ÇANKIRI KARATEKİN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TRİBULUS TERRESTRİS'İN SULU EKSTRAKTI İLE GARGARA YAPMANIN DİŞ ETİ İLTİHABI OLAN İNSANLARIN AĞIZLARINDA BULUNAN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Lama Jawad Ali AL-TAIE

BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

ÇANKIRI
2023

Her hakkı saklıdır

TEZ ONAYI

Lama Jawad Ali AL-TAIE tarafından hazırlanan **"*Tribulus terrestris*'in Sulu Ekstraktı ile Gargara Yapmanın Diş Eti İltihabı Olan İnsanların Ağızlarında Bulunan Bakteriler Üzerindeki Etkisi"** adlı tez çalışması 17/04/2023 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalında **Yüksek Lisans Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ

Eş Danışman : Prof. Dr. Ibraheem Hadi MOHAMEED

Jüri Üyeleri :

Başkan : Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Biyoloji Anabilim Dalı
Çankırı Karatekin Üniversitesi

Üye : Prof. Dr. Mine TÜRKTAŞ
Biyoloji Anabilim Dalı
Gazi Üniversitesi

Üye : Doç. Dr. Melda DÖLARSLAN
Fiziki Coğrafya Anabilim Dalı
Ankara Hacı Bayram Veli Üniversitesi

Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Hamit ALYAR

Enstitü Müdürü

ETİK İLKE VE KURALLARA UYGUNLUK BEYANNAMESİ

Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğine göre hazırlamış olduğum "***Tribulus terrestris*'in Sulu Ekstraktı ile Gargara Yapmanın Diş Eti İltihabı Olan İnsanların Ağızlarında Bulunan Bakteriler Üzerindeki Etkisi**" konulu tezin bana ait, özgün bir çalışma olduğunu; çalışmamın hazırlık, veri toplama, analiz ve bilgilerin sunumu olmak üzere tüm aşamalarında bilimsel etik ilke ve kurallara uygun davrandığımı, tezin içerdiği yenilik ve sonuçları başka bir yerden almadığımı, tezde kullandığım eserleri usulüne göre kaynak olarak gösterdiğimi, tezin Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'nden başka bir bilim kuruluna akademik amaç ve unvan almak amacıyla vermediğimi ve bu çalışmanın Çankırı Karatekin Üniversitesi tarafından kullanılan "Bilimsel İntihal Tespit Programı"yla tarandığını, "intihal içermediğini" beyan ederim. Çalışmamla ilgili yaptığım bu beyana aykırı bir durumun saptanması halinde ortaya çıkacak tüm ahlaki ve hukuki sonuçlara razı olduğumu bildiririm. Çankırı Karatekin Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca gereğinin yapılmasını arz ederim (17/04/2023).

Lama Jawad Ali AL-TAIE

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

TRİBULUS TERRESTRİS'İN SULU EKSTRAKTI İLE GARGARA YAPMANIN DİŞ ETİ İLTİHABI OLAN İNSANLARIN AĞIZLARINDA BULUNAN BAKTERİLER ÜZERİNDEKİ ETKİSİ

Lama Jawad Ali AL-TAIE

Çankırı Karatekin Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Eş Danışman: Prof. Dr. Ibraheem Hadi MOHAMEED

Bu çalışmanın amacı, *Tribulus terrestris* ekstraksiyonunun, lenfositlerin ve üç kanser hücre hattı olan insan meme kanseri HepG2, HeLa ve farelerde karaciğer kanseri HC'nin diş eti iltihabı ile antibakteriyel ajanın proliferasyonu üzerindeki etkilerinin belirlenmesidir. Tümör hücre dizisinin inhibisyon aktivitesi, ekstrakt konsantrasyonunun yükselmesiyle artmıştır. HeLa için en yüksek inhibisyon oranı 1000 µg\mL konsantrasyonda %95,85 olurken, HC hücre dizisi için en yüksek inhibisyon oranı 1000 µg/mL'de %18,60 olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, farklı konsantrasyonlardaki *T. terrestris* ekstraktlarının bazı bakteriler üzerindeki inhibitör etkileri belirlenmiştir. Buna göre, çalışmada kullanılan bakteri türleri *Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Yüksek inhibisyon bölgesi *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da (31,3 mm ve 28,7 mm) gözlenmiş olup bunları *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* (15,7mm ve 18,7mm) takip etmiştir.

2023, 54 sayfa

ANAHTAR KELİMELER: *Tribulus terrestris*, HepG2, HeLa, HC

ABSTRACT

Master of Science Thesis

THE EFFECT OF GARGLING WITH AQUEOUS EXTRACT OF THE *TRIBULUS TERRESTRIS* ON THE BACTERIA PRESENT IN THE MOUTH OF PEOPLE WITH GINGIVITIS

Lama Jawad Ali AL-TAIE

Çankırı Karatekin University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology

Advisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÖZDENİZ
Co-Advisor: Prof. Dr. Ibraheem Hadi MOHAMEED

The aim of this study was to determine the effects of *Tribulus terrestris* extraction on the proliferation of lymphocytes and three cancer cell lines, human breast cancer HepG2, HeLa, and liver cancer HC in gingivitis and antibacterial agent in mice. The inhibitory activity of the tumor cell line increased with the increase of the extract concentration. The highest inhibition rate for HeLa was 95.85% at 1000 µg\mL concentration, while the highest inhibition rate for HC cell line was 18.60% at 1000 µg/mL. In addition, the inhibitory effects of *T. terrestris* extracts at different concentrations on some bacteria were determined. Accordingly, the bacterial species used in the study are *Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. High zone of inhibition was observed in Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa (31.3 mm and 28.7 mm), followed by *Acinetobacter baumannii* and *Escherichia coli* (15.7 mm and 18.7 mm).

2023, 54 pages

Keywords: *Tribulus terrestris*, HepG2, HeLa, HC

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Tez danışmanım Doç. Dr. Ebru ÖZDENİZ'e sabrı, rehberliği ve anlayışı için teşekkür ederim.

Lama Jawad Ali AL-TAIE

Çankırı, Mayıs 2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ..... **iii**
İÇİNDEKİLER ..... **iv**
SİMGELER DİZİNİ ..... **vii**
KISALTMALAR DİZİNİ ..... **viii**
ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **ix**
ÇİZELGELER DİZİNİ ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. LİTERATÜR ÖZETİ **3**
2.1 Diş Çürükleri **3**
2.2 Diş Plağı **3**
2.3 Karyojenik Bakteriler **4**
2.4 Streptokoklar **5**
2.4.1 *Streptococcus* cinsi **5**
2.5 Mutans Streptokoklar **6**
2.5.1 Mutans streptokokların yapışması **6**
2.6 Kemoprofilaktik Ajanlar **7**
2.6.1 Kemo ajanının türleri ve sınıflandırılması **7**
2.7 Klorheksidin **8**
2.8 Sodyum Florür (NaF) **8**
2.9 Ajan Kombinasyonları **9**
2.10 Diş Eti İltihabı ve Bakteriler **9**
2.10.1 Diş eti iltihabının tedavisi **10**
2.11 *Tribulus terrestris L.* Bitkisi **10**
2.11.1 *Tribulus terrestris L.*'nin sınıflandırılması ve kimyasal bileşimi **11**
2.11.2 *T. terrestris*'in tıbbi önemi **13**
3. MATERYAL VE METOT **14**
3.1 Materyal **14**
3.1.1 Araç ve gereçler **14**

3.1.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler 15
3.2 *T. terrestris* Bitkisinden Ekstrakt Hazırlanması 15
3.3 Sitotoksisite Testi için Kullanılan Konsantrasyonlar 16
3.4 Lenfositlerde Sitotoksisite Testi için Kullanılan Çözelti 16
3.5 Kan Örneği Toplama 17
3.6 *T. terrestris* Ekstraksiyonunun İnsanların Mitotik İndeksine Etkisinin İncelenmesi 17
3.7 *T. terrestris* Ekstraktlı Kan Kültürü 17
3.7.1 Hücre toplama 18
3.7.2 Fiksasyon 18
3.7.3 Yıkama 18
3.7.4 Damlatma 18
3.7.5 Boyama ve mikroskop incelemesi 19
3.8 Doku Kültürü için Kullanılan Çözeltiler 19
3.9 Kanser Hücre Dizileri 20
3.9.1 İnsan meme kanseri hücre dizisi HepG2 20
3.9.2 İnsan rahim ağzı kanseri hücre dizisi (Henrietta Lacks) (HeLa) 20
3.9.3 Normal hücre dizisi HC 20
3.10 HepG2, HeLa Kanseri Hücre Dizileri ve HC Normal Hücresinin Büyümesi . 21
3.11 Kanser Hücre Hatlarında Ekstrakte Edilen *T. terrestris*'in Sitotoksik Testi .. 22
3.12 Kültür Besiyeri 23
3.12.1 Kültür besiyerinin hazırlanması 23
3.13 Mutans Streptokokların İzolasyonu ve Saflaştırılması 25
3.13.1 Örnek toplama 25
3.14 Mutans Streptokok İzolasyonu 25
3.15 Bakteri İzolatlarının Saflaştırılması ve Sürdürülmesi 26
3.16 Antimikrobiyal Ajanlar 26
3.17 Mutant Streptokokların *T. terrestris* Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarına ve Antimikrobiyal Ajanlara İn Vitro Duyarlılıkları 26
3.18 Ekstraktların ve Diğer Antimikrobiyal Ajanların Mutans Streptokoklarının İn Vivo Canlılık Sayıları Üzerindeki Etkileri 27
3.19 İstatistiksel Analiz 29
4. BULGULAR VE TARTIŞMA 30

4.1 *T. terrestris* Bitkisi Ekstraksiyonunun Hazırlanması 30

4.2 İnsan Lenfositinde Mitotik İndekste *T. terrestris* Ekstraktının Etkisinin İncelenmesi 30

4.2.1 *T. terrestris* ekstraktının lenfosit bölünmesi için bir uyarıcı olarak etkisi 30

4.2.2 *T. terrestris* ekstraktının bir lenfosit üzerindeki bölünme önleyici etkisinin incelenmesi 30

4.3 *T. terrestris* Ekstraktının Kanser ve Normal Hücre Dizileri Üzerindeki Etkisi 33

4.4 *T. terrestris* Ekstraktlarının İn Vitro Antimikrobiyal Ajanlarının Hassasiyetleri 39

4.5 *T. terrestris* Ekstraktlarının ve Anti-Mikrobiyal Ajanların İn Vitro Mutans Streptokokların Canlılık Sayımı Üzerindeki Etkileri 42

4.6 Ekstraktların ve Diğer Antimikrobiyallerin İn Vivo Mutans Streptokok Üzerindeki Etkileri 43

5. SONUÇ VE ÖNERİLER 47

KAYNAKLAR 48

ÖZGEÇMİŞ 54

SİMGELER DİZİNİ

α	Alfa
+	Artı
β	Beta
>	Büyüktür
-	Eksi
<	Küçüktür
µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
mL	Mililitre
mm	Milimetre
ºC	Santigrat derece
%	Yüzde

KISALTMALAR DİZİNİ

A375	İnsan melanom hücre hattı
A549	Adenokarsinom insan alveolar bazal epitel hücreleri
AMJ13	İnvaziv duktal karsinom
AO\PI	Akridin turuncu\Propidium iyodür lekesi
ATP	Adenozin trifosfat
BAD	Bcl-2 ilişkili hücre ölümü agonisti
BAK	Bcl-2 antagonist öldürücü
BAX	Bcl-2 ilişkili X-proteini
Bcl-2	B hücreli lenfoma 2
BID	BH3 etkileşimli alan ölüm agonisti
C. albicans	*Candida albicans*
CBDs	Cembranoid tipi diterpenler
cdk2	Sikline bağımlı kinaz 2
cDNA	Tamamlayıcı deoksiribonükleik asit
C-myc	Hücresel-miyelositomatozis
DNA	Deoksiribonükleik asit
E. coli	*Escherichia coli*
E2F	Ekspresyon faktörü
ECM	Ekstra hücresel matris
ER	Endoplazmik retikulum
erb B-1	Epidermal büyüme faktörü reseptörü
GC-MS	Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
H22	Hepatoma-22 hücre hattı

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 *Tribulus terrestris L.* bitkisi 11
Şekil 4.1 Mitotik indekste *T. terrestris* ekstraktının insan lenfositi üzerindeki etkisi ... 31
Şekil 4.2 Kristal menekşe boyası kullanılarak *T. terrestris* ekstraktı (x20) (A) kontrol grubu lenfositler (B) 1000 µg/mL konsantrasyonda ekstrakt ile işlenmiş lenfositler 32
Şekil 4.3 Kristal menekşe boyası kullanılarak *T. terrestris* ekstraktı (x100) (A) kontrol grubu lenfositler (B) 1000 µg/mL konsantrasyonda ekstrakt ile işlenmiş lenfositler 32
Şekil 4.4 *T. terrestris*'in etkisiyle HepG2 kanser hücre dizisindeki inhibisyon yüzdesi 34
Şekil 4.5 *T. terrestris*'in etkisiyle HeLa kanser hücre dizsindeki inhibisyon yüzdesi ... 35
Şekil 4.6 *T. terrestris*'in etkisiyle HC normal hücre dizisindeki inhibisyon yüzdesi 35
Şekil 4.7 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) (A) Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HepG2 kanser hücre dizisi (B) işlem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HepG2 hücre dizisi 36
Şekil 4.8 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) (A) Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HeLa kanseri hücre dizisi (B) işlem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HeLa hücre dizisi 37
Şekil 4.9 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) (A) Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HC kanseri hücre dizisi (B) işem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HC hücre dizisi 37
Şekil 4.10 Bakterilerin inhibisyon bölgesi 40

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1 İnsanların ağız boşluklarındaki seçili habitatlarda normal olarak bulunan başlıca bakteri cinsleri ve türleri 5
Çizelge 2.2 *Tribulus terrestris*'in sınıflandırması 11
Çizelge 3.1 Araç ve gereçler 14
Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler 15
Çizelge 3.3 Lenfositler üzerinde sitotoksisite testi için kullanılan çözeltiler 16
Çizelge 3.4 Doku kültürü için kullanılan çözeltilerin hazırlanması 19
Çizelge 3.5 Mutans streptokok besiyerleri 24
Çizelge 4.1 Mitotik indekste *T. terrestris* ekstraktının insan lenfositi üzerindeki etkisi ve kolşisin ile karşılaştırması 31
Çizelge 4.2 *T. terrestris*'in etkisiyle HepG2 kanser hücresindeki inhibisyon yüzdesi 34
Çizelge 4.3 *T. terrestris*'in etkisiyle HeLa kanser hücresindeki inhibisyon yüzdesi 34
Çizelge 4.4 *T. terrestris*'in etkisiyle HC normal hücresindeki inhibisyon yüzdesi 35
Çizelge 4.5 Kanser hücre dizileri HepG2, HeLa ve normal hücre dizisi HC'deki IC50 konsantrasyon değerleri 36
Çizelge 4.6 *T. terrestris*'in bazı bakteri türleri üzerindeki inhibisyon etkisi 39
Çizelge 4.7 Diş eti iltihabından kaynaklanan bakteri suşları 40
Çizelge 4.8 Mutans streptokokların *T. terrestris*'in farklı konsantrasyonlarına karşı duyarlılıkları 41
Çizelge 4.9 Mutans streptokokların antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıkları 41
Çizelge 4.10 *T. terrestris* ekstraktlarının ve antimikrobiyal ajanların *Streptococcus mutans*'ın canlılık sayısı üzerindeki etkileri 43
Çizelge 4.11 Farklı sürelere göre mutans streptokokların SS değerleri 44
Çizelge 4.12 Farklı sürelere göre mutans streptokok sayıları arasındaki istatistiksel fark 44
Çizelge 4.13 Farklı sürelerinde temsilciler arasındaki istatistiksel fark (Mutans streptokok için) 45

1. GİRİŞ

Diş çürüğü, dişlerin mineralize dokusunu etkileyen mikrobiyal bir hastalıktır. Hastalık, özellikle gelişmekte olan ülkelerde artan prevalans ve şiddeti ile farklı popülasyonlarda yayılmaktadır. Diş çürüklerinin önlenmesi; çoklu florür tedavisi, şeker alımının kısıtlanmasını içeren diyet modifikasyonu ve bireysel ve profesyonel ağız hijyeni önlemleri yoluyla diş plağının kontrolü ile dişlerin asit saldırılarına karşı direncini artırmaya yöneliktir (Xiang *et al.* 2019).

Olağan ağız hijyeni önlemleri, antimikrobiyal ajanların kullanımı yoluyla kimyasal plak kontrolüne ek olarak mekanik plak kontrolünü (diş fırçası ve diş arası temizlik) içermektedir. Bu maddeler bakteriyostatik veya bakterisidaldir ve iyi ağız hijyeni için olağan önlemlere ek olarak kullanılır (Yan *et al.* 2021). Karyojenik bakteriler üzerindeki özgüllüklerini tam olarak mutans streptokoklar üzerinde test etmek için insan ve deneysel çalışmalar yapılmıştır. Ancak bu ajanların mutans streptokok üzerindeki etkileri ve virülans faktörleri ile ilgili bilgi eksikliği devam etmektedir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda klorheksidin ve sodyum florür, klorheksidin ve çinko gibi kombine maddeler test edilmemiştir.

Tribulus terrestris tozunun kullanım ekstraksiyonunun, oral bakteriler üzerindeki etkisini test etmek için farklı bir yöntemle hazırlanmıştır. *T. terrestris* ekstraktının karyojenik bakteriler üzerindeki özgüllüğüne ilişkin çalışmalar yetersizdir (Zamaraev *et al.* 2017). Bu konuda yapılan bir çalışma bulunabilmiştir. Bu çalışmanın sonuçları, *T. terrestris*'in kimyasal bileşeninin bu bakterilerin büyümesini engelleyebileceğini göstermiştir. Ancak *T. terrestris* ekstraktının bu bakterilerin karyojenik determinantı üzerindeki etkisine ilişkin bilgi eksikliği hala devam etmektedir. *T. terrestris*'in antimikrobiyal etkisinin diğer antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırıldığında test edilmesi, ağız hastalıklarının önlenmesi için diş hekimliği uygulamalarında rutin olarak kullanılmasına yol açabilir.

Tüm bu bilgiler doğrultusunda bu çalışmada, mitotik indekste *T. terrestris* ekstraksiyonunun insan lenfositlerindeki etkisinin incelenmesi, *T. terrestris* bitkisinin

ekstraksiyonunun kanser ve normal hücre dizisi üzerindeki etkisi, farklı konsantrasyonlarda *T. terrrestris* ekstraktlarının antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırmalı olarak in vitro yöntemlerle mutans streptokokların büyümesi üzerindeki etkisinin test edilmesi, *T. terrestris* ekstraktlarının antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırmalı olarak mutans streptokokların tutunma kabiliyeti üzerindeki etkisinin in vitro incelenmesi, *T. terrestris* ekstraktının ve diğer ajanların mutans streptokok üzerindeki inhibitör etkisinin bir grup gönüllü arasında karşılaştırılması amaçlanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Diş Çürükleri

Diş çürüğü, mineralize diş dokularının (mine, dentin ve sement) bakteriyel bir hastalığı olmakla beraber, bu hastalığa neden olmak için mikroorganizmalara ihtiyaç duyulduğu anlamına gelmektedir. Bu organizmaların, karbonhidratların fermantasyonu yoluyla asit üretme yeteneğine sahip olması, bu dokuların mineral kısmının demineralizasyonu ve ardından organik matrisin parçalanması ile sonuçlanmaktadır (Namba *et al.* 1982).

Diş çürüğü, üç ana faktör grubunun karşılıklı ilişkisine bağlı olan multifaktöriyel bir hastalık olup, bunlar arasında diş plağı (mikrobiyal), karbonhidrat (substrat) ve hassas dişler (konakçı faktörler) yer almaktadır. Diş çürüğünün oluşabilmesi için bu faktörlerin aynı anda mevcut olması gereklidir. Tükürük, diş çürüğü ile ilgili olarak küçük bir konakçı faktör olarak kabul edilmekle beraber, sağlıklı ağız dokusunun korunmasında hayati rol oynayan kompleks bir sıvı olup, ağız boşluğu, konuşma, tat ve antibakteriyel etkisinin yanı sıra gıdaların yağlanması, sindirim gibi birçok özelliğe sahiptir. Tükürüğün tampon sistemi, plak bakterilerinin asit üretimini takiben pH'daki değişikliklerin zararlı etkisine karşı korunmada önemli bir rol oynar. Ayrıca tükürük, kalsiyum, fosfor, florür vb. iyonlar için bir rezervuar görevi görür ve bunların tümü dişlerin remineralizasyonunu kolaylaştırır. Tükürüğün işlevleri, bileşimine ve akış hızına bağlıdır (Klein *et al.* 2010).

2.2 Diş Plağı

Diş plağı, çürük etiyolojisi ile ilgili en önemli faktörlerden biri olarak kabul edilmekle beraber, dişlere veya diğer katı ağız yapılarına yapışmış bir bakteri topluluğu olup, dişlere yapışan, esnek, sarı-grimsi bir maddedir. Diş plağının oluşum hızı ve yeri bireyler arasında değişebilir ve buna ek olarak diyet, yaş, ağız hijyeni, diş dizilimi, sistemik hastalık ve tükürük konak faktörleri gibi farklı değişkenlerden etkilenir. Ayrıca aynı bireyde bir bölgeden diğerine ve aynı dişte bir yüzeyden diğerine birikim açısından farklılık gösterebilir (Matsumoto-Nakano *et al.* 2011).

Diş plağı kütlesinin %90'dan fazlasını mikroorganizmalar oluştururken, geri kalan kısmı tükürük proteinlerinden ve mikrobiyal ekstraselüler polisakkaritlerden türetilen organik matriks oluşturur. Plak; Streptokoklar, Fakültatif *difteroidler,* Anaerobik difteroidler, Pepto streptokoklar, *Veillonella, Bacteroides, Fusobacterium, Neisseria, Vibrio* gibi mikroorganizma gruplarını içermektedir (Ooshima *et al.* 2000).

Temiz bir diş yüzeyi ağız ortamına maruz kaldığında birkaç dakika içinde pelikül adı verilen amorf bir organik film ile kaplanır. Bu, esas olarak tükürükten türetilen bir glikoproteinden oluşur ve belirli bakteri türlerinin diş yüzeyine yapışmasına yardımcı olabilir. Başlangıçta zarda kolonize olan organizmalar ağırlıklı olarak kokaldir, bunların büyük bir kısmı Streptokok olsa da ancak bunların sadece %2'si mutans streptokoklardır. Birkaç gün içinde plak kalınlaşır ve farklı mikroorganizma türlerinin bir karışımı ortaya çıkar. Plakta 352'den fazla farklı bakteri türünün bulunabileceği tahmin edilmektedir.

Bakteri plağı tarafından asit üretimi, sıvı ortamın pH'sının kritik pH değeri olan 5,5'in altına bile düşmesine neden olabilir, bunun sonucunda, hidroksiapatit kristalitlerinin iyonik bileşenlerine çözünmesine neden olarak sıvı ortamın hidroksiapatite göre yetersiz doymasına neden olur. Artan basınç gradyanına yanıt olarak, kalsiyum ve fosfat iyonları dişten çevreye doğru difüze olur.

2.3 Karyojenik Bakteriler

Mikroorganizmaların çürük sürecinde önemli bir rol oynaması, çok sayıda gözlemsel ve deneysel çalışma tarafından onaylanmıştır. Bununla birlikte, çürük sürecine her bakteri türü dahil değildir. Araştırmalar baskın tipin mutans streptokok, *Lactobacilli, Actinomyces* ve *Streptococcus sangius* olduğunu göstermiş olup, çalışmalar, bu bakterilerin karyojenik determinantlarının değişebileceğini göstermiştir. Hayvan, in vitro ve insan çalışmaları, özellikle mutans streptokoklar ve çürük gelişimi arasındaki ilişkiyi doğrulamıştır. İnsanlarda yapılan kesitsel çalışmalar, diş çürüğünün şiddetinin artmasıyla birlikte tükürük veya plakta bu mikroorganizmaların sayısının arttığını göstermiştir (Woo 2001). Boyuna çalışmalar, mutans streptokokların sayısında zaman içinde bir artışın, çürüğün başlangıcı ve ilerlemesi ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1 İnsanların ağız boşluklarındaki seçili habitatlarda normal olarak bulunan başlıca bakteri cinsleri ve türleri

Organizma	**Tükürük**	**Dil**	**Diş plağı**
Streptococcus			
S. mutans	V[b]	V[c]	V
S. sanguis	P	V	P
S. oralis	V	V	P
S. mitis biovar 1	V	V	V
S. mitis biovar 2	V	P	V
S. gordonii	V	V	V
S. salivarius	P	V	V
S. anginosus	V	V	V
S. vestibularis	V	V	V
Actinomyces			
A. naeslundi genosp 1	V	V	P
A. naeslundi genosp 2[d]	V	V	P
A. odontolyticus	P	V	P
Neisseria species	P	P	P
Corynebacterium			
C. matruchotta	V	V	P
Rothia			
R. dentocariosa	P	V	P
Stomatococcus	P	P	V
Lactobacillus			
L. casei	V	V	V
L. fermenti	V	V	V
L plantarum	V	V	V
Haemophilus	V	V	P
Veillonella	P	P	P
Fusebacterium	P	P	P
Prevotella			
P. melaninogenica	V	P	P
P. intermedia	V	P	P
Leptotrichia	V	V	P
Eubacterium	V	V	P
Bacteroides	V	V	P

a) Organizmaların listesi tam olmamakla beraber, diş plağı yalnızca supragingival bakteri topluluklarını ifade etmektedir. b) P=genellikle mevcut c) V=değişken izolasyon d) Daha önce *A. viscousus* 2

2.4 Streptokoklar

2.4.1 *Streptococcus* cinsi

Streptokoklar, çok çeşitli özelliklere ve belirli koşullar altında bağımsız patojenite yeteneğine sahip olan büyük ve karmaşık bir bakteri grubunu oluşturmaktadır. İnsan ağız

boşluğunda, streptokoklar oral enfeksiyonlarda en sık görülen mikroorganizmalardır. *Streptococci* cinsi *Lactobacillaceae* familyasının bir üyesi olmakla beraber, *Pyogenic, Lactic, Viridance* ve *Enterococcal* olmak üzere dört ana gruba ayrılır. Klasik bir gruplandırma yöntemi, kanlı agar plaklarında eritrosit lizisine dayanır ve streptokokları üç gruba ayırır:

- Beta hemolitik, kanlı agarda temiz bir hemolitik bölge oluşturur.
- Alfa hemolitik, kanlı agarda yeşil bir hemolitik bölge oluşturur.
- Gama hemolitik, kanlı agar üzerinde etki yaratmaz.

2.5 Mutans Streptokoklar

Familya olarak *Lactobacillaceae* familyasına, cins olarak *Streptococcus* cinsine ve sınıf olarak *Streptococceae* sınıfa aittirler (Shouji *et al.* 2000). Bu bakteriler ilk olarak insan çürük lezyonlarından izole edilmiş ve morfolojilerindeki farklılıklardan dolayı *Streptococcus mutans* olarak adlandırılmıştır. Mutans streptokokların özellikleri, kısa veya orta zincirli, hareketsiz ve katalaz negatif Gram pozitif koklardır. Kanlı agarda üreyen suşlar başlangıçta gama hemolitik tipten 24-48 saat inkübasyondan sonra alfa-hemolitik hale gelmektedir. Mitis Salivarius Agar'da dışbükey pulvinat (yastık şeklinde) koloniler olarak büyümüş olup, bu koloniler buzlu cam (pürüzlü) veya pürüzsüz yüzeylerle opak olmakla beraber, dairesel koloniler 0,5-1,5 mm çapındadır. Diğer oral streptokoklardan farklı olarak, mutans streptokokların çoğu, düşük konsantrasyonlarda sülfonamid varlığında kültürlenebilir.

2.5.1 Mutans streptokokların yapışması

Bazı karyojenik bakteriler fiziksel olarak dişlerin çukurlarında ve çatlaklarında, diş tedavisinde kullanılan cihazlarda, çürük lezyonlarında, dişeti çatlaklarında ve plak matrisinin kendisinde tutulur. Laktobasiller açık çürük lezyonlarında ve ortodontik bantların çevresinde bulunurken, *Spirochetes, Vibrios* ve *Bacteroid* suşları ağırlıklı olarak dişeti çatlaklarında bulunur. Mutans streptokokların en önemli faktörlerinden biri dişin

pürüzsüz yüzeyine yapışabilmeleridir. Bu yetenek, sükroza bağımlı olmayan adezyon olarak bilinen ilk kolonizasyon ve adezyon veya sükroza bağlı mekanizma olmak üzere iki farklı mekanizmada sınıflandırılabilir (Otten *et al.* 2011).

2.6 Kemoprofilaktik Ajanlar

Bir kemoprofilaktik ajan, diş plağı bakterilerinin metabolik aktivitesine veya yapışmasına müdahale etme kabiliyetine sahip herhangi bir bileşiktir. Oral mekanik profilaktik prosedürlere ek olarak kullanılmak üzere formüle edilmişlerdir. Bununla birlikte, erken çürük lezyonlarının invaziv olmayan tedavisinde kullanıldığında, bu ajanlar kemoterapötik olarak kabul edilir. Başka bir deyişle, diş çürüklerinin önlenmesi ve/veya tedavisi için kullanılırlar (Shimotoyodome *et al.* 2007). Kemoprofilaktik ajan, ortodontik apareyleri olan hastalarda, çürüğe eğilimli yetişkinlerde, düşük tükürük akış hızı ve/veya kserostomisi olanlarda ve engelli durumdaki hastalarda olduğu gibi, normal mekanik fırçalamaya yardımcı olarak kullanılır ve onun yerini almaz. Ancak bazı durumlarda ağız hijyeninin kontrolü için oral mukoza ve dişeti enfeksiyonu, periodontal veya oral cerrahi ve iyileşme döneminde ve çene kırıklarında intermaksiller fiksasyon durumunda tek başına kullanılabilirler.

Kemoprofilaktik ajanların kullanımının ilk olarak, yaklaşık MÖ 2700'de Çin tıbbında görülmektedir. Bu tür ajanların kullanımı; jeller, gargaralar, diş temizleme ürünleri, çiğneme sakızları ve pastillerin yanı sıra sürekli salım sağlayan cihazlar ve cilalardır (Yamanaka-Okada *et al.* 2008).

2.6.1 Kemo ajanının türleri ve sınıflandırılması

Farklı sınıflandırmalara sahip farklı kemoprofilaktik ajan türleri vardır. Kimyasal bileşimlerine veya etki mekanizmalarına göre sınıflandırılabilirler. Genel olarak, bu ajanların farklı etki biçimleri vardır, bazıları bakteri kolonizasyonunu ve/veya büyümesini inhibe edebilir veya bakteriyel enzimlerin hidrolitik etkisiyle olgun plağın

bozulmasına neden olabilir. Diğer ajanlar ise mikrobiyal metabolizmanın baskılanmasına neden olabilir ve bu durum da biyokimyayı etkileyebilir (Choi *et al.* 2001).

Kemoprofilaktik ajanlar, antibakteriyel olarak oral florayı azaltan ve diş çürüğünün önlenmesine yardımcı olan florürlü gargaralar olarak sınıflandırılmıştır. Koo *et al.* (2000) yapmış oldukları çalışmada bunları antiseptiklerin, antibiyotiklerin, enzimlerin tekli veya kombinasyonunun, bakteriyel bağlanmaya müdahale eden ajanların ve enzimatik olmayan, denatüre edici veya modifiye edici ajanlar dahil olmak üzere diğer grupların etki mekanizmasına göre kategorize etmiştir. Ayrıca, Thylstrup and Fejerskov (1996), bunları kimyasal bileşime göre ikiye ayırmıştır:

- Katyonik ajanlar: Klorheksidin içermektedir.
- İyonik ajan: Sodyum dodesil sülfat gibi.

2.7 Klorheksidin

İlk olarak 20. yüzyılın ortalarında yara antiseptiği, genel cilt temizleyici ve sağlık personeli için genel bir dezenfektan olarak kullanılmıştır. Ayrıca hastanın ameliyat öncesi hazırlığında ve cerrahi ovma olarak da kullanılmıştır. Oftalmik ürünlerde koruyucu, üroloji ve jinekolojide antiseptik olarak kullanılmıştır (Hussain *et al.* 2009).

Klorheksidin ayrıca karyojenik bakterileri azaltmadaki etkisi açısından da test edilmiştir. Çalışmalar, profilaktik bir rejimle birlikte profesyonel klorheksidinin uygulanmasının diş çürüğü insidansını azaltabileceğini göstermiştir.

2.8 Sodyum Florür (NaF)

Yılda üç kez %0,1 sodyum florür uygulamalarının 10-13 yaş arası çocuklarda çürük vakalarında %33 azalma sağladığı için sodyum florür çözeltisi kullanılmıştır. 1943'te 3, 7, 11 yaşından 13 yaşına kadar olan çocuklara çürük oluşumunu önlemek için sodyum florür önerilmiş, bu işlemde kullanılan %2'lik NaF solüsyonu daimi dişlerde çürük

azaltma oranını %40'a ulaştırmıştır. 1960 yılında, nötr sodyum florür çözeltisinin düzenli kullanımının çürük insidansını azalttığını gösteren raporlar ortaya çıkmıştır ve bu raporlara göre ya günlük %0,05 (225 ppm florür) ya da haftalık %0,2 (900 ppm florür) içeren çözeltiler kullanılmıştır.

2.9 Ajan Kombinasyonları

Plak, çeşitli bakteri türlerinin toplanmasından oluşur. Ağız florası, yüzlerce türü temsil eden milyonlarca mikroorganizmadan oluşur. Bu nedenle tek bir ajanın kompleks floraya karşı etkili olması olası değildir, bu yüzden iki veya daha fazla ajanın kombinasyonları kemoprofilaktik ajanların etkinliğini artırabilir ya da yan etkilerini azaltabilir. Metal iyonlarının sürfaktanlarla çeşitli kombinasyonları değerlendirilmiştir. Bunlar, metal iyonları Cu^{2+}, Zn^{2+} ve klorheksidin, Zn^{2+} ve sodyum dodesil sülfat ile kombinasyon halinde olan heksetidindir (CLSI 2009). Düşük konsantrasyonlarda CHX ve NaF'nin bir kombinasyonu, antibakteriyel etkileri açısından çalışmalar ile test edilmiştir. Bununla birlikte, karyojenik bakterilerin kombine ajanlarının etkinliği konusunda bir tartışma söz konusudur. Çeşitli çalışmalar, bu kombinasyonun mutans streptokokları azaltmada etkili olduğunu göstersede, Hong-Keun *et al.* (2011) yapmış oldukları çalışmada bu kombinasyonun mutans streptokoklar ve laktobasiller üzerinde hiçbir etkisinin olmadığını göstermiştir.

2.10 Diş Eti İltihabı ve Bakteriler

Ağız boşluğu birçok bakteri türünü içermekte olup, ayrıca sağlık ve hastalıklardaki bileşimi nedeniyle son yıllarda araştırmalarda önemli bir rol oynayan bol ve çok sayıda mikrobiyal topluluğun yeri olarak kabul edilmektedir (Moura *et al.* 2018). Periodontitis, dişlerin periodonsiyumunun akut veya kronik iltihabı olmakla beraber, kötü ağız sağlığının bir sonucu olarak diş yüzeylerinde bakteri birikmesinden kaynaklanan mikrobiyal biyofilmden kaynaklanır (Chiodoni *et al.* 2019). Ağız boşluğunda bulunan birçok bakteri türü, esasen anaerobik veya fakültatif anaerobik Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler olabilir ve bunlar, hareketli olmayan, anaerobik bir Gram olan *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) gibi periodontal patolojiye neden olabilir.

Negatif bakteriler, bu tür bakteriler periodontite neden olan anahtar patojen olarak kabul edilir (Mukherjee 2019). Bir streptokok mutans bakterisi (*S. mutans*), diş çürüğüne neden olan ana etyolojik patojen olarak kabul edilen ve aynı zamanda periodontitisin nedenlerinden biri olarak kabul edilen Gram-pozitif fakültatif anaerobik bir bakteridir. Hossan *et al.* (2018) tarafından yapılan araştırmalar, *Streptococcus mutans*'ın diş eti iltihabından izole edilen çok sayıda bakteriye sahip olduğunu göstermiştir.

2.10.1 Diş eti iltihabının tedavisi

Antibiyotikler 1970'lerin sonlarında periodontitis tedavisinde kullanılmaya başlanmış olup, aynı zamanda bakterilerin periodontal hastalıklarla ilişkili olduğu bulunmuştur (Hu *et al.* 2021). Antibiyotikler, diş etini istila eden patojenik bakterilerin yok edilmesinde çok önemli ve hayati bir rol oynamakta olup, Periodontitis tedavisinde kullanılan en yaygın antibiyotikler amoksisilin, metronidazol, tetrasiklin, gentamisin ve azitromisindir (Saquib *et al.* 2019). Ayrıca, ağız bakımını daha iyi hale getirmek için gargaralar kullanılır. Gargaraların etkisi, bakterilerin yapışmasını, kolonizasyonunu ve metabolik aktivitesini inhibe ederek temsil edilir. Klorheksidin (CHX), ZAK gargara (Klorheksidin Glukonat %0,12, Sodyum Florür %0,05 ve fenol ve NAF gargara (Sodyum Florür)) gibi çeşitli ağız hastalıklarının etken maddesi olan bakteri, mantar ve virüsler üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip birçok gargara türü vardır (Jiang *et al.* 2020).

2.11 *Tribulus terrestris L.* Bitkisi

Tribulus terrestris L. bitkisi Şekil 2.1'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1 *Tribulus terrestris L.* bitkisi

2.11.1 *Tribulus terrestris L.*'nin sınıflandırılması ve kimyasal bileşimi

Tribulus terrestris'in sınıflandırması Çizelge 2.2'de gösterilmiştir (Kianbakht and Jahaniani 2003).

Çizelge 2.2 *Tribulus terrestris*'in sınıflandırması

Alem	**Bitki**
Filum	*Phanerogams*
Sınıf	*Dicotyledonae*
Takım	*Giraniales*
Familya	*Zygophyllaceae*
Cins	*Tribulus*
Tür	*terrestris Linn.*

Tribulus terrestris L. (Zygophyllaceae), dünya çapında yetişen, tek yıllık bitkidir. Meyveleri dikenlerle kaplı olmakla beraber, geleneksel olarak çeşitli kültürlerde afrodizyak olarak bilinir.

Tribulus, bazı hormonların düzeyini artırabilecek kimyasallara sahiptir. Ancak insanlarda erkeklik hormonlarını (testosteron) arttırdığı görülmemektedir. *Tribulus,* keskin dikenleri bisiklet lastiklerini patlattığı için delici sarmaşık olarak da bilinir. Özellikle subtropikal bölgede, Hindistan, Çin, Irak ve diğer ülkelerde halk hekimliğinde cinsel iktidarsızlık, ödem,

karın şişkinliği ve kalp-damar hastalıklarına karşı kullanılmaktadır. *T. terrestris* ekstrakları içeren müstahzarlar, motor aktivite, kas tonusu üzerinde genel bir uyarıcı etki ve canlılık için onarıcı tonik olduğu iddiasıyla ABD'de gıda takviyesi olarak satılmaktadır. Aslında, *T. terrestris* müstahzarları esas olarak sporda performansı artırmak ve w1–3x iktidarsızlık tedavisi için kullanılır. Bu bitkide, saponinler w4–11x, flavonoidler w12x, amidler ve alkaloidler w2,13x olmak üzere çok çeşitli bileşiklerin meydana geldiği bildirilmiştir. Birçok çalışma, saponinlerin *T. terrestris* ekstraktlarının biyolojik aktivitelerinden sorumlu bileşikler arasında yer aldığını göstermiştir (Chhatre *et al.* 2014). *T. terrestris*'ten izole edilen steroidal saponinler öksürük ilacı ve böcek kovucu olarak da kullanılır. Bu bitkinin farklı organları çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için kullanılmaktadır. Yapılan çalışmalar, düz kaslar üzerinde hipotansif ve kardiyak depresan etkileri ve kasılma aktivitelerini ortaya çıkarmıştır (Zhu *et al.* 2017). Küçük öz bezeli, 10-60 cm uzunluğunda, tüylü veya ipeksi tüylü bir çalıdır. Yapraklar karşılıklı, genellikle eşit değildir, beş ile sekiz çift kulakçık, eliptik veya dikdörtgenimsi-mızrak şeklindedir. Çiçekler sarı renklidir. Karpel meyveleri karakteristik yıldız şeklinde, biraz yuvarlak, basık, beş köşeli ve çok açık sarı renkli dikenlerle kaplıdır. Her lokusta, aralarında enine bölmeler bulunan birkaç tohum vardır (Semerdjieva and Zheljazkov 2019). Tohumlar doğada yağlıdır. Kök taze iken ince, lifli, silindirik, sıklıkla dallı, çok sayıda küçük kökçük taşıyan ve açık kahverengi renktedir. Meyveler ve kökler çoğunlukla çeşitli rahatsızlıkları tedavi etmek için halk ilacı olarak kullanılır. Kök parçalar halinde, 7-18 cm uzunluğunda ve 0,3-0,7 cm çapında, silindirik, lifli, sık dallı, çok sayıda küçük kökçük taşıyan, sert, odunsu, sarıdan açık kahverengiye kadar renkte olup, küçük nodüller varlığı nedeniyle yüzeyi pürüzlü, kırık lifli, aromatik kokulu, tatlımsı buruk tatlıdır. *Tribulus terrestris L.* çeşitli biyolojik olarak aktif ikincil metabolitler içermekte olup, ilgili araştırmalar, *Tribulus* bitkisinin terpenoidler, özellikle alkaloidler, steroller ve fenolik bileşikler açısından zengin olduğunu göstermiştir (Al-Bayati and Al-Mola 2008). *Tribulus* tohum yağındaki yüksek linoleik asit içeriği, bazı kimyasal üretimler için çok önemlidir. *T. terrestris*, pro-oksidan aktivitesinden, anti-oksidan aktivitesinden, hücre farklılaşmasının düzenlenmesinden veya hücre döngüsünün durdurulmasından kaynaklanan antikanser etkiye sahip olan β-karoten gibi en zengin karotenoid kaynaklarından biridir. Yapılan bir çalışma, *T. terrestris* yapraklarının terpen ve fenilpropanoid uçucular gibi birçok kimyasal bileşik, çeşitli fenol sınıfları, alkaloidler ve diğer bileşikleri içerdiğini, bu bileşiklerin hepsinin antibakteriyel ve karınca tümörü

aktivitelerine sahip olduğunu kanıtlamıştır. *T. terrestris*, nikotin, nornikotin, anabazin, nitrat, sorbitol, miyosmin, anatabin dahil olmak üzere çok sayıda bileşik içermektedir (Soleimanpour *et al.* 2015).

2.11.2 *T. terrestris*'in tıbbi önemi

T. terrestris, ülser, öksürük, yılan ısırığı, solunum yolu enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, astım, diş ağrısı tedavisi ve mantar ve bakteriyel enfeksiyonlar gibi insan enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Son araştırmalar, *T. terrestris* L.'den izole edilen Cembranoid tipi diterpenlerin (CBD'ler) iyi antimikrobiyal, antitümör ve nöroprotektif aktiviteler sergilediğini kanıtlamıştır (Kostova and Dinchev 2005). α-CBD, hücre klonlarının oluşumunu azaltmış, mitozun S fazında hepatoselüler karsinom hücrelerinin proliferasyonunu, değişen hücre şeklini ve yapısını, membran geçirgenliğindeki değişikliği, değiştirilmiş gen ekspresyonunu ve daha sonra programlanmış hücre ölümünü indüklemiştir. Tütün yapraklarından izole edilen flavonoid, MCF-7 hücreleri üzerinde sitotoksik aktiviteye sahiptir ve insan meme kanseri tedavisi için potansiyel bir ajan olabilir. *T. terrestris* özlerinin çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterileri baskıladığı kanıtlanmıştır (Mohammed 2008).

3. MATERYAL VE METOT

3.1 Materyal

3.1.1 Araç ve gereçler

Bu araştırmada kullanılan araç ve gereçler Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 Araç ve gereçler

Araç ve Gereçler	**Üretici Firma**	**Menşei**
96 kuyucuklu mikrotitre plakası	Santa Cruz	ABD
24 kuyucuklu mikrotitre plakası	Santa Cruz	ABD
Spektrofotometre	Shimadzu	Japonya
Buzdolabı	Indesit	Türkiye
ELISA	Quik Fit	Almanya
Soxhlet	Sci-plus	İngiltere
Elektroforez	Advance	Japonya
Nükleik asit ekstraktörü	-	Türkiye
Mikro santrifüj	Hermal	Almanya
Soğutma santrifüjü	Hettich	Almanya
Nanodrop spektrofotometre	Thermo Scientific	ABD
Geleneksel PCR	Agilent MX3005P	Almanya
Gerçek zamanli PCR	Agilent MX3005P	Almanya
Damıtıcı	Kottermann	Almanya
CO_2 inkübatörü	Gallenkamp	İngiltere
Fırın	Memaret	Almanya
Doku kültürü için plastik şişe	Falcon	ABD
Laminar akiş başliği	K & K	Kore
Dijital mikroskop kamera	Lamin	ABD
Döner buharlaştırıcı	Memmert	Almanya
Derin dondurucu	Electron operation	ABD
Ters mikroskop	Olympus	Japonya
Vorteks	Hermal	Almanya
Floresan mikroskop	Lumin	ABD
Manyetik karıştırıcı	K & K	Kore
Otoklav	Gallenkamp	Ingiltere
Hassas terazi	Sartorius	Almanya
Filtre ünitesi 0,22 µm	Microlab Scientific	Çin
Swab medyası	BDH	İngiltere
Whatman filtre kâğıdı No.1	GE Healthcare	Çin

3.1.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler

Bu araştırmada kullanılan biyolojik ve kimyasal malzemeler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2 Biyolojik ve kimyasal malzemeler

Malzemeler	**Üretici Firma**	**Menşei**
Kültür besiyeri (RPMI-1640)	Chemical Point	Almanya
Fitohemaglutinin (PHA)	Medicago	Isveç
Di-sodyum hidrojen-O-fosfat (Na_2HPO_4)	Quali Kems	India
Mono-potasyum fosfat (KH_2PO_4)	GCC	Ingiltere
Potasyum klorür (KCI)	Alpha Chemika	Hindistan
Fetal sığır serumu (FBS)	Avonchem	Ingiltere
Giemsa lekesi	Chemical Point	Almanya
Etanol	Sigma	ABD
Metanol	Chem-Lab	Belçika
Kloroform	Chem-Lab	Belçika
Petrol eteri	Universal reagent	Hindistan
Kolşisin	Avonchem	Ingiltere
Asetik asit	Avonchem	Ingiltere
Amonyak (NH_3)	Hi-media	Hindistan
Sodyum bikarbonat	BDH	Ingiltere
Tripsin\Versine	Sigma	ABD
Kristal menekşe	BDH	Ingiltere
Tripan mavisi lekesi	BDH	Ingiltere
Fosfat tampon salin (PBS)	Sigma	ABD
Formaldehit	Fluka	Isviçre
Kanlı agar	Mast Group	Ingiltere
Mueller Hinton agarı	Hi-media	Hindistan
MacConkey agarı	Bio-mark	Hindistan

3.2 *T. terrestris* Bitkisinden Ekstrakt Hazırlanması

Bitki ekstrakt, Harborne (1973)'e göre aşağıdaki gibi hazırlanır:

- 10 g kuru bitki alınır ve (Yüksük) adı verilen gözenekleri olan kâğıttan yapılmış silindirik bir kaba konur ve Soxhlet'te bunun için belirlenmiş yere konur.
- Üzerine 500 mL metanol %70 eklenir ve 60°C'de 5 saat ekstraksiyon yapılır.

- Metanolik ekstraktı, Petri kaplarına dökülür ve ardından ekstrakt, oda sıcaklığında bir rotor buharlaştırıcı kullanılarak buharlaştırılır ve ardından Whattman No. 1 filtre kâğıdı ile süzülür.
- Ayırma hunisinde her 100 mL ekstrakt için 100 mL kloroform ilave edilir, pH'ı ayarlamak için amonyak ilave edilerek pH'nın 8 olması sağlanır ve 24 saat bekletilir. İki katman elde edilir, üst tabaka kloroform tabakası, alt tabaka ise petrol eteri ile eşit oranlarda karıştırılıp 0,22 mm filtre ünitesi ile filtre edilmiş alkaloit içeren sulu tabakadır (Cannell 1998).

3.3 Sitotoksisite Testi için Kullanılan Konsantrasyonlar

Sitotoksik testi için kullanılacak olan konsantrasyonlar standart konsantrasyondan elde edilmiştir. Buna göre, kademeli seyreltmeler yapmak için serumsuz RPMI-1640 besiyeri kullanılmış ve toksisite testinde kullanılmak üzere 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL'lik beş konsantrasyon hazırlanmıştır.

3.4 Lenfositlerde Sitotoksisite Testi için Kullanılan Çözelti

Çözeltiler Yaseen (1999)'a göre ve Çizelge 3.3'te gösterildiği gibi hazırlanmıştır.

Çizelge 3.3 Lenfositler üzerinde sitotoksisite testi için kullanılan çözeltiler

Çözelti	Hazırlama Yöntemi
Tam Büyüme Besiyeri	Buzağı fetal serum ilavesiyle RPMI-1640 besiyeri kullanılmıştır. pH 7,2'ye ayarlanmış, daha sonra besiyeri 0,22 µm membran filtreler kullanılarak sterilize edilmiştir. Besiyeri, kirletici içermediğinden emin olmak için 37°C'de üç gün süreyle inkübe edilmiş, daha sonra tüp başına 5 mL steril tüplere dökülerek -20°C'de tutulmuştur.
Fetal Buzağı Serumu	Irak Biyoteknoloji Şirketi tarafından hazırlanmıştır.
Fitohaemaglutinin (PHA)	2,5 mg PHA 4 mL steril suda çözülüp 0,1 mL alınarak 0,6 mL steril suya ilave edilerek eş zamanlı olarak PHA hazırlanmıştır. Daha sonra 5 mL kültür besiyeri içeren her besiyeri tüpüne 0,1 mL alınarak nihai konsantrasyon 15 µg/mL olacak şekilde ilave edilmiş ve -20°C'de saklanmıştır
Kolşisin	0,5 mg kolşisin tozu 10 mL distile suda eritilir ve ışıktan korunur.
Hipnotik çözelti	1,1175 g KCl, 200 mL saf suda 0,075 M konsantrasyona gelinceye kadar çözülerek hipotonik bir çözelti hazırlanır ve kullanılıncaya kadar 4°C'de bekletilir.

Çizelge 3.3 Lenfositler üzerinde sitotoksisite testi için kullanılan çözeltiler (Devam)

Çözelti	Hazırlama Yöntemi
Fiksatif Çözelti	Mutlak metanolün buzlu asetik asit ile 1:3 hacim oranında eş zamanlı karıştırılmasıyla hazırlanır ve soğuk olarak kullanılır.
Sorensen Tampon Çözeltisi	Sorensen tampon çözeltisi, 7,08 g Na_2HPO_4'ün 6,7 g KH_2PO_4 tuzu ile 1000 mL distile suda çözülmesiyle hazırlanır ve kullanılıncaya kadar 4°C'de tutulur.
Giemsa Boyama	2 g Giemsa boyama tozunu 100 mL mutlak metil alkol içinde manyetik karıştırıcı kullanarak 72 saat çözülür, sonra boyayı Whattman No.1 filtre kâğıdı kullanarak süzülür. Hava geçirmez, opak bir şişede saklanır. Bu çözelti stokta saklanır ve kullanım için 1 mL boya 4 mL Sorensen tamponu ile karıştırılıp seyreltilerek hazırlanır.

3.5 Kan Örneği Toplama

İnsan venöz kanı, kanın pıhtılaşmasını önlemek için önceden heparinle yıkanmış 5 mL'lik bir şırınga kullanılarak alınmıştır. Örnekler 20-45 yaşlarında görünüşte sağlıklı kişilerden toplanmış ve alınan kan örnekleri eş zamanlı olarak kullanılmıştır.

3.6 *T. terrestris* Ekstraksiyonunun İnsanların Mitotik İndeksine Etkisinin İncelenmesi

Ekstraktın farklı konsantrasyonlarda lenfositlerin mitotik indeksi üzerindeki etkisi, Verma and Babu (1995) tarafından yapılan çalışmada belirtilen yöntem kullanılarak incelenmiştir.

3.7 *T. terrestris* Ekstraktlı Kan Kültürü

Ekstrakt, karışımın nihai hacmi 5 mL oluncaya kadar tam RPMI-1640 kültür besiyeri içeren hazırlanmış kültür tüplerine 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda ilave edilmiş ve her konsantrasyon için üç tekrar yapılmıştır. Sonra 5 mL'lik şırınga kullanılarak her bir tüpe 0,5 mL kan ilave edilmiş, daha sonra 0,1 mL lenfosit ayırıcı ajan (PHA) ilave edilerek besiyeri yavaşça karıştırılmıştır. Ardından 37°C'de eğimli formda 24 saat inkübe edilmiş ve tüpler 12 saatte bir karıştırılmıştır. Herhangi bir ekstrakt eklenmeden bırakılan bir dizi tüp kontrol olarak kabul edilmiştir.

3.7.1 Hücre toplama

Kullanılan 0,1 mL kolşisin, orijinal kültür süresinin bitiminden 150 dakika önce her bir kontrol tüpüne 10 µg/mL konsantrasyonunda eklenmiştir. İşlem gören tüplere kolşisin eklenmezken tüm tüpler tekrar inkübatöre alınmıştır. Daha sonra tüm tüpler 10 dakika 1,500 devir/dk santrifüje yerleştirilmiş, süzüntü atılmış ve kalan çökelti, kültür besiyerinin kalıntıları ile iyice çalkalanmıştır. Her bir tüpe 5-10 mL 0,075 M hipotonik çözelti 37°C'de ısıtılarak yavaş yavaş ve hafifçe çalkalanarak eklenmiştir. Tüpler 37°C benmari yöntemiyle 30 dakika inkübe edilmiş, daha sonra tüpler 1,500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilerek süzüntü atılmıştır.

3.7.2 Fiksasyon

Çökelti iyice çalkalanmıştır. Çalkalama esnasında tüp duvarına birkaç damla soğuk fiksatif ilave edilerek hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır. Örnekler vorkeks ile 30 dakika karıştırıldıktan sonra tüpler 4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.7.3 Yıkama

Tüpler 10 dakika 1,500 devir/dk santrifüje yerleştirildi, süzüntü atıldı ve çöken hücreler bırakıldı. Süspansiyonun berrak rengi ortaya çıkana kadar fiksasyon işlemi tekrarlandı. Çökelti 1 mL fiksatif ile süspanse edildi ve -20°C'de saklandı.

3.7.4 Damlatma

Temiz, soğuk, ıslak ve yağsız cam lamlar hazırlandı ve hücreler iyice karıştırılarak 0,5-1 m mesafeden Pasteur pipeti kullanılarak soğuk lamların üzerine damlatıldı.

3.7.5 Boyama ve mikroskop incelemesi

Lamlar 4:1 oranında hazırlanmış ılık Sorensen tampon çözeltisi ile seyreltilerek hazırlanan Giemsa boyası ile 2-3 dakikada boyandı, sonra Sorensen tamponu ile yıkandı, kurumaya bırakıldı ve ardından King *et al.* (1982)'de belirtilen yönteme göre Mitotik İndeksi (MI) hesaplamak için ışık mikroskobunda incelendi. Metafazdaki hücreler, aşağıdaki Denklem (3.1)'de olduğu gibi, incelenen toplam hücre sayısına (1000) bölündü:

Mitotik İndeks (MI)={Bölünen hücre sayısı\Toplam hücre sayısı 1000}*100 (3.1)

3.8 Doku Kültürü için Kullanılan Çözeltiler

Çözletiler, Gurung and Pandey (2015)'te belirtilen yönteme göre göre hazırlandı (Çizelge 3.4).

Çizelge 3.4 Doku kültürü için kullanılan çözeltilerin hazırlanması

Çözelti	Hazırlama Yöntemi
Sodyum bikarbonat	Çözelti, 4,4 g sodyum bikarbonat monohidrojenin 100 mL damıtılmış suda çözülmesi, sonra çözeltinin bir oksitleyici ile 121°C'de 15 dakika sterilize edilmesi yoluyla hazırlandı ve kullanıma kadar 4°C'de saklandı.
Kültür Besiyeri RPMI-1640	Besiyeri, 10,4 g RPMI-1640 ile 0,5 mg/L Penisilin ve Streptomisin ile 100 mL dana cenin serumu karıştırılarak hazırlandı. Besiyerinin bileşenleri karıştırılarak %4,4 sodyum bikarbonat çözeltisi ilave edildi ve distile su ile hacmi 900 mL'ye tamamlandı. Daha sonra pH 7,2'ye ayarlandı ve distile su ile hacim 1 litreye tamamlandı. Besiyeri, 0,22 µm filtre ünitesi ile sterilize edildi ve kirletici içermediğinden emin olmak için 37°C'de 72 saat inkübe edildi.
Fosfat Tampon Tuz Çözeltisi (PBS)	0,85 g sodyum klorür tuzunun 100 mL distile suda eritilmesi ve geri akışla steril edilmesi ile hazırlandı ve kullanılana kadar buzdolabında saklandı.
Tryisin–Versen çözelrisi	Bu çözelti, 1 gm tripsin/versin tozunun 100 mL distile suda eritilmesi, pH'ı 7'ye ayarlamak için sodyum hidroksit eklenmesi, sonra 0,22 µm filtre ünitesi ile sterilize edilmesi yoluyla kazırlandı kullanılana kadar buzdolabında saklandı.
Kristal menekşe boyama	5 g boya 200 mL mutlak metanol içinde çözüldü, Whattman No. 1 ile süzüldü, daha sonra süzüntüye 50 mL %37 formaldehit eklendi ve hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı.
Tripan mavisi boyama	1 gr boyama 100 mL PBS içinde çözüldü, daha sonra Whatman Paper No 1 kullanarak filtre edildi ve kullanılana kadar 4°C'de saklandı.

3.9 Kanser Hücre Dizileri

Tüm kanser hücre dizileri Irak Kanser ve Tıbbi Genetik Araştırma Merkezi tarafından Deneysel Tedavi Müdürlüğü/Hücre Bankası Birimi tarafından hazırlanmıştır.

3.9.1 İnsan meme kanseri hücre dizisi HepG2

Gerekli yerlerden alınan izin belgeleri doğrultusunda (50 numaralı izin), dizinin kökeni ve tanımı araştırmacı tarafından belirtilmiş ve örnek 69 yaşındaki bir kadının meme kanserinden alınmıştır. Bu dizi, %10 dana cenin serumu ile donatılmış RPMI-1640 besiyerinde büyütüldü. Tam alt kültür tabakası oluştuğunda hücreler, tripsin/versen çözeltisi ile işleme tabi tutuldu.

3.9.2 İnsan rahim ağzı kanseri hücre dizisi (Henrietta Lacks) (HeLa)

Gerekli yerlerden alınan izin belgeleri doğrultusunda (58 numaralı izin), 1951 yılında araştırmacı Dr. George Gey tarafından bu dizinin kökeni ve tanımından bahsedilmiş ve 31 yaşındaki Afro-Amerikan bir kadının rahim ağzı kanseri hücrelerinden örnek alınmıştır. Bu dizi, %10 dana cenin serumu ile donatılmış RPMI-1640 besiyerinde büyütüldü. Hücreler, alt kültür katmanının tamamı tamamlandığında, tripsin/versin çözeltisi le işleme tabi tutuldu.

3.9.3 Normal hücre dizisi HC

Gerekli yerlerden alınan izin belgeleri doğrultusunda (43 numaralı izin), bu dizinin kaynağı ve tanımı araştırmacı tarafından belirtilmiş ve örnek 7 yaşındaki bir kadının pelvik RMS'sinden alınmıştır. Bu dizi, %10 dana cenin serumu ile donatılmış RPMI-1640 besiyerinde büyütüldü. Tam alt kültür tabakası oluştuğunda hücreler, tripsin/versen çözeltisi ile işleme tabi tutuldu.

3.10 HepG2, HeLa Kanseri Hücre Dizileri ve HC Normal Hücresinin Büyümesi

Kanserli dizi hücrelerinin büyütülmesi Freshney (2021)'de belirtilen yönteme uygun olarak aşağıda belirtildiği şekilde yapılmıştır.

- Dizilerin her birinin hücreleri, RBMI-1640 kültür besiyer ve %10 buzağı B serumu içeren 25 cm^2 çapında bir kültür kabına yerleştirildi.
- Hücre süspansiyonu ve kültür besiyerini içeren kaplar %5 CO_2 inkübatöründe 37°C'de 24 saat inkübe edildi.
- Bir günlük inkübasyondan sonra hücre kültüründe üreme olduğu ve kontaminasyondan arınmış olduğu doğrulandıktan sonra sekonder kültürleri yapıldı.
- Hücreler, yaşayabilirliklerini, kontaminasyondan bağımsız olmalarını ve yaklaşık 500 ile 800 bin hücre/mL'lik gerekli sayıya büyümelerini sağlamak için binoküler mikroskop kullanılarak incelendi.
- Hücreler büyütme kabinine aktarıldı ve kullanılan kültür besiyeri atıldı.
- Hücreler PBS çözeltisi ile yıkandıktan sonra atıldı ve işlem her seferinde 10 dakika olmak üzere iki kez tekrarlandı.
- Hücrelere yeterli miktarda tripsin/versen enzimi ilave edilerek 37°C'de 30-60 saniye inkübe edildi ve tek tabakalı hücrelerden tek hücreli hale gelene kadar izlendi, daha sonra serum içeren yeni bir kültür besiyeri ile enzim durduruldu.
- Santrifüj tüplerinde toplanan hücreler, çökeltilmesi, tripsin ve kullanılan kültür besiyerinden arındırılması için oda sıcaklığında 2,000 rpm/dk santrifüjde 10 dakika bekletildi.
- Filtrat atıldı ve hücreler %10 serum içeren taze kültür besiyerinde süspanse edildi.
- Hücre süspansiyonunun belirli bir hacmini alarak hücre sayısını incelendi, Denklem (3.2)'ye göre bir Hemasitometre lamı kullanarak hücre sayısını ve canlılıklarını belirlemek için aynı hacimde Trypan mavi boyası eklendi:

$$C=N\times 10^4 \times F\backslash mL \qquad (3.2)$$

Burada:

- C=Bir mL çözeltideki hücre sayısı
- N=Lamdaki hücre sayısı
- F=Seyreltme faktörü
- 10^4=Lam Ölçüleri

Örnekdeki hücre canlılığının yüzdesi yine Denklem (3.3)'e göre bir Hemasitometre lamı kullanılarak hesaplandı:

Canlı hücre yaşama yeteneği=(canlı hücreler)\ölü hücreler)x100 (3.3)

Hücre süspansiyonu yeni kaplara dağıtıldı ve ardından %5 CO_2 inkübatöründe 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

3.11 Kanser Hücre Hatlarında Ekstrakte Edilen *T. terrestris*'in Sitotoksik Testi

Farklı konsantrasyonlarda (62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL) bitki ekstrakt kullanıldı ve steril koşullar altında 0,22 µm çapında bir filtre ünitesi kullanılarak sterilize edildi. Hazırlanan tüm konsantrasyonlar, hazırlama işlemi tamamlandıktan hemen sonra kullanıldı.

- Eski kültür besiyeri boşaltılıp şişe hafifçe hareket ettirildikten sonra 25 cm²'lik bir doku kültürü kabının içindekiler tripsin/versene çözeltisi ile işleme tabi tutularak hücre süspansiyonu hazırlandı ve sonra 37°C sıcaklıkta 10 dakika inkübe edildi. Daha sonra üzerine 20 mL serum içeren kültür besiyeri eklendi. Hücre süspansiyonları iyice karıştırıldı ve otomatik ince pipet kullanılarak doku kültürü için düz tabanlı plakanın her bir deliğine 0,2 mL aktarıldı.
- Plak, hücreler deliğe yapışana kadar 24 saat 37°C sıcaklıkta inkübatörde bırakıldı, sonra eski kültür besiyeri deliklerden boşaltıldı ve ekstraktın önceden hazırlanmış konsantrasyonlarından 0,2 mL her konsantrasyon için üç tekrar olacak şekilde ilave edildi, buna ek olarak kontrol için üç tekrar yapıldı (sadece hücre süspansiyonu) ve plakalar 37°C'de inkübe edildi.

- 24 saatlik maruz kalma süresinden sonra, plaka inkübatörden çıkarıldı ve hücreleri içeren tüm deliklere her delik için 100 µL oranında kristal viyole boya çözeltisi eklendi.
- Plaka tekrar 20 dakika inkübatörde bekletildi, sonra çıkartıldı, canlı hücreler boyayı alırken ölü hücreler almadığından, hücreler boya çıkana kadar su ile yıkandı.
- Sonuçlar 492 nm dalga boyuna sahip ELISA kullanılarak okundu.

İnhibisyon oranı, Denklem (3.4)'e göre hesaplandı:

Hücre inhibisyonu yüzdesi=(kontrol hücrelerinin absorbans okuması- her konsantrasyon için tedavi edilen hücrelerin absorbans okuması/kontrol hücrelerinin absorbans okuması) x 100 (3.4)

24 saatlik maruz kalma süresinden sonra her kanser dizisi için IC50 tayini gerçekleştirildi (Freshney 2021).

3.12 Kültür Besiyeri

Teşhis edilen örnekler Fen Fakültesi Biyoteknoloji Anabilim Dalı mikrobiyoloji laboratuvarından temin edilmiş ve aşağıdaki antibiyotiklere dirençli izolatlar seçilmiştir:

Antibakteriyel antibiyotikler arasında Vankomisin, Sefalosporinler, Klindamisin, Eritromisin ve Fucidin bulunmaktadır.

3.12.1 Kültür besiyerinin hazırlanması

Muller Hinton Agar besiyeri, üreticinin talimatlarına göre, pH 7'ye ayarlı olarak yapılmıştır, daha sonra 121°C 15 pound/inç^2'de 15 dakika süreyle bir otoklav ile sterilize edildi ve ardından kullanıma kadar 4°C'de saklanmadan önce 24 saat 37°C'de inkübe edildi.

Nutrient Agar besiyeri, üreticinin talimatlarına (Hi-media) göre hazırlandı, otoklavda sterilize edildi, soğutuldu, tek kullanımlık steril bir petri kabına yerleştirildi ve kullanılana kadar 4ºC'de saklandı.

Mitis – Salivarius Agar (MSA) besiyeri, saflaştırılmış izolatların slant besiyerinde alt kültürlenmesi için kullanıldı ve buzdolabında 4°C'de saklandı. Ayrıca bitki ekstraktının kontaminasyonunu kontrol etmek için de kullanılmaktadır (Halawany 2012). *Streptococcus* kültivasyonu için bu seçici besiyeri, Çizelge 3.5'te gösterildiği gibi aşağıdaki bileşenlerden hazırlanmıştır.

Çizelge 3.5 Mutans streptokok besiyerleri

Besiyeri	**Üretici firma**	**Konsantrasyon**
Bacto-Tryptose	Oxoid	10 g
Protease–peptone	Oxoid	10 g
Dextrose	Oxoid	1,0g
Saccharose	Oxoid	50 g

Tüm bu bileşenler bir litre distile suda çözüldü. 0,1 NaOH kullanılarak pH 7,2'ye ayarlandı ve otoklavda sterilize edildi. Daha sonra 45-50°C'ye kadar soğumaya bırakıldı, ardından septik koşullarda basitrasin çözeltisi (200 ünite/litre) eklendi. Besiyeri plakalara döküldü, oda sıcaklığında 24 saat katılaşmaya bırakıldı, sonra kullanılana kadar buzdolabında saklandı. Basitrasin stok çözeltisi, 0,364 gm tozun 100 mL steril deiyonize suda çözülmesiyle hazırlandı, zira bu, 200 IU/litrelik bir konsantrasyon sağlayacaktır (1 birim basitrasin=0,0182 mg). Çözelti Millipore filtre (0,45 μm) ile sterilize edildi ve daha sonra buzdolabında saklandı. Bu bileşenler bir litre damıtılmış suda eritildi, pH 7,2'ye ayarlandı, daha sonra her şişe 10 mL içerecek şekilde vidalı kapaklı şişelere dağıtıldı, otoklavda sterilize edildi, sonra kullanılana kadar buzdolabında saklandı (Al Subait *et al.* 2016).

3.13 Mutans Streptokokların İzolasyonu ve Saflaştırılması

3.13.1 Örnek toplama

İn vitro deneylerin tümü, diş hekimliği öğrencileri tarafından toplanan uyarılmış tükürükten elde edilen saf mutans streptokok izolatı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 20-22 yaşlarında sağlıklı görünen yedi diş hekimliği öğrencisi bu amaç için gönüllü olmuştur. Uyarılmış tükürük örnekleri için, her bireyden bir dakika boyunca bir parça Arap sakızı (0,35-0,4 gm) çiğnemesi, ardından yiyecek artıklarını çıkarmak için balgamını çıkarması ve aynı sakız parçasıyla çiğnemeye devam etmesi istendi ve tükürük steril vidalı kapaklı bir şişede toplandı.

- Hastanın örnek toplanmadan önce sigara içmemesi veya ağır fiziksel strese maruz kalmaması sağlanmalıdır (Abhary and Al-Hazmi 2016).
- Toplama süresi sabit olmalıdır.
- Hasta rahat bir pozisyonda oturmalıdır.
- Mümkünse tüm deneklerden toplama, günün aynı saatinde yapılmalıdır.
- Gönüllü, toplamadan 1 saat önce (su hariç) bir şey yememeli veya içmemelidir.
- 1 dakikalık bir ön örnekleme süresi önerilmektedir.
- Tükürüğün kimyasal analizi planlanıyorsa kan içeren örnekler atılmalıdır.
- Sistemik hastalık, akut hastalık veya kronik hastalık yanı sıra ilaç tedavisi de düşünülmeli, mikrobiyolojik test planlanıyorsa kaçınılmalıdır.

3.14 Mutans Streptokok İzolasyonu

Her örnek bir vorteks karıştırıcı kullanılarak iki dakika karıştırıldı. Daha sonra 0,1 mL 0,9 sterilize edilmiş normal tuz (pH 7,0) eklenerek on kat seyreltme gerçekleştirildi. Örneklerin 10^{-3} ve 10^{-5} dilüsyonlarından 0,1 mL alındı ve MSB agar üzerine iki kopya halinde yayıldı. Bu plakalar bir gaz paketi kullanılarak anaerobik olarak 37°C'de 48 saat inkübe edildi, daha sonra plakalar oda sıcaklığında 24 saat aerobik olarak inkübe edildi (Dahiya *et al.* 2012).

İnkübasyondan sonra koloniler aşağıdaki özelliklere göre incelendi ve teşhis edildi:

- **Morfolojik özellikler:** Mutans streptokokları diseksiyon mikroskobu altında incelendi. Tanı, MSB agar plaklarındaki morfolojik özelliklerine göre konuldu.
- **Gram boyama:** MSB agardan steril koşullarda bir veya iki koloni alınarak Gram boyamaya tabi tutuldu. Mutans streptokoklar Gram-pozitiftir ve küçük veya orta zincirlerde küçük ön veya küre şeklinde görünürler.

3.15 Bakteri İzolatlarının Saflaştırılması ve Sürdürülmesi

Mutans streptokok teşhisinin ardından, Triptoz Fosfat Sıvı Besiyerinden 0,1 mL bakteri, MSB agar plakalarında yeniden inokülasyona tabi tutuldu ve 37°C'de 48 saat anaerobik olarak inkübe edildi, ardından 24 saat oda sıcaklığında aerobik olarak inkübe edildi. Seçilen bir koloni, 10 mL steril Triptoz Fosfat Sıvı besiyerine (pH 7,0) aktarıldı ve 24 saat aerobik olarak 37°C'de inkübe edildi. Bu izolatların sürdürülebilirliği için TPB'ler kullanılıncaya kadar buzdolabında saklandı. Bu prosedür aylık olarak tekrarlandı. Uzun süreli saklama için izolatlar %15 gliserol içeren TPB'de büyütüldü ve -20°C'de saklandı (Al-Marzoqi *et al.* 2016).

3.16 Antimikrobiyal Ajanlar

Klorheksidin glukonat %0,2 konsantrasyonda kullanıldı. Bu aynı zamanda Zac solüsyonu (%0,05 NaF ile CHX diglukonat) için de geçerli olduğundan, çözelti doğrudan şişeden alınmıştır. NaF'nin %0,05'lik konsantrasyonda hazırlaması için, 0,05 g toz 100 mL steril normal tuz içinde çözüldü.

3.17 Mutant Streptokokların *T. terrestris* Ekstraktlarının Farklı Konsantrasyonlarına ve Antimikrobiyal Ajanlara İn Vitro Duyarlılıkları

Bu deneyde kullanılan ekstraktların ve diğer antimikrobiyal maddelerin son konsantrasyonları aşağıdaki gibidir:

- Ekstraktlar 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL
- CHX glukonat % 0,2
- NaF % 0,05
- Zac ağız yıkama %0,05 NaF ile %0,12 CHX diglukonat

Bu deneyde, seçilen ajanların Muller-Hinton Agar besiyeri üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemek için on mutant streptokok izolatı kullanılarak Agar-Well tekniği uygulanmıştır.

İşlem adımları: 25 mL hacminde MHA (pH 7,0) steril bir Petri kabına döküldü ve 24 saat oda sıcaklığında bırakıldı. Her plakaya 0,1 mL streptokok inokulumu yayılarak 20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra her plakada 4-5 kuyucuk olacak şekilde agarda eşit büyüklükte ve derinlikte kuyucuklar hazırlandı. Her kuyucuk, seçilen ajanlardan (0,1 mL) ile doldurulduu. Plakalar, oda sıcaklığında 1 saat bırakıldı ve 37°C'de 24 saat anaerobik olarak inkübe edildi. İnhibisyon bölgesi, her kuyucuğun çapı boyunca ölçüldü. Bakterilerin test edilen ajana karşı tam direnci, kuyucuk çapı=6 mm olan bir inhibisyon bölgesi oluşmadığında olmadığında gösterilmiştir (Bagheri *et al.* 2018)

3.18 Ekstraktların ve Diğer Antimikrobiyal Ajanların Mutans Streptokoklarının İn Vivo Canlılık Sayıları Üzerindeki Etkileri

Antimikrobiyal ajanların ve farklı ekstrakt konsantrasyonlarının mutans streptokokların canlılık sayıları üzerindeki etkileri, kontrol gruplarıyla karşılaştırılarak tahmin edilmiştir.

- Eksraktlar 62,5 µg/mL, 125 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL
- CHX glukonat %0,2%
- NaF %0,05

İşlem Adımları: Beyin Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri (pH 7,0) hazırlandı ve her şişeye 8,9 mL olacak şekilde vidalı kapaklı şişelere dağıtıldı.

Daha sonra üç yöntemle hazırlanan ekstraktlardan 1 mL farklı konsantrasyonlarda ve kontrol grubu dışında seçilen diğer antimikrobiyal ajanlar eklendi. Hem çalışma hem de kontrol şişelerine (sadece Beyin Kalp İnfüzyon Sıvı Besiyeri) %1 (0,1mL) bakteriyel inokulum eklendi ve kontrol tüpünden 0,1 mL, 0,9 mL steril normal tuz (pH 7,0) aktarıldı. On kat seyreltme yapıldı, seyreltme 10^{-3} ve 10^{-5}'ten 0,1 mL alındı ve iki kopya halinde MSB agar plakalarına yayıldı, anaerobik olarak 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra 48 saat sonra mililitre başına koloni oluşturan birim (CFU/mL) sayıldı. Bu değer ilk bakteri sayısı olarak kabul edildi. Çalışma ve kontrol sıvı kültürleri aerobik olarak 37°C'de 24 saat inkübe edildi.

Bir grup gönüllünün uyarılmış tükürüğündeki *Streptococcus* ve mutans streptokok sayıları, kontrol olarak CHX, Zac, NaF ve steril deiyonize su ile karşılaştırmalı olarak ekstraktla tek bir durulamanın ardından tahmin edildi. Durulamanın ardından farklı zaman noktalarında bakteri sayısı izlendi. Uygulanan işlem, Hussein *et al.* (2017) tarafından tarif edildiği şekilde yapıldı.

Çalışma Gurubu: Bu deneye katılanların yaş aralıkları 24-28'dir. Deney gününde olağan ağız hijyeni uygulamalarına ara vermeleri istendi. Toplam gönüllü sayısı 35 olup, her biri yedi gönüllüden oluşan dört çalışma grubu ve bir kontrol grubuna ayrılmıştır. İşlem sabah 9,00'da kahvaltıdan en az iki saat sonra başlamıştır. Kullanılan antimikrobiyal ajanlar:

- Birinci Grup: 500 µg/mL ekstrakt
- İkinci Grup: %0,2 CHX glukonat
- Üçüncü Grup: Zac (%0,05 NaF ile %0,12 CHX diglukonat).
- Dördüncü Grup: %0,05 NaF
- Beşinci Grup: Steril deiyonize su

İşlem adımları: Her gönüllüye bir parça Arap sakızı verildi ve bunu sadece bir dakika çiğnemesi istendi. Daha sonra uyarılmış tükürük, steril vidalı kapaklı bir şişede toplandı. Sadece iki dakika sonra, her bir gönüllüden yukarıdaki antimikrobiyal ajanlardan birinin

10 mL'sini bir dakika boyunca ağızlarında çalkalaması istendi, daha sonra balgam söktürüldü.

Aşağıdaki ekspektorasyonla uyarılan tükürük 30 dakika, 1 saat, 2 saat ve 4 saatlik zaman dilimlerinde toplandı. Bu süre boyunca gönüllülerden su dışında hiçbir şey yememeleri ve içmemeleri istendi. Mutans streptokok çözeltisi gram boyamaya ek olarak agar plaklarındaki morfolojilerine göre teşhis edildi (Hussein *et al.* 2019).

Tanımlamanın ardından, koloni sayacı kullanılarak koloniler sayıldı. Streptokokların sayısı, Gram boyamasına ek olarak sırasıyla MS Agar ve MSB agardaki morfolojik özelliklerine göre belirlendi. Sayı, seyreltme faktörü dikkate alınarak kaydedildi ve koloni oluşturan birimler ile milimetre tükürük başına dilüsyon faktörü (CFU/mL) ile çarpılarak ifade edildi. Durulama sonrasında ve 24 saat veya daha uzun bir süre sonra herhangi bir rahatsızlığa ek olarak gargaraların tadına ilişkin bilgiler kaydedildi.

3.19 İstatistiksel Analiz

Verilerin işlenmesi SPSS paketi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Veriler aşağıdaki işlemlere tabi tutulmuştur:

- İstatistiksel parametreler, ortalama, standart sapma ve yüzdelerin hesaplanması
- t-Testi ve eşleştirilmiş t-testi kullanılarak ortalama değerler arasındaki farkların anlamlılığının tahmin edilmesi.

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 *T. terrestris* Bitkisi Ekstraksiyonunun Hazırlanması

T. terrestris'in 10 g kuru öğütülmüşünden 50 mL elde edilmiş olup, ekstraktın rengi kahverengiydi. Elde edilen ekstrakt, daha sonra bu çalışmada kullanılan 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarını hazırlamak için kullanıldı. Bu çalışma, farmakolojik özelliklere sahip birçok biyolojik olarak aktif madde açısından zengin bir kaynak olan *T. terrestris*'in antikanser ve antibakteriyel etkinliğini araştırmayı amaçlamıştır. Bitkinin tüm kısımlarında anti-inflamatuar, antimikrobiyal ve antikanser gibi biyolojik özelliklerinden sorumlu kimyasal bileşiklerin sinerjistik etkileri vardır (Kusumawardani *et al.* 2020).

4.2 İnsan Lenfositinde Mitotik İndekste *T. terrestris* Ekstraktının Etkisinin İncelenmesi

İnsan lenfositleri, 37°C'de 24 saat boyunca beş konsantrasyonda ekstrakt ile işleme tabi tutulmuştur. Bu test, PHA varlığında lenfositlerin ekstraktla işlenmesini içermektedir.

4.2.1 *T. terrestris* ekstraktının lenfosit bölünmesi için bir uyarıcı olarak etkisi

62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL arasında değişen beş konsantrasyona PHA yerine, *T. terrestris* ekstraktı eklenerek kullanıldı. Sonuçlar, kullanılan tüm konsantrasyonlar için lenfosit bölünmesi için herhangi bir uyarı olmadığını göstermiştir. Bu sonuç, ekstraktların lenfositleri bölünmeye teşvik edemediğinin kanıtıdır.

4.2.2 *T. terrestris* ekstraktının bir lenfosit üzerindeki bölünme önleyici etkisinin incelenmesi

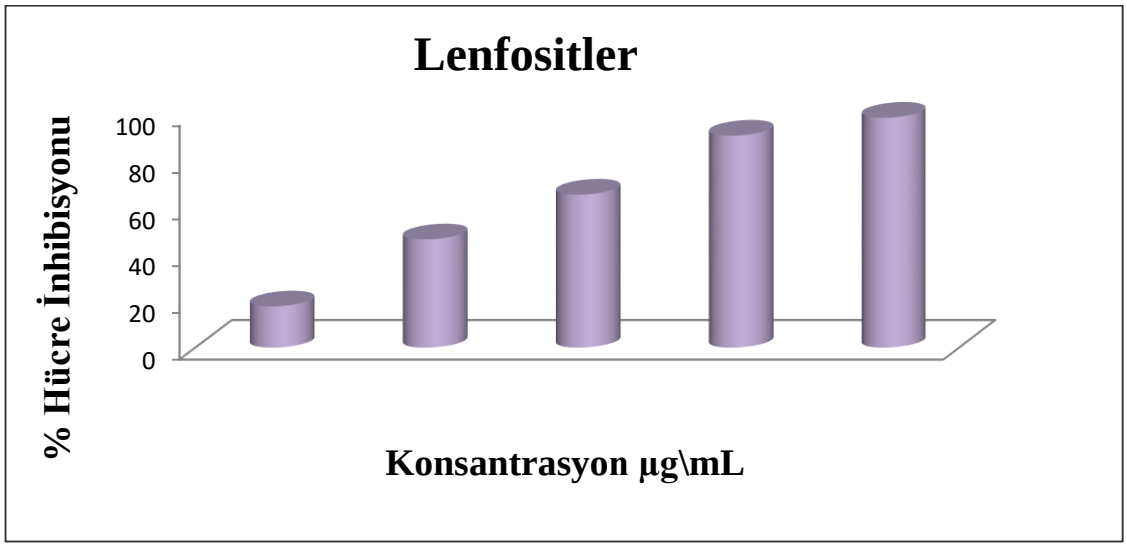
T. terrestris ekstraktının lenfosit bölünmesini durdurmadaki etkinliğini test etmek amacıyla yapılan işlem, Çizelge 4.1'de gösterildiği gibi konsantrasyon arttıkça lenfosit

bölünme hızında bir artışa yol açmıştır. Metafazda durdurulan askıya alınmış hücrelerin yüzdesi, 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlarda sırasıyla %31,06, 56,45,76,46 ile %93,60 iken, kontrol grubunda durdurulan hücrelerin yüzdesi 4,30 olmuştur. Sırasıyla 500 ve 1000 µg/mL olan iki konsantrasyon ile kontrol grubu arasında anlamlı bir fark söz konusu değilken, diğer konsantrasyonlarda uzaklaştırılmış hücrelerin yüzdeleri arasındaki fark anlamlı olmuştur. Hücreler 62,5 µg/mL konsantrasyonda işlem gördüğünde metafaz fazındaki uzaklaştırılmış hücre yüzdesi %31,06 iken, 500 µg/mL konsantrasyonda bu oran %82,12'ye yükselmiş olup, artış Şekil 4.1, Şekil 4.2 ve Şekil 4.3'te gösterildiği gibi 1000 µg/mL konsantrasyonda yüzde %93,61'e ulaşana kadar devam etmiştir.

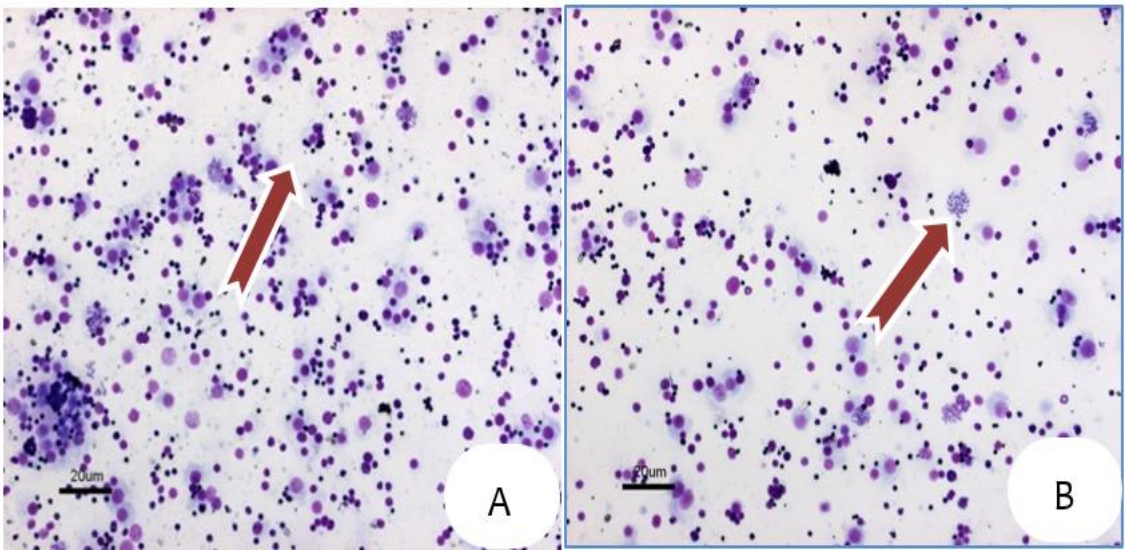
Çizelge 4.1 Mitotik indekste *T. terrestris* ekstraktının insan lenfositi üzerindeki etkisi ve kolşisin ile karşılaştırması

Konsantrasyon µg/mL	**Metafazda hücre oranı Standart sapma±inhibisyon oranı**
Kontrol grubu (Kolşisin)	
62,5	1,2 ± 31,06 e
125	2,1 ± 56,45 d
250	3,9 ± 76,46 c
500	4,9 ± 80,12 b
1000	5,1 ± 93,61 a

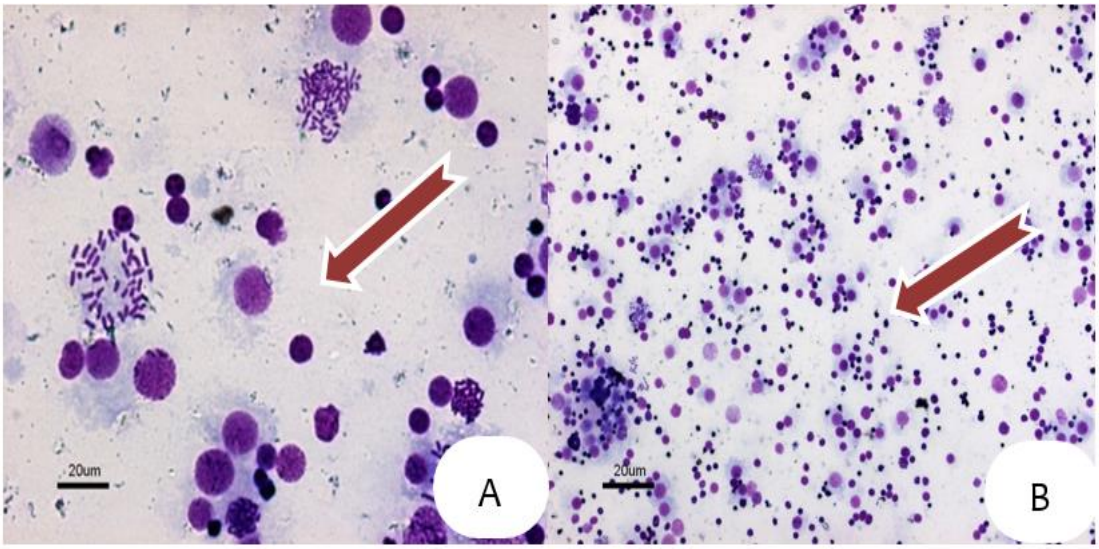
Aynı sütundaki farklı harfler (0,05≥P) düzeyinde istatistiksel fark olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.1 Mitotik indekste *T. terrestris* ekstraktının insan lenfositi üzerindeki etkisi



Şekil 4.2 Kristal menekşe boyası kullanılarak *T. terrestris* ekstraktı (x20) **(A)** kontrol grubu lenfositler **(B)** 1000 µg/mL konsantrasyonda ekstrakt ile işlenmiş lenfositler



Şekil 4.3 Kristal menekşe boyası kullanılarak *T. terrestris* ekstraktı (x100) **(A)** kontrol grubu lenfositler **(B)** 1000 µg/mL konsantrasyonda ekstrakt ile işlenmiş lenfositler

Bu sonuçlardan, *T. terrestris L.* ekstraktının metafazdaki lenfosit bölünmesini durdurabileceği sonucuna varabiliriz. Konsantrasyon 5 µg\mL'den 200 µg\mL'ye çıkarıldığında bitki ekstraktı, insan lenfositlerinin mitotik indeksini %4,6'dan %1,4'e düşürmüştür. MI'daki büyük düşüş, hücrenin mitotik bölünmeye girmesini engelleyen G2 olaylarının bloke edilmesinden veya ATP düzeylerinin düşmesinin bir sonucu olabilir.

Ahmed *et al.* (2019), *Equisetum arvense* alkaloidinin metanolik ekstraktının kullanılan tüm konsantrasyonlarda lenfosit bölünmesinde azalmaya yol açtığını ve bu düşüşün %4,20 olan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olduğunu belirtmiştir. *Nerium oleander* yapraklarının etil alkol ekstraktı, 48 saat boyunca ekstraktın farklı konsantrasyonları ile işleme tabi tutulduğunda insan lenfositi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahiptir. *Tribulus terrestris*'in sulu ekstraktı, metafazdaki lenfositlerin hücre bölünmesini %3,33 olan kontrol grubuna kıyasla %1,8 oranında azaltır (Ramesh and Valan 2018).

4.3 *T. terrestris* Ekstraktının Kanser ve Normal Hücre Dizileri Üzerindeki Etkisi

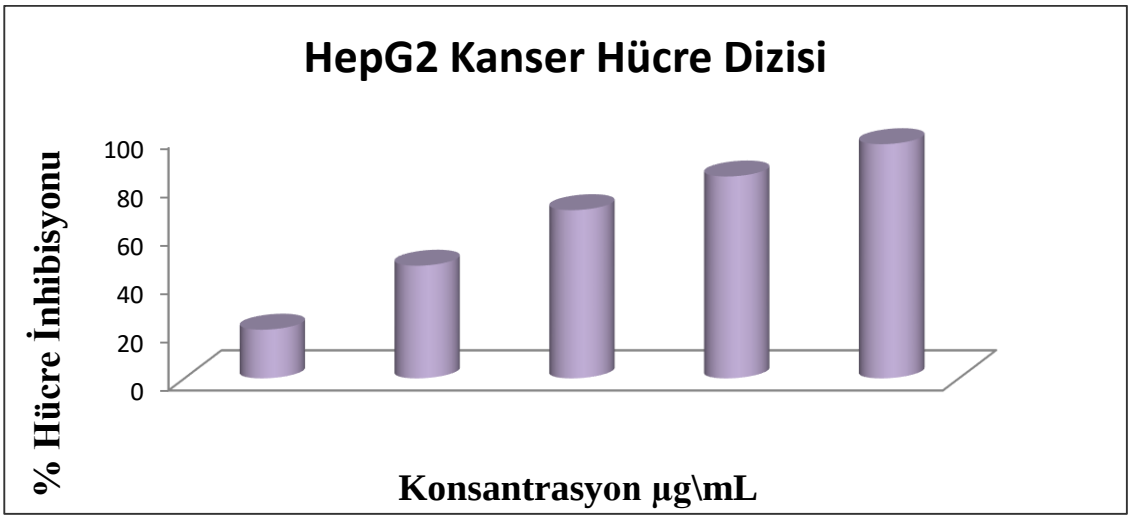
Bitki ekstraktının kanserli tümörlerin büyümesi üzerindeki etkisini test etmek için, HepG2, HeLa ve bir normal hücre dizisi olan HC üzerinde deneyler gerçekleştirilmiştir. Kanser hücre dizileri, 62,5, 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL olmak üzere farklı konsantrasyonlar kullanılarak, 37°C'lik bir sıcaklıkta 24 saat boyunca bitki ekstraktının her bir konsantrasyonu için üç tekerrür halinde yapılmıştır. Ekstrakt konsantrasyonlarının hücrelerin büyümesi üzerindeki etkisini, büyüme inhibisyon oranının yüzdesi cinsinden belirlemek için sitotoksisite testi uygulanmıştır.

Çizelge 4.2'de, bitki ekstraktın 50 µg/mL'lik konsantrasyondan başlayarak HepG2 kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. 50 µg/mL'lik konsantrasyonda inhibisyon yüzdesi %21,01 olurken 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları için bu oran sırasıyla %46,45, %59,45, %70,56 ve %91,22'ye yükselmiştir (Şekil 4.4). Çizelge 4.3'te, bitki ekstraktın 62,5 µg/mL'lik konsantrasyondan başlayarak HeLa kanser hücrelerinin büyümesi üzerinde inhibe edici bir etkiye sahip olduğu görülmektedir. 62,5 µg/mL'lik konsantrasyonda inhibisyon yüzdesi %34,87'ye ulaşmış ve 125, 250, 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları için sırasıyla %49,89, %61,11, %80,90, %95,35'e yükselmiştir. Şekil 4.5'te 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında bir fark görülmektedir. Çizelge 4.4'te, ekstraktın normal hücre dizisi HC üzerinde diğerlerine göre daha az inhibe edici etkiye sahip olduğunu gösterilmektedir. 62,5, 125 ve 250 µg/mL konsantrasyonlarda inhibisyon yüzdesi %0 ve 500 ve 1000 µg/mL konsantrasyonlar için sırasıyla %13,13 ve %18,60'a yükselmiştir.

Şekil 4.6'da 62,5, 125 ve 250 µg/mL konsantrasyonları arasındaki fark görülmektedir. İstatistiksel sonuçlara göre, Çizelge 4.5, Şekil 4.7, Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da gösterildiği gibi HepG2 dizisi (300), HeLa dizisi (80) ve normal HC dizisi (200) için olan IC50 konsantrasyonunu kullandıktan sonra, *T. terrestris* ekstraktının kanserli diziler üzerindeki etkisi karşılaştırıldığında anlamlı bir fark olduğu görülmüştür.

Çizelge 4.2 *T. terrestris*'in etkisiyle HepG2 kanser hücresindeki inhibisyon yüzdesi

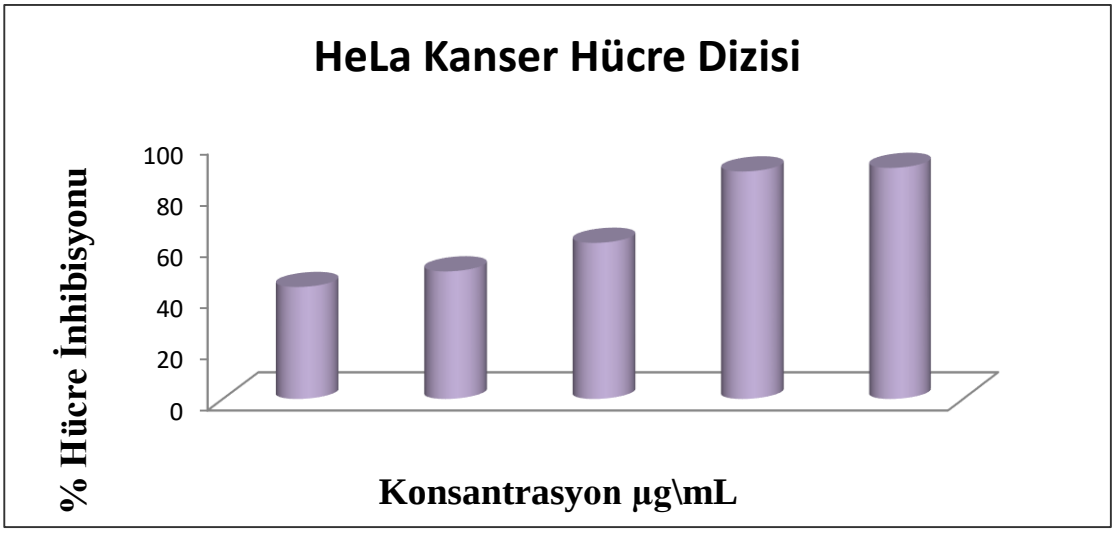
Konsantrasyon µg/mL	**İnhibisyon oranı ±Standart sapma**
65,5	21,01 e±2,6
125	46,45 d±3,1
250	59,45 c±4,2
500	70,56 b±7,9
1000	91,22 a±8,5



Şekil 4.4 *T. terrestris*'in etkisiyle HepG2 kanser hücre dizisindeki inhibisyon yüzdesi

Çizelge 4.3 *T. terrestris*'in etkisiyle HeLa kanser hücresindeki inhibisyon yüzdesi

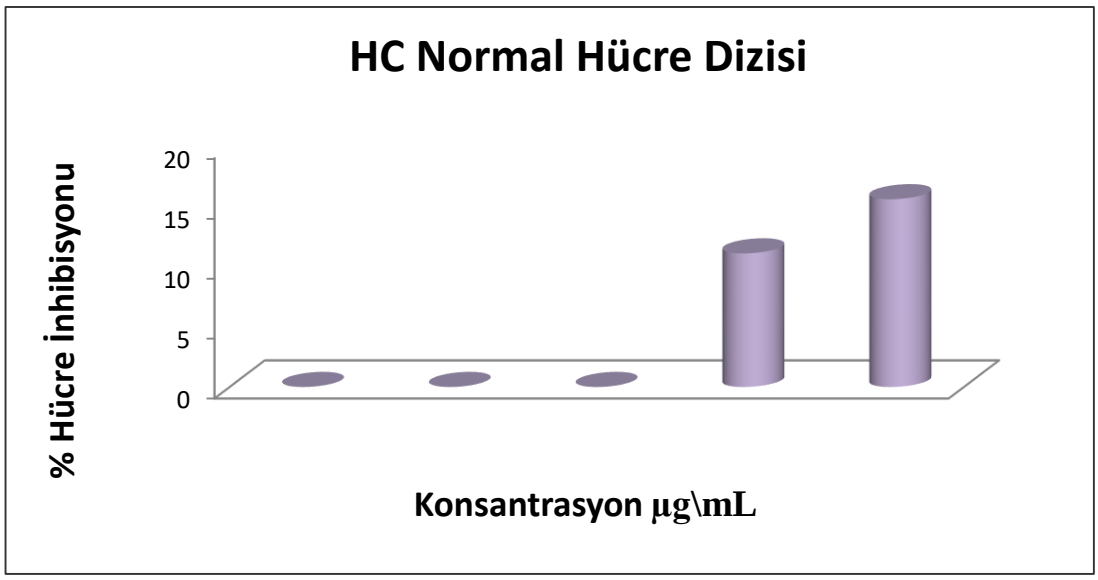
Konsantrasyon µg/mL	**İnhibisyon oranı ±Standart sapma**
62,5	34,87 d±2,6
125	49,98 c±7,1
250	61,11 b±8,3
500	80,90 a±8,6
1000	95,35 a±7,1



Şekil 4.5 *T. terrestris*'in etkisiyle HeLa kanser hücre dizsindeki inhibisyon yüzdesi

Çizelge 4.4 *T. terrestris*'in etkisiyle HC normal hücresindeki inhibisyon yüzdesi

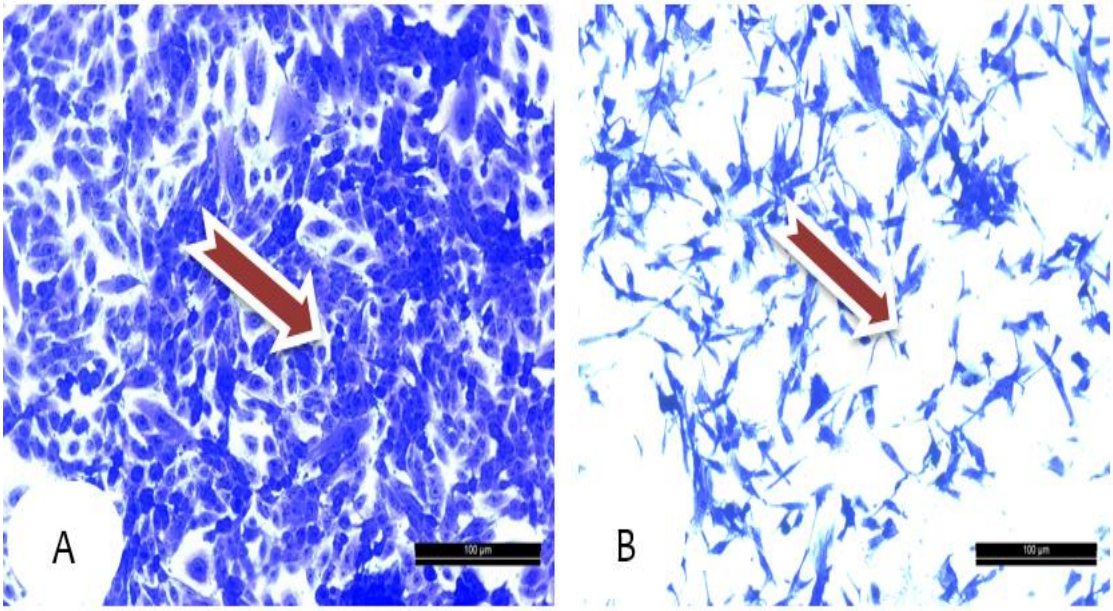
Konsantrasyon µg/mL	**İnhibisyon oranı ±Standart sapma**
62,5	0 c
125	0 c
250	0 c
500	13,13 b±2,7
1000	18,60 a±2,8



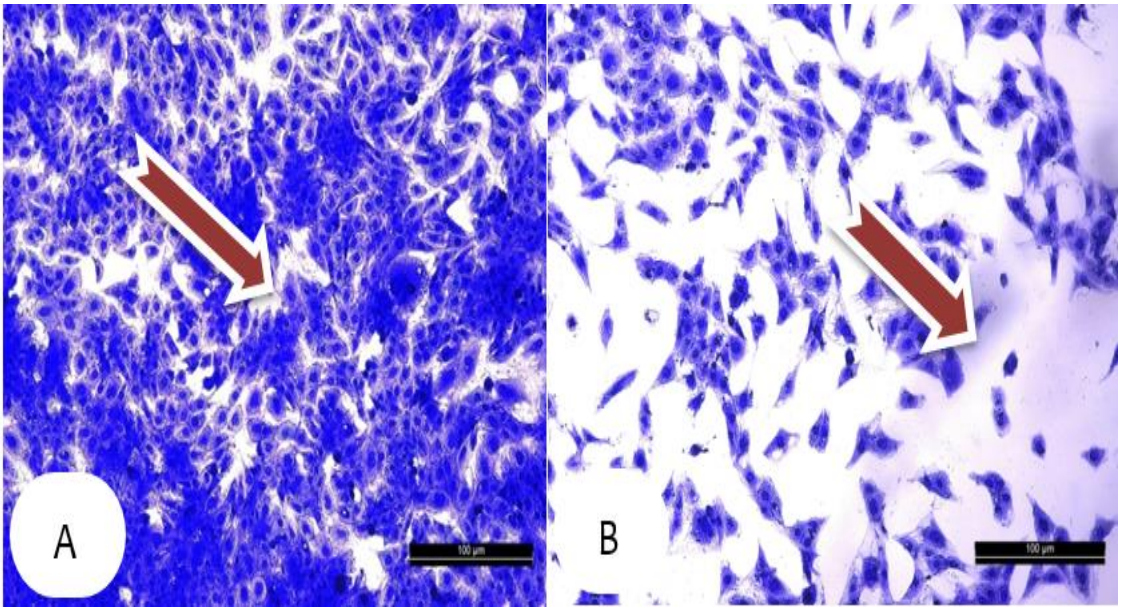
Şekil 4.6 *T. terrestris*'in etkisiyle HC normal hücre dizisindeki inhibisyon yüzdesi

Çizelge 4.5 Kanser hücre dizileri HepG2, HeLa ve normal hücre dizisi HC'deki IC50 konsantrasyon değerleri

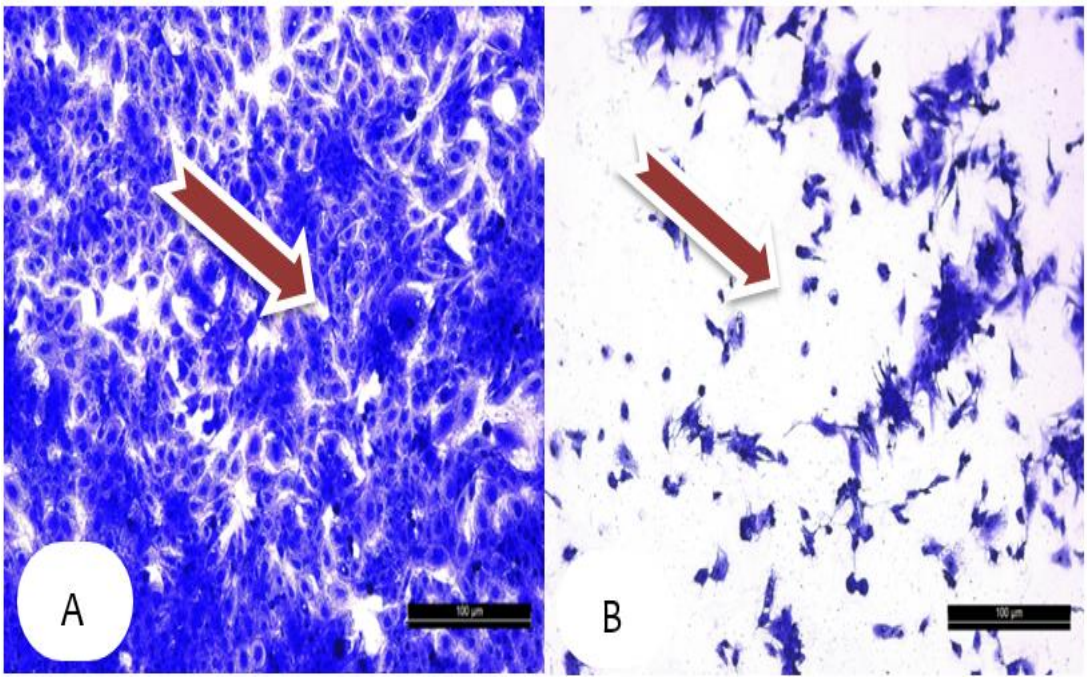
Hücre dizisi	**IC_{50} konsatrasyonu µg/mL**
HepG2	300
HeLa	80
HC	200



Şekil 4.7 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) **(A)** Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HepG2 kanser hücre dizisi **(B)** işlem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HepG2 hücre dizisi



Şekil 4.8 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) **(A)** Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HeLa kanseri hücre dizisi **(B)** işlem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HeLa hücre dizisi



Şekil 4.9 Kristal menekşe boyası kullanılarak 1000 µg/mL'lik *T. terrestris* ekstraktı (x100) **(A)** Kontrol grubunu temsil eden ve yoğunluğu gösteren HC kanseri hücre dizisi **(B)** işem görmüş ölü hücreleri ve hücreler arasındaki boşlukları gösteren HC hücre dizisi

Bu çalışmanın sonuçları, birçok araştırmacının bitki ekstraktlarının kanser önleyici aktiviteye sahip olduğu konusundaki bulgularını desteklemektedir. Bu etkinlik, kanser hücrelerinin duyarlılığına ek olarak ekstraktın türüne ve konsantrasyonuna bağlıdır. Sonuçlar, Çizelge 4.2 ve Çizelge 4.3'te gösterildiği gibi kullanılan tüm konsantrasyonlar için *T. terrestris* ekstraktının HepG2 ve HeLa kanser hücre dizilerinin büyümesi üzerindeki toksik etkilerini göstermiştir. Sonuçlar ayrıca Çizelge 4.4'te gösterildiği gibi *T. terrestris* ekstraktının normal hücre dizisi HC üzerinde daha yüksek konsantrasyonlarda etkili olduğunu, ancak kanser hücre dizilerinde gerçekleşene göre daha düşük oranlarda bir etkisi olduğunu göstermiştir. Ekstraktın kanser hücreleri üzerindeki inhibitör etkisi, başta *T. terrestris* olmak üzere kanser hücrelerinin büyümesinin inhibe edilmesinde veya durdurulmasında etkili birçok kimyasal bileşik içermesinden kaynaklanmaktadır (Battistelli and Falcieri 2020). Al-Lahham *et al.* (2020) tarafından yapılan çalışma, *T. terrestris* köklerinin sulu ve metanol ekstraktlarının HeLa servikal adenokarsinoma üzerinde anti-proliferatif etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, *T. terrestris* yapraklarının flavonoid ekstraktı, MCF7 insan meme kanseri hücreleri üzerinde güçlü bir sitotoksik etkiye sahiptir.

Thawabteh *et al.* (2019) tarafında n yapılan araştırmaya göre, *T. terrestris* saplarının %70'inin sulu aseton ekstraktı A549, PC3 ve MCF7 gibi çeşitli insan kanser hücre dizileri üzerinde toksik etkiye sahiptir. Ayrıca aynı çalışmaya göre, *Coptis chinensis* Franch'ın alkaloid ekstraktının, hücre döngüsünü durdurarak ve endoplazmik retikulumda stres üreterek meme ve karaciğer kanseri hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve kanser hücresi metastaz inhibisyonu ile sonuçlandığı keşfedilmiştir. Başka bir çalışma, eter, kloroform ve *Cynanhum acutum* L. tohumlarının sulu ekstraktlarını kullanarak, alkaloid ekstraktının akciğer kanseri (A549), meme kanseri (MCF-7), hepatoselüler karsinoma (HepG-2) ve normal insan fetal akciğer fibroblastı (WI-38) hücre dizilerinin gelişimi üzerindeki etkilerini araştırmıştır.

Yukarıda açıklandığı üzere, *T. terrestris* ekstraktının kanser hücrelerine karşı sitotoksisiteye sahip olduğu açıktır. İlaçlar için sitotoksisite testlerinin kullanılması, yeni ilaçları tespit etmenin önemli bir parçasıdır. Bu durum, hücreler toksik bir maddeye maruz kaldıktan sonra çoklu metabolik yolları etkileyen karmaşık bir süreçtir. Sonuç

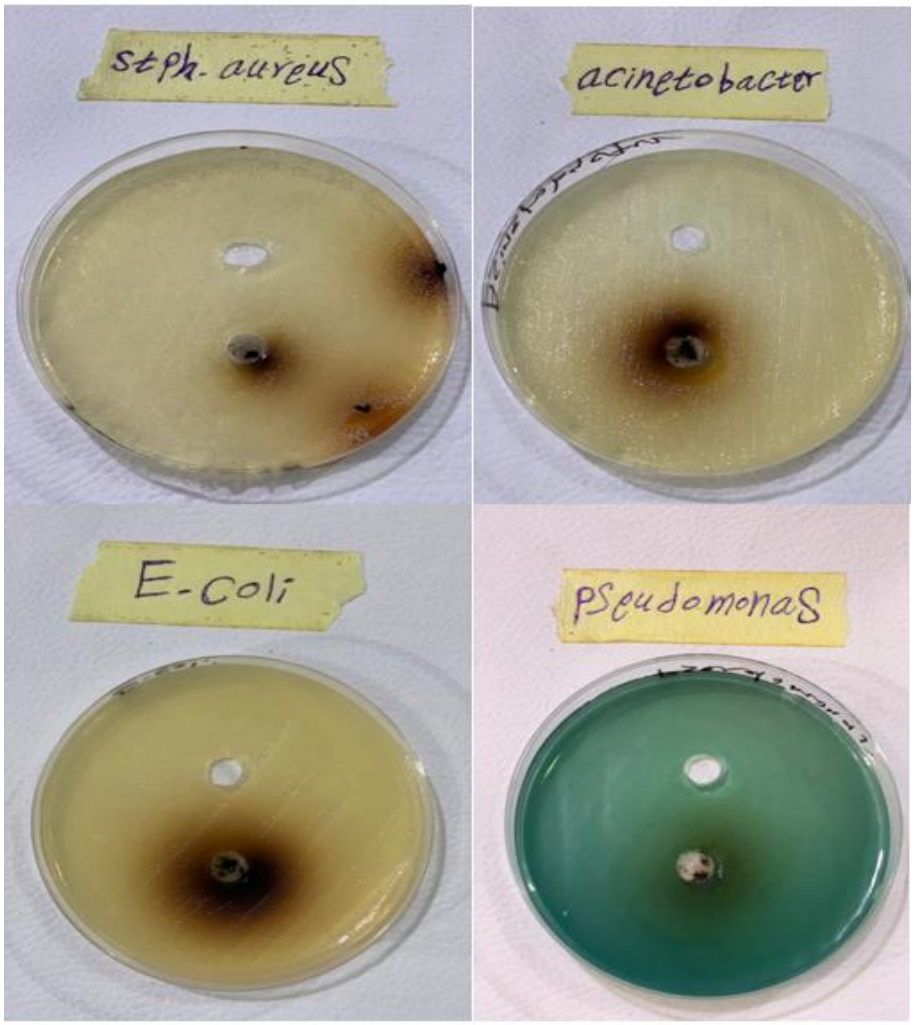
olarak, hücrelerin büzülmesi, apoptotik cisimlerin oluşumu gibi morfolojik değişikliklerle karakterize edilen programlanmış hücre ölümü ile hücrelerin ölmesine ve genellikle hücre zarının bütünlüğünün kaybı, mitokondriyal zar işlevindeki değişiklikler ve mitokondriden Sitokrom-C salınımı ile karakterize edilen hücre enkazı veya nekrozuna neden olur (Ramamurthy and Mag 2018).

4.4 *T. terrestris* Ekstraktlarının İn Vitro Antimikrobiyal Ajanlarının Hassasiyetleri

Yapılan çalışmalar *T. terrestris* ekstraktındaki varlığını ve bazı bakteriler üzerindeki inhibitör etkilerini tespit etmeyi amaçlamaktadır. Bu çalışmada kullanılan bakteri türleri *Staphylococcus aureus, Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'dır. Yüksek inhibisyon bölgesi sırasıyla *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa*'da (31,3 mm ve 28,7 mm) gözlenmiş olup, bunları *Acinetobacter baumannii* ve *Escherichia coli* (15,7 mm ve 18,7 mm) izlemiştir (Çizelge 4.6) (Şekil 4.10).

Çizelge 4.6 *T. terrestris*'in bazı bakteri türleri üzerindeki inhibisyon etkisi

Bakteri türü	**İnhibisyon bölgesi (mm) Ortlama±SS**
Staphelococcus auruess	31,3±2,5
Acinetobacter baumannii	15,7±1,5
Escherichia coli	18,7±1,5
Pseudomonas aeruginosa	28,7±2,1



Şekil 4.10 Bakterilerin inhibisyon bölgesi

Diş eti iltihabına en çok neden olan bakteriler Çizelge 4.7'de gösterilmiştir. Bunlar, *Streptococcus mutans* %36,5, *Streptococcus pyogens* %17,5, *Staphylococcus aureus* %11, *Pseudomonas monilli* %10, *Escherichia coli* %15'tir.

Çizelge 4.7 Diş eti iltihabından kaynaklanan bakteri suşları

Bakteri Türü	**Suş no.**	**%**
Streptococcus mutans	50	36,50
Streptococcus pyogens	24	17,50
Staphylococcus aureus	14	11
Streptococcus pneumoniae	10	10
Pseudomonas monilli	10	10
Escherichia coli	22	15

Bitki ekstraktları, doğal bir antimikrobiyal ajan kaynağı ve beslenme açısından güvenli ve kolayca parçalanabilir olarak kabul edilmekte olup, bitki ekstraktlarının bakteriyel enfeksiyona karşı sergilediği antimikrobiyal aktivite, daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Üç farklı yöntemle hazırlanan *T. terrestris* ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına mutans streptokokların duyarlılıkları Çizelge 4.8'de görülmektedir. Her bir ekstrakt türü için ekstrakt konsantrasyonu arttıkça inhibisyon zon çaplarının arttığı bulunmuştur. Farklı konsantrasyonlar arasında istatistiksel testler yapılmış olup, 125 µg/mL ve 250 µg/mL konsantrasyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken, 250 ve 500 µg/mL, 1000 µg/mL konsantrasyonları arasında oldukça anlamlı bir fark bulunmuştur. Çizelge 4.9'da CHX ve D.W'nin inhibisyon bölgeleri görülmektedir. CHX en yüksek inhibisyon bölgelerini sergilemiştir. Kontrol olarak kullanılan deiyonize su ise sıfır inhibisyon bölgesi ortaya çıkarmıştır. Zac için, inhibisyon bölgesinde CHX ve ekstrakt ile önemli bir fark görülmezken, NaF ve deiyonize su açısından oldukça anlamlıdır. CHX ayrıca su Siwak ekstraktı ile anlamlı bir fark göstermemiş olup, NaF, su ekstraktı ile oldukça anlamlı bir fark göstermiştir.

Çizelge 4.8 Mutans streptokokların *T. terrestris*'in farklı konsantrasyonlarına karşı duyarlılıkları

İnhibisyon bölgesi mm		***T. terrestris* ekstraktının konsantrasyonu µg/mL**				
		65,5	**125**	**250**	**500**	**1000**
	Ortalama	0	2,2	14,4	17,2	18,9
	S.S	0	3,16	3,50	3,36	3,48

Çizelge 4.9 Mutans streptokokların antimikrobiyal ajanlara karşı duyarlılıkları

İnhibisyon bölgesi mm		**Antimikrobiyal Ajanlar**			
		CHX	**Zac**	**NaF**	**D.W.**
	Ortalama	15,1	14,4	6,6	0
	S.S	1,66	3,95	2,12	0

Farklı yöntemlerle hazırlanan *T. terrestris* ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına mutans streptokokların duyarlılıkları Agar Well Tekniği izlenerek çalışılmıştır. Hazırlama yönteminden bağımsız olarak, *T. terrestris* ekstraktlarının bu bakterilerin büyümesini engellediği bulunmuştur. *T. terrestris* ekstraktlarının konsantrasyonu

arttığında inhibisyon bölgesinin arttığı bulunmuş olup, bu bulgular Hussein *et al.* (2018) tarafından yapılan çalışmayla tutarlıdır.

Bunlara ek olarak *T. terrestris* ekstraktının konsantrasyonu arttırıldığında, inhibisyon bölgeleride artmaktadır. Bu bulgu, mutans streptokokların ekstraktın daha yüksek bir konsantrasyonuna karşı hassasiyetini gösterebilir. Bu durum, birinci yöntemle hazırlanan *T. terrestris*'in antibakteriyel bileşenlerinin diğer yöntemlerle hazırlananlara göre suda çok daha fazla çözündüğü ihtimali ile açıklanabilir. Bununla birlikte, bu öneriyi doğrulamak ve bu bileşenleri tam olarak tespit etmek ve tahmin etmek için daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Mutans streptokokların; klorheksidin, sodyum florür ve her ikisinin Zac formundaki bir kombinasyonuna karşı duyarlılıkları test edilmiştir. Diğerlerine kıyasla klorheksidin için inhibisyon bölgeleri daha büyük olmuş, ancak farklar Zac için istatistiksel olarak anlamlı değilken NaF için oldukça anlamlıdır. NaF'nin klorheksidin ile karşılaştırıldığında zayıf bir antibakteriyel madde olduğu görülmektedir. NaF'nin antibakteriyel etkisi, düşük klorheksidin konsantrasyonlarının (%0,12) varlığını artırmıştır. Klorheksidin (%0,2) Zac'e göre daha yüksek inhibisyon bölgeleri oluştursa da aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Bu bulgu Kamal *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmayla aynı fikirdedir.

4.5 *T. terrestris* Ekstraktlarının ve Anti-Mikrobiyal Ajanların İn Vitro Mutans Streptokokların Canlılık Sayımı Üzerindeki Etkileri

Başlangıçtaki bakteri sayısı ve antimikrobiyal ajan kullanılan inkübasyondan 24 saat sonraki sayımlarda istatistiksel olarak 24 saat sonra bakteri sayısında oldukça anlamlı artış görülmüştür (Çizelge 4.10). Tüm *T. terrestris* ekstraktları ve NaF için, 24 saat sonra bakteri sayısında bir artış fark edilmekle beraber, Zac ve CHX için ise bakteri sayısında bir azalma söz konusu olmuştur. Ancak, kontrol ile karşılaştırıldığında 500 µg/mL konsantrasyonda *T. terrestris* ekstraktı dışında tüm test ajanları için farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildir.

Çizelge 4.10 *T. terrestris* ekstraktlarının ve antimikrobiyal ajanların *Streptococcus mutans*'ın canlılık sayısı üzerindeki etkileri

Maddeler		**Ortalama x10^4**	**S. S**
Kontrol grubu	Başlangıç	1437,00	1875,97
	24 saat sonra	1652,40	1856,34
***T. terrestris* Ekstraktı**	125 µg/mL	3410,00	1201,22
***T. terrestris* Ekstraktı**	250 µg/mL	3160,80	1011,19
***T. terrestris* Ekstraktı**	500 µg/mL	1417,00	596,78
***T. terrestris* Ekstraktı**	1000 µg/mL	112,60	578,83
CHX		220,80	1,32
NaF		2721,20	532,68
Zac		220,20	5,98

Diğer antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırıldığında klorheksidin glukonat ve Zac mutans streptokoklarda maksimum azalmaya neden olmuştur. Klorheksidin glukonatın, ister tek başına ister NaF ile Zac formunda kombinasyon halinde kullanılsın, bakteriyel büyümenin inhibisyonunda çok daha etkili olduğu görülmektedir. Çok sayıda in vivo ve in vitro çalışma, klorheksidinin streptokok dahil farklı bakteri türlerine karşı etkinliğini doğrulamıştır. Hussein *et al.* (2019) tarafından yapılan çalışmada da etkinliği mutans streptokoklara karşı da test edilmiş ve pozitif sonuç kaydedilmiştir.

4.6 Ekstraktların ve Diğer Antimikrobiyallerin İn Vivo Mutans Streptokok Üzerindeki Etkileri

Mutans streptokok sayıları, beş kosantrasyonun tümü için dört farklı zaman noktasında seçilen bir ajanla tek durulamadan önce ve sonra sayılmıştır. Tüm ajanlar için 30 dakika sonra mutans streptokok sayılarında bir azalma gözlenmiş olup, bu durum kontrol grubu için de geçerli olmuştur. Test edilen ajanlar için azalma bir saat sonra devam etmekte olup, ancak iki saat ve dört saat sonra bakteri sayısında bir artış söz konusu olsa da, D.W için artış 30 dakika sonra başlamıştır. Test edilen ajanlar için mutans streptokok sayımlarında maksimum azalmaya CHX'e, daha sonra Zac sahipken, antimikrobiyal ajanlar arasında su *T. terrestris* ekstraktı (500 µg/mL) en az etkili olmuştur. Çizelge 4.11, zaman noktalarına göre mutans streptokok sayımlarının standart sapma değerlerini göstermektedir. Çizelge 4.12, başlangıçtaki ve diğer zaman noktalarındaki mutans

streptokok sayımlarındaki istatistiksel farklılıkları göstermektedir. Su *T. terrestris* ekstraktı için, başlangıçta ve takip eden saatlerde bakteri sayımlarında önemli bir fark belirlenmemiş olup, bu durum Zac için de geçerli olmuştur. Diğer antimikrobiyal ajanlar (CHX ve NaF) için 30 dakika ve bir saat sonra mutans streptokok sayımlarında sırasıyla önemli ve oldukça anlamlı düşüşler gözlenmiştir. NaF grubu için anlamlı bir azalma dört saate kadar devam etse de ve mutans streptokokların sayısı halen başlangıca göre az olsa da farkın test edilen diğer ajanlar için anlamlı olmadığı bulunmuştur. Kontrol grubu için başlangıç ve tüm zaman noktaları arasında mutans streptokoklarda anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Çizelge 4.11 Farklı sürelere göre mutans streptokokların SS değerleri

Süre	***T. terrestris* ekstraktı 500 µg/mL**	**CHX**	**Zac**	**NaF**	**D.W**
Başlangıç	765,451	700,875	465,101	476,821	344,371
30 dk	192,123	23,401	64,321	71,226	285,352
1 saat	203,536	17,413	52,841	63,289	679,723
2 saat	344,926	245,015	50,621	67,526	711,404
4 saat	465,046	540,534	52,810	265,015	467,586

Çizelge 4.12 Farklı sürelere göre mutans streptokok sayıları arasındaki istatistiksel fark

Süre / **Ajanlar**	**30dk sonra**	**1 saat sonra**	**2 saat sonra**	**4 saat sonra**
Su ekstraktı 500 µg/mL	N.S	N.S	N.S	N.S
CHX	t=2,349* df=12 P<0,05	t=2,375* df=12 P<0,05	N.S	N.S
Zac	N.S	N.S	N.S	N.S
NaF	t=3,809** df=10 P<0,01	t=4,030** df=10 P<0,01	t=3,917** df=10 P<0,01	t=2,314* df=9 P<0,05
D.W	N.S	N.S	N.S	N.S
* Anlamlı / ** oldukça anlamlı / N.S anlamlı değil / P>0,05				

Çizelge 4.13, farklı zaman noktalarında mutans streptokok sayımlarında kontrol grubuna ek ajanlar arasındaki istatistiksel farkı göstermektedir. Başlangıçta mutans streptokok sayısında anlamlı bir fark rapor edilmemiştir (P>0,05). 30 dakika sonra su *T. Terrestris* ekstraktı (500 µg/mL) ve diğer antimikrobiyal ajanlar arasında kontrol grubuyla bile mutans streptokok sayımlarında önemli bir fark rapor edilmemiştir Bir saat sonra, *T.*

Terrestris ekstresi grubundaki bakteri sayısı, anlamlı olan D.W. (P<0,05) hariç, diğer antimikrobiyal ajanlar için benzer şekilde azalmıştır (P>0,05). İki saat sonra (Zac ve D.W) (P <0,05) hariç gruplar arasında mutans streptokok sayısında istatistiksel bir fark rapor edilmemiş olup, bu "dört saat sonra" için de geçerli olmuştur.

Çizelge 4.13 Farklı sürelerinde temsilciler arasındaki istatistiksel fark (Mutans streptokok için)

30 dk sonra					**1 saat sonra**				
	NaF	**CHX**	**D.W**	**500 µg/mL**		**NaF**	**CHX**	**D.W**	**500 µg/mL**
Zac	t=2,284* df=11 P<0,05	N.S	N.S	N.S	Zac	N.S	N.S	t=3,009* df=11 P<0,05	N.S
NaF			t=3,592** df=12 P<0,01	N.S	NaF		t=2,908* df=12 P<0,05	t=2,793 df=11 P<0,05	N.S
CHX				N.S	CHX			t=3,089 df=11 P<0,05	N.S
D.W				N.S	D.W				t=2,236* df=10 P<0,05
2 saat sonra					**4 saat sonra**				
	NaF	**CHX**	**D.W**	**500 µg/mL**		**NaF**	**CHX**	**D.W**	**500 µg/mL**
Zac	N.S	N.S	t=2,208* df=11 P<0,05	N.S	Zac	N.S	N.S	t=2,587* df=11 P<0,05	N.S
NaF		N.S	N.S	N.S	NaF		N.S	N.S	N.S
CHX			N.S	N.S	CHX			N.S	N.S
D.W				N.S	D.W				N.S

* Anlamlı / ** oldukça anlamlı / N.S anlamlı değil / P>0,05

Bitkiden elde edilen ekstraktlar (500 µg/mL), diğer antimikrobiyal ajanlarla karşılaştırmalı olarak bir grup gönüllü arasında mutans streptokok üzerindeki etkileri açısından test edilmiştir. Bakteri sayısı, ajanın farklı zaman sürelerinde (30 dakika, bir saat, iki saat ve dört saat) tek bir durulamasının ardından tahmin edilmiştir. Tüm ajanlar için bakteri sayısında belirgin bir azalma fark edilmiş, ancak en büyük azalma klorheksidin ve Zac için olmuştur. Test edilen tüm ajanlar için ekstrakt ve Zac gruplarında mutans streptokok için anlamlı olmamakla beraber, sırasıyla klorheksidin ve NaF grupları için anlamlı ve oldukça anlamlı olmuştur. Bu sonuç, mutans streptokok üzerinde test edilen ajanların özgüllüğü ile ilgili bir soruyu gündeme getirebilir. Florürün varlığı, dış

mine yüzeyinin remineralizasyonunu artırabilir ve asit çözünmesine karşı direncini artırabilir. Bu sonuç, Khan *et al.* (2011) tarafından yapılan çok sayıda deneysel çalışmayla kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, Zac bileşiklerinde serbest florür iyonlarının mevcudiyeti ile ilgili sorular devam etmektedir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmalarda, insanlarda *T. Terrestris*'in ekstraksiyonunun 62,5 µg/mL ile 1000 µg/mL arasındaki farklı konsantrasyonlarda lenf hücrelerinin mitotik indeksini etkilemektedir. Ayrıca belirlenen bu konsantrasyonlarda HepG2 ve HeLa hücre dizisi gibi kanser hücrelerine yüksek ve normal hücre dizisi olan HC'ye düşük etki göstermektedir.

Diş eti iltihabına sebep olan bakteri Mutans streptokoklardır. Mutans streptokokları, *T. terrestris* ekstraktlarının farklı konsantrasyonlarına duyarlılık göstermiştir. *T. terrestris* ekstraktlarının 500 µg/mL ve 1000 µg/mL konsantrasyonlardaki etkileri, 125 µg/mL ve 250 µg/mL'ye kıyasla bakterilerin canlılık sayılarının azaltılmasında daha etkili olmuştur. Ayrıca, Klorheksidin glukonat ve klorheksidin ve NaF kombinasyonu, bakteri sayısının azaltılmasında *T. terrestris* ekstraktları ve NaF'ye kıyasla daha etkili olmuştur. Test edilen ajanların hiçbiri mutans streptokokların adezyonunun önlenmesinde etkili olmamıştır. Klorheksidin ve Zac ajanları mutans streptokok sayısının azaltılmasında NaF ve *T. terrestris* ekstraktına göre çok daha etkili olmuştur. Test edilen tüm ajanlar için Streptokok sayımlarında hem istatistiksel ve sayısal olarak oldukça anlamlı bir azalma tespit edilmiştir. Mutans streptokoklar için, *T. terrestris* ekstraktının 500 µg/mL konsantrasyonu ve Zac için anlamlı değilken, klorheksidin ve NaF için önemli ve oldukça anlamlı bir azalma belirlenmiştir.

Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, *T. terrestris* ekstraktlarının ve diğer antimikrobiyal ajanların mutans streptokokların asitojenite, hücre dışı polisakkarit oluşumu vb. gibi diğer karyojenik belirleyicileri üzerindeki etkisinin, *T. terrestris* ekstraktlarının *Lactobacilli* ve *Actinomyces* gibi diğer karyojenik bakteri türleri üzerindeki etkisinin, *T. terrestris*'in kimyasal bileşenlerinin, özellikle antimikrobiyal etkiye sahip olanların, antimikrobiyal aktivite için ayrı ayrı test edilmesi, Bakterilerin genetiği ve başka bir hücre dizisinin araştırılması ve son olarak *T. terrestris*'ten aktif kimyasalın bakterilere ekstraksiyonu ve GC kütlesinin kullanılması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

Abhary, M. and Al-Hazmi, A. A. 2016. Antibacterial activity of Miswak (Salvadora persica L.) extracts on oral hygiene. Journal of Taibah University for Science, 10(4): 513–20.

Ahmed, A. H., Mohammed, I. H. and Tawfeeq, A. T. 2019. Cytotoxic effect of alkaloid extract of equisetum arvense plant on human lymphocytes and MCF7 cancer cell line. Diyala Journal for Pure Science, 15(02): 3-9.

Al Subait, A. A., Alousaimi, M., Geeverghese, A., Ali, A. and El Metwally, A. 2016. Oral health knowledge, attitude and behavior among students of age 10–18 years old attending Jenadriyah festival Riyadh; a cross-sectional study. The Saudi Journal for Dental Research, 7(1): 45-50.

Al-Bayati, F. A. and Al-Mola, H. F. 2008. Antibacterial and antifungal activities of different parts of Tribulus terrestris L. growing in Iraq. Journal of Zhejiang University Science, 9(2): 154-159.

Al-Lahham, S., Sbieh, R., Jaradat, N., Almasri, M., Mosa, A., Hamayel, A. and Hammad, F. 2020. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of four different extracts derived from the roots of Nicotiana tabacum L. European Journal of Integrative Medicine, 33: 101039.

Al-Marzoqi, A. H., Al-Khafaji, N. M. S. and Hussein, H. J. 2016. In vitro antibacterial activity assessment of the crude phenolic, alkaloid and terpenoid compounds extracts of Lepidium sativum L. on human pathogenic bacteria. International Journal of ChemTech Research, 9(4): 529-532.

Bagheri, M., Yari, A. and Mahdipoor, A. 2018. Determination of lead ion by a modified carbon paste electrode based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and poly 4-N-pyridine para styrene sulfonamide. Journal of Environmental Treatment Techniques, 6(3): 53-58.

Battistelli, M. and Falcieri, E. 2020. Apoptotic bodies: particular extracellular vesicles involved in intercellular communication. Biology, 9(1): 18-21.

Cannell, R. J. 1998. How to approach the isolation of a natural product, in natural products isolation? Humana Press, 425-463.

Chhatre, S., Nesari, T., Somani, G., Kanchan, D. and Sathaye, S. 2014. Phytopharmacological overview of Tribulus terrestris. Pharmacognosy Reviews, 8(15): 45-51.

Chiodoni, C., Di Martino, M. T., Zazzeroni, F., Caraglia, M., Donadelli, M., Meschini, S. and Scotlandi, K. 2019. Cell communication and signaling: how to turn bad language into positive one. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 22-26.

Choi, B. K., Kim, K. Y., Yoo, Y. J., Oh, S. J., Choi, J. H. and Kim, C. Y. 2001. In vitro antimicrobial activity of a chitooligosaccharide mixture against Actinobacillus actinomycetemcomitans and Streptococcus mutans. International Journal of Antimicrobial Agents, 18(6): 553-557.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility test. Approved Standard M02-A10, 29: 3-5.

Dahiya, P., Kamal, R., Luthra, R. P., Mishra, R. and Saini, G. 2012. Miswak: A periodontist's perspective. Journal of Ayurveda and Integrative Medicine, 3(4): 184.

Freshney, R. I. 2021. Culture of animal cells: a manual for basic technique and specialized application. John Wiley and Sons, 736 page, New York.

Gurung, S. and Pandey, R. A. 2015. Perception of side effects of chemotherapy among cancer patients in B.P. Koirala Memorial Cancer Hospital Bharatpur; Nepal. Journal of College Medical Sciences Nepal, 11: 14-19.

Halawany, H. S. 2012. A review on miswak (Salvadora persica) and its effect on various aspects of oral health. The Saudi Dental Journal, 24(2): 63-69.

Harborne, J. B. 1973. Phytochemical methods, science paper backs. Chapman and Hall, 389 page, London.

Hong-Keun, O., Soo, J. P., Hae, D. M., Seung, H. J., Na-Young, C. and Yong-Ouk, Y. 2011. Tribulus terrestris inhibits caries-inducing properties of Streptococcus mutans. Journal of Medicinal Plants Research, 5(25): 6061-6066.

Hossan, M. S., Jindal, H., Maisha, S., Samudi Raju, C., Devi Sekaran, S., Nissapatorn, V. and Wiart, C. 2018. Antibacterial effects of 18 medicinal plants used by the Khyang tribe in Bangladesh. Pharmaceutical Biology, 56(1): 201-208.

Hu, X. M., Li, Z. X., Lin, R. H., Shan, J. Q., Yu, Q. W., Wang, R. X. and Xiong, K. 2021. Guidelines for regulated cell death assays: a systematic summary, a categorical

comparison, a prospective. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 9: 634690.

Hussain, A. A., Mohammed, A. A., Ibrahim, H. H. and Abbas, A. H. 2009. Study the biological activities of Tribulus terrestris extracts. World Academy of Science, Engineering and Technology, 57: 433-435.

Hussein, H. J., Al-Khafaji, N. M. S., Al-Mamoori, A. H., Juaifer, W. A. K., Al-Marzoqi, A. H. and Al-Zobiady, R. A. 2017. Antimicrobial effect of the crude phenolic, alkaloid and terpenoid compounds extracts of Myrtus communis L. against human gram-negative pathogenic bacteria. Journal of Global Pharma Technology, 9(8): 130-133.

Hussein, H. J., Kaizal, A. F., Al-Khafaji, N. M. S., Sadiq, Z. F. and Shahad, A. S. 2018. Evaluation of antibacterial potential of the crude Phenolic, Alkaloid and Terpenoid extracts of Ricinus communis L. against gram-negative pathogenic bacteria. Journal of Global Pharma Technology, 10(05): 384-388.

Hussein, H. J., Sahi, N. M., Saad, A. M. and Altameme, H. J. 2019. The Antibacterial effect of bioactive compounds extracted from Cassia didymobotrya (Fresenius) Irwin and Barneby against some pathogenic bacteria. Annals of Tropical Medicine and Public Health, 22(1): 6-9.

Jiang, X., Wang, J., Deng, X., Xiong, F., Zhang, S., Gong, Z. and Xiong, W. 2020. The role of microenvironment in tumor angiogenesis. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research, 39(1): 1-19.

Kamal, A. S., Hussein, H. J. and Tolaifeh, Z. A. 2019. Antibacterial potential of Hibiscus sabdarifa L. against some Enterobacteriaceae: In vitro. Biochemical and Cellular Archives, 19(2): 4291-4294.

Khan, A. V., Ahmed, Q. U., Mir, M. R., Shukla, I. and Khan, A. A. 2011. Antibacterial efficacy of the seed extracts of Melia azedarach against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine, 1(6): 452-455.

Kianbakht, S. and Jahaniani, F. 2003. Evaluation of antibacterial activity of Tribulus terrestris L. growing in Iran. Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics, 2: 2-24.

King, A. M., McCahon, D., Slade, W. R. and Newman, J. W. 1982. Recombination in RNA. Cell, 29(3): 921-928.

Klein, M. I., DeBaz, L., Agidi, S., Lee, H., Xie, G., Lin, A. H. M. and Koo, H. 2010. Dynamics of Streptococcus mutans transcriptome in response to starch and sucrose during biofilm development. PloS One, 5(10): 13478.

Koo, H., Smith, A. M. V., Bowen, W. H., Rosalen, P. L., Cury, J. A. and Park, Y. K. 2000. Effects of Apis mellifera propolis on the activities of streptococcal glucosyltransferases in solution and adsorbed onto saliva–coated hydroxyapatite. Caries Research, 34(5): 418-426.

Kostova, I. and Dinchev, D. 2005. Saponins in Tribulus terrestris–chemistry and bioactivity. Phytochemistry Reviews, 4(2): 111-137.

Kusumawardani, B., Febi, Q. N., Rosidah, M., Azis, D. A., Puspitasari, E. and Nugraha, A. S. 2020. Cytotoxic potential of flavonoid from nicotiana tabacum leaves on MCF-7 human breast cancer cells. Indonesian Journal of Cancer Chemoprevention, 11(2): 97-102.

Matsumoto-Nakano, M., Nagayama, K., Kitagori, H., Fujita, K., Inagaki, S., Takashima, Y. and Ooshima, T. 2011. Inhibitory effects of Oenothera biennis (evening primrose) seed extract on Streptococcus mutans and S. mutans-induced dental caries in rats. Caries Research, 45(1): 56-63.

Mohammed, M. J. 2008. Biological activity of saponins isolated from Tribulus terrestris (fruit) on growth of some bacteria. Tikrit Journal of Pure Science, 13(3): 1-4.

Moura, C. S., Lollo, P. C. B., Morato, P. N. and Amaya-Farfan, J. 2018. Dietary nutrients and bioactive substances modulate heat shock protein (HSP) expression: A review. Nutrients, 10(6): 683.

Mukherjee, S. 2019. Genomics-guided immunotherapy for precision medicine in cancer. Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals, 34(8): 487–497.

Namba, T., Tsunezuka, M. and Hattori, M. 1982. Dental caries prevention by traditional Chinese medicines. Planta Medica, 44(02): 100-106.

Ooshima, T., Osaka, Y., Sasaki, H., Osawa, K., Yasuda, H., Matsumura, M. and Matsumoto, M. 2000. Caries inhibitory activity of cacao bean husk extract in in-vitro and animal experiments. Archives of Oral Biology, 45(8): 639-645.

Otten, M. P., Busscher, H. J., Van Der Mei, H. C., Van Hoogmoed, C. G. and Abbas, F. 2011. Acute and substantive action of antimicrobial toothpastes and mouthrinses on oral biofilm in vitro. European Journal of Oral Sciences, 119(2): 151-155.

Ramamurthy, J. and Mag, V. 2018. Comparison of effect of hiora mouthwash versus chlorhexidine mouthwash in gingivitis patients: A clinical trial. Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 11(7): 84–88.

Ramesh, M. H. and Valan, M. F. 2018. Phytochemical investigation and the study of drug potential of phyto compounds in nicotina tobaccum. Research Chronicle in Health Sciences, 4(1): 66-72.

Saquib, S. A., AlQahtani, N. A., Ahmad, I., Kader, M. A., Al Shahrani, S. S. and Asiri, E. A. 2019. Evaluation and comparison of antibacterial efficacy of herbal extracts in combination with antibiotics on periodontal pathobionts: an in vitro microbiological study. Antibiotics, 8(3): 89.

Semerdjieva, I. B. and Zheljazkov, V. D. 2019. Chemical constituents, biological properties, and uses of Tribulus terrestris: A review. Natural Product Communications, 14(8): 6-9.

Shimotoyodome, A., Koudate, T., Kobayashi, H., Nakamura, J., Tokimitsu, I., Hase, T. and Takaesu, Y. 2007. Reduction of Streptococcus mutans adherence and dental biofilm formation by surface treatment with phosphorylated polyethylene glycol. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 51(10): 3634-3641.

Shouji, N., Takada, K., Fukushima, K. and Hirasawa, M. 2000. Anticaries effect of a component from shiitake (an edible mushroom). Caries Research, 34(1): 94-98.

Soleimanpour, S., Sedighinia, F. S., Afshar, A. S., Zarif, R. and Ghazvini, K. 2015. Antibacterial activity of Tribulus terrestris and its synergistic effect with Capsella bursa-pastoris and Glycyrrhiza glabra against oral pathogens: an in-vitro study. Avicenna Journal of Phytomedicine, 5(3): 210.

Thawabteh, A., Juma, S., Bader, M., Karaman, D., Scrano, L., Bufo, S. A. and Karaman, R. 2019. The biological activity of natural alkaloids against herbivores, cancerous cells and pathogens. Toxins, 11(11): 656.

Thylstrup, A. and Fejerskov, O. 1996. Textbook of clinical cariology. Munksgaard, 8(9): 1-9.

Verma, R. S. and Babu, A. 1989. Human chromosomes: Manual of basic techniques. Pregramon Press, 240 page, New York.

Woo, W. S. 2001. Experimental methods for phytochemistry. Seoul National University Press, 9: 52-62.

Xiang, F., Ma, S. Y., Lv, Y. L., Zhang, D. X., Song, H. P. and Huang, Y. S. 2019. Tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 regulates hypoxia-induced apoptosis through a mitochondria-dependent pathway mediated by cytochrome c oxidase subunit II. Burns and Tauma, 7: 21-25.

Yamanaka-Okada, A., Sato, E., Kouchi, T., Kimizuka, R., Kato, T. and Okuda, K. 2008. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on cariogenic bacteria. The Bulletin of Tokyo Dental College, 49(3): 107-112.

Yan, W., Diao, S. and Fan, Z. 2021. The role and mechanism of mitochondrial functions and energy metabolism in the functional regulation of the mesenchymal stem cells. Stem Cell Research & Therapy, 12(1): 1-17.

Yaseen, N. Y. 1999. Tumor origin: Polyclonal or monoclonal. The Medical Journal of Tikrit University, 5: 167-175.

Zamaraev, A. V., Kopeina, G. S., Prokhorova, E. A., Zhivotovsky, B. and Lavrik, I. N. 2017. Post-translational modification of caspases: The other side of apoptosis regulation. Trends in Cell Biology, 27(5): 322-339.

Zhu, W., Du, Y., Meng, H., Dong, Y. and Li, L. 2017. A review of traditional pharmacological uses, phytochemistry, and pharmacological activities of Tribulus terrestris. Chemistry Central Journal, 11(1): 1-16.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı ve Soyadı : Lama Jawad Ali AL-TAIE

Eğitim

Yüksek Lisans	Çankırı Karatekin Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı	2021-Halen
Lisans	Bağdat Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü	1994-1998