



## Evaluation of Biofilm Formation in Clear Aligners with Different Materials and The Effect of Lugol on the Formed Biofilm by Microbiological and SEM Analysis

Gün Sümer<sup>a,\*</sup>, Erhan Özdiler<sup>b</sup>

Ortodonti Anabilim Dalı, Diş Hekimliği Fakültesi, Ankara Üniversitesi, Ankara, Türkiye

\*Corresponding author

### Research Article

### History

Received: 03/10/2022

Accepted: 14/11/2022

### ABSTRACT

The aim of this study; The aim of this study is to investigate the biofilm uptake in transparent plaques, which are widely used today, and the effect of 5% Lugol on both biofilm formation (inhibition) and eradication of the formed biofilm. 3 different clear aligners were cut into 5mm rounds (n=10) and *S. mutans* biofilm formation on them was examined by both colony counting method and Scanning Electron Microscope (SEM). The effect of 5% Lugol was determined as Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Inhibition at sub-MIC values and MIC -2 MIC values were tested. Kruskal Wallis analysis of variance and analysis of variance in repeated measures were used to evaluate the data. When the data obtained with colony forming unit count (cfu) and SEM images were compared, biofilm formation was observed at the end of the 3rd hour in all 3 plates and reached the maximum at the end of 48 hours. 5% Lugol provided complete inhibition in all 3 plaques, but although it was effective in eradication, it could not completely remove it. When 5% Lugol was applied without biofilm formation, it prevented the biofilm formation regardless of the transparent plaque brand, but it was able to partially remove the formed *S. mutans* biofilms.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*, biofilm, Lugol, SEM

## Farklı Materyallere Sahip Şeffaf Plaklarda Biyofilm Oluşumunun ve Lugol'ün Oluşan Biyofilme Etkisinin Mikrobiyolojik ve SEM İncelemesi ile Değerlendirilmesi

### Süreç

Geliş: 00/00/0000

Kabul: 00/00/0000

### Öz

Bu çalışmanın amacı; günümüzde kullanımı yaygınlaşan şeffaf plaklardaki biyofilm tutulumunu ve %5 Lugol'un hem biyofilm oluşumuna (inhibisyon) hem de oluşmuş biyofilmin eradikasyonuna etkisini araştırmaktır. Üç farklı marka şeffaf plak 5mm'lik yuvarlaklar halinde kesilip (n=10) üzerlerine *S. mutans* biyofilm oluşumu hem koloni sayma yöntemi hem de Scanning Elektron Mikroskop (SEM) ile incelendi. %5 Lugol'un etkisi Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MIC) olarak tespit edildi. MIC altı değerinde inhibisyon ve MIC -2 MIC değerlerde deneyleri yapıldı. Verilerin değerlendirilmesinde Kruskal Wallis varyans analizi ve tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi kullanıldı. Koloni oluşturan birim sayımı (cfu) ve SEM görüntüleri ile elde edilen veriler karşılaştırıldığında her üç plakta da 3. Saatin sonunda biyofilm oluşumu izlenmiş ve 48 saatin sonunda maksimuma ulaşmıştır. %5 Lugol her üç plakta da tam inhibisyon sağlamış ancak eradikasyonda etkili olmakla birlikte tam bir uzaklaştırma yapamamıştır. %5 Lugol biyofilm oluşmadan uygulandığında biyofilm oluşumunu şeffaf plak markası fark etmeksizin engellemiş, ancak oluşmuş *S. mutans* biyofilmlerini kısmen uzaklaştırabilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** *Streptococcus mutans*, biyofilm, Lugol, SEM

### Copyright



This work is licensed under  
Creative Commons Attribution 4.0  
International License

<sup>a</sup> dtgunsumer@gmail.com

<sup>b</sup> https://orcid.org/0000-0002-1698-7335

<sup>b</sup> ozdiler@gmail.com

<sup>b</sup> https://orcid.org/0000-0002-6574-5885

**How to Cite:** Sumer G, Ozdiler E (2022) Evaluation of Biofilm Formation in Clear Aligners with Different Materials and The Effect of Lugol on the Formed Biofilm by Microbiological and SEM Analysis, Journal of Health Sciences Institute, 7(3): 215-221

## Giriş

Günümüzde maloklüzyon, ergenler ve yetişkinler arasında sık görülen bir bulgudur ve sabit ortodontik terapi, farklı maloklüzyon tiplerinin tedavisinde en yaygın yaklaşımdır. Ancak çoklu braketli sabit tedavinin etkinliğine rağmen bu tedavi şekli braket, bant ve ark tellerinin varlığı nedeniyle diş hijyeni işlemlerini zorlaştırmaktadır. İyi temizlenmeyen dişlerde ise kolaylıkla bakteri plakları oluşmaktadır. Sabit ortodontik apaney kullanan hastalarda bakteri plağı birikiminin en fazla dişeti kenarında ve maksiller lateral kesici dişlerin ve köpek dişlerinin ark tellerinin arkasında olduğu gösterilmiştir (Köse ve Küçük, 2022).

Erişkin ortodontik hastaların estetik ve konfor gereksinimlerini karşılamak için son yıllarda şeffaf plak tedavisi devreye girmiştir. Bu tedavi, tüm dişleri ve diş etinin marjinal yönlerinin bir kısmını kaplayan ve dişleri aşamalı olarak ideal bir konuma getiren çıkarılabilir şeffaf plaklardan oluşmaktadır (Uzuner ve ark., 2014).

Şeffaf plak [Clear Aligner Therapy (CAT)], dişlerin çoğunu veya tamamını kaplayan şeffaf, ısıyla şekillendirilmiş plastik hizalayıcıların genel kullanım adıdır. Şeffaf plaklar önceleri sadece diş pozisyonunun küçük düzensizliklerini tedavi etmek için kullanılırken son zamanlarda ortodontik tedaviye ihtiyaç duyan yetişkinlerdeki estetik görünüm kaygılarındaki artışla birlikte, geleneksel sabit mekaniklerden hem daha estetik hem de daha konforlu tedavilere yönelik talepte artma olmuş ve bu nedenle şeffaf plakların kullanım alanları ve yaygınlığı artmıştır (Rosvall ve ark., 2009; Jeremiah ve ark., 2011; Tektas ve ark., 2020).

Şeffaf plaklar, geleneksel sabit ortodontik tedavilere göre belirli avantajlar sunar. Bunlar arasında daha az klinik acil durum ve daha iyi estetik, rahatlık ve ağız hijyeni, periodontal sağlık ve yumuşak doku tahrişinin olmaması sayılabilir. Hatta şeffaf plakların sabit apaneylere göre periodontal sağlık için daha iyi olduğu ve diş eti iltihabı riski yüksek olan hastalara önerilebileceği bildirilmiştir. Ancak şeffaf plakların ağız hijyenini olumsuz yönde etkileyebileceği ve bakteri kolonizasyonunu arttırdığı düşünülmektedir. Artan bakteri kolonizasyonu dental plak olarak da bilinen mikrobiyal biyofilmlerin oluşumuna neden olur (Köse ve Küçük, 2022).

Mikrobiyal dental plak oluşumu sırasında üç aşama gözlenmektedir. Aşamalar sırasıyla pelikül oluşumu, erken plak oluşumu ve plağın olgunlaşmasıdır. Pelikül oluşumu ağız temizliğini takiben 2 saat sonra başlar. Bu yapının özelliği homojen ve granüler olmasıdır. Mikroorganizmalar bu tabakaya yapışıp kolonize olurlar. Pelikül yapısına ilk tutunan bakterilerin %56'sı *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguis* ve *S. mitis*'tir (Marsh, 2008). Gram pozitif bakterilerin kolonizasyonundan sonra ikincil olarak Gram negatif bakteriler plak yapısına girerler (Şahin, 2003). Biyofilmler, çürük ve periodontitis gibi ağız hastalıklarının başlangıcı ile etiyolojik olarak ilişkilidir. Plağın yaşına ve diyetle bağlı olmaksızın *Streptococcus mutans* dental mikro floradaki en baskın mikroorganizmadır. Ayrıca diş çürüklerinin başlaması ve ilerlemesinde asıl sorumlusudur (Beighton, 2005).

İyot uzun zamandır antibakteriyel bir ajan olarak bilinmektedir. Birkaç klinik çalışma iyot (I<sub>2</sub>) ve povidon iyodin (PI)'in ağız hijyenindeki etkinliğini göstermiştir (Vratsanos, 1983; Gottardi, 1991; Rosling ve ark., 2001; Hoang ve ark., 2003). İyotun *S. mutans* biyofilm ile ilgili protez malzemeleri ile yapılmış birkaç çalışma bulunsa bile özellikle şeffaf plaklarla ilgili yapılmış çalışmalar sınırlıdır (Gupta ve Hardiya, 2014).

Diş çürüğü insidansının azaltılması ile ilgili yapılan çalışmada, potasyum iyodür (Lugol) veya povidon-iyodin (PVP-I) gibi iyot bileşiklerinin antibakteriyel etkileri gösterilmiş ve kısa süreli kullanımlarında, hasarlı ağız mukozasını bile tahriş etmediği belirtilmiştir (Durani ve Leaper, 2008; Hosaka ve ark., 2012).

Çalışmamızın amacı, farklı içeriklere sahip üç şeffaf plak materyalinin yüzeylerinde oluşan *Streptococcus mutans* biyofilmi üzerine iyotun inhibisyon ve eradikasyon etkilerini kantitatif olarak tespit etmek ve aynı zamanda sonuçları Scanning Elektron Mikroskopta (SEM) görüntülemektir.

## Materyal ve Yöntem

Çalışmamızda Zendura, SmartTrack ve Orthero firmalarından sağladığımız üç farklı maddeden üretilmiş şeffaf plaklar kullanıldı. Mikrobiyolojik deneyler Cumhuriyet Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda, SEM incelemeleri ise Sivas Cumhuriyet Üniversitesi İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi (CÜTAM)'nde yapılmıştır.

Bu çalışmanın yapılmasına dair gerekli etik izin Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.12.2021 tarih ve 83/2021 sayılı belgesiyle alınmıştır.

### Örneklerin hazırlanması

Kullanılan şeffaf plaklar;

Marka	Malzeme
Zendura (Clearcorrect)	Poliüretan reçine
SmartTrack (Invisalign)	Çok katmalı aromatik termoplastik poliüretan
Orthero	Kopolyester

Plaklar hasta kullanımına hazırlanır gibi hazırlanmış, sonrasında 5 mm çapında daireler halinde kesilip paketlenildikten sonra Hidrojen Peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) sterilizatörde düşük ısıda steril edilmiştir.

### %5 Lugol'ün hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan %1'lik Lugol solüsyonu steril H<sub>2</sub>O içinde %1 iyot ve %2 potasyum iyodür ile hazırlanmıştır (WHO, 2022).

### Bakteri suşları

Bu çalışmada kullanılacak *S. mutans* ATCC 25175 bakteri suşları bir gece boyunca 37°C'de Beyin Kalp Infüzyon (BHI) (Difco, MD, ABD) agarda %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda büyütülmüştür.

### Mikrodilüsyon deneyi

*S. mutans* ATCC 25175 suşuna iyotun minimum inhibitör konsantrasyonları (MIC), Klinik Laboratuvar Standardizasyon Enstitüsü'nün (CLSI) standartlarına göre sıvı mikrodilüsyon yöntemi kullanılarak belirlenmiştir. Kısaca, Mitis Salivaris Agar'da gece boyunca üretilen bakteri izolatları McFarland 0.5 bulanıklığında hazırlanmış ve kuyucuktaki son bakteri konsantrasyonu  $1 \times 10^4$  cfu/ml olacak şekilde seyreltilmiştir. Lugol %5 stok solüsyon olarak hazırlanmış, 96 kuyucuklu mikropalakada başlangıç dozunun iki kat seri dilüsyonları BHI broth kullanılarak hazırlanmıştır. Daha önceden hazırlanan bakteri süspansiyonları da her kuyucuğa 50 µl olacak şekilde inoküle edilmiştir. Bir kuyucuğa üreme kontrolü olarak bakteri süspansiyonu, bir kuyucuğa sterilite kontrolü için BHI eklenmiştir. Bu şekilde hazırlanmış mikropalakalar 24-48 saat 37°C'de geliştirildikten sonra makroskopik olarak görünür üreme göstermeyen en düşük ilaç konsantrasyonu MIC değeri olarak belirlenmiştir (CLSI, 2012).

### Biyofilm oluşumu deneyinin yapılışı

*Streptococcus mutans* ATCC 25175 bakterisinin hazırlanmış 5 mm çapındaki şeffaf plak disklerine tutulumunun araştırılması amacıyla düz tabanlı 96-kuyucuklu steril plakalar kullanılmıştır. Steril disklerin bulunduğu tüm kuyucuklara %3 sükröz destekli BHI broth da McFarland 0.5 ( $1 \times 10^6$ ) konsantrasyonunda hazırlanmış bakteri süspansiyonundan 200 µl eklenmiş ve 48 saat süresince 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır. Süre sonunda planktonik formda bulunan bakterilerin uzaklaştırılması için diskler üçer kez PBS ile yıkanmıştır. Ardından tüm diskler 5'er ml steril serum fizyolojik bulunan tüplere aktarılmış ve tüpler ultrasonik banyoda 15 dk süreyle sonikasyona tabi tutulmuştur. Ardından her bir tüpten 10 µl alınıp Mitis Salivaris Agar besiyerine steril eküvyon ile yayma yapılmıştır. Plaklar 24 saat süresince 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiş ve koloniler sayılmıştır. Şeffaf plaklara tutunan bakteri sayısı cfu/ml (colony-forming unit) şeklinde belirlenmiştir. Deneyler her bir şeffaf plak örneği için 10'ar kez tekrarlanmıştır.

### Biyofilm inhibisyon deneyi yapılışı

96-kuyucuklu steril plakalar içinde 5 mm çapındaki şeffaf plaklar yerleştirilmiş ve üzerlerine 100 µl %3 sükröz destekli BHI broth besiyerinde McFarland 0.5 ( $1 \times 10^6$ )'lik konsantrasyonda hazırlanmış *Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşu ve 100 µl BHI broth da MIC konsantrasyonunda hazırlanmış Lugol solüsyonu eklenmiştir. Böylece sonuç olarak ½ MIC yani MIC altı konsantrasyonlar elde edilmiştir. Örnekler 24 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası örnekler koloni sayımı ve SEM görüntüleme için işleminden geçirildi ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### Biyofilm eradikasyon deneyi yapılışı

*Streptococcus mutans* ATCC 25175 %3 sükröz destekli BHI broth da McFarland 0.5 ( $1 \times 10^6$ )'lik konsantrasyonda

hazırlanıp 96 kuyucuklu steril plakalar içinde 5 mm çapındaki şeffaf plak diskleri üzerine 200 µl eklenip biyofilm oluşumu için 48 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübasyona bırakılmıştır.

48. saatin sonunda plaklardaki besiyeri boşaltılmış ve üzerlerine 200 µl BHI broth da MIC ve 2MIC konsantrasyonlarında hazırlanmış Lugol solüsyonu eklendikten sonra 24 saat 37°C sıcaklıkta %5 CO<sub>2</sub>'li ortamda inkübe edilmiştir. Sürenin sonunda örnekler koloni sayımı ve SEM görüntüleme için işleminden geçirilmiş ve sonuçlar değerlendirilmiştir.

### SEM incelemesi için örneklerin hazırlanması

Şeffaf plakların her birinden işlem görmemiş ikişer örnek, sadece *Streptococcus mutans* 'ta 48 saat bekletilmiş ikişer örnek Lugol'le yapılan inhibisyon ve eradikasyon deneyleri sonucunda çıkan ikişer örnek olmak üzere her markadan 8'er örnek SEM incelemesi için ayrılmıştır. Örnekler %4'lük gluteraldehit solüsyonunda 4 saat bekletilerek fikse edildikten sonra sırasıyla %20, 40, 60, 80 ve 100'lük alkol serilerinden geçirilmiş ve 24 saat kurutulduktan sonra SEM incelemesi için CÜTAM'a gönderilmiştir. Burada örnekler yüksek saflıkta altın kaplama malzemesi kullanılarak 5 nm kalınlığında kaplandıktan sonra Tescan Marka, Modeli; Mira 3, Çek Cumhuriyeti menşeli cihazla incelenmiştir.

### İstatistiksel analiz

Çalışmadan elde edilen veriler "Statistical Package for the Social Sciences" (SPSS) 22.0 paket programında değerlendirilmiştir. Farklı şeffaf plak materyallerde *S. mutans* biyofilm oluşumu, Lugol'ün biyofilm oluşumuna inhibisyon ve oluşmuş biyofilm üzerine eradikasyon etkisi ile ilgili elde edilen verilerin analizinde; üç farklı marka şeffaf plağın ortalamalarını karşılaştırmada Kruskal Wallis varyans analizi ile fark yaratan grubun saptanmasında Mann Whitney U testi; aynı şeffaf plağın farklı saatlerdeki ölçüm sonuçlarını değerlendirmede tekrarlayan ölçümlerde varyans analizi ile fark yaratan grubun tespitinde Bonferroni testi kullanılmıştır.  $p < 0,05$  değeri istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

### Bulgular ve Tartışma

#### Plaklarda biyofilm oluşumu

Şeffaf plak markalarında saatlere göre bakteri tutulumu Çizelge 1'de verilmiştir. Her üç markada da 48. saatin sonunda biyofilm oluşumu hem SEM görüntüleriyle hem de koloni sayımlarıyla gösterilmiştir. Sonuçlar incelendiğinde tüm markalarda 3. saatte Zendura'da en fazla olmak üzere bakteri tutulumunun başladığı görülmektedir. 8. ve 24. saatlerde bakteri tutulumu düzenli artış göstermiş ve 48. saatte tam bir biyofilm oluşumu izlenmiştir.

Çizelge 1'de şeffaf plak markalarında saatlere göre *S. mutans* koloni sayıları verilmiştir. Bu sonuçlara göre her üç plakta 3. saatten itibaren yeterli tutulum olmakla birlikte; 3. ve 8. saatlerde Zendura, 24. saatte Orthero

marka plaklardaki *S. mutans* tutulumu diğer marka plaklara göre istatistiksel olarak anlamlı ölçüde fazla bulunmuştur ( $p<0,05$ ). 48. saatte ise her üç marka plaktaki *S. mutans* tutulumu birbirine eşitlenmiştir ( $p>0,05$ ). Şeffaf plak markaları kendi içlerinde zamana göre değerlendirildiğinde; her üç şeffaf plak markasında da saat ilerledikçe *S. mutans* tutulumunun istatistiksel olarak anlamlı artış gösterdiği saptanmıştır ( $p<0,05$ ). Şeffaf plak markalarında *S. mutans* biyofilm oluşumunun 0. ve 48. saatlerdeki SEM görüntüleri Şekil 1'de verilmiştir.

### Mikrodilüsyon deneyi

*Streptococcus mutans* ATCC 25175 suşuna karşı %5 Lugol solüsyonu kullanılarak yapılan mikrodilüsyon deneyinin sonucunda Lugol'ün MIC değeri %0.125 µg/ml =1250 ppm olarak saptanmıştır. Biyofilm inhibisyon deneyinde bu değerin yarısı MIC altı olarak, eradikasyon deneyinde ise bu değer ve iki katı, MIC ve 2MIC olarak kullanılmıştır.

### Biyofilm inhibisyon deneyi sonuçları

Çizelge 2'de şeffaf plak markalarına göre inhibisyon sonuçları verilmiştir. 24 saatin sonunda %5 Lugol MIC altı değerinde inkübe edilen her 3 şeffaf plakta biyofilm oluşumu izlenmemiştir. Şeffaf plak markalarına göre inhibisyon deneyi sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 2'de verilmiştir.

### Biyofilm eradikasyon deneyi

Çizelge 3'te şeffaf plak markalarına göre eradikasyon sonuçları verilmiştir. Plaklar *S. mutans*' la 48 saat inkübe edilip biyofilm oluşumu sağlandıktan sonra üzerlerine MIC ve 2xMIC değerlerinde %5 Lugol eklenip 24 saat sonunda her 3 şeffaf plakta oluşmuş biyofilmin eradikasyonu değerlendirilmiştir. Şeffaf plak markalarına göre eradikasyon deneyi sonucunda elde edilen SEM görüntüleri Şekil 3'de verilmiştir.

Ortodontik tedavilerde ağız hijyeninin sağlanması için fazlaca alternatif arayışları mevcuttur. Son yıllarda antibiyotikler, antimikrobiyal tedavi (klorheksidin, povidon-iyodin, florür ve penisilin ile) gibi biyolojik yöntemler ve probiyotik katkılı diş macunlarının kullanımı önem kazanmıştır (Razeghian-Jahromi ve ark., 2022). Maloklüzyon tedavisinde şeffaf plak kullanımı özellikle 1998'den itibaren ortodontik pratiğin bir parçası olmuş ve kullanımı hızla yaygınlaşmaktadır. Uygun vakaların tedavilerindeki etkinlikleri nedeniyle de günümüzde sabit ortodontik cihazlara alternatif olarak başarıyla kullanılabilmesi belirtilmektedir (Wheeler, 2017). Tedavinin başarılı olabilmesi için şeffaf plakların günde en az 20-22 saat takılması tavsiye edilmekte ve sadece gıda alımı ve diş fırçalama sırasında çıkarılması önerilmektedir (Tektaş ve ark., 2020). Bunun yanı sıra şeffaf plak kullanımının ağız hijyenini olumsuz yönde etkileyebileceği ve bakteri kolonizasyonunu arttırdığı sonuçta biyofilm oluşumuna neden olduğu düşünülmektedir (Malik ve ark., 2013). Biyofilmler ise,

çürük ve periodontitis gibi ağız hastalıklarının başlangıcı ile etiyolojik olarak ilişkilidir (Marsh, 2008).

Mikrobiyal dental plağın yapısında %30 müsin, su ve polisakaritten oluşan kolloid yapıda kompleks bir matriks ve %70'lik oranda da bakteriler bulunmaktadır. Biyofilm oluşumundaki ilk aşama olan pelikül olgunlaşmasından sonra bu yapıya ilk yapışan *Streptococcus mutans*, *S. oralis*, *S. sanguis* ve *S. mitis*' tir (Matsumoto-Nakano, 2018). Ortodontik hastalardaki plakta bulunan asidik bakteri, özellikle *S. mutans* seviyesinin daha yüksek olduğu gösterilmiştir (Lucchese ve ark., 2018). Ağız hijyeninin sağlanması ile ilgili yapılan çalışmalarda Lugol solüsyonunun daha iyi sonuçlar sağladığı gösterilmiştir (Chopra ve ark., 2021; Grønseth ve ark., 2017).

Bu çalışmada da Lugol'ün antibakteriyel etkisinden yola çıkarak şeffaf plakların temizlik bakımında yer alıp alamayacağını araştırmak istedik. Öncelikle plaklarda biyofilm oluşumunu araştırdık ve 3. saatte bile biyofilm oluştuğunu gerek bakteriyel sayımla gerekse görsel olarak gösterdik. Biyofilm oluşturma zamanları bakteriler arasında fark göstermektedir. Örneğin Grønseth ve arkadaşları *Staphylococcus aureus*' la yaptıkları çalışmada 24 saatte biyofilm oluştuğunu, Wang ve arkadaşları *Bacillus subtilis* 'in 12 saatte gözle görülebilir biyofilm oluşturduğunu, Wang ve Ren ise bakterilerin farklı biyofilm oluşturma süreleri arasındaki farktan dolayı çalışmalarında *S. aureus*'un 24 saatlik biyofilmini kullanırken *S. mutans*'ı 48 saatlik inkübasyondan sonra kullanmışlardır. Pek çok bakteriye nazaran yavaş üreyen ve nazlı tabir ettiğimiz bir bakteri olan *S. mutans* bile 3 saatte biyofilm oluşturmaya başlıyorsa ağız sağlığı için şeffaf plakların sık aralıklarla temizlenmesi büyük önem taşımaktadır (Wang ve ark., 2015; Wang ve Ren, 2017).

Bu çalışmanın öncesinde yaptığımız araştırmada *S. mutans* biyofilmi ve Lugol ile yapılmış fazla çalışmaya rastlayamadık. Tam ve arkadaşları iyotun *S. mutans*' in biyofilm oluşumunda etkili olan glukosiltransferaz ve fructosiltransferaz ekspresyon ve aktivitelerini incelemişler ve iyotun MIC altı değerlerde biyofilm oluşumunu azaltacak etkinlikte olduğunu bildirmişlerdir (Tam ve ark., 2006). Ham ve arkadaşları da rafinozun glikoziltransferaz enzimi üzerinden *S. mutans* biyofilmini inhibe ettiğini göstermişler ve ağız hijyen ürünlerinde rafinozun antibiyofilm maddesi olarak kullanılabilceğini belirtmişlerdir (Ham ve ark., 2022). Dias ve arkadaşları metal braketlerde oluşan *S. mutans* biyofilmi üzerine klorheksidinin etkili olduğunu göstermişlerdir (Dias, ve ark., 2018).

Bazı araştırmacılar *S. mutans*' a ağız mikrobiyotasında bulunan *Lactobacillus*'ların etkilerini araştırmış ve yerel bir fermente üründen elde edilen *L. plantarum* K41 suşunun invivo *S. mutans* biyofilm oluşumunu etkili bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Hatta *L. plantarum* K41'in inhibisyon etkisini klorheksidin asetattan anlamlı derecede fazla bulmuşlardır (Zhang ve ark., 2020).



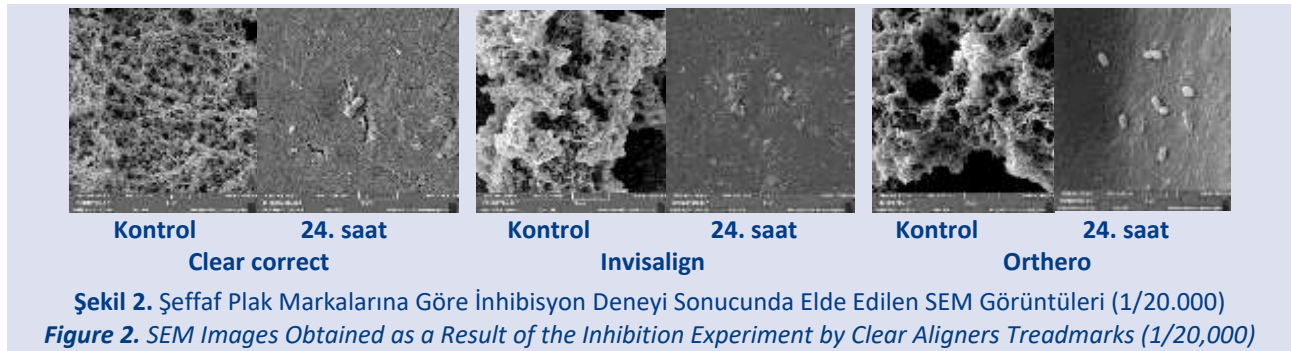
**Çizelge 1.** Şeffaf Plak Markalarında Saatlere Göre *S. mutans* Koloni Sayıları (cfu/ml)**Table 1.** *S. mutans* Colony Numbers By Hours in Different Clear Aligners Treadmarks (cfu/ml)

Malzemeler	Saatler				Test (p)(F)
	3.	8.	24.	48.	
Zendura (Clearcorrect)	1 x 10 <sup>4*</sup>	5 x10 <sup>4*</sup>	7 x10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	,000 (172,656)
SmartTrack (Invisalign)	5 x 10 <sup>3</sup>	1 x 10 <sup>4</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	,000 (137,104)
Orthero	4 x 10 <sup>3</sup>	4 x 10 <sup>4</sup>	8 x10 <sup>4*</sup>	1 x 10 <sup>5</sup>	,000 (191,865)
<b>Test (p) (X<sup>2</sup>)</b>	,000 (19,158)	,001 (14,503)	,000 (22,673)	1,000 (0,000)	

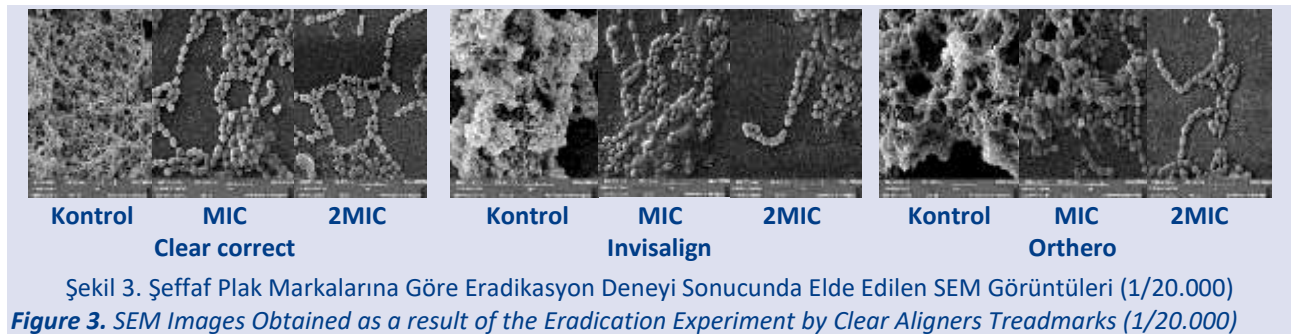
\*Farklı yaratan grup

**Çizelge 2.** Şeffaf Plak Markalarına Göre İnhibisyon Sonuçları**Table 2.** Inhibition Results by Clear Aligners Treadmarks

Malzemeler	<i>S. mutans</i> (cfu/ml)	
	Kontrol	Lugol %5
Zendura (Clearcorrect)	1 x 10 <sup>5</sup>	-
SmartTrack (Invisalign)	1 x 10 <sup>5</sup>	-
Orthero	1 x 10 <sup>5</sup>	-

**Çizelge 3.** Şeffaf Plak Markalarına Göre Eradikasyon Sonuçları**Table 3.** Eradication Results by Clear Aligners Treadmarks

Malzemeler	<i>S. mutans</i> (cfu/ml)		
	Kontrol	Lugol %5 (MIC)	Lugol %5 (2xMIC)
Zendura (Clearcorrect)	1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>1</sup>
SmartTrack (Invisalign)	1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>1</sup>
Orthero	1 x 10 <sup>5</sup>	1 x 10 <sup>2</sup>	1 x 10 <sup>1</sup>



Zayed ve arkadaşları 75 dental plaktan 150 adet *S. mutans* izole etmişler ve bu izolatlar üzerine yeşil çayın alkollü ve sulu ekstraktlarının minimum biyofilm önleyici konsantrasyonların (MBIC) araştırmışlardır. MBIC değerlerini alkollü ekstrakta 3.1 ila 12.5 mg/ml ve sulu ekstrakta ise 6.5 ila 50 mg/ml aralığında olduğunu gösterdiler. Buna göre, diş çürüklerini önlemek için çeşitli oral preparatlara yeşil çay ekstraktları eklenebileceği gibi gün içinde yeşil çay tüketmenin de erişilebilir ve ekonomik olduğunu belirtmişlerdir (Zayed ve ark., 2021).

Lugol'un antibakteriyel ve antibiyofilm etkileri başka bakteriler üzerinde de araştırılmıştır. En sık *Staphylococcus aureus* ile yapılmış çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda Grønseth ve arkadaşları üç yıl arayla yaptıkları iki çalışmada metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA)'nın oluşturduğu biyofilm eradikasyonunda ve yara iyileşmesinde Lugol'ün etkilerini araştırmış ve topikal antibiyotiklere alternatif oluşturabileceğini belirtmişlerdir (Grønseth ve ark., 2017).

Alerjik reaksiyon korkusu, birçok doktorun iyot içeren ürünleri kullanma konusunda isteksiz olmasına neden olmuştur. Lugol çözeltisi sadece vücuttaki temel bileşenler olan H<sub>2</sub>O, potasyum iyot ve elementer iyot içerir ve bu nedenle alerjik reaksiyon korkusu makul bir endişe olmamalıdır (Schabelman ve Witting, 2010).

Âmin ve arkadaşları çocuklar üzerinde bir yıl izleme yaptıkları çalışmada 2 ay arayla üçer kez povidon iyot ile ağızlarına bakım yapılmış. Bir yılın sonunda uygulama yapılmayan 8 çocuktan beşinde, uygulama yapılan 11 çocuktan ikisinde diş çürükleri tespit edilmiştir. Bu süreçte ailelerin de hiçbir şikâyeti olmamıştır (Amin ve ark., 2004).

Yaptığımız inhibisyon deneyi sonucunda %5'lik Lugol'ün her üç tip plakta da MIC altı değerlerde tam bir inhibisyon yaptığını tespit ettik. Biyofilm oluşumunu önlemesi nedeniyle hijyen açısından bakteri plağı oluşmadan önce kullanılması gerekliliği öne çıkmaktadır. Biyofilm eradikasyon deneyimizin sonucunda ise her üç şeffaf plakta da MIC değerlerinde bakteri sayısı 10<sup>2</sup>'ye, 2-MIC değerlerinde ise 10<sup>1</sup>'e kadar düşmüş ancak sıfırlanmamıştır.

Literatürde *S. mutans* ve iyot türevleriyle yapılmış biyofilm eradikasyon çalışmalarına rastlamadık. Ancak iyot türevleri ve başka bakterilerle yapılmış biyofilm eradikasyon çalışmaları mevcuttur. Grønseth ve arkadaşları *S. aureus* biyofilmi üzerine değişik kimyasalların eradikasyon etkileri ile Lugol'ün etkilerini karşılaştırmış ve Lugol'ü daha etkili bulmuşlardır (Grønseth ve ark., 2017). Jeronimo ve arkadaşları, Povidon-iyod'ün kokusunu bloke edip bir kompozit oluşturmuşlar ve bakteriyel biyofilm oluşumu ile eliminasyonu üzerindeki etkisini değerlendirmiş ve sonuç olarak Povidon -iyotlu kompozitin *Pseudomonas aeruginosa* ve *S. aureus* biyofilmlerinin eliminasyonu üzerine etki yaptığını göstermişlerdir (Jeromino ve ark., 2020). Hosaka ve arkadaşları periodontal hastalıklara neden olan *Porphyromonas gingivalis* ve *Fusobacterium nucleatum* bakterilerinin et suyu kültüründe üretildikten sonra polikarbon membranda oluşturdukları biyofilm

üzerine Povidon-iyotun değişik konsantrasyonlarını denemişler ve %2'nin üzerindeki derişimlerde etkili olduğunu göstermişlerdir. Sonuçta Povidon-iyot kullanımının subgingival biyofilm oluşumunu önleyebileceğini belirtmişlerdir (Hosaka ve ark., 2012). Freeman ve arkadaşlarının yaptıkları çalışma ise povidon iyot ve Lugol'ün antibakteriyel etkileri olmasına rağmen sitotoksik ajanlar olmadığını göstermektedir (Freeman ve ark., 2022).

## Sonuç

Sonuç olarak çalışmamızda %5'lik Lugol'ün maloklüzyon tedavisinde kullanılan şeffaf plaklar üzerinde *S. mutans* biyofilm oluşmasını önlediği ancak biyofilm oluşuktan sonra eradikasyonunda etkili olmakla birlikte tamamen temizleyemediği saptanmıştır. Lugol solüsyonunun sitotoksik olmadığı da göz önüne alınarak şeffaf plakların düzenli temizliğinde kullanılabileceği görüşündeyiz. Çalışmamızın bu konuda daha kapsamlı çalışmalara ışık tutacağı kanısındayız.

## Çıkar çatışması

Yazarlar arasında çıkar çatışması bulunmamaktadır.

## Kaynaklar

- Beighton, D., (2005). The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol*, 33(4), 248-55.
- Chopra, A., Sivaraman, K., Radhakrishnan R., Balakrishnan D., Narayana A. (2021). Can povidone iodine gargle/mouthrinse inactivate SARS-CoV-2 and decrease the risk of nosocomial and community transmission during the COVID-19 pandemic? An evidence-based update. *Japanese Dental Science Review*, Cilt 57, 39-45.
- CLSI, (2012). *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.
- Durani, P. & Leaper, D. (2008). Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. *Int Wound J*, 5, 376-387.
- Freeman, C., Duan, E., Kessler, J. (2022). Molecular iodine is not responsible for cytotoxicity in iodophors. *J Hosp Infect*, 122, 194-202.
- Gottardi, W., (1991). Iodine and iodine compounds. *Disinfection, Sterilization, and Control of Hospital Waste*. PA: Lea & Febiger, Philadelphia.
- Grønseth, T. Vestby L. K., Neese L. L., Thoen E., Habimana O., Unge M., Silvola J. T. (2017). Lugol's solution eradicates *Staphylococcus aureus* biofilm in vitro. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 103, 58-64.
- Gupta, H. & Hardiya, S. (2014). Evaluation of Efficacy of 2% Povidone Iodine & Chlorhexidine in Reducing Salivary *Streptococcus Mutans*. *J Evolution of Medical and Dental Sciences*, 3(72), 15214-15220.
- Ham, S. Y., Kim H. S., Cha, E., Lim, T., Byun, Y., Park H. D. (2022). Raffinose Inhibits *Streptococcus mutans* Biofilm

- Formation by Targeting Glucosyltransferase. *Microbiol Spectr*, 10(3), e0207621.
- Hoang, T., Jorgensen, M. G., Keim, R. G., Pattison A. M., Slots J. (2003). Povidone-iodine as a periodontal pocket disinfectant. *J Periodontal Res*, 38, 311-7.
- Hosaka, Y., Saito A., Maeda R., Fukaya C., Moriakawa S., Makino A., Ishihara K., Nakagawa T. (2012). Antibacterial activity of povidone– iodine against an artificial biofilm of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*. *Arch Oral Biol*, 57(4), 364-8.
- Jeremiah, H. G., Bister, D. & Newton, J. T. (2011). Social perceptions of adults wearing orthodontic appliances: a cross-sectional study. *Eur J Orthod*, 33(5), 476-82.
- Jeromino, L. P., Choi, M. R., Yeon, S. H., Park, S. K., Yoon, Y. H., Choi, S. H., ve ark. (2020). Effects of povidone-iodine composite on the elimination of bacterial biofilm. *Int Forum Allergy Rhinol*, 10(7), 884-92.
- Köse, İ. B. & Küçük, E. B. (2022). Güncel Bilgiler Işığında Şeffaf Plak Tedavileri: Evreklioğlu C., Erten M. (ed). Sağlık Bilimlerinde Güncel Araştırmalar Cilt I. Gece Kitaplığı, Ankara, 331-58.
- Lucchese, A., Bondemark, L., Marcolina, M. & Manuelli, M. (2018). Ortodontik apareylere bağlı oral mikrobiyotadaki değişiklikler sistematik bir derleme. *J Oral Mikrobiyol*, 10(1), 1476645–1476645.
- Malik, O. H., McMullin, A. & Waring, D. T., 013). Invisible orthodontics part 1: invisalign. *Dent Update*, 40(3), 203-4, 207-10, 213-5.
- Marsh, P. D. (2008). The oral microflora and biofilms on teeth. 163-87.
- Matsumoto-Nakano, M. (2018). Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn Dent Sci Rev*, 54(1), 22-9.
- Razeghian-Jahromi, I., Babanouri N., Ebrahimi Z., Najafi H. Z., Sarbaz M., Najafabady N. M. (2022). Effect of 8% arginine toothpaste on *Streptococcus mutans* in patients undergoing fixed orthodontic treatment: randomized controlled trial. *Dental Press J Orthod*, 27(3), e2220322.
- Rosling, B., Hellstrom, M. K., Ramberg, P., Socransky S.S., Lindhe J. (2001). The use of PVP-iodine as an adjunct to non-surgical treatment of chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, 28, 1023-31.
- Rosvall, M. D., Fields H.W., Ziuchkovski J, Rosentiel S. F., Johnston W. M. (2009). Attractiveness, acceptability, and value of orthodontic appliances. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 135(3), 276-7.
- Şahin, V. N., (2003). Vital ağartma ajanlarının farklı porselenler üzerine etkileri; yüzey sertliği, pürüzlülüğü, renk değişikliği ve oral bakteri tutumunun in vitro olarak incelenmesi. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Ankara, 107s.
- Tam, A., Shemesh M., Wormser U., Sintov A., Steinberg D. (2006). Effect of different iodine formulations on the expression and activity of *Streptococcus mutans* glucosyltransferase and fructosyltransferase in biofilm and planktonic environments. *J Antimicrob Chemother*, 57(5), 865-71.
- Tektas, S., Thurnheer T., Eliades T., Attin T., Karygianni L. (2020). Initial Bacterial Adhesion and Biofilm Formation on Aligner Materials. *Antibiotics (Basel)*, 9(12), 908.
- Uzuner, D., Kaygısız E., Taner L., Yüksel S., Sezgin Y., Çulhaoğlu R., Ateş C. (2014). Sabit ortodontik tedavinin periodontal sağlık ve ağız kokusu üzerine etkisi. *Acta Odontologica Turcica*, 31(2), 121-6.
- Vratsanos, S. M. (1983). On the structure and function of polyvinyl pyrrolidone-iodine complex. %1 içindeln: Degenes G. Lexington, KY: University of Kentucky: ed. Proceedings of International Symposium on Povidone-Iodine, 289-01.
- Wang, H. & Ren, D. (2017). Controlling *Streptococcus mutans* and *Staphylococcus aureus* biofilms with direct current and chlorhexidine. *AMB Express*, 7.
- Wang, X., Wang, G. & Hao, M. (2015). Modeling of the *Bacillus subtilis* Bacterial Biofilm Growing on an Agar Substrate. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*.
- Wheeler, T. T. (2017). Orthodontic clear aligner treatment. *Seminars in Orthodontics*, 23(1), 83-9.
- WHO (World Health Organization), (2022). Servikal Neoplazilerde Gözle Tarama Pratik El Kitabı, Bölüm 3 / Lugol Solüsyonu İle Yapılan Gözle Muayene (VILI) Sonuçlarının Raporlanması ve Değerlendirilmesi, <https://screening.iarc.fr/viavilichap3.php?lang=6#:~:text=Lugol%20Sol%C3%BCsyonunun%20Hazirlanisi%20100%20ml,agzi%20kapali%20bir%20sekilde%20saklanmalidir>.