a General Phenomenon. *Nature*, 1973, 246:527-529.
170. Anerud A, Loe H, Boysen H. The natural history and clinical course of calculus formation in man. *Journal of Clinical Periodontology*,1991, 18:160-170.
171. Griffiths GS, Duffy S, Eaton KA, Gilthorpe MS, Johnson NW. Prevalence and extent of lifetime cumulative attachment loss (LCAL) at different thresholds and associations with clinical variables: changes in a population of young male military recruits over 3 years. *Journal of Clinical Periodontology*,2001, 28:961-969.
172. Ong G. Periodontal reasons for tooth loss in an Asian population. *Journal of Clinical Periodontology*,1996, 23:307-309.
173. Timmerman MF, Van der Weijden GA, Abbas F, Arief EM, Armand S, Winkel EG, Van Winkelhoff AJ, Van der Velden U. Untreated periodontal disease in Indonesian adolescents. Longitudinal clinical data and prospective clinical and

- microbiological risk assessment. *Journal of Clinical Periodontology*,2000, 27:932-942.
174. Newman HN. The development of dental plaque. In Harris NO, Christen AG (eds). *Primary Preventive Dentistry*, East Norwalk, Appleton & Lange, 1994:19-58.
 175. Abraham J, Grenon M, Sanchez HJ, Perez C, Barrea R. A case study of elemental and structural composition of dental calculus during several stages of maturation using SRXRF. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*,2005, 75:623-628.
 176. Abraham J, Grenon M, Sanchez HJ, Perez CA, Barrea RA. Spectrochemical analysis of dental calculus by synchrotron radiation X-ray fluorescence. *Analytical Chemistry*,2002, 74:324-329.
 177. Garcia-Godoy F, Hicks MJ. Maintaining the integrity of the enamel surface: the role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. *Journal of AmericanDental Association*,2008, 139:25-34.
 178. Baskar S, Baskar R, Mauclarie L,McKenzie JA. Microbially induced calcite precipitation in culture experiments: Possible origin for stalactites in Shastradhara caves, Dehradun,India. *Current Science*, 2006, 92:350-355.
 179. Streckfuss JL, Smith WN, Brown LR, Campbell MM. Calcification of selected strains of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*. *Journal of Bacteriology*,1974, 120:502-526.
 180. Souchay A, Pouezat JA, Menanteau J. Mineralization of *Streptococcus mutans* in vitro. An ultrastructural study. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology*,1995, 79:311-320.

181. Dahlen G, Wikstrom M. Occurrence of enteric rods, staphylococci and Candida in subgingival samples. *Oral Microbiology and Immunology*,1995, 10:42-46.
182. Dogan B, Antinheimo J, Cetiner D, Bodur A, Emingil G, Buduneli E, Uygur C, Firatli E, Lakio L, Asikainen S. Subgingival microflora in Turkish patients with periodontitis. *Journal of Periodontology*,2003, 74:803-814.
183. Jabra-Rizk MA, Ferreira SM, Sabet M, Falkler WA, Merz WG, Meiller TF. Recovery of Candida dubliniensis and other yeasts from human immunodeficiency virus-associated periodontal lesions. *Journal of Clinical Microbiology*,2001, 39:4520-4522.
184. Azmanova V, Stojanova O, Videnov L. The role of Candida infections in periodontosis. *Stomatologiia (Sofia)*,1983, 65:14-20.
185. Ennever J, Summers FE. Calcification by Candida albicans. *Journal of Bacteriology*,1975, 122:1391-1393.
186. Aydın M, Mısırlıgil A, Cengiz AT. *Tıp ve Diş Hekimliğinde Genel ve Özel Mikrobiyoloji*. Ankara, Güneş Yayınevi, 2004:1109.
187. Gilmour MN. The classification of organisms termed Leptotrichia (Leptothrix) buccalis. II. Reproduction of Bacterionema matruchotii. *Bacteriological Reviews*,1961, 25: 142-151.
188. Ennever J, Streckfuss JL, Takazoe I. Calcification of bacillary and streptococcal variants of Bacterionema matruchotii. *Journal of Dental Research*,1973, 52:305-308.
189. Boyan-Salyers BD, Boskey AL. Relationship between proteolipids and calcium-phospholipid-phosphate complexes in Bacterionema matruchotii calcification. *Calcified Tissue International*,1980, 30:167-174.

190. Takazoe I, Kurahashi Y, Takuma S. Electron microscopy of intracellular mineralization of oral filamentous microorganisms in vitro. *Journal of Dental Research*, 1963, 42:681-685.
191. Lie T, Selvig KA. Calcification of oral bacteria: an ultrastructural study of two strains of *Bacterionema matruchotii*. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 1974, 82:8-18.
192. Kundu D, Hazra C, Chatterjee A, Chaudhari A, Mishra S. Extracellular biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using *Rhodococcus pyridinivorans* NT2: Multifunctional textile finishing, biosafety evaluation and in vitro drug delivery in colon carcinoma. *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, 2014, 140:194-204.
193. Vogel JJ, Boyan-Salyers BD. Acidic lipids associated with the local mechanism of calcification: a review. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 1976:231-241.
194. Hauser H, Chapman D, Dawson RM. Physical studies of phospholipids. XI. Ca^{2+} binding to monolayers of phosphatidylserine and phosphatidylinositol. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1969, 183:320-333.

EKLER

EK-1. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler
Adı Soyadı: Fatih KARAASLAN
Doğum tarihi: 14.11.1987
Doğum yeri: İskilip
Medeni Hali: Evli
Uyruğu: T.C
Adres: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı, 25240 Erzurum
Tel: 0442 231 35 63
Faks:
E-mail: fkaraaslan.19@hotmail.com
Eğitim
Lise: Ümraniye Anadolu Lisesi (2002-2006)
Lisans: İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2006-2011)
Uzmanlık: Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Periodontoloji Anabilim Dalı (2012-2015)
Yabancı Dil Bilgisi
İngilizce: Orta derece (ÜDS 63.75)
Üye Olunan Mesleki Kuruluşlar
İlgi Alanları ve Hobiler