

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ  
ENDODONTİ ANABİLİM DALI



**GÜMÜŞ NANOPARTİKÜLÜ İLAVE EDİLMİŞ KANAL İÇİ  
MEDİKAMENTLERİN ÇOK TÜRLÜ BİYOFİLM ÜZERİNE  
ANTİBAKTERİYEL ETKİNLİKLERİNİN  
KARŞILAŞTIRILMASI- *EX VİVO* ÇALIŞMA**

Arş. Gör. Dt. Güzin TÜLÜ

UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından TDH-2018-6752 proje numarası ile  
desteklenmiştir**

**ISPARTA-2019**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Diş Hekimliği Dekanlığı'na;

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı Uzmanlık Eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/04/2019

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

Üye: Doç Dr. Tuğba TÜRK

Ege Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

Üye: Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ

Süleyman Demirel Üniversitesi Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

ONAY: Bu uzmanlık tezi yukarıda belirtilen jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Timuçin BAYKUL  
Fakülte Dekanı

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

*“Gümüş Nanopartikülü İlave Edilmiş Kanal İçi Medikamentlerin Çok Türli Biyofilm Üzerine Antibakteriyel Etkinliklerinin Karşılaştırılması- Ex Vivo Çalışma”* adlı Diş Hekimliğinde Uzmanlık tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Arş. Gör. Dt. Güzin TÜLÜ

İmza

Danışman

Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

İmza

## ÖNSÖZ

Bu çalışmada gümüş nanopartikülü ile karıştırılmış kalsiyum hidroksit veya klorheksidinin insan dentin bloğunda, *E. faecalis*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii* suşları ile oluşturulan çok türlü biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliği kültür ve konfokal lazer taramalı mikroskopi yöntemleri ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı kök kanal tedavisinde kullanılan mevcut antibakteriyellerin etkinliğini arttırmak ve dirençli enfeksiyonlara karşı daha etkili yeni antibakteriyeller geliştirmektir.

Bu çalışma TDH-2018-6752 proje numarası ile Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Isparta, 2019

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübesiyle bana yol gösteren, tez çalışmamın her aşamasında yanımda olan, beni cesaretlendiren, güçlendiren ve sevgisini her daim hissettiren, birlikte çalışmaktan ve öğrencisi olmaktan onur ve mutluluk duyduğum değerli danışman hocam Doç.Dr. Bulem ÜREYEN KAYA'ya ,

Uzmanlık eğitimimde değerli bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan, fikir ve önerileri ile bana destek olan ve aynı zamanda tez jürimde de bulunan anabilim dalı başkanımız Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ'ye,

Uzmanlık eğitimime akademik ve klinik tecrübeleriyle katkıda bulunan öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Murat MADEN, Doç.Dr. Gül ÇELİK ve Dr.Öğr. Üyesi Emre ERİK'e,

Lisans eğitimimde bana endodontiyi sevdiren, bilgi ve tecrübesiyle beni aydınlatan ve tez jürimde olmasından onur duyduğum hocam Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fak. Endodonti AD. öğretim üyesi Doç.Dr.Tuğba TÜRK'e,

Tezimin kilit noktalarında tüm enerjisi ve samimiyeti ile bana yol gösteren ve deney aşamalarında değerli bilgi ve tecrübesiyle hep yanımda olan SDÜ Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD öğretim üyesi Prof. Dr. Emel SESLİ ÇETİN'e,

Tezimin deney aşamalarında benimle birlikte çalışıp tüm imkanlarını paylaşan Dr. Merve KÖLE ve SDÜ Tıp Fak. Mikrobiyoloji AD çalışanlarına,

Deney aşamaları esnasında sonsuz anlayış ve sabırla tüm imkanlarını bizimle paylaşan, adeta bizi evimizde hissettiren, birlikte çalışmaktan onur duyduğum SDÜ Tıp Fak. Biyofizik AD başkanı Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU ve ekibine,

Tez çalışmamın istatistiksel analizini gerçekleştiren Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a,

Uzmanlık projemizi desteklediği için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne ve güleryüzlü personeline,

Hayata ve endodontiye dair tüm tecrübelerini paylaşip ufkumu genişleten, zor zamanlarda samimiyeti ve desteği ile bana güç veren, onu tanıma ve birlikte çalışma şansım olduğu için her daim kendimi mutlu hissettiğim değerli arkadaşım, Uzm. Dt. Volkan DİNÇ'e,

Uzmanlık eğitimine başladığımız andan itibaren beraber gülüp beraber ağladığımız, acemilikten ustalığa beraber yaklaştığımız, pozitif enerjisi ve sevgisi ile hep yanımda olan ve her konuda desteğini hissettiren, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım arkadaşım Dt. Burçak GÜRSOY EMEK'e,

Tüm enerji ve samimiyetleri ile benimle hem hayat hem de klinik tecrübelerini paylaşan, sevgilerini her daim hissettiren Uzm. Dt. Arife MERSİNLİOĞLU, Dr.Öğr.Üyesi Gülsen KIRAZ ve Dr.Öğr.Üyesi Safa KURNAZ'a,

Birlikte çok keyifli vakit geçirdiğim ve her an sevgi ve desteklerini hissettiğim, uzmanlık eğitimimin bana kazandırdığı değerli arkadaşlarım Dt. Tolga EMEK, Dt. Gülben GÜNEY ve Dt. Canan BAYRAKTAR'a,

Kliniğe geldikleri andan itibaren pozitif enerjileri ile neşe saçan, birlikte çalışmaktan büyük keyif aldığım asistan arkadaşlarıma,

Hayatımın tüm dönemlerinde bilimin aydınlattığı yolda bana destek olan, bugünlere gelmemdeki en büyük emeğin sahipleri aileme,

Tüm kalbimle sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	iii
ÖNSÖZ.....	iv
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER .....	viii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ .....	x
TABLolar DİZİNİ .....	xii
RESİMLER DİZİNİ .....	xiii
1. GİRİŞ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Endodonti Mikrobiyoloji İlişkisi .....	2
2.1.1. Endodontik Mikrobiyolojinin Tarihçesi .....	5
2.2. Endodontik Enfeksiyonlarda Öne Çıkan Mikroorganizmalar .....	5
2.2.1. Enterokoklar ve <i>E. faecalis</i> .....	10
2.2.2. Streptokoklar ve <i>S. mutans</i> .....	12
2.2.3. Laktobasiller ve <i>L. acidophilus</i> .....	13
2.2.4. Aktinomiçesler ve <i>A. naeslundii</i> .....	13
2.2.5. Endodontik Enfeksiyonlardaki Diğer Mikroorganizmalar .....	15
2.3. Biyofilm.....	16
2.3.1. Biyofilmin Gelişimi .....	16
2.3.2. Bakterilerin Virülans Faktörleri.....	18
2.3.3. Biyofilmlerdeki Antimikrobiyal Dirençte Etkili Faktörler ve Mekanizmalar .....	18
2.3.4. Çok Türü Biyofilmlerdeki Antimikrobiyal Direnç.....	21
2.3.5. Kök Kanalı Mikroflorasındaki Antimikrobiyal Direnç .....	21
2.3.6. Biyofilmin Değerlendirilmesi .....	22
2.3.6.1. Işık Mikroskobu .....	22
2.3.6.2. Mikrobiyolojik Kültür Yöntemi .....	23
2.3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) .....	24
2.3.6.4. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (KLTM).....	25
2.3.6.5. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) .....	27
2.3.6.6. Moleküler Teknikler.....	27
2.4. Kök Kanalı Dezenfeksiyonunda Kullanılan Kanal İçi Medikamentler.....	28

2.4.1. Kalsiyum Hidroksit (Ca(OH) <sub>2</sub> ).....	29
2.4.2. Klorheksidin Glukonat (CHX) .....	30
2.4.3. Antibiyotik Patları .....	32
2.4.4. Antibiyotik- Kortikosteroid Karışımları .....	33
2.5. Endodontide Nanoteknoloji.....	34
2.5.1. Giriş .....	34
2.5.2. Tarihçe .....	35
2.5.3. Nanomateryel Nedir.....	35
2.5.4. Endodonti Alanındaki Nanoteknolojik Gelişmeler .....	36
2.5.4.1. Doku Mühendisliği.....	36
2.5.4.1.1. Doku Mühendisliğinde Nanopartikül Kullanımı .....	39
2.5.4.2. Antibakteriyel Etki .....	41
2.5.4.2.1. Antibiyotik İçerikli İskelelerin Kullanımı.....	41
2.5.4.2.2. Antibakteriyel Etki Gösteren Nanopartiküller .....	43
2.5.4.2.2.1. Gümüş Nanopartikülleri .....	43
2.5.4.2.2.2. Kitosan Nanopartikülleri.....	46
2.5.4.2.2.3. Biyoaktif Cam Nanopartikülleri .....	47
2.5.4.2.2.4. Fonksiyonalize Antimikrobiyal Nanopartiküller .....	48
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>50</b>
3.1. Dentin Bloklarının Hazırlanması.....	50
3.2. Çok Türü Biyofilm Oluşturulması .....	52
3.3. Kültür Yöntemi İle Mikrobiyolojik Değerlendirme .....	56
3.4. KLTM İncelemesi .....	58
3.5. İstatistiksel Analiz .....	60
3.5.1. Kültür Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi .....	60
3.5.2. KLTM Verilerinin İstatistiksel Analizi .....	61
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>62</b>
4.1. Çok Türü Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntülenmesi .....	62
4.2. Kültür Yöntemi İle Elde Edilen Verilere Ait Bulgular .....	65
4.3. KLTM Verilerine Ait Bulgular .....	67
4.3.1. Bir Günlük Uygulama Süresi Sonunda Elde Edilen KLTM Verilerine Ait Bulgular .....	67
4.3.2. Yedi Günlük Uygulama Süresi Sonunda Elde Edilen KLTM Verilerine Ait Bulgular .....	78



<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>89</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>122</b>
<b>7. ÖZET.....</b>	<b>124</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>126</b>
<b>8. KAYNAKLAR .....</b>	<b>122</b>
<b>9. EKLER.....</b>	<b>152</b>



## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>mL</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>SEM</b>	: Taramalı Elektron Mikroskop
<b>KLTM</b>	: Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
<b>FISH</b>	: Floresan İn Situ Hibridizasyon
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum Hidroksit
<b>CHX</b>	: Klorheksidin Glukonat
<b>AgNP</b>	: Gümüş Nanopartikülü
<b>NaOCl</b>	: Sodyum Hipoklorit
<b>EDTA</b>	: Etilen Diamin Tetraasetik Asit
<b>CMCP</b>	: Kamfore Paramonoklorfenol
<b>IKI</b>	: İyodür Potasyum İodid
<b>MTA</b>	: Mineral Trioksit Agregat
<b>CFU</b>	: Koloni Oluşturan Birim
<b>EPS</b>	: Ekstrasellüler Polimerik Matriks
<b>VBNC</b>	: Görülebilen Fakat Kültüre Edilemeyen Faz
<b>PCR</b>	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik Asit
<b>RNA</b>	: Ribonükleik Asit
<b>HA</b>	: Hidroksiapatit
<b>ATCC</b>	: Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
<b>DPSC</b>	: Dental Pulpa Kök Hücresi
<b>SCAP</b>	: Apikal Papilla Kök Hücresi

## TABLÖLAR DİZİNİ

**Tablo 1.** Endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan gram negatif bakteriler .... 8

**Tablo 2.** Endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan gram pozitif bakteriler **Hata! Yer işareti t**

**Tablo 3.** Medikament uygulaması sonrası bakteri sayısında azalma (ortalama, SS ve min-max log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>) değerleri. .... 66

**Tablo 4.** Medikament uygulama süreleri sonunda bakteri sayısında azalma (ortalama, SS ve min-max log<sub>10</sub> CFU mL<sup>-1</sup>) değerleri. .... 66

**Tablo 5.** Medikamentlerin 1 günlük uygulanması sonrası çok türlü biyofilmdeki canlı bakteri yüzde değerleri ..... 67

**Tablo 6.** Medikamentlerin 7 günlük uygulanması sonrası çok türlü biyofilmdeki canlı bakteri yüzde değerleri ..... 78

**Tablo 7.** Son 5 yıl içinde yapılmış bazı antibakteriyel etkinlik çalışmaları ..... 120

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> İnsan alt premolar dişinin mine sement sınırının 1 mm altından separe yardımı ile kesilmesi .....	51
<b>Resim 2.</b> İnsan alt premolar dişinden elde edilmiş tam silindir dentin bloğu ve ikiye ayrılarak 1mm kalınlığa inceltilmiş yarı silindir dentin bloğu.....	51
<b>Resim 3.</b> Kanlı agar besiyerinde kültüre edilmiş bakteri suşları .....	52
<b>Resim 4.</b> Bakteriyel penetrasyonun arttırılması amacıyla kullanılan mikrosantrifüj cihazı .....	53
<b>Resim 5.</b> Deneyde kullanılan geleneksel medikamentler- klorheksidin jel ve kalsiyum hidroksit patı .....	55
<b>Resim 6.</b> Deneyde kullanılan gümüş nanopartikülü dispersiyonu.....	55
<b>Resim 7.</b> a) Kalsiyum hidroksit patı ve gümüş nanopartikülü solüsyonunun eşit miktarlarda karıştırılması, b) Klorheksidin jel ve gümüş nanopartikülü solüsyonunun eşit miktarlarda karıştırılması .....	56
<b>Resim 8.</b> Medikamentlerin uygulanmasından sonra örneklerin eppendorf içindeki görüntüsü.....	56
<b>Resim 9.</b> Dezenfektanların kanal boşluğundan uzaklaştırılması amacıyla steril salin ile yikanması.....	57
<b>Resim 10.</b> Kanal boşluğunda kalan salinin, 3 adet steril kağıt koniye aseptik şartlar altında emdirilmesi.....	57
<b>Resim 11.</b> Steril salin içinde kağıt koniler .....	58
<b>Resim 12.</b> SDÜ Teknokent BSN sağlık analiz laboratuvarında bulunan KLTM.....	58
<b>Resim 13.</b> LIVE/DEAD™ BacLight™ 7012 kiti (thermofisher.com).....	59
<b>Resim 14.</b> KLTM ye yerleştirilen dairesel petri içindeki dentin bloğunun kanal boşluğuna odaklanmış lazer ışını .....	60
<b>Resim 15.</b> a), b), c). Dentin yüzeyini kaplayan çok türlü biyofilmin SEM ile 5000, 10000 ve 20000 büyütme altında görüntülenmesi .....	63
<b>Resim 16.</b> a),b),c). Çok türlü biyofilm kesiti ve EPS içine gömülü bakteri kolonilerinin 5000,10000 ve 20000 büyütme altında görüntülenmesi .....	65
<b>Resim 17.</b> 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması .....	68
<b>Resim 18.</b> 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü. ....	69
<b>Resim 19.</b> 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü. ....	69

<b>Resim 20.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	70
<b>Resim 21.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ 'e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü. ....	71
<b>Resim 22.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ 'e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü. ....	71
<b>Resim 23.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	72
<b>Resim 24.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü. ....	73
<b>Resim 25.</b> 1 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	73
<b>Resim 26.</b> 1 gün boyunca CHX ne maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	74
<b>Resim 27.</b> 1 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	75
<b>Resim 28.</b> 1 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	75
<b>Resim 29.</b> 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	76
<b>Resim 30.</b> 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	77
<b>Resim 31.</b> 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	77
<b>Resim 32.</b> 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	79
<b>Resim 33.</b> 7 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	80
<b>Resim 34.</b> 7 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	80
<b>Resim 35.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	81
<b>Resim 36.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	82

<b>Resim 37.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	82
<b>Resim 38.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	83
<b>Resim 39.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	84
<b>Resim 40.</b> 7 gün boyunca $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP}$ ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	84
<b>Resim 41.</b> 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	85
<b>Resim 42.</b> 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	86
<b>Resim 43.</b> 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	86
<b>Resim 44.</b> 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin karşılaştırılması .....	87
<b>Resim 45.</b> 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü .....	88
<b>Resim 46.</b> 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü .....	88

## 1. GİRİŞ

Enfekte kök kanalı, birçok bakteri türünün bir arada bulunduğu çok türlü biyofilm barındırır. Kök kanal tedavisinin başarısızlıkla sonuçlanmasının en önemli nedenlerinden biri, kök kanal sistemindeki biyofilmin tamamen elimine edilememesidir (1). Mikroorganizmaların kök kanallarından uzaklaştırılmasında uzun yıllardır farklı ajanlar değişik konsantrasyonlarda denenerek kullanılmaktadır. Fakat günümüzde kullanılan yöntemler ile hala enfekte kök kanalını tamamen dezenfekte edebilmek oldukça güçtür (2).

Son yıllarda nanoteknoloji alanındaki gelişmeler endodonti alanına da yansımış, nano boyuttaki materyallerin kazandığı üstün özellikler sayesinde farklı alanlarda nanopartikül kullanımı araştırmaları hız kazanmıştır. Gümüş nanopartikülü; bakterilerin hücre zarının işlevini bozarak, metabolik yollarıyla etkileşime girerek ya da DNA replikasyonlarını olumsuz etkileyerek antibakteriyel etki gösterebilmektedir. Bu nedenle son yıllarda endodonti alanında kök kanal sisteminin dezenfekte edilmesinde kullanılabileceği düşünülmektedir (3).

Bu çalışmanın amacı, geleneksel kök kanal medikamentlerinin (Ca(OH)<sub>2</sub> patı, CHX jeli) gümüş nanopartikülü ile karışımının 1 ve 7 günlük uygulamalarının kök dentininde oluşturulan çok türlü (*E. faecalis*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii*) biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin kültür ve konfokal lazer taramalı mikroskopi yöntemleri ile değerlendirilmesidir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Endodonti Mikrobiyoloji İlişkisi

Sağlıklı bir dişte pulpa-dentin kompleksi mine ve sement ile örtülü olduğundan oral kavitedeki mikroorganizmalardan izole halde ve sterildir. Mine ve sementin bütünlüğünü kaybetmesi (örn: çürük, travma kaynaklı çatlak ve kırıklar, restoratif prosedürler, diş yüzeyi temizliği ve kök yüzeyi düzleştirilmesi, atrizyon, abrazyon vb.) ya da doğuştan yokluğu (sement yüzeyinin servikalde boşluklar içermesi vb.) halinde pulpa-dentin kompleksi oral kavitedeki mikrobiyal floraya açık hale gelir. Periodontal hastalıkla ilişkili subgingival florada bulunan mikroorganizmalar da sementte bulunan açıklıklardan ya da lateral-apikal foraminalardan pulpa/dentin kompleksine geçiş yapabilir (1). Dentin, tübüler yapıda boşluklarla pulpa ile bağlantıda olan bir doku olduğundan, yüzeyi açığa çıktığında pulpa enfeksiyon açısından risk altındadır. Vital dişlerde, dentin tübüllerinde bulunan sıvı hareketi, odontoblast uzantıları, kollajen fibriller, lamina limitans gibi faktörler mikroorganizmaların dentine invazyonunu zorlaştırır. Vital olmayan dişlerde bakteriyel invazyonun vital dişlere göre çok daha hızlı gerçekleştiği çalışmalarla gösterilmiştir (4).

Endodontik enfeksiyon sadece pulpa nekrozu (çürük, travma, periodontal hastalık, iyatrojenik operatif prosedürler) ya da kök kanal tedavisi yoluyla, dişin savunma mekanizması olan pulpa kaybedildiğinde gelişebilir. Apikal periodontitis, kök kanal sisteminin enfeksiyonuna bağlı mikrobiyal kaynaklı enflamatuvar bir hastalıktır (5).

Endodontik enfeksiyon bir çok farklı yolla gelişebilir;

a) Açık dentin tübülleri: Dentin tübülleri; konik şekillidir, çapları pulpa sınırında en geniş (ortalama 2,5µm), mine ya da sement sınırında en dardır (ortalama 0.9 µm). En dar tübül çapı bile bir çok oral bakterinin ( ortalama 0.2-0.7 µm) geçişine izin verecek kadar geniştir. Dentin tübüllerinin mikroskopik çapının mine-dentin sınırında 1 µm olduğu bilinmesine rağmen, tübüler içerikten dolayı fonksiyonda olan kısmının çapı sadece 0.1 µm kadardır (6). Çürüğe bağlı gelişen dentinal skleroz, tersiyer dentin, smear tabakası, fibrinojenin intratübüler birikimi gibi sebeplerle dentin



geçirgenliği azalır ve bakterilerin pulpal alana geçişi zorlaşır (7). Dentinal sıvıda bulunduğu düşünülen antikor, kompleman sistem komponentleri gibi konak savunma mekanizmaları da dentini derin bakteriyel invazyondan korur (8). Pulpa vital olduğu sürece açık dentin tübüleri pulpal enfeksiyon için belirgin bir yol sayılamaz ancak dentin kalınlığının belirgin oranda azaldığı ve dentin geçirgenliğinin arttığı vakalarda enfeksiyon gelişme ihtimali olabilir. Periferal alandaki dentin kalınlığı en az 3 mm olduğunda bakterilerin toksik materyalleri pulpaya zarar veremezken, kalan dentin kalınlığı 0.3 mm ve daha az olduğunda belirgin bir irritasyon gelişebilir (9).

b) Çürük: Derin bir çürük lezyonunun altındaki dentin tübüleri içindeki bakteriler, pulpa direk olarak ağız ortamına açık olmasa dahi pulpaya ulaşabilir (10). Ayrıca bakteri hücreleri çiğneme esnasında gelişen hidrostatik basınç etkisiyle tübüllere doğru yönlenebilirler (11). Buna rağmen pulpa vital olduğu sürece enfekte olmayacaktır. Az sayıda bakteri pulpaya ulaşabilse de vital pulpa bakteri ürünlerini hızlı bir şekilde yok edebilir. Diğer bir yandan pulpa vitalitesi şüpheli ve savunma mekanizması zayıflamış durumda ise çok az sayıdaki bakteri bile enfeksiyonu başlatmakta yeterli olabilir (12).

c) Travma: Travmatize olmuş, nekrotik pulpalı ve kron bütünlüğü korunan dişlerde bakterilere rastlanmaktadır (13). Bakterilerin kanal içine nasıl ulaşabildikleri ise hala tartışma konusudur. Travma çoğunlukla mine ve dentinde makro ve mikro çatlaklara sebep olur. Bu çatlaklar kimi zaman sağlıklı dişlerde bile bulunabilir. Mine dentin sınırına kadar ulaşmasa dahi, dentinin derinliklerine inen bu çatlaklar fazla sayıda dentin tübülünün oral floraya açılmasına neden olur. Eğer travma sonrası pulpa vitalitesini koruyorsa pulpal sağlık tehlike altında değildir. Öte yandan pulpa nekrotik hale gelmişse kendini koruma yeteğini kaybeder ve enfeksiyona yatkın hale gelir (14).

Pulpa direk olarak ağız ortamına açık olduğu durumlarda; plak, çürük lezyonları, tükürük gibi etkenlerle enfekte olabilir. Pulpanın açılması ve tüm kanalın enfeksiyonu arasındaki süre çoğunlukla tahmin edilemez olsa da genellikle bu süreç yavaş ilerler (15).

d) Yan kanallar: Periodontal hastalıkla ilişkili subgingival biyofilmlerde bulunan mikroorganizmalar; servikal kök yüzeyindeki sement tarafından örtülenmemiş dentin tübüleri, lateral veya apikal foramen aracılığıyla kök kanalına ulaşabilirler. Buna rağmen marginal periodontitisli dişlerin pulpalarında enflamasyon artışı görülebilirken,

pulpa nekrozu sadece apikale kadar uzanan kemik defektine sahip periodontal hastalıklı dişlerde apikaldeki ana damarların geri dönüşümsüz olarak hasar görmesi ile gelişebilir (16).

e) Anakorezis: Kan veya lenf yoluyla sistemik dolaşıma geçen bakterilerin, hasarlı bölgelerde damar dışına çıkarak enfeksiyona neden olmasıdır. Ancak anakorezisin mikroorganizmaların kök kanalına ulaşma yollarından biri olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur (17).

f) Kök kanal tedavisi esnasında: Kanal tedavisi esnasında kanalların enfekte olmasının temel sebepleri; rezidüel dental plak, krona dıştaşı ya da çürük varlığı, rubber-dam uygulamasında teknik yetersizlikler ve tükürük izolasyonunun sağlanamaması, endodontik enstrümanların kontaminasyonu, irrigasyon solüsyonlarının kontaminasyonu olarak sıralanabilir.

g) Ara seans esnasında: Geçici dolgu materyalinin düşmesi, kırılması, mikrosızıntıya neden olması, diş dokusunun kırılması ya da drenaj için kanalın açık bırakılması gibi sebeplerle kök kanalları seans arasında enfekte olabilir.

h) Kök kanal tedavisi sonrasında: Kök kanal tedavisinin tamamlanmasından sonra geçici ya da daimi restoratif materyalin mikrosızıntısı, kopması, kırılması; diş dokusunun kırılması, kaybedilmesi, rekürrent çürükler, daimi restorasyonun geç yapılması gibi sebeplerle tedavi sonrasında da kanallar enfekte olabilir (1).

Mantarlar, arkealar ve virüslerin endodontik enfeksiyonla bağlantılı olduğu bilinmektedir (18, 19). Fakat apikal periodontitisin patogenezi ile ilişkili olan primer mikroorganizma bakterilerdir. Endodontik enfeksiyonların farklı tiplerinde 100 tür ve 9 filuma ait 460 dan fazla bakteri türü ve filotip bulunabildiği bildirilmiştir (20). 16s rRNA analizinin kullanıldığı son yıllardaki çalışmalarda enfekte kök kanallarında 10 fila, 143 tür gösterilmiştir (21).

Endodontik tedavinin temel amacı enfeksiyon odağının ortadan kaldırılması ve mikroorganizmaların kök kanalında ve çevre dokularda enfeksiyon/reenfeksiyon oluşturmasının engellenmesidir. Bu sayede periradiküler doku iyileşmesinin de gerçekleşmesi beklenir (1).

### **2.1.1. Endodontik Mikrobiyolojinin Tarihçesi**

Kök kanallarındaki bakterilerin varlığı ilk defa 17. yüzyılda amatör mikroskop yapımcısı Antonie van Leeuwenhoek tarafından gösterilmiştir. Leeuwenhoek bu organizmaları “animalcules” olarak tanımlamıştır (22).

Bu mikroorganizmaların endodontik hastalık yapabileceğinden o dönem şüphelenilmese de, ilerleyen 200 yıl içerisinde endodontik hastalığın mikroorganizma temelli olduğu konusunda düşünceler ortaya atılmıştır. 1894 yılında Dayton Miller, ışık mikroskobu kullandığı çalışmada kök kanallarında kok, basil ve spiroket şekilli bakterileri tanımlamıştır. Miller, o günkü teknolojiye bu bakterilerin çoğunu kültüre edemese de, endodontik hastalığa bakterilerin sebep olduğu hipotezini ortaya atmıştır (23).

Bu çalışmadan yaklaşık 70 yıl sonra Kakehashi ve ark. Miller'ın hipotezinin doğruluğunu onaylamışlardır. Konvansiyonel ve germ free ratların pulpalari ağız ortamına açılarak doku cevabını incelemişlerdir. Tüm konvansiyonel ratlarda pulpada nekroz ve apikal periodontitis oluşumu gözlenirken, germ free ratların pulpalari vital kalmış ve hatta kendilerini bir sert doku formasyonu ile tamir etmişlerdir. Dentin benzeri bu doku pulpadaki açıklığı kapatarak pulpanın oral kaviteden izole olmasını sağlamıştır (24).

1981 yılında Möller ve ark.ları apikal periodontitis gelişimi için mikroorganizma varlığının gerekliliğini bir kez daha gösterilmişlerdir. Maymun dişlerinde yapılan bu çalışmada devital ve enfekte olan dişlerde apikal periodontitis gelişimi görülürken, devitalize olmasına rağmen enfekte olmamış dişlerde periapikal alanda belirgin patolojik değişiklik gözlenmemiştir (25).

### **2.2. Endodontik Enfeksiyonlarda Öne Çıkan Mikroorganizmalar**

Endodontik enfeksiyona bağlı olarak gelişen apikal periodontitiste bir çok endojen enfeksiyonda olduğu gibi tek bir patojen sorumlu değildir. Farklı patojen türlerin bir arada bulunduğu kompleks bir flora mevcuttur. (26). Nekrotik pulpa içeren kök kanalları nemli, sıcak, besin içeren, anaerobik ve konak savunma mekanizmasından yoksun olduğundan bakterilerin çoğalması için uygun bir ortamdır

(1). Endodontik enfeksiyonlarda, enfeksiyonun tipi, zamanı, yeri gibi etkenler mikrobiyotayı etkilemektedir. Oral kavitede bulunan mikroorganizmalar kök kanallarına ulaşabilseler dahi kanallardaki besin varlığı, ortam asiditesi, ısı, konak direnci, bakteri etkileşimleri, oksijen gerilimi gibi faktörler mikroorganizmaların virülanslarını etkiler. Bu nedenle kök kanallarından izole edilebilen bakteri türleri daha sınırlıdır (27).

Kök kanallarında enfeksiyona sebep olan bakteriler enfeksiyonun başlangıç aşamasında ağırlıklı olarak fakültatif türlerdir (28). Enfeksiyonun ilerlemesi ile birlikte bir kaç gün ya da bir kaç hafta sonra pulpa nekrozu gerçekleşir, fakültatif bakterilerin de tüketimi ile birlikte ortamdaki oksijen azalmaya başlar. Bu azalmayla birlikte anaerobik türler ortamda baskın hale gelir. Özellikle kök kanalının apikal üçlüsünde anaerobik ortam daha da belirgindir (20).

Kök kanalına kolonize olan bakterilerin temel besin kaynakları:

- Ortograd yoldan kök kanalına ulaşan tükürük içeriği,
- Nekrotik pulpa dokusu,
- Retrograd yoldan apikal ve yan kanallar aracılığı ile kök kanalına sızan doku sıvıları ve eksudada bulunan protein ve glikoproteinler,
- Diğer bakterilerin metabolik son ürünleri.

Ortamdaki besinin türü de bakterilerin çeşitliliğini etkiler. Enfeksiyonun başlangıç aşamasında sakkarolitik bakteriler baskınken, ilerleyen safhalarda besin kaynağının değişmesi ile proteolitik bakteriler baskın hale gelir (20).

Primer intraradiküler enfeksiyon nekrotik pulpa dokusuna bağlı olarak gelişen apikal periodontitis enfeksiyonlarıdır. Genellikle anaerobik bakterilerin baskın olarak bulunduğu karışık bir flora mevcuttur. Primer endodontik enfeksiyonlu bir kök kanalı 10-20 türü/filotipi\* içeren yaklaşık  $10^3$ - $10^8$  adet bakteri hücresi bulundurabilir (29). Apikal periodontitis lezyonunun büyüklüğü direk olarak kök kanalı içindeki bakterilerin yoğunluğu ve çeşitliliği ile orantılıdır. Konuyla ilgili yapılan moleküler bir çalışmada 5 mm den küçük lezyonlarda yaklaşık 12 takson\*\* saptanabilirken, 5-10 mm lezyonlarda 16 takson, 10 mm den büyük lezyonlarda ise yaklaşık 20 takson

\*filotip: Karşılaştırmalı 16 S rRNA sekans analizi ile tanımlanan bir bakterinin filogenetik pozisyonu

\*\*takson: Canlıların sınıflandırılmasında, âlemden alt türe kadar bir hiyerarşi içinde düzenlenmiş tüm birimlerin ortak adı.

saptanmıştır. Geniş lezyon içeren bazı kanallarda ise 40 tan fazla takson olabileceği bildirilmiştir (27).

Primer endodontik enfeksiyonların hem akut hem de kronik formlarında gram negatif (Tablo 1); *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* ve *Veilonella*, gram pozitif (Tablo 2); *Porvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ve *Eubacterium* bakterileri yaygın olarak saptanmıştır (30).

İnatçı/sekonder intraradiküler enfeksiyonlar, endodontik tedavi başarısızlığının en önemli sebeplerinden biridir. Çok başarılı bir kemomekanik dezenfeksiyon yapılsa dahi kanaldaki bakterilerin tümünün yok edilemediği bir çok çalışma ile gösterilmiştir. İnatçı bakterilerin uygulanan tedavi prosedürlerine dirençli olduğu ya da ulaşılamayan alanlarda bulunduğu düşünülmektedir (31-33). Primer enfeksiyonlarda genel olarak görülen gram negatif bakteriler sekonder enfeksiyonlarda çoğunlukla uzaklaştırılmıştır. Enstrumantasyon ve medikasyon sonrası *F.nukleatum*, *Provetella* türleri, *Campylobacter rectus* gibi anaerobik gram negatif çomakların kanal içinde bulunabildiği bildirilmiştir (34).

Kemomekanik tedavi prosedürlerine direnç gösteren bakterilerin çoğunun gram pozitif özellik taşıdığı bilinmektedir. Gram pozitif fakültatif ve anaerobik türlerden Streptokoklar, *P. micro*, *Actinomyces* türleri, *Propionibacterium* türleri, *P. alactolyticus*, laktobasiller, *E. faecalis* ve *Olsenella uli* ye sıklıkla bu örneklerde rastlanmaktadır. Gram pozitif bakterilerin antimikrobiyal tedaviye daha dirençli olduğu ve mekanik temizleme sonrası medikament uygulanan kanallarda oluşan olumsuz çevre koşullarına daha iyi adapte olabildiği düşünülmektedir (31, 34, 35).

**Tablo 1.** Endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan gram negatif bakteriler

ANAEROPLAR		FAKÜLTATİFLER	
Cins	Tür	Cins	Tür
<i>Dialister</i>	<i>D.invisus</i>	<i>Capnocytophaga</i>	<i>C.gingivalis</i>
	<i>D.pneumosintes</i>		<i>C.ochracea</i>
	kültüre edilemeyen filotipler	<i>Eikenella</i>	<i>E.corrodens</i>
<i>Porphyromonas</i>	<i>P.endodontalis</i>	<i>Aggregatibacter</i>	<i>A.actinomycetomcomitans</i>
	<i>P.gingivalis</i>		<i>A.aphrophilus</i>
<i>Tannerella</i>	<i>T.forsythia</i>	<i>Neisseria</i>	<i>N. mucosa</i>
<i>Prevotella</i>	<i>P.intermedia</i>		<i>N.sicca</i>
	<i>P.nigrescens</i>		
	<i>P.tannerae</i>		
	<i>P.denticola</i>		
	<i>P.baroniae</i>		
	kültüre edilemeyen filotipler		
<i>Fusobacterium</i>	<i>F.nucleatum</i>		
	<i>F.periodonticum</i>		
	kültüre edilemeyen filotipler		
<i>Campylobacter</i>	<i>C.rectus</i>		
	<i>C.gracilis</i>		
	<i>C.curvus</i>		
<i>Synergistes</i>	kültüre edilemeyen filotipler		
<i>Veillonella</i>	<i>V.parvula</i>		
	kültüre edilemeyen filotipler		
<i>Megasphaera</i>	kültüre edilemeyen filotipler		
<i>Anaeroglobus</i>	<i>A.geminatus</i>		
<i>Treponema</i>	<i>T.denticola</i>		
	<i>T.socranskii</i>		
	<i>T.parvum</i>		
	<i>T.maltophilum</i>		
	<i>T.medium</i>		

**Tablo 2.** Endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla karşılaşılan gram pozitif bakteriler

ANAEROPLAR		FAKÜLTATİFLER	
Cins	Tür	Cins	Tür
Actinomyces	<i>A.israelii</i>	Actinomyces	<i>A.naeslundii</i>
	<i>A.gerencseriae</i>	Corynebacterium	<i>C.matruchotif</i>
	<i>A.meyeri</i>	Lactobasillus	<i>L.salivarius</i>
	<i>A.odontolyticus</i>		<i>L.acidophilus</i>
Pseudoramibacter	<i>L.paracasei</i>		
Filifactor	<i>F.alocis</i>	Streptococcus	<i>S.mitis</i>
Eubacterium	<i>E.infirmum</i>		<i>S.sanguinis</i>
	<i>E.saphenum</i>		<i>S.gordonii</i>
	<i>E.nodatum</i>		<i>S.oralis</i>
	<i>E.brachy</i>		Enterococcus
	<i>E.minutum</i>	Granulicatella	<i>G.adiacens</i>
Mogibacterium	<i>M.timudum</i>		
	<i>M.pumilum</i>		
	<i>M.neglectum</i>		
	<i>M.vescum</i>		
Propionibacterium	<i>P.acnes</i>		
	<i>P.propionicum</i>		
Eggerthella	-		
Olsenella	<i>O.uli</i>		
	<i>O.profusa</i>		
	kültüre edilemeyen filotipler		
Bifidobacterium	<i>B.dentium</i>		
Lactobasillus	<i>L.cateniformis</i>		
Peptostreptococcus	-		
Parvimonas	-		
Streptococcus	-		
Peptoniphilus	-		

### 2.2.1. Enterokoklar ve *E. faecalis*

Enterokoklar küre veya ovoid şekilli, tek başlarına, çiftler veya kısa zincirler halinde bulunabilen, hareketsiz, gram-pozitif koklardır. Fakültatif anaerop oldukları için buldukları ortamda oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilirler (36). Aşırı alkali pH (9.6) ve tuz konsantrasyonları dahil olmak üzere sert çevre koşullarında bile üreme yetenekleri vardır. Safra tuzları, deterjanlar, ağır metaller, etanol, azidler ve dehidratasyona karşı direnç gösterirler. 10 - 45 °C aralığında büyüeyebilirler ve 60 °C'lik bir sıcaklıkta 30 dakika boyunca yaşayabilirler (37). Enterokoklar insan vücudunda gastrointestinal sistem, genitoüriner sistem ve oral kavitede bulunabilirler. Hospitalize edilmiş hastalarda sıklıkla invaziv enfeksiyonlara sebep olurlar (38). Oral enfeksiyonlarda en fazla görülen çeşidi *E. faecalis* tir (39). Kök kanal tedavisi tamamlanmış dişlerde sekonder enfeksiyon etkeni olarak sıklıkla izole edilir. Özellikle çoklu seans tedavi uygulanmış ya da drenaj için açık bırakılmış kanallarda bulunma sıklığı daha fazladır (40). *E.faecalisin* kök kanal tedavi prosedürlerine dirençli olması sahip olduğu bazı özellikler ile açıklanmaya çalışılmaktadır:

- Kök kanal duvarlarında kolonize olarak yoğun agregatlar ya da biyofilm oluşturabilmesi,
- Dentin tübüllerinin derinlerine penetre olarak kök kanal tedavisi prosedürlerinden kaçabilmesi (41),
- Kalsiyum hidroksite dirençli olması (42),
- Kök kanallarında diğer bakterilerin besin zincirlerinden bağımsız olarak tek başına kolonize olabilmesi (43),
- Çevre koşullarına gen ekspresyonu yoluyla adapte olabilmesi (44),
- Görülebilen fakat kültüre edilemeyen fazda (VBNC-viable but non-culturable) iken görünürlüğü ve patojenitesini koruyarak uygun çevre koşullarında tekrar kendini aktifleştirebilmesi (45),

*E. faecalis*, primer endodontik enfeksiyonlar ve inatçı enfeksiyonlar dahil olmak üzere farklı periradiküler hastalık formlarıyla ilişkilidir. Primer endodontik



enfeksiyonlar kategorisinde *E. faecalis*, asemptomatik kronik periradiküler lezyonlardan, akut periradiküler periodontitis veya akut periradiküler apse lezyonlarından daha fazla sıklıkla izole edilmektedir. *E. faecalis*, primer endodontik enfeksiyonların %4 ila %40'ında bulunur (36). Başarısız kök kanal tedavisi vakalarında *E.faecalis* rastlanma olasılığı primer endodontik enfeksiyonlara göre dokuz kat daha fazladır. Kök kanal tedavisi tamamlanmış periradiküler enfeksiyonlu dişlerdeki prevalansı %24-77 olarak bildirilmiştir (36). Çalışma sonuçları arasındaki bu farklılığın sebepleri, farklı tanımlama tekniklerinin kullanılması, coğrafik farklılıklar ve örnek sayılarının farklılığı ile açıklanabilir (46).

*E. faecalis*; litik enzimler, sitolizin, agregasyon maddesi, feromonlar ve lipoteikotik asit gibi belirli virülans faktörlerine sahiptir. Konak hücrelere yapıştığı, diğer bakteriyel hücrelerle rekabet etmesini sağlayan proteinler salgıladığı ve konak cevabını değiştirdiği gösterilmiştir (36). *E. faecalis*, lenfositlerin etkisini baskılayarak potansiyel olarak endodontik başarısızlığa sebep olabilir (47). Yaygın genetik polimorfizm sergilediği bilinmektedir (48). Dentine bağlanmasına yardımcı olan serin proteaz, jelatinaz ve kolin bağlama proteinine (ACE) sahiptir. Dentin tübülleri içerisine invaze olup yaşayabilecek kadar küçük, yeterli bir beslenme kaynağı elde edilinceye kadar uzun süreli açlıklara dayanacak kadar güçlüdür (49).

*E.faecalisin* sahip olduğu bu özellikler, kök kanal tedavisi tamamlanmış dişlerdeki sekonder enfeksiyon etkeni olarak prevalansının yüksek olmasını açıklayabilmektedir. Ancak son yıllarda, birbirinden bağımsız laboratuvar çalışmalarından elde edilen bazı bulgular nedeniyle *E.faecalisin* endodontik başarısızlıktaki temel etken olup olmadığı sorgulanmaktadır:

- Kolay kültüre edilebilmesine rağmen kök kanal tedavisi tamamlanmış sekonder enfekte örneklerin hepsinde tespit edilememektedir (50).
- Sekonder enfekte vakalarda tespit edildiğinde nadiren baskın olan bir kaç türden biri olmaktadır (51).
- Periapikal lezyonu bulunan vakalarda bulunma sıklığı, lezyonu olmayan vakalara göre daha düşüktür. Bu da düşük patojenik yeteneğe sahip olabileceğini düşündürmektedir (52).

### 2.2.2. Streptokoklar ve *S.mutans*

İlk defa 1924 yılında Clarke, çürük lezyonlarından küçük, gram pozitif kokobasilleri izole etmiş ve değişken (mutant) koloni morfolojileri göstermesi sebebiyle bu bakteriyi *Streptococcus mutans* olarak isimlendirmiştir (53). Önceki yıllarda yapılan serolojik tiplendirme çalışmaları *mutans* streptokokları grubunda yer alan ve serolojik farklılıklar gösteren 7 farklı grubun var olduğunu göstermiştir (54). Mutans streptokoklar ve laktobasiller, asit meydana getirerek diş çürüğünün oluşmasında asidojenik etki oluştururlar. Bu bakterilerin diş çürüğü üzerindeki rolleri hakkında pek çok çalışma bulunmaktadır (55). Streptokokların çok sayıda ekstrasellüler protein salımı gerçekleştirerek sert çevresel koşullara adapte olduğu bilinmektedir. Bu proteinlerin bazıları, metabolizmalarının anahtar bileşenlerdir. *S. floridis*, *S. oralis* ve *S.parasanguis* düşük pH ortamında hidrojen adenozintrifosfataz salımı gerçekleştirerek, *S. oralis* piruvat- format liyaz ve laktat dehidrojenaz enzimleri sentezleyerek sert çevre koşullarına adaptasyon gösterir (56).

Bir çok streptokok türü ve *S.mutans*, primer enfekte nekrotik pulpal kök kanallarından (13), kök kanalı genişletilmesi ve medikament uygulanması sonrası (31, 57) ya da kök kanal tedavisi tamamlanmış sekonder enfekte vakalardan izole edilmiştir (58). Streptokokların, diğer Gram pozitif organizmalar (laktobasiller ve enterokoklar) ile birlikte, özellikle endodontik tedavi sırasında ve sonrasında alınan kültürlerdeki baskınlığı, kötü beslenme şartları altında dayanıklılığına ve hayatta kalma kabiliyetine işaret etmektedir. Ortam koşullarına adaptasyonu ve kök kanal tedavisi sonrası apikal periodontitis gelişimindeki rolü ise henüz tam olarak açıklanamamıştır (35).

Chavez ve arkadaşlarının apikal periodontitisli kök kanallarında bulunan streptokok türleri ile ilgili çalışmalarında, analiz ettikleri örneklerde tespit ettikleri türlerin çeşitliliği, tedavi sonrası apikal periodontitise neden olan kompleks floranın rolünü göstermektedir. Streptokokların, ortamdaki diğer organizmalara bağlanma sağlayarak mikro toplulukların oluşumunu başlatmada önemli olabileceklerini, böylece diğer mikroorganizmaların hayatta kalabilmeleri için besin ve diğer olumsuz koşullara karşı direnç oluşturabileceklerini bildirmişlerdir. Bu tür mikro topluluklar,

antimikrobiyal prosedürlere karşı bile direnç geliştirebilecek yeteneğe sahip olabilir (35).

Apikal periodontitisin patojenitesini açıklığa kavuşturmak için streptokok türlerinin, tedavi edilmiş kök kanallarındaki elverişsiz koşullara adapte olma, hayatta kalma ve büyümek için kullandıkları mekanizmaların araştırılması gerekmektedir (35).

### **2.2.3. Laktobasiller ve *L.acidophilus***

Laktobasiller çubuk şekilli, Gram pozitif, spor oluşturmeyen, mikroaerofilik, yüksek oranda asidojenik ve asit toleranslı bakterilerdir. Laktobasiller, mine ve dentini dekalsifiye edebilen laktik asiti üretme yetenekleri nedeniyle diş çürüğünün ilerlemesi ile ilişkilidir. Laktobasillerin 100 den fazla türü tanımlanmıştır. İnsan oral mikrobiyom veritabanında bunların 26 tanesi listelenmiştir (59, 60).

Enfekte kök kanallarındaki laktobasil prevalansı hakkında az sayıda çalışma bulunmaktadır. Enfekte kök kanallarında en yaygın olarak bulunan türler; *L. casei*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *L. fermentum*dur (61). Tanımlama için çeşitli yöntemler mevcut olmasına rağmen, laktobasillerin tür seviyesinde tanımlanmasının genetik benzerlikler nedeniyle zor olduğu kanıtlanmıştır (62). Sjöholm ve Bahrami nin 2014 yılında 16S ribozomal RNA (rRNA) gen sekansı yöntemini kullanarak enfekte kök kanallarındaki laktobasil varlığını araştırdıkları çalışmada prevelansı %22 olarak bildirmişlerdir (63). Bu oran, 1974 yılında Sundqvist ve Carlsson un %27 lik oranıyla benzerdir (61). Konuyla ilgili diğer çalışmalarda laktobasil prevelansı %3-37 arasında bildirilmiştir (64). Çalışmalar arasındaki prevelans farklılıklarının sebebi; örnekleme tekniklerinin farklılığına veya Gram-pozitif çubukların çalışmaya dahil edilip edilmemesine bağlı olabilir.

### **2.2.4. Aktinomiçesler ve *A.naeslundii***

Aktinomiçes türleri gram-pozitif, filamentöz büyüme ve dallanma gösteren, anaerobik veya mikroaerofilik bakterilerdir. Geçmişte bu organizmalar, dallanmış morfolojileri ve miçelyal görünümleri nedeniyle fungal organizmalar olarak sınıflandırılmalarına rağmen, ökaryotik organizmalarda bulunan mitokondri ve

çekirdek zarının bu organizmalarda bulunmayışı nedeniyle prokaryotik bakteriler olarak sınıflandırılmışlardır (65).

Aktinomiçes türlerinin en belirgin özellikleri pleomorfik olmalarıdır. Bu nedenle, filament, çubuk, kok ve hatta spiral gibi çeşitli mikroskopik görümlere sahiptirler. Bununla birlikte, çubuk şeklindeki yapılar diğer mikroskopik görümlere göre baskındır (66).

Aktinomiçes olarak sınıflandırılan mikroorganizmalar, insan ağız boşluğu ve faringeal bölgenin yaygın sakinleridir. Tonsil kript, dental plak, çürük dentin ve periodontal cep gibi sahalardan izole edilebilir (67). *Actinomyces* türlerinin supra ve subgingival plağın en yaygın türü olduğu bildirilmiştir (68). Bu mikroorganizmalar, yumuşak dokuya invaze olduğunda oral bölgede patojenik hale gelebilir. Çoğu aktinomikotik enfeksiyon vakası, diş çekimi, çene kırığı veya periodontal cerrahi gibi bir ön travma ile ilişkilendirilmiştir (69-71). Derin periodontal cepler de aktinomikoz için giriş yolu oluşturabilir (72).

Aktinomiçesler ayrıca kök kanalları yoluyla dokulara girebilir. Bu organizmaların oluşturduğu enfeksiyonlar, kök kanalı enfekte olmuş dişlerin apikallerini çevreleyen dokularda gösterilmiştir (73). Aktinomiçes suşlarının kök kanal duvarına tutunmasını sağlayacak, endodontik tedavi sırasında apikale itilen dentinal debrislere yapışacak ve diğer bakterilere veya konakçı hücrelere tutunabilecek fimbriyal yapılara sahip olabileceği öne sürülmüştür (74). Aktinomiçeslerin, konakçıya aşırı rahatsızlık vermeden uzun süre dokularda yaşayabilme yeteneği olduğu bilinmektedir. Bakteriler, protein-polisakkarit kompleksi matriksinde çok sayıda dallanma ve filament meydana getirip kolektif koloniler oluşturarak konak savunmasından kaçabilir (74). Bu tür aktinomikotik koloniler, akut bir tepkiye neden olmaksızın, kronik bir periradiküler enflamasyon oluşturarak konak doku ile dengede yaşayabilir. Persiste enfeksiyonların oluşabilmesi için çok miktarda koloniye ihtiyaç vardır (75). Bu mikroorganizmaların düşük patojenitesi ve bunun sonucunda minimal konak yanıtı oluşması, periradiküler lezyonun kronik devam etmesinin nedenlerinden olabilir (76).

Aktinomiçes türleri, primer kök kanal enfeksiyonlarının yaklaşık % 10 ila % 15'inde bulunabilir (76). *A.naeslundii* enfekte kök kanallarından sıklıkla izole

edilmektedir. Tang ve ark. enfekte kök kanallarında *A.naeslundii* nin travma ile ilişkili dişlerden sıklıkla izole edildiğini bildirmişlerdir (76, 77).

Bağımsız ekstradiküler enfeksiyonlar, intradiküler enfeksiyonun başarılı bir şekilde ortadan kaldırılmasından sonra bile varlığını sürdürebilir. Apikal aktinomikozis olarak adlandırılan ekstradiküler enfeksiyonlarda rol oynayan ana bakteri türleri aktinomiçes türleri ve *Propionibacterium propionicum* olarak bildirilmiştir (78). Aktinomikoz, süpürasyon, apse oluşumu ve drene olan sinüs yolu ile karakterize kronik, granülomatöz bir enfeksiyöz hastalıktır. Dokularda, Actinomyces türleri 4 mm'ye kadar çaplara ulaşabilen mikroskobik veya makroskopik kümeler halinde büyüyebilir (79). Kümeler bazen yumuşak dokulardan sinüs yolları ile salınır ve kükürt içerdiğine dair kesin bir kanıt olmasa bile sarımsı görünümünden dolayı kükürt granülleri olarak adlandırılırlar. Ricuci ve ark. vaka raporlarında apikal rezeksiyon gerektiren persiste bir enfeksiyonda apikal parçada ve lezyon sahasında apikal aktinomikoz ve sülfür granülleri varlığını bildirmişlerdir (80).

### **2.2.5. Endodontik Enfeksiyonlardaki Diğer Mikroorganizmalar**

Mantarlar: Ökaryotik bazı mantar türleri - özellikle candida türü - ağızda kolonize olabilir. Kök kanallarında sadece primer intradiküler enfeksiyonlarda tespit edilmişlerdir. Bu konuyla ilgili moleküler bir çalışma C.albicans 'ın primer enfekte kanallarda bulunma oranını %21 olarak bildirmiştir (81).

Arkeler: Arkeler, bakteriler ve ökaryotlar üç saha sisteminin temel gruplarıdır. Arkeler, prokaryotların oldukça farklı bir grubudur. Bu ailenin üyeleri genellikle ekstremofil (aşırısever) olarak tanınırlar. Fakat bazıları ekstrem olmayan çevre koşullarında da yaşayabilir. Bugüne dek insan vücudunda patojen özellik gösteren bir arkeye rastlanmamıştır. Primer enfekte kanallarda yapılan bir çalışmada *Methanobrevibacter oralis* e benzeyen filotipte mikroorganizmalara rastlanmıştır (82).

Virüsler: Virüsler, çoğalmak için konak hücrelerini kullandıklarından nekrotik pulpa içeren kanallarda bulunmaz. Kök kanallarında virüsler; enflame olmayan vital pulpalı, human immunodeficiency virus (HIV) enfeksiyonlu hastalarda bildirilmiştir

(83). Başka bir çalışmada konak hücrelerin canlı olduğu periapikal lezyonlarda sitomegalovirüs (CMV) ve epstein- barr virüs (EBV) varlığı gösterilmiştir (84). CMV ve EBV enfeksiyonlarının semptomatik apikal periodontitis lezyonlarında, geniş lezyonlarda ve HIV pozitif hastalarda daha sık görüldüğü bildirilmiştir (84, 85).

### **2.3. Biyofilm**

Mikroorganizmalar topluluklar halinde bulduklarında genellikle biyofilm olarak adlandırılırlar. Biyofilmlerin tanımı, biyofilm araştırmalarındaki yeni keşiflerle birlikte yapısal ve gelişimsel karmaşıklıkları açıklayacak şekilde zamanla değişmiştir. Bakteriyel orijinli ekstraselüler polimerik matris (EPS) içine gömülmüş canlı veya canlı olmayan yüzeye bağlı mikrobiyal agregatlar tanımı, sıvı bir fazda yüzen ya da hava-sıvı arayüzlerinde bulunan hücre agregatlarını içerecek şekilde genişletilmiştir (86). Biyofilm oluşturabilme yeteneği bir virülans faktörü olarak kabul edilmektedir. İnsan vücudunda yaşayan mikroorganizmalar, ağırlıklı olarak biyofilmlerde yaşamaktadır. Biyofilm topluluklarında yaşayan mikroorganizmaların enfeksiyonların yaklaşık % 80'ine neden olduğu tahmin edilmektedir (87, 88).

#### **2.3.1. Biyofilmin Gelişimi**

Biyofilm oluşumu için gerekli faktörler; bakteri hücreleri, sıvı bir ortam ve bir yüzeydir.

Aşama 1: Yüzeye inorganik ve organik moleküllerin absorpsiyonu ile yüzeyin bakteri tutunmasına uygun hale gelmesidir. Dental plak meydana gelmesi esnasında yüzey, tükürük pelikülleri ile bakteri yapışmasına uygun hale gelir.

Aşama 2: Planktonik bakteri hücrelerinin yüzeye adezyon göstermesi ile karakterizedir (89).

Faz 1 (Bakterilerin yüzeye tutunması): İlk bakteri-substrat etkileşimi, yüzey enerjisi ve yük yoğunluğu gibi fizikokimyasal özelliklerle belirlenir. Bakteriler, fimbria, pili, flagella ve EPS (glikokaliks) gibi bakteriyel yüzey yapıları ile bir

substrata yapışır. Bu bakteriyel yapılar tarafından bakteri ve yüzey arasında köprüler oluşturulmaktadır (90).

Faz 2 (başlangıçta spesifik olmayan mikrobiyal-substrat yapışma fazı): Bakteri yüzey yapıları ve substrat arasındaki moleküler spesifik etkileşimler aktif hale gelir. Bu etkileşimler, elektrostatik çekim, kovalent bağ ve hidrojen bağı, dipol etkileşimi ve hidrofobik etkileşimin birleşimidir. *Porphyromonas gingivalis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus salivarius*, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*, *Streptococcus mutans* ve *Actinomyces naeslundii*, bu yüzey yapılarına sahip oral bakterilerin bazılarıdır (91).

Faz 3 (spesifik mikrobiyal-substrat yapışma fazı): Substrat üzerindeki reseptörlere bağlanan polisakarit adhezin veya ligand oluşumu sayesinde, bir substrata spesifik bakteriyel yapışma gerçekleşir (92, 93).

Aşama 3: Bakteriyel büyüme ve biyofilmin genişlemesi aşamasıdır. Mikroorganizmaların oluşturmuş olduğu tek katmanlı mikrokoloni, sekonder kolonileri yüzeye çekerek biyofilmin son aşamasını oluşturur (94). Bu metabolik olarak aktif mikroorganizma topluluğu, bireylerin görev ve yararlarını paylaştığı olgun bir biyofilmdir (95).

Biyofilm formasyonu sırasında hücre düzeyinde iki çeşit mikrobiyal etkileşim gerçekleşir. İlki, askıda duran hücre ve zemine daha önceden tutunan hücre arasında gerçekleşen “ko-adezyon” etkileşimidir. İkinci etkileşim ise genetik olarak farklı hücrelerin birbirini tanıması ve yığın halinde yaşamasıdır. Bu etkileşim ko-agregasyon olarak adlandırılır (96, 97). Oral bakteriler ko-agregasyon için işbirliği içine girebilir. *F. nucleatum* Gram-negatif filamentöz anaerobik bir bakteri olup bütün oral bakteriler ile ko-agregasyon oluşturabilir. Non-agrege bakteriler arasında bile köprü görevi görerek birbirlerine bağlar (98). Uzun filamentöz bakteri ve yüzeye tutunan küre şeklindeki kokların etkileşimi karakteristik “corncob” yapısını oluşturur (99).

### 2.3.2. Bakterilerin Virülans Faktörleri

Bir mikroorganizmanın hastalığa neden olma yeteneği, patojenitesi olarak kabul edilir. Virülans, bakterilerin patogenezi arttıran ve kötü çevre koşullarında hayatta kalmalarını sağlayan faktörlerdir.

Bakterilerin virülans faktörleri şu şekilde sıralanabilir:

*Tutunmada etkili virülans faktörleri:* Adezinler (fimbrialar, afimbrial yüzey proteinleri), ekzopolisakkaritler, lipoteikoik asit, dış membran proteinleri, dış membran vezikülleri,

*İnvazyonda etkili virülans faktörleri:* Flagella, enzimler (kollejenaz, hyalüranidaz, kondroitin sülfataz, fibrinolizin, asit fosfataz, DNAaz),

*Yaşamlarını sürdürmede etkili virülans faktörleri:* Ekzopolisakkaritler (kapsül), IgM, IgG, IgA, C3 ve C5 proteinleri, lipopolisakkaritler, flagella, ekzotoksinler, ısı-şok proteinleri, metabolik son ürünleri,

*Direk hasarda etkili virülans faktörleri:* Ekzotoksinler, enzimler (kollejenaz, hyalüranidaz, kondroitin sülfataz, aminopeptidaz, fosfolipaz, nörominidaz, asit fosfataz), metabolik son ürünleri (kısa zincirli yağ asitleri, polyamınler, volatil sülfür bileşenleri, indol, amonyak),

*İndirek hasarda etkili virülans faktörleri:* Lipopolisakkaritler (lipid A), peptidoglikan, lipoteikoik asit, fimbria, ekzopolisakkaritler, dış membran proteinleri, lipoproteinler, DNA, ısı-şok proteinleri (1).

### 2.3.3. Biyofilmlerde Antimikrobiyal Dirençte Etkili Faktörler ve Mekanizmalar

Biyofilm topluluğunda yaşayan mikroorganizmaların antimikrobiyallere karşı daha fazla direnç gösterdiği ve konvansiyonel antibiyotiklerin 10- 1000 kat daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılmalarının gerekliliği bildirilmiştir (100). EPS, biyofilmin içine nüfuzu sınırlamak için antimikrobiyal maddeleri aktif olarak bağlar. Antimikrobiyalin difüzyonunu yavaşlatarak ve sınırlayarak biyofilm topluluğunda yaşayan hücrelere ulaşan etkili lokal konsantrasyonu azaltır. Bu nedenle, biyofilmler,



topluluğu korumak için evrimleşmiş olabilecek çeşitli mekanizmalara bağlı olarak antibiyotiklere ve bağışıklık savunma mekanizmalarına daha fazla direnç gösterirler (86).

*EPS* : EPS nin ana bileşeni, hücre kümeleri etrafında dolaşan sudur (101). Su kanalları besin maddelerinin içeri girmesine ve atık maddelerin çıkışına izin verir. Sıvı akışı, biyofilm içinde ve dışında, besin ve metabolik ürünlerin hareketinde önemli bir rol oynar (102).

Geçmişte EPS ya da “glikokaliksin” rolünün, yüzeylere ve hücreler arasında adezyonu sağlamak olduğu düşünülüyordu (103). Günümüzde, EPS nin, bakteri hücrelerinin agregasyonu, su tutma, bakteri hücrelerini koruma, enerji havuzu olma, iyonik değişim sağlama, organik ve inorganik bileşiklerin emilmesi, besin kaynağı olma ve genetik bilgi alışverişini içeren daha geniş bir fonksiyon aralığına sahip olduğu bilinmektedir. EPS, biyo-filmlerin çoğunun kuru kütlesinin % 90'ından fazlasını oluşturmaktadır ve biyofilm için bir “iskele” ve aynı zamanda antimikrobiyal ajanlara karşı fiziksel bir bariyer görevi görür (104).

*Ekzopolisakkaritler*: Eksopolisakkaritler yapısal stabilite sağlarlar. Hücreler arası adezyona ve biyo-film bir yüzeye yapışmasına aracılık eden proteinler için iskele görevi gören yapılardır (104, 105). Ayrıca biyo-filmde antimikrobiyal dirençte ve biyo-film konak savunmasından korunmasında da rol oynayabilirler (106).

*eDNA*: eDNA, adhezyon, agregasyon, uyum ve genetik bilgi alışverişinde görev yapar (107). Ayrıca biyo-film ilk kuruluşunda kritik bir rol oynar. eDNA nın birincil kaynağının *quorum sensing* mekanizmasıyla kontrol edilen otoliz hücreleri olduğu düşünülmektedir (108). Erken biyo-film oluşumu sırasında eDNA'nın hücre lizizinden bağımsız bir şekilde üretildiği de gösterilmiştir (109).

*Hücre-hücre etkileşimi ve quorum sensing*: Biyo-film oluşumunda temel süreçler bir yüzeye tutunmayı, hücre proliferasyonunu, diğer bakterilere yapışmayı, hücre dışı polimerik madde matriksinin üretimini ve olgunlaşmayı içerir (88). Bakterilerin biyo-film içindeki dağılımının ve hücre-hücre mesafesinin hücreler arasındaki iletişimde etkili olduğu bilinmektedir. Bakteriler, türlere özgü moleküler etkileşimler sayesinde, biyo-filmdeki değişken çevresel koşullara uyum

sağlayabilmektedir. Bu sayede ortamdaki değişikliklere cevap olarak iletişim kurabilir, işbirliği yapabilir ve davranışlarını değiştirebilirler (110, 111).

*Horizontal gen transferi:* Horizontal gen transferi, hem tür içinde hem de türler arasında genetik bilginin hareketine izin verir. Horizontal gen havuzu, plazmidleri, bakteriyofajları, transpozonları, insersiyon sekanslarını ve patojenite adalarını içerir. Horizontal gen transferi, antibiyotik direncinin yayılmasına neden olmasından dolayı klinik açıdan özellikle önemlidir (112).

*Antimikrobiyallerin düşük penetrasyonu:* Biyofilmlerdeki hücrelerin antimikrobiyalere maruz kalma derecesi; biyofilmin kalınlığı ve antimikrobiyallerin konsantrasyonu ve matrise nüfuz etme yetenekleri de dahil olmak üzere birçok faktöre bağlıdır. Yüzeysel hücreler, yüksek konsantrasyonlarda antibiyotiklere hızlı bir şekilde maruz kalabilirken, biyofilmin daha derin kısımlarında, artan antibiyotik konsantrasyonlarına maruz kalma daha kademeli olacaktır ve antibiyotiklerin biyofilm boyunca yayılma kabiliyetine bağlı olarak değişkenlik gösterecektir (113). Antimikrobiyal maddenin biyofilmin tüm derinliğine nüfuz edememesi, bir biyofilm direnç mekanizmasıdır (88).

*Efluks pompası:* Efluks sistemleri, zehirli maddeleri ve antibiyotikleri aktif olarak hücrelerden dışarı pompalayabilen sistemlerdir. Çok sayıda ilaca dirençli efluks pompaları, biyofilmlerin antibiyotik direncine katkıda bulunur. Terapötik olarak, efluks pompası inhibitörleri biyofilm oluşumunu azaltmak için faydalı olabilir (114).

*Persiste hücreler:* Persiste hücreler, antibiyotik maruziyetinden kurtulmuş, genetik olarak homojen bir bakteri popülasyonunun küçük bir alt popülasyonunu oluşturan uyku halindeki hücrelerdir. Sürekli olarak meydana gelen rastlantısal olaylara (stokastik) veya çevresel stimuluslara (deterministik) yanıt olarak oluştukları düşünülmektedir. Biyofilm için, bu toleranslı fenotipik varyantların varlığı, nüfusun hayatta kalmasını sağlar. Biyofilmlerin antibiyotiklerle tedavisinin ardından, hızla büyüyen hücreler öldürülürken, persiste hücreler biyofilmi yeniden oluşturabilecek şekilde hayatta kalabilir (115).

#### **2.3.4. Çok Türlü Biyofilmlerdeki Antimikrobiyal Direnç**

Biyofilimde bulunan farklı tür mikroorganizmalar birbirlerini olumlu ya da olumsuz olarak etkileyebilirler. Olumlu olarak birarada ko-agrege olmaları, konjuge olmaları ya da antimikrobiyale maruz kalındığında diğer türlerin eradike olmalarını engellemeleri gösterilebilir. Ayrıca, birbirlerinin enzimlerini tamamlayabilir ve biyofilmin üç boyutlu organize uzaysal dağılımını sağlayabilirler. Bu sinerjistik etkiler sayesinde o ortamda tek başına biyofilm oluşturması mümkün olmayan bazı türlerin biyofilm oluşumuna katılması sağlanabilir (116). Çok türlü biyofilmlerin, tek türlü biyofilmlere göre antimikrobiyal tedaviye karşı daha dirençli olduğu gösterilmiştir (117). Bu durum, antimikrobiyal ajanlara maruziyetin ardından hayatta kalmış biyofilm topluluğunun kooperatif davranışlarıyla açıklanmaktadır (110). Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar quorum sensing mekanizmasını kullanarak haberleşme sağlarlar. Bu mekanizma sayesinde ortamdaki ihtiyaca göre biyofilme yararlı olacak türlerin daha çok üreyerek baskın hale gelmesi sağlanır (118). Ayrıca, tek türlü biyofilmlere kıyasla çok türlü biyofilmlerde kazanılabilecek potansiyel avantajlar olduğu gösterilmiştir (116). Hücreler arası salgılanan ürünler ve hücreler arasındaki türe özgü fiziksel etkileşimler, antimikrobiyal ajanlara karşı direncin artmasını sağlar (119). Kara ve ark. biyofilmin uzaysal analizlerinde, klorheksidin maruziyetine yanıt olarak tek ve çift türlü biyofilmler arasında farklılık olduğu gösterilmiştir (117).

#### **2.3.5. Kök Kanalı Mikroflorasında Antimikrobiyal Direnç**

İntraradiküler biyofilmler; kök kanal enfeksiyonu, büyük periapikal lezyonlar ve kistler gibi uzun süreli patolojik süreçlerin ana nedeni olarak kabul edilmektedir (120). Enfekte kök kanallarından ve periapikal apselerden sıkça kültüre edilen türler *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* ve *Candida*'dır. Moleküler teknikler kullanılarak yapılan endodontik enfeksiyon analizlerinde ise, büyük oranda tanımlanamayan ve kültüre edilemeyen türlerden oluşan çok çeşitli bir flora gösterilmiştir (121). Pirosekanslamamanın kullanıldığı son araştırmalar da, geleneksel Sanger dizilemeyle gösterilenden daha çeşitli bir florayı ortaya çıkarmıştır

(122). Fakat, kök kanalı yıkama solüsyonlarının, intrakanal medikametlerin ve kök dolgu materyallerinin antimikrobiyal aktivitesi, çoğunlukla (daha yakın tarihli çalışmalarda biyofilmleri içermekle birlikte) planktonik koşullar altında yetiştirilen suşlar (ağırlıklı olarak *E. faecalis*) kullanılarak değerlendirilmiştir. Antibakteriyel aktivite çalışmalarında klinikteki kök kanal florasının daha iyi taklit edilebilmesi için çok türlü biyofilmler üzerine çalışmalar planlanmalıdır. Bir *ex vivo* modelde, antibiyotik direnç belirleyicileri taşıyan konjugatif bir plazmidin iki yönlü transferi, endodontik enfeksiyon ile ilişkili iki tür- *S. gordonii* ve *E. faecalis*- arasında gösterilmiştir (123). Şu ana dek bilindiği kadarıyla elde edilen veriler, antibiyotik direncinin nadir olmadığını, çoklu ilaca dirençli suşların ise düşük bir insidansı olduğunu göstermektedir (124).

### **2.3.6. Biyofilmin Değerlendirilmesi**

Leeuwenhoek 1675 yılında, mikroskop kullanarak ilk kez suda ve tükürükte bulunan mikroorganizmaları saptamıştır. Birkaç yıl sonra, oral biyofilmlerdeki bakterileri araştırmaya başlamıştır. Biyofilmlerin görüntülenmesinde kullanılan mikroskopi yöntemleri; biyofilmin görselleştirilmesini sağlayarak, kanal içindeki biyofilmin uzaysal dağılımı, ultrastrüktürel yapısı ve substrat ile bağlantısı hakkında basit bilgiler sunar (125).

Topluluklardaki organizmaların fizyolojik tepkilerini izlemek ve çevresel rahatsızlıklara karşı direnmek için oluşturdukları davranışları anlayabilmek amacıyla, kontrollü koşullar altında çalışmalar yapılarak bir veri tabanı oluşturmak gereklidir. Modern moleküler araçlar, belirli besinlerin varlığında veya bozulmuş ortamlarda (örn., antimikrobiyallerin uygulanmasından sonra) mikroorganizmaların fizyolojik süreçlerinin incelendiği *in situ* çalışmalara olanak sağlar (86).

#### **2.3.6.1. Işık Mikroskobu**

Diş dokularının ve biyofilmin ışık mikroskobu ile incelenebilmesi için örneklerin fiksasyon, dekalsifikasyon, kesim ve boyama işlemlerinden geçmesi gereklidir. Bu adımlar uygulanırken çok miktarda emek ve zaman gerekir. Özellikle dekalsifikasyon zaman alıcı bir işlemdir. Bu teknikle, genellikle kesitsel biyofilm

görüntüleri elde edilir. Kanalın tamamının veya kanalın bir bölümündeki durumun anlaşılabilmesi için çok sayıda ardışık kesit değerlendirilmelidir. Işık mikroskobu, her bir kesitin biyofilmine genel bakışın yanı sıra mikrobiyal hücre morfolojisi ve organizasyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağlayan geniş bir büyütme aralığı sunar. Fakat, canlı ve ölü bakteriler arasında bir ayırım yapılamaz ve kesme işlemi sırasında dış yüzeyinden biyofilm kopabilir. Bu nedenlerle, ışık mikroskobu biyofilmi kantitatif değerlendirmek için uygun bir yöntem değildir. Yine de, histobakteriyolojik analizlerin, klinik örneklerde endodontik biyofilm gözlemlenmesinde çok değerli olduğu gösterilmiştir (126). Işık mikroskobu kullanılarak klinik koşulların histobakteriyolojik analizlerle incelendiği çok sayıda çalışma ve olgu sunumu endodontik araştırmalara önemli katkılarda bulunmuştur (120, 127).

### **2.3.6.2. Mikrobiyolojik Kültür Yöntemi**

Antimikrobiyal uygulanması sonrası hayatta kalan mikroorganizma miktarı, kök kanalından çeşitli yöntemlerle alınan örneklerle belirlenir. Örnekleme yapılırken temel hedef kök kanalında hayatta kalabilmiş tüm mikroorganizmaların alınabilmesidir. Genellikle bunun için kök kanalına damlatılan sıvının steril kağıt koniler ile absorbe edilmesi sağlanır. Ya da kanalın örnekleme sıvısı ile güçlü bir şekilde yıkanması gerekir. Kök kanalındaki biyofilm eğeler ya da gates glidden frezler yardımıyla gevşetilebilir, dentin chipleri ile birlikte toplanabilir. Kök kanal örneği mikroorganizma sayımının yapılabilmesi için kültüre edilmelidir. Bu yöntem, örnekleme sıvısının seri seyreltilmesini ve büyüme ortamını içeren agar plakları üzerinde eşit hacimlerin ekilmesini içerir. İnkübasyondan sonra, plak üzerinde görünür koloniler sayılır ve böylece koloni oluşturan birimlerin (CFU'lar) sayısı saptanmış olur. Bu yöntem plak sayımı yöntemi denir. Bu teknik yaygın olarak kullanılmaktadır ve çoğu mikrobiyoloji laboratuvarında mevcuttur. CFU sayısı, deneyler arasında karşılaştırmaya izin veren, açık ve evrensel olarak kabul edilen bir sonuç ölçüsüdür. Aerobik ya da anaerobik şartlarda gerçekleştirilen inkübasyon sürecinden sonra mikroorganizma kolonilerinin makroskopik görünümünün, Gram boyama ile mikroskopik olarak hücresel morfolojilerinin gözlemlenebilir olması bu tekniğin avantajlarından (126).

### 2.3.6.3. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM)

SEM yüksek enerjili elektronların küçük bir alana odaklanması ve yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Işık mikroskobuna oranla geleneksel SEM kullanılarak 400 kat daha yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilebilir (128). Az sayıda teknik biyofilm topluluklarında hem hücre dışı matriks hem de mikroorganizmaları eşzamanlı olarak görüntüleyebilir ve biyofilmlerin morfolojik olarak yapısal karakterizasyonunu sağlar., SEM, elektron-yoğun malzemeyi tarayarak, bakteriyel hücre yüzeyleri de dahil olmak üzere yüzeylerin ayrıntılı, yüksek çözünürlüklü görüntüsünü sağlar ve hücrel membran hasarını tanımlayabilir (129). SEM çalışmaları periapikal patoloji ile ilişkili kök kanallarında kanal lümeninde ve kanal duvarına tutunmuş olan heterojen mimarideki biyofilmi göstermiştir. Bu biyofilmler, koklar, çubuklar, filamentler ve spiroketler gibi çeşitli hücrel morfolojileri içerebilir (130). Bu araştırmalar ayrıca, geniş çürük lezyonlar mevcut olduğunda kök kanal duvarında daha fazla bakterinin bulunduğunu (131) ve kök kanalının koronal kısmının apikal parçadan daha fazla enfekte olduğunu göstermiştir (131). Ayrıca, enfekte olmuş kök kanallarında SEM ile maya benzeri yapılar ve mantar hifleri gözlemlenmiştir (130). SEM ile görüntüleme ayrıca, dentin tübüllerinin 150 µm'ye kadar koklar, çubuklar ve mayalar ile invazyonunu göstermiştir (132).

SEM analizi yapmak için, gerekirse köklerin kesilerek kanal duvarlarının ortaya çıkarılması gerekir. Daha sonra, örnekler SEM incelemesi için hazırlanmalıdır. İşlem, yüksek vakum altında gerçekleştirildiğinden katı ve kuru bir örnek hazırlanması gerekir. Görüntü bozulmasına neden olabilecek elektrik yükünün birikmesini önlemek için, örnek bir iletken ile (altın gibi) kaplanmalıdır. Bu nedenle örnekler fiksasyon, dehidratasyon, donma - kritik nokta kurutma ve püskürtme kaplamalarına tabi tutulmalıdır. Işık mikroskopisinin aksine, SEM ile mikro organizmaların / biyofilmlerin boyanması mümkün değildir. Biyofilmin SEM ile görselleştirilmesi için yüksek büyütme gerektirir. Dolayısıyla, ilgilenilen bölgenin (yani tüm kanal duvarı) sadece sınırlı bir bölümü görüntülenebilir. Burada, gözlenen alanlar öznel olarak seçilebildiği ve genel durumu temsil edemediği için potansiyel bir önyargı riski bulunmaktadır. Bu önyargı riskini önlemek için, yeterli sayıda gözlem alanı bulunmalı ve ilgilenilen alanlar rastgele seçilmelidir (126). Lin ve ark.

biyofilm eliminasyonunun değerlendirilmesinde önyargı oluşumunu engellemek için “tabakalı rastgele örnekleme prosedürünü” tanımlamıştır (133). Alternatif bir protokol, en yüksek biyofilm konsantrasyonuna sahip alanları seçmek ve bu alanların yüksek büyütme görüntülerini yakalamak olabilir (134). Ek olarak, görüntüleme yazılımı, biyofilm kaplı alanın objektif ve kantitatif bir şekilde değerlendirilmesine yardımcı olabilir (133).

Endodontik enfeksiyonların araştırılmasında SEM kullanımı önemli bilgiler sağlamıştır. Bununla birlikte, polisakkarit matrisinde gömülü mikroorganizmaları göstermek zordur. Numuneler SEM incelemesi için fiksasyon ve dehidrasyona uğratıldığında matris temel olarak sudan oluştuğundan, üç boyutlu yapısı değişir. Ayrıca, SEM mikroorganizmaların büyüklüğü ve morfolojisi hakkında bilgi sağlayabilirken, kesin mikrobiyal tanımlama mümkün değildir (131).

Farklı mikroskopik tekniklerin kombinasyonunun kullanılması ile biyofilm mimarisinin daha derin ve daha gerçekçi bir analizinin gerçekleştirilmesi mümkündür (135).

#### **2.3.6.4. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop (KLTM)**

Konfokal lazer taramalı mikroskopu (KLTM), *in situ* mikrobiyal toplulukları analiz etmek için başarılı bir görüntüleme aracı olduğundan, biyofilmlerin mimarisini incelemek için tercih edilen yöntem haline gelmiştir. Bu teknikte elektron mikroskopisinde karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerle karşılaşmaz. Eğer örnekler uygun floresan boyalar ile boyanabilirse canlı/ölü organizmaların analizi yapılabildiği gibi, 50-200 µm kalınlığına kadar biyofilmlerin 3 boyutlu, kantitatif analizi de yapılabilmektedir. Ancak ışık mikroskopisindeki kısıtlamalara bağlı olarak biyofilmleri oluşturan matriks ve hücrelerin yapısal özellikleri detaylı olarak incelenememektedir (136).

KLTM, genellikle optik geometri yapısından yararlanan floresan prob teknikleriyle uygulanır. Üç boyutlu bir örnek boyunca farklı derinliklerde biyofilm yüzeyinin 200 µm altına kadar çeşitli derinliklerde çok ince (nm) optik kesitlerin kaydedilmiş bir dizi dar odak düzlemini görüntüler. Ardından, üç boyutlu sayısallaştırılmış görüntüler oluşturmak için tek-düzlemli görüntüler görüntü işleme

teknikleri kullanılarak birleştirilebilir (137). Bu üç boyutlu mikrobiyal biyofilm bölümlerinin rekonstrüksiyonları, bir biyofilm numunesinin *in situ* derinlikli profilini oluşturur. Bu teknik, mikrobiyal biyofilmin oldukça heterojen yapısını ortaya çıkarmıştır. KLTM tekniği genellikle bakterilere tutunabilen floresan probalar ile uygulanır. Fluoresein, bakterilerin boyanmamış hücreler olarak görülebildiği bir flüoresan zemin sağlayan probadır. Resazurin gibi diğer maddeler “canlı” ve “ölü” hücreler arasında ayırım yapmak için kullanılır (138). Geleneksel mikrobiyolojide büyüyen ve çoğalabilen mikroorganizmalar canlı kabul edilirken, KLTM tekniğinde floresan problemleri katalize edebilen aktif metabolizmaya sahip mikroorganizmalar canlı kabul edilebilir. Örneğin, tetrazolyum tuzları oksidasyon/redüksiyon reaksiyonlarını hedefleyen işaretlerdir. Floresan boyaların kullanımı, mimarinin görselleştirilmesine ve biyofilmin uzaysal dağılımının anlaşılabilmesine izin verir. Ayrıca, canlılık boya, kök kanalındaki biyofilm bakterilerinin canlılık profilinin belirlenmesini sağlar. Böylece, biyofilm mimarisinin bir görüntüsünün yanı sıra, yarı-nicel bir analiz mümkündür. Hem biyofilm eliminasyonu hem de mikrobiyal canlılık bir arada değerlendirilebilir. Hücre membran bütünlüğü yaygın olarak kullanılan ticari ajan LIVE / DEAD BacLight® canlılık probu ile araştırılabilir. Floresan boyama için en sık kullanılan boyalar, SYTO-9 ve propidium iyodür (PI) dır. Biyofilm bu boya ile boyandığında canlı hücreler yeşil, ölü hücreler kırmızı floresan ışımaya yaparlar (126). Propidium iodid sadece hasarlı membranı olan bakterilere penetre olabilirken, SYTO 9 boyası tüm bakterilere penetre olabilmektedir. Birlikte kullanıldıklarında PI, SYTO 9 boyasında redüksiyona neden olduğundan, ölü bakteriler PI ile boyanıp kırmızı floresan ışımaya yaparken, canlı bakteriler SYTO ile boyanarak yeşil ışımaya yaparlar. Bu boya için uyarma / emisyon maksimum değeri SYTO 9 boyası için yaklaşık 480/500 nm ve PI için 490/635 nm'dir. Boyalar, ideal boyanmayı sağlayabilmek için çevre koşullarının çeşitliliğine bağlı olarak farklı kombinasyonlarla kullanılabilir. Her ne kadar KLTM'nin çözünürlüğü SEM ile elde edilebilenden az olsa da; numunenin üç boyutlu mimarisinin belirlenmesine ve biyofilmin hacmi, kalınlığı, pürüzlülüğü, biyofilm yapısındaki hücrelerin dağılımı gibi nicel parametrelerin çıkarılmasına olanak sağlar (139). Işık mikroskobu ve SEM'in aksine, örneğin fiksasyonu gerekmez ve örnek sulu kalır. SEM'e benzer şekilde, KLTM, intrakanal biyofilmin



görüntülenebilmesi için dişten kesit alınarak kanalın açığa çıkarılmasını gerektirir. Çoğunlukla, kanal yüzeyinin sadece bir kısmı analiz edilir. Tüm çalışmalarda, daha önce SEM bölümünde tarif edildiği gibi, görüntülenen alan rasgele seçilerek belirlenir. Kanalın tamamını görüntülerken, kök kanalı yarısının yarım daire şekli, dik eğimli kenarlardan gelen ışık yansımaları konfokal görüntüde karanlık alanlar oluşturabileceğinden, teknik problemlere neden olabilir (140). Sonuç olarak, KLTM mikrobiyolojik biyofilmler için popüler bir görüntüleme yöntemidir. Çünkü biyofilimde asgari işlem gerektirerek, biyofilmin iyi uzaysal çözünürlükle, doğrudan, invaziv olmayan, optik şekilde incelenmesine olanak sağlar.

#### **2.3.6.5. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH)**

İnsan vücudunda çeşitli bölgelerde bulunabilen biyofilmlerin içeriği ve yapısı değişkenlik gösterir (örn: kök kanal biyofilmi, oral mukoza biyofilmi). Bu nedenle mevcut farklı türleri daha doğru tanımlayabilmek için buldukları ortamda üç boyutlu olarak incelenmeleri gerekir. FISH, filogenetik olarak farklı bakterilerin eş zamanlı tespitine izin verir. Bu yöntem mikroorganizmaların, tür, cins ve aile seviyelerinde ayırım yapabilir. Ribozomal RNA'ya (rRNA) dayalı oligonükleotid problemleri ile spesifik olarak hedeflenen bakterileri tanımlayabilir. 16S rRNA geninin belirli bölgelerini hedeflemek için tasarlanan oligonükleotid problemler daha sonra spesifik floresan boyalarla etiketlenir. FISH tekniği ile kompleks bir mikrobiyal popülasyon zarar görmeden tanımlanabilir. FISH tekniğinin yardımıyla, bir toplumdaki özgün bakteri hücrelerinin tanımlanması, mikrobiyal ekosistemlerin organizasyonunu anlamak için önemli bir avantaj sağlayacaktır (141).

#### **2.3.6.6. Moleküler teknikler**

Kültür yöntemleriyle karşılaştırıldığında, moleküler yöntemler, sadece ekilebilir bakterileri değil, aynı zamanda kültüre edilemeyen ya da görülebilen fakat kültüre edilemeyen fazdaki (VBNC) türleri tespit etme avantajına sahiptir. Oldukça hassas ve özgül olma potansiyeline sahiptirler ve hızlıdır. Moleküler biyoloji tekniklerinin çoğu, numunedeki hedef mikroorganizmayı niteliksel olarak saptar, ancak miktar tayinine izin vermez. Gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu

(PCR), kantitatif sonuçlar sağlayan tek testtir. Kantitatif gerçek zamanlı PCR, PCR tabanlı bir teknik olduğundan, DNA primerlerinin kullanılmasını gerektirir. Tanımlanmış bir biyofilm ile çalışırken, türlere özgü primerler kullanılabilir. Böylece biyofilimde bulunan türlerin her birinin nicelleştirilmesine izin verilir. Doğal, tanımlanmamış bir biyofilm söz konusu olduğunda, geniş spektrumlu primerler kullanılmalıdır. Bu şekilde farklı türlerin nicelik bilgilerine ilişkin veri elde edilemez fakat, toplam mikrobiyal yükün miktarı ölçülebilir (126, 142).

Moleküler metodlarla ilgili bir başka endişe, ölü hücrelerdeki DNA'nın ve ya serbest ekstraselüler DNA'nın (eDNA) aynı anda yanlış verilere yol açacak şekilde amplifiye edilip saptanabilmesidir (142-144). Numuneyi propidyum monoazid (PMA) (hücre dışı veya ölü hücrelerde bulunan DNA'nın çoğalmasını engelleyen bir boyaya) ile boyayarak, bu sorunun çözülebileceği bildirilmiştir (145).

Cook ve ark. (146) kök kanal obturasyonundan önce  $Ca(OH)_2$  veya CHX'in *E. faecalis* 'in sağkalımı üzerindeki etkisini kültür ve PCR teknikleri kullanılarak değerlendirmişlerdir. Kültürlerin hiçbirinde bakteri üremesi görülmemiştir. Fakat, PCR sonuçları deney gruplarının çoğunda pozitif sonuç göstermiştir.

Roças ve ark. (147) kök kanal tedavisi sonrası yeniden tedavi gerektiren vakalardaki *E. faecalis* ve streptokok türlerinin tanımlanıp prevelansının araştırılmasında gerçek zamanlı PCR kullanmışlardır. Anderson ve ark. (148) ikincil enfeksiyonlardaki türleri saptamak için kültür yöntemi ve ribozomal DNA ile PCR kullanarak yaptıkları çalışmada kök kanallarında *S. mutans* varlığını bildirmişlerdir. Xia ve ark. (149) endodontik kaynaklı abse ve sellülit vakalarında enfekte kök kanalındaki *Actinomyces* prevelansını PCR ile incelemişlerdir.

#### **2.4. Kök Kanalı Dezenfeksiyonunda Kullanılan Kanal İçi Medikamentler**

Kanal içi ilaç kullanımı, genellikle kök kanal tedavisinin seans aralarında kanal içindeki mikroorganizmaların sayısının azaltılmasını ve periapikal enflamasyonun giderilmesini hedefleyen bir aşamadır. Pulpa nekrozu gerçekleşmiş vakalarda ya da retreatment vakalarında enfekte kök kanal sisteminde kemomekanik dezenfeksiyon ile ulaşılamayan yan kanallar, apikal deltalar, isthmuslar ya da ana kanalda -özellikle oval veya yassı ise- aletin temas etmediği dentin yüzeyleri

bulunabilir (150). Seans aralarında kanal içi medikament kullanımı, kemomekanik dezenfeksiyonu destekleyerek inatçı bakterilerin eliminasyonunu sağlar (42, 151, 152).

Son yıllarda giderek popülerleşen süper esnek nikel titanyum rotary sistemlerin gelişmesi ile birlikte hastanın koltukta kalma süresi ve irrigasyon ajanlarının dentin ile temas süresi kısalmaktadır. Bu durum kök kanallarında elimine edilememiş bakterilerin ilave bir dezenfeksiyon sistemi ile eliminasyonunu gerekli kılabilir (153).

#### **2.4.1. Kalsiyum Hidroksit (Ca(OH)<sub>2</sub>)**

Kalsiyum hidroksit endodontide ilk olarak 1920 de Hermann tarafından kullanılmıştır. Kimyasal formülü Ca(OH)<sub>2</sub>, molekül ağırlığı 74,08 olup, beyaz renkli kokusuz bir tozdur. Suda çözünürlüğü düşüktür (25 °C de 1,2 g L<sup>-1</sup> ) ancak sıcaklık arttıkça çözünürlüğü azalır (154). Kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal aktivite, doku çözme kabiliyeti, diş dokularının rezorpsiyonunun engellenmesi ve sert doku oluşumu gibi çeşitli biyolojik özellikleri araştırılmış ve kök kanal tedavisinde geniş bir kullanım alanı oluşmuştur (42).

Kalsiyum hidroksit kanal içi medikasyonda en sık tercih edilen ajandır. Direk olarak bakteri hücresi ile temas ettiğinde pH bağımlı olarak letal etki gösterir. Kalsiyum hidroksitten salınan yüksek konsantrasyondaki hidroksil iyonları, bakterilerin yaşaması için uygunsuz çevre koşulları oluşturur (42). Kalsiyum hidroksitin meydana getirdiği yüksek alkali ortamın bakteri hücrelerine letal etkisi kimyasal olarak; bakterinin stoplazmik membranının zarar görmesi, enzim aktivitesinin ve hücrel metabolizmanın bozulması, protein denaturasyonu ya da DNA nın zarar görmesi ile açıklanabilir. Fiziksel olarak; kök kanallarını dolduran Ca(OH)<sub>2</sub>, bakterilerin apikale ulaşmasını güçleştirecek bir bariyer oluşturur. Bakterilerin büyümesi ve çoğalması için kısıtlı alan kalmasını sağlar. Ayrıca bakterilerin lipopolisakkaritlerini inhibe ederek periapikal doku tamirini indükler (154).

Literatürde kalsiyum hidroksitin etkinliği ile ilgili çalışmalar arasında tutarsızlık izlenmektedir. Bir çok çalışma inert taşıyıcılarla (salin, distile su, gliserin

vb.) hazırlanan kalsiyum hidroksitin uygulandığı kanallarda %0-%20 ya da %40 oranında pozitif kültür saptandığını bildirirken (42, 155), bazı çalışmalarda medikasyon sonrası kanal içi pozitif kültür sayısının enstrumantasyon sonrası pozitif kültür sayısından fazla olduğu da gösterilmiştir (33, 156).

Bununla birlikte kalsiyum hidroksidin, özellikle yüksek pH sağlanamadığında *E. faecalis*'i kendi başına yok etmede başarısız olduğu da bilinmektedir (41, 157). *E. faecalis*'in kalsiyum hidroksite karşı oluşturduğu direnç mekanizmaları incelendiğinde; pH 11.1 iken dirençli olduğu, ancak 11.5 pH değerinde direnci kaybettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, *E. faecalis*'in kalsiyum hidroksit içinde hayatta kalmasının, pH değerinin bir noktaya yükseldiği ve maksimum kapasitesine ulaştığı zaman aktive edilen proton pompasının bir fonksiyonu olduğu sonucuna varılmıştır (158).

Kalsiyum hidroksitin antibakteriyel etkisini arttırmak amacıyla farklı taşıyıcılarla kullanımı araştırılmıştır. Kafurlu paraklorfenol gibi bazı taşıyıcılarla uygulanan kalsiyum hidroksitin antibakteriyel spektrumun genişlediği, antibakteriyel etkinin daha uzak alanlara yayılabildiği bildirilmiştir (159-161). Kalsiyum hidroksitin, klorheksidin (CHX) ile karıştırılarak kullanılması ile antibakteriyel etkisinin arttığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (155, 162). Bununla birlikte, kalsiyum hidroksitin antibakteriyel etkinliğinin dentin, hidroksilapatit ve serum tarafından inaktive edildiği, *in vitro* olarak biyofilm matrisini bozmadığı görülmüştür (163, 164).

Özet olarak, nekrotik pulpa ve apikal periodontitisli dişlerde ara seans medikamenti olarak kalsiyum hidroksit kullanımının bilimsel olarak tamamen kabul edilmesi ya da reddedilmesi mümkün değildir. Kanıtlar Cochrane standartlarına göre tartışmalı ve zayıftır. Bu sorunun kesin olarak cevaplanabilmesi için daha güçlü kanıtlara ihtiyaç duyulmaktadır (165).

#### **2.4.2. Klorheksidin Glukonat (CHX)**

Klorheksidin, iki simetrik 4-klorofenil halkası ve bir merkezi heksametilen zinciri ile bağlanmış iki biguanit grubundan oluşan sentetik bir katyonik bis-guanittir (166). CHX, pozitif yüklü hidrofobik ve lipofilik bir moleküldür. Bakterilerin hücre

zarındaki fosfolipidler ve lipopolisakkaridlerle etkileşerek aktif veya pasif transport mekanizması yoluyla hücreye girer (167). Etkinliği; molekülün pozitif yükünün, hücre duvarları üzerindeki negatif yüklü fosfat grupları ile etkileşimi sonucu hücrelerin ozmotik dengesini değiştirmesi ile ortaya çıkar. Bu durum hücre çeperinin geçirgenliğini arttırarak CHX molekülünün bakterilere nüfuz edebilmesini sağlar (168). Antiseptik özelliği göz önünde tutularak plak oluşumunun önlenmesi amacıyla periodontolojide %0,1-0,2 konsantrasyon aralığında kullanılmaktadır. Endodontide ise %2'lik konsantrasyonunun kullanılması tavsiye edilmektedir (169). Geniş bir antibakteriyel spektrumu vardır. Hem gram negatif hem de gram pozitif bakterilere karşı etkilidir. *C.albicans* da dahil olmak üzere geniş bir antifungal spektrumu vardır. Hidroksiapatite (HA) adsorbe edilerek, zaman içinde yavaş yavaş salınır. Düşük yüzey gerilimi gösterir (170).

CHX'in mikrobiyal biyofilmler üzerindeki etkisi sodyum hipoklorit (NaOCl) den önemli ölçüde daha azdır. NaOCl ile karıştırılması durumunda kök kanalını tıkayabilecek, kanaldan uzaklaştırılması güç olan turuncu- kahverengi parakloroanilin (PCA) çökeltisi oluşur. NaOCl ye kıyasla en önemli dezavantajlarından biri organik dokuları çözme kapasitesinin çok az olması ya da hiç olmamasıdır (154).

Jel formundaki CHX, kanal içi bir medikament olarak kullanılmaya uygundur. Viskoz yapısı nedeniyle, kök kanal duvarlarına iyi bir uyum göstererek iki hafta veya daha uzun bir süre kalıcı bir antibakteriyel etkinlik sağlar (171, 172). Bununla birlikte, solüsyon formundaki CHX, *in vivo* kanal içi medikament olarak uygulandığında, bakteri sayısında azalma olmadığı gözlenmiştir (173).

CHX; dentine bağlanarak, antibakteriyel etkisini uygulama süresinin sonrasında da devam ettirir (174). CHX tarafından salınan pozitif yüklü iyonlar dentine absorbe olarak dentin yüzeyinde mikrobiyal kolonizasyonu engeller(167). %2 lik CHX nin dentin üzerindeki substantivite süresi ile ilgili çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Leonardo ve ark. bu süreyi 48 saat olarak bildirirken (175), White ve ark. 72 saat (176), Khademi ve ark. 4 hafta (174), Rosenthal ve ark. 12 hafta (177) olarak bildirmişlerdir. Dentin, dentin bileşenleri (HA ve kollajen), kök

kanal sistemindeki öldürülmüş mikroorganizmalar ve enflamatuar eksüdalar, CHX'in antibakteriyel aktivitesini azaltır (178) .

Antimikrobiyal substantivite özelliği nedeniyle, CHX preparatlarının dişin koronal kısmından kök kanal sistemine bakteri girişini geciktirdiği bildirilmiştir (179). Ayrıca dentine uygulandığında adeziv-dentin stabilitesini belirgin şekilde artırır (178).

Klorheksidin,% 2 jel veya sıvı konsantrasyonda, kök kanal boşluğundan ve dentin tübüllerinden *E. faecalis*'i uzaklaştırmada etkili olduğu bildirilmiştir (180, 181). %2 klorheksidin ile en az 2 dk lık yıkama sonrası dentin tübüllerinde 100 mikrometreye kadar *E.faecalis* eliminasyonu gerçekleştiği gösterilmiştir (180).

### **2.4.3. Antibiyotik Patları**

Bazı cerrahi ve cerrahi olmayan kök kanal tedavisi prosedürlerinde sistemik antibiyotik kullanımının başarılı sonuçlar verdiği bilinse de, oluşan yan etkilerden (gastrointestinal sistem problemleri, bakterilerin direnç kazanması, allerjik reaksiyonlar, toksisite vb.) kaçınmak amacıyla kullanımları en az düzeye indirilmeye çalışılmaktadır. Ayrıca antibiyotiklerin enfekte alana taşınabilmesi için o bölgede kan dolaşımı sağlanabiliyor olmalıdır. Fakat nekrotik pulpalı, pulpasız ya da önceden kök kanal tedavisi uygulanmış dişlerde böyle bir kan dolaşımından söz etmek mümkün değildir. Bu nedenle antibiyotiklerin kanal içine lokal olarak uygulanmasının etkinin görülmesi için daha uygun bir yol olabileceği bildirilmiştir (182).

Kök kanalı enfeksiyonunda görülen çok türlü kompleks biyofilmden dolayı tek tür antibiyotik kullanımı ile kanalın tamamen dezenfekte edilebilmesi mümkün olmamaktadır. Bu nedenle metronidazol, siprofloksasin ve minosiklin içeren 3 lü antibiyotik patının uygun dezenfeksiyonu sağlayabileceği bildirilmiştir (183). Özellikle rejeneratif tedaviler için dezenfeksiyonu sağlamada uygun görülen 3 lü antibiyotik patının dişte renklere yol açabildiği (183), apikal papilla kök hücrelerinin sayısı ve görünürlüğünü azaltabildiği (184), kalsiyum hidroksite göre daha fazla enflamatuar hücre oluşturabildiği (185) ve 1 aydan uzun süre uygulandığında dentinin mikrosertliğini azaltabildiği bilinmektedir (186).

Windley ve ark. (187) kök gelişimi tamamlanmamış apikal periodontitisli köpek dişlerinin dezenfeksiyonunda üçlü antibiyotik patının etkili olduğu göstermişlerdir. Sato ve ark. (188) bu karışımın enfekte kök kanal dentininin derin tabakalarındaki bakterileri öldürme potansiyelini *in situ* olarak araştırmışlardır. Her bir antibiyotikten eşit ve 50 µg/ml olmak üzere hazırlanan kombinasyonun 24 saat sonra kök kanal dentinini, çok az bakterinin izole edilebildiği 1 örnek hariç tamamen dezenfekte edebildiğini bildirmişlerdir. Iwaya ve ark. (189) bir olgu raporunda kök ucu gelişimi tamamlanmamış, enfekte pulpalı, periapikal enfeksiyonu ve fistülü olan mandibular ikinci premolar dişin tedavisinde standart kök kanal tedavisi ve apeksifikasyon prosedürlerinin izlenmesi yerine iki antibiyotikten (metronidazol ve siprofiloksasin) oluşan bir patı kök kanalına yerleştirmiştir. Antimikrobiyal tedavinin tamamlanmasının ardından kanal boş bırakılarak diş radyografik olarak takip edilmiştir. Radyografik incelemede 5 ay sonra apikal kapanmanın başladığı gözlenmiştir. Tedaviden 30 ay sonra kök dentininde kalınlaşma ve apikalde tam olarak kapanma izlenmiştir. Bu olgu raporu genç daimi dişlerin pulpasının kök kanal boşluğu bakteriden arındırıldığında revaskülarize olabildiğini ortaya koymuştur.

#### **2.4.4. Antibiyotik- Kortikosteroid Karışımları**

İlk kez Schroeder ve Triadan tarafından 1960 yılında geliştirilmiş, Ledermix ismi ile piyasaya sürülmüştür. Asıl üretim sebebi kortikosteroidin etkisinden faydalanarak ağrı ve enflamasyonu kontrol altına almaktır. İçeriğinde bulunan antibiyotik; kortikosteroidin neden olabileceği konak immün direncindeki azalmaya bağlı olarak olası bakteriyel çoğalmaların önüne geçmek amacıyla karışıma eklenmiştir. Schroeder ve Triadan ilk denemelerinde antibiyotik olarak kloramfenikol kullanmış olsalarda ilerleyen yıllarda üretici firma içerikteki antibiyotiği demeklosiklin (tetrasiklin grubu antibiyotik) olarak değiştirmiştir. Günümüzde ledermix, polietilen glikol bir baz içerisinde, demeklosiklin HCl (%3.2 konsantrasyonda) ve bir kortikosteroid olan, triamsinolon asetonidden (%1 konsantrasyonda) oluşmaktadır (167).

Ledermix dentin kanalları ve semente diffüze olma özelliğine sahiptir. Periodontal ve periapikal dokulara ulaşabilir. Travma geçirmiş dişlerde,

replantasyondan sonra ve enflamatuvar kök rezorpsiyonunun tedavisinde etkili bir kanal içi ilaçtır (190). Rezorpsiyonu azaltması konusundaki yararlı etkileri Bryson ve ark. tarafından köpek dişlerinde gösterilmiştir. Triamsinolon dentinin tamponlama kapasitesine bağlı olarak periodontal dokulara yavaş salınır, bu da terapötik etkisinin uzun sürmesini sağlar (191). Ehrmann ve ark. (192) ledermix patınının post-operatif ağrı oluşumu açısından  $\text{Ca(OH)}_2$ 'den ya da kanalın boş bırakılmasından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Kim ve ark. (193) ledermix uygulanan dişlerde koyu gri-kahverengi renkleşme olabildiğini bildirmişlerdir. Dişler güneş ışığına maruz kaldığında renkleşmenin gerçekleştiğini, karanlık ortamda renkleşme olmadığını gözlemlemişlerdir. Araştırmacılar ledermixin mine sement sınırının altına yerleştirilmesi gerektiğini, böylece renkleşmenin en aza indirilebileceğini bildirmişlerdir.

## **2.5. Endodontide Nanoteknoloji**

### **2.5.1. Giriş**

Nano sözcüğü, yunanca “nannos” sözcüğünden türemiş olup “cüce” anlamına gelmektedir. Nano ile tanımlanan ifadeler bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda birini temsil eder. Bir nanometre metrenin bir milyarda birine (bir milimetrenin milyonda biri) eşit uzunluk birimidir. İnsan saç telinin çapının yaklaşık 100.000 nanometre olduğu düşünüldüğünde ne kadar küçük bir nicelik olduğu daha net anlaşılır. Bir nanometre içine yan yana ancak 2-3 atom dizilebilir, yaklaşık 100-1000 atom bir araya gelerek nanoölçeklerde bir nesneyi oluşturur. Boyutlar nanometre ölçeklerine yaklaşırken malzemenin fiziksel özellikleri kuantum mekaniğinin kontrolüne girer, elektron durumlarının fazı ve enerji spektrumunun kesikli yapısı daha belirgin hale gelir. Daha da önemlisi, malzemeyi oluşturan atom sayıları 100 ler düzeyine inince, atomsal yapının geometrisi, hatta atom sayısının kendisi bile fiziksel özelliklerin belirlenmesinde etkili olur.

Nanoteknoloji, materyallerde atom ve molekül düzeyinde ihtiyaca göre düzenlemelere olanak tanıdığından, bilimde devrim niteliğindedir. Teknolojinin yeni taleplerine cevap verebilecek, nanometre boyutlarında olaganüstü özellikler



kazandırılan yapay malzemelerin sentezlenebilmesi bilim dünyasını heyecanlandırmaktadır (194).

### **2.5.2. Tarihçe**

Bir yapının nano boyutlara indirilmesi ile olağanüstü özellikler kazanabileceği fikrinin temelleri 1860 lı yıllara dayanmaktadır. Tüm dünya nesnelere giderek daha büyük hale getirmeye çalışırken, James Clerk Maxwell atom ve moleküllerden oluşan submikroskopik makineler yapılabileceğini öngördü. “Maxwell’in şeytanları” olarak tanımladığı bu makineler günümüzde nanorobot olarak tanımlanabilecek cinstendi. Nanoteknoloji terimini 20.yüzyılın başlarında bilime kazandıran kişi ise Prof. Kerie E. Drexler dir (195).

Nobel ödüllü fizikçi Richard Feynman 1959 yılında “Aşağıda bir çok yer var (There is plenty of room at the bottom).” başlıklı konuşmasında nanoteknoloji konseptini ayrıntılı olarak ele aldı. Konuşmasında gelecekte nanorobotlar, nanomakineler, nanoaygıtlar tasarlanabileceğinden ve nanoteknolojinin göz ardı edilemeyecek bir gelişme olduğundan söz etti (196).

Dişhekimliğine nanoteknoloji kavramı 2000’li yılların başında R.A Freitas Jr. tarafından ortaya konulan nanorobot kullanılarak yapılabilecek ortodontik hareketler, dentisyon rejenerasyonu, nanomateryaller, dentifrobot gibi düşünceler ile geliştirildi (196). Bu düşüncelerin bir kısmı hala bilim kurgu düzeyinde iken bir kısmı gerçek yaşama aktarılabilmıştır. Günümüzde dişhekimliğinin bir çok alanında nanoteknoloji kullanımı giderek artmaktadır (197).

### **2.5.3. Nanomateryel Nedir**

Nanomateryalleri belirgin olarak diğerlerinden ayıran 2 temel özellik; yüzey alanının artması ve kuantum etkisinin oluşmasıdır. Örneğin, 30 nm büyüklüğünde bir partikül atomlarının % 5 ini yüzeyinde bulundururken bu oran 10 nm de % 20, 3 nm de % 50 ye çıkar. Bu nedenle nanopartiküller daha büyük partiküllerle karşılaştırıldığında kitle başına çok daha fazla yüzey alanı elde edilmiş olur (198).

Maddenin nanoboyutlara indirgenerek kuantum etkisinin baskın hale gelmesiyle optik, elektrik, manyetik davranışları etkilenebilir. Örneğin nanokristalin nikel, katı çelik kadar serttir (198).

Nanomateriyeller bir boyutlu, iki boyutlu, üç boyutlu olarak sınıflandırılabilir. Bir boyutta tabakalar, iki boyutta nanoteller ve nanotüpler, üç boyutta ise kuantum noktaları (dots) oluşturulabilir (199).

Nanopartikül sentezinde 3 temel yaklaşım vardır:

- Bütünden parçaya yaklaşım: Partiküllerin konvansiyonel olarak sentezlenip, bileme ya da öğütme yoluyla daha küçük hale getirilmesidir.
- Parçadan bütüne yaklaşım: Nanopartiküllerin direk sentezlenip daha kompleks moleküller oluşturmak üzere bir araya getirilmesidir.
- Fonksiyonel yaklaşım: Nanopartikülün nasıl sentezlendiği ile ilgili olmayıp sadece özel kullanım alanına uygun üretim prensibidir.

#### **2.5.4. Endodonti Alanındaki Nanoteknolojik Gelişmeler**

Nanoteknoloji hızla ilerleyen ve bir çok farklı sağlık hizmetinde farklı amaçlarla kullanılan yeni bir alandır. Nanoboyutta materyallerin olağanüstü özellikler kazanmasından yola çıkılarak endodontik hastalığın önlenmesi, teşhisi ve tedavisi alanlarında bir çok çalışma yapılmaktadır. Bu çalışmaların en önde gelenleri doku mühendisliği, ilaç salınımı ve antibakteriyel etkinliğin artırılmasıyla ilgili olarak karşımıza çıkmaktadır. Çalışmalarda nanoboyutta partiküller, nanopartiküllerden elde edilen iskeleler, nanokapsüller farklı tekniklerle elde edilerek kullanılmaktadır.

##### **2.5.4.1. Doku Mühendisliği**

Günümüzde halen çürük, periodontal hastalık ve travmaya bağlı olarak çok sayıda diş kaybedilmektedir. Kaybedilen diş ya da diş dokularının doğal haliyle yerine konulabilmesi ve bu şekilde fonksiyonunu sürdürebilmesi önemlidir.

Dental doku rejenerasyonu 2 amaç için uygulanabilir:

- Hem yapısal olarak sağlıklı hem de fonksiyonel olacak şekilde bir diş bütünüyle rejenere etmek
- Dişin belirli bir dokusunun (mine-dentin-sement-pulpa) ya da diş çevresindeki bir dokunun (kemik-periodontal ligament) rejenere edilmesi

Dental doku rejenerasyonunda; bütünden parçaya yaklaşım, hücrelerin 3 boyutlu polimer iskelelere, doğal pöröz materyallere ya da hücrelerinden arındırılmış doğal ekstrasellüler matriks içine ekilmesi prensibine dayanır.

Parçadan bütüne yaklaşım ise tüm dokuyu ya da organı oluşturmak üzere subunit parçaların birleştirilmesi prensibine dayanır. Hücrelerin kopyalanması, mikro boşluklar, hücre tabakaları ve kendiliğinden birleşik hidrojeller gibi hücrelerin birleşerek subunitler oluşturması ve bu alt ünitlerin de birleşerek tüm organı oluşturması esasına dayanmaktadır (200).

Günümüzde dental doku rejenerasyonunda kullanılan 2 temel yaklaşım:

1. Doku iskelesinin kullanıldığı rejenerasyon: Ekilecek olan hücrelerin esas dokuyu taklit edecek şekilde istenen büyüklük ve yapıda olabilmesi için laboratuarlarda bilgisayar destekli sistemler ile büyüme faktörlerinden zengin 3 boyutlu doku iskeleleri oluşturulur. Daha sonra doku iskelelerinin maturasyonu hayvan dokuları gibi *in vivo* ya da kanlanma-besin-oksijen desteğinin sağlandığı *in vitro* koşullarda gerçekleştirilir. Rejenere edilen doku daha sonra alıcı dokuya implante edilebilir. Rijit iskeleler kimi zaman implante edilmek istenen bölgeye uyumlu şekilde yerleştirilemezler (örn: giriş kavitesinden pulpa odasına ulaşmak). Yumuşak ya da enjekte edilebilen iskeleler bu gibi durumlarda kullanılabilir (201).
2. Doku iskelesinin kullanılmadığı rejenerasyon: Belirli sinyallerin rehberliğindeki embriyonik doku oluşumunun gelişim aşamalarının, doğal dişin yapı ve büyüklüğünü taklit eden diş dokularını üretmek için direk olarak indüklenmesidir (197).

Hücrelerin birbirleriyle uyumlu çalışmalarıyla dokular oluşur. Bu uyumun oluşabilmesi için EPS uygun üç boyutlu mikroçevrenin oluşabilmesi açısından çok

önemlidir. EPS, hücrelere fiziksel bir destek sağlar, hücre-hücre etkileşimlerini organize eder, hücrelerin yapışması, göçü, çoğalması, farklılaşması ve matris birikimi için çeşitli biyokimyasal ve biyofiziksel uyarıları yapar. Doku iskeleleri tam olarak EPS in görevlerini yerine getirebilecek bir ortam oluşturmak için hazırlanmaktadır. Ayrıca zamanla gerçek hücre dışı matriksin yeniden oluşumuna katkıda bulunurlar. Doku iskelesi üretiminde kullanılacak malzame; biyouyumlu olmalıdır, hücre adezyonu ve işlevini arttırıcı yüzey özellikleri göstermelidir, hücreler kendi EPS lerini oluşturabildikten sonra rezorbe olabilmeli, parçalanırken toksisite göstermemeli ve hücrelerin ve besinlerin geçişini sağlayabilecek yüksek gözeneklilik oranına ve uygun gözenek büyüklüğüne sahip olmalıdır.

Wang ve ark. (202) tip 1 kollojen fiber yapıyı taklit edecek şekilde faz ayrımı ve porojen süzdürme yöntemlerinin kombine kullanılması ile elde ettikleri yüksek derecede porozlu yapıya sahip nanofibröz polilaktik asit (NF-PLLA) iskelesinde insan dental pulpa kök hücrelerinin (DPSC) *in vivo* ve *in vitro* şartlarda odontojenik diferansiyasyon kapasitesini göstermişlerdir.

Yüksek poroziteye sahip ve porları birbiriyle ilişkili poli(L-laktik asit) (PLLA) iskelelerinin makroporoz ve nanofibroz yapılarının DPSC proliferasyonu ve odontojenik farklılaşması için uygun bir ortam sağladığı bilinmektedir. Ancak klinikte defekt büyüklüğünün küçük olması, düzensiz şekilli olması ve tedavi suresinin kısa olması gibi sebeplerle enjekte edilebilen hidrojel, HA partikülleri ve insan dentin matrixlerinin kullanımı dikkat çekmektedir. Ancak bunların porozitesinin düşük olması, kırılma olmaları, çözünmelerinin yetersiz olması gibi sebepler yeni nanofibroz sünger mikroküre şeklindeki doku iskelelerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Kendiliğinden düzenlenme ve faz ayrımı teknikleriyle nanofibroz sünger mikroküreler içerisine biyocozebilen ve biyouyumlu Poli(L- laktik asit)-blok-poli(L-lizin) eklenen doku iskelelerinde DPSC lerin proliferasyonu ve dentin benzeri bir doku oluşturdukları bildirilmiştir (203).

Li ve ark. (204) elektrospinning ile elde ettikleri poly(laktid ko-glikolid) (PLGA) iskelesinin sahip olduğu hücre adezyonunu ve büyümesini arttıran benzersiz yapısı nedeniyle doku mühendisliğinde kullanılabileceğini bildirmişlerdir.

Yang ve ark. (205) elektrospinning yöntemiyle elde edilmiş polycaprolakton (PCL)/jelatin iskelelere nanohidroksiapatit (nHA) ekleyerek ve ya eklemeyerek dental pulpa kök hücrelerinin hem *in vitro* hem de *in vivo* davranışlarını incelemişlerdir. nHA kombinasyonu içeren iskelelerin spesifik odontojenik genlerin ekspresyonunu arttırdığını ve sonuç olarak iskelelere nHA eklenmesinin DPSCs lerin hem *in vitro* hem de *in vivo* olarak odontoblast benzeri fenotip diferansiyasyonunun arttırdığını göstermişlerdir.

Guo ve ark. elektrospinning yöntemiyle elde edilmiş polycaprolakton (PCL) fiberlerine florapatit (FA) ekleyerek ya da eklemeyerek insan dental pulpa kök hücrelerinin (hDPSCs) davranışlarını incelemişlerdir. İlk ekimden sonra kök hücrelerin her iki iskeleye de iyi tutunduğunu fakat FA ilave edilmiş PCL iskelelerinde multihücrel agregasyon olduğunu, 14 gün sonra FA kaplanmış PCL iskeledeki hücre proliferasyonunun sadece PCL den oluşan iskeleye göre daha yavaş olduğunu gözlemlemişlerdir. PCL iskelede proliferasyonun hızlı olmasına rağmen multihücrel agregatlar görülmediğini, bunun sebebinin daha önce bildirilmiş olan “hücrel diferansiyasyon başladığında proliferasyon yavaşlar” prensibi (206) olabileceğini bildirmişlerdir. PCL ve FA içeren iskelede proosteogenik ve odontojenik bazı moleküllerin ekspresyonunun ve alkalen fosfataz (ALP) aktivitesinin sadece PCL içeren iskeleye göre arttığını gözlemlemişlerdir. Sonuç olarak kemik ve dentin/pulpa rejenerasyonu için FA modifiye PCL iskelenin çok iyi bir biyomimetik materyal olabileceği ve odontojenik-osteojenik doku mühendisliğinde başarıyla kullanılabilceği bildirilmiştir (207).

#### **2.5.4.1.1. Doku Mühendisliğinde Nanopartikül Kullanımı**

Liu ve ark. yaptıkları çalışmada insan dental pulpa hücrelerindeki enflamasyon ve doku rejenerasyonu cevabına miR-146a/bFGF/PEG-PEI nanopartiküllerinin etkisini araştırmışlardır. miR/146a enflamasyon ve immün hastalıklarla yakından ilişkili olduğu belirlenen yeni keşfedilmiş küçük RNA molekülüdür. Hücre proliferasyonu, diferansiyasyonu, apoptoz, enflamasyon cevabı ve ekstracelluler matris metabolizması ile ilişkisi daha önce bildirilmiştir. bFGF (basic fibroblast growth factor) hücrenin hayatta kalması, doku rejenerasyonu, yara

iyileşmesi, enflamasyon ve immün cevapla ilgili bir çok biyolojik olayda görevlidir. PEG-PEI (polietilen-glikol-polietilenamin) düşük sitotoksisite, hücrel absorpsiyon, sürekli protein salınımı ve yüksek transfeksiyon etkisi nedeniyle gen terapisi için viral olmayan potansiyel taşıyıcı olabilecek bir polimerdir. miR-146a/PEG-PEI nanopartikülleri ve bFGF ile aljinat jel kombine edilmiştir. Elde edilen bu kombinasyonun dental pulpa hücrelerinin enflamasyon ve rejenerasyon cevabını; hücrel proliferasyonu ve odontojenik diferansiyasyonu arttırarak geliştirebileceği bildirilmiştir (208).

Bellamy ve ark. (209) transforming growth faktör (TGF)-B1 salınımı yapabilen kitosan nanopartikülleri içeren yeni bir iskele modifiye etmişlerdir. Dentin pulpa rejenerasyonu için en önemli faktörlerden biri olduğu bildirilen TGF süperailisinin kitosan nanopartikülleri ile birlikte uygulanmasının apikal papilla kök hücrelerinin (SCAP) migrasyon ve diferansiyasyonunu artırabileceğini öngörmüşlerdir. TGF-B1 salınımı yapan kitosan nanopartikül içeren iskelelerin endodontik rejenerasyon protokollerinde uygulanabileceğini bildirilmiştir.

Shrestha ve ark. (210) biyoaktif molekül salınımı yapan nanopartikül sistem ile dentini muamele ettiklerinde SCAP ların dentin yüzeyine yapışması, çoğalması ve farklılaşmasındaki artışı incelemişlerdir. Önceki çalışmalarda deksametazon rejeneratif endodontide SCAP için odontojenik stimulan olarak tanımlanmıştır. Yavaş salımlı deksametazon içeren kitosan nanopartikülleri (Dex-CSnpl), hızlı salımlı dexametazon içeren kitosan nanopartikülleri (Dex-CSnpll) ve dex içermeyen kitosan partikülleri ve hiç nanopartikül uygulanmamış sistemler apikal papilladaki kök hücrelere olan etkileri bakımından karşılaştırılmıştır. Son yıkamada sadece NaOCl kullanıldığında nanopartikül kullanılan sistemlere göre daha az SCAP hücresinin dentin yüzeyine yapıştığı ve çoğalmanın daha az olduğu gösterilmiştir. Nanopartikül sistemler ile dentinin muamale edildiği gruplarda SCAP ın yapışma ve görünürlüğü artmıştır. Dex-CSnpll grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında SCAP lardan en yüksek seviyede dentinsialofosfoprotein ve dentin matrix protein-1 salınımı gerçekleşmiştir. Sonuç olarak rejeneratif endodontik tedavi protokolünde biyoaktif molekül sentezi yapabilen nanopartikül sistemlerin avantajlı olabileceği görülmüştür.

#### 2.5.4.2. Antibakteriyel Etki

Güncel çalışmalarla birlikte antibiyotik içerikli nanofiber iskelelerin ya da direkt olarak antibakteriyel etki gösteren nanopartiküllerin kullanımı ile kök kanallarında antibakteriyel etkinin sağlanabildiği bilinmektedir.

##### 2.5.4.2.1. Antibiyotik İçerikli İskelelerin Kullanımı

Endodontik tedavide başarı için en önemli basamaklardan biri kök kanalının dezenfeksiyonudur. Özellikle rejeneratif tedavilerde dezenfeksiyonun çok daha etkin yapılabilmesi için çeşitli antibiyotik patları kullanılmaktadır. Fakat bu patların dişlerde renklenmeye, servikal kök kırıklarına ve yetersiz pulpa-dentin formasyonuna neden olabildiği bildirilmiştir (211). Patların bu dezavantajlarını azaltabilmek ya da tamamen ortadan kaldırmak amacıyla antibiyotik içerikli nanoiskele ya da nanokapsüllenmiş jel şeklinde kullanımı ile ilgili çalışmalar sürmektedir.

Bottino ve ark. (212) antibiyotik içerikli iskelelerin rejenerasyona olan etkisini değerlendirmişlerdir. Polidioksan (PDS) polimer solüsyonuna %5 ya da %25 oranında siprofloksasin (CIP) ya da metronidazol (MET) eklemişler ve elektrospinning tekniği ile fiberler elde etmişlerdir. Antimikrobiyal etkinlik *P.gingivalis* ve *E.faecalis* üzerinde değerlendirilmiştir. CIP içerikli iskelelerin her iki bakteri biyofilmini de belirgin şekilde inhibe ettiğini fakat MET içerikli iskelelerin sadece *P.gingivalis*in büyümesini inhibe ettiğini ancak sitotoksik etkinin de sadece %25 CIP içeren iskelede olduğu bildirilmiştir. Sonuç olarak rejeneratif endodontide antibiyotik içerikli elektrospin iskele kullanımının biyolojik olarak güvenli antimikrobiyal ilaç taşıma sistemi olabileceği gösterilmiştir.

Palasuk ve ark. (213) ikili antibiyotik karışım içeren iskelelerin rejeneratif tedavideki yerini araştırmışlardır. İkili antibiyotik patını (siprofloksasin ve metronidazol) taklit edecek şekilde, bu antibiyotikleri içeren polimer solüsyonlar ile iskeleler hazırlanmıştır. *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Fusobacterium nucleatum* üzerindeki antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Aynı zamanda iskelelerin insan dental pulpa kök hücreleri üzerine sitotoksitesisi de değerlendirilmiştir. İkili antibiyotik patı içeren iskelelerin *E.faecalis*, *P.gingivalis* ve *F.nucleatumun* büyümesini inhibe edip antibakteriyel etki gösterdiği gözlenmiştir.

İnsan dental pulpa kök hücrelerine sitotoksik etki ya çok az olmuştur ya da hiç olmamıştır. Tüm bu nedenlerden dolayı ikili antibiyotik karışımı içeren iskelelerin rejeneratif tedavi için ikili antibiyotik patına iyi bir alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Albuquerque ve ark. (214) siprofloksasin içerikli iskelelerin *Enterococcus faecalis* biyofilmine etkilerini araştırmışlardır. Antibiyotik içermeyen polidioksan (PDS) iskele kontrol grubunu oluştururken, %5 ve %25 ağırlıkta siprofloksasin içeren iskeleler antibakteriyel etki açısından karşılaştırılmıştır. %25 ağırlıkta siprofloksasin içeren iskele %100 bakteriyel eliminasyon sağlamıştır. %5 ağırlıkta siprofloksasin içeren iskele ve antibiyotik içermeyen iskele arasında da bakteri eliminasyonu açısından anlamlı fark bulunmuştur.

Albuquerque ve ark. (215) antibakteriyel özellikli üçlü antibiyotik patını taklit eden elektrospin polimer iskelenin *P.gingivalis* ile enfekte edilmiş dentin biyofilmine etkisini araştırmışlardır. Antibiyotik içermeyen polidioksan (PDS) iskele, %25 ağırlıkta üçlü antibiyotik patı (her mL de her antibiyotikten [metronidazol, siprofloksasin ve minosiklin] 25 mg içeren PDS polimer solüsyonu) içeren PDS iskele ve doymuş üçlü antibiyotik patı solüsyonu karşılaştırılmıştır. Negatif kontrol grubu olarak enfekte dentin tedavi edilmeden bırakılmıştır. Hem üçlü antibiyotik patını taklit eden iskele hem de üçlü antibiyotik patı solüsyonu total bakteri eliminasyonunu sağlamıştır. Negatif kontrol grubu ve antibiyotik içermeyen PDS iskele arasında istatistiksel anlamlı fark bulunamamıştır. Genellikle primer endodontik enfeksiyonlarda sorumlu olarak apikal periodontitise neden olabilen ve nekrotize olmuş daimi dişlerde sıklıkla karşılaşılan ayrıca rejenerasyon tedavisini olumsuz etkileyebilen *P.gingivalis*in eliminasyonunda üçlü antibiyotik patını taklit eden PDS iskelenin üçlü antibiyotik patına alternatif olabileceği bildirilmiştir.

Albuquerque ve ark. (216) başka bir çalışmada üçlü antibiyotik patını taklit eden elektrospin polimer iskelenin, travmatize olmuş daimi dişlerin nekroz pulpalarında sıklıkla gözlenen *Actinomyces naeslundii* biyofilmine etkisini araştırmışlardır. Üçlü antibiyotik patı ile total bakteri eliminasyonu sağlanırken, üçlü antibiyotik patı içeren PDS scaffold ile negatif kontrol ve antibiyotik içermeyen PDS iskeleye göre bakteri sayısında belirgin azalma gözlemlenmiştir. Bu nedenle üçlü



antibiyotik patını taklit eden iskelelerin rejeneratif endodontinin kritik basamağı olan bakteriyel biyofilmin eradike ve elimine edilebilmesinde güçlü bir potansiyel taşıdıklarını bildirmişlerdir.

#### **2.5.4.2.2. Antibakteriyel Etki Gösteren Nanopartiküller**

Kök kanal tedavisinde başarısızlığın temel nedenlerinden biri şekillendirme ve irrigasyon ile ulaşılamayan kompleks kök kanal anatomileri ve bu bölgelerde çoğalmaya devam eden mikroorganizmalardır. Ultraküçük boyut, geniş yüzey alanı, artmış kimyasal aktivite gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip olan nanopartiküllerin dental enfeksiyonların tedavisinde kullanımı umut vericidir. İrrigasyon solusyonu ya da kanal medikamenti olarak ya da kanal patları ve restoratif materyallere eklenerek antibakteriyel etkinliğin artırılması hedeflenmektedir (217).

##### **2.5.4.2.2.1. Gümüş Nanopartikülleri (AgNP)**

Gümüş, elementlerin periyodik tablosunda simgesi Ag (Ag sembolü *Latince argentum* kelimesinden gelir) olan, beyaz, parlak, değerli bir metalik elementtir. Atom numarası 47, atom ağırlığı 107,87 gramdır. Erime noktası 961,9 °C, kaynama noktası 1950 °C ve özgül ağırlığı da 10,5 g/cm<sup>3</sup>tür. Çoğu bileşiklerinde +1 değerlidir (218). +1 değerlikli iyonize gümüş sahip olduğu antimikrobiyal özelliği sayesinde 200 yıldan uzun süredir özellikle yanık yaralarının bakımında, protezlerde ve kataterlerde kullanılmaktadır. Metalik halde inert iken, yaradaki nem ile reaksiyona geçip iyonize forma dönüşmektedir. Gümüş iyonları ya da gümüş bileşikleri içeren jeller ve yara bakımı ürünlerinin popülaritesi son yıllarda artmıştır (219). Gümüş; güçlü bir antimikrobiyal olmasının yanı sıra, düşük toksisite ve insan hücreleriyle iyi biyolojik uyumluluk, uzun süreli antibakteriyel aktivite, sürekli iyon salınımı ve azalmış bakteriyel direnç gibi birçok avantaja sahiptir. Nanoteknolojide meydana gelen gelişmeler sonrasında sentezlenen gümüş nanopartikülleri sahip oldukları geniş yüzey alanı nedeniyle artmış reaktivite ve artmış antibakteriyel özelliklere sahiptir. Özellikle bakteri hücre membranına daha kolay nüfuz olabilmeye yeteneği nedeniyle biyofilmde bulunan dirençli bakterilere karşı bile antibakteriyel etki gösterebilir (220). Morones ve ark. (221) çalışmalarında geniş reaktif yüzeylere sahip farklı dağılım ve morfolojilerde gümüş nanopartikülleri kullanmışlar ve

bakterilere olan etkilerini bildirmişlerdir. Gram negatif bakterilere karşı; 1-10 nm aralığında olan nanopartiküllerin hücre zarının yüzeyine tutunup, geçirgenlik ve solunum gibi işlevleri büyük ölçüde bozduğunu, bakteri içine nüfuz edip DNA gibi kükürt ve fosfor içeren bileşiklerle etkileşime girerek hasara neden olabildiğini bildirmişlerdir.

AgNP içeren materyallerin hazırlanmasında en önemli aşamalardan birisi karakterizasyonun sağlanmasıdır. Birçok çalışma materyaldeki Ag dağılımını, transmisyon elektron mikroskobu (TEM) ile analiz etmiştir. Bu teknik, AgNP'lerin test edilen materyale nasıl yayıldığını ve partikül boyutunu görselleştirmeyi sağlar (222). Cheng ve ark. (223) 3 nm'lik AgNP partiküllerinin net şekilde gözlenebildiğini ve polimer matrisi boyunca iyi dağıldığını bildirmişlerdir. Bu sonuçlar, 2 ila 5 nm arasında değişen büyüklükte AgNP ile yapılmış sonraki başka bir çalışmada doğrulanmıştır. Bu çok küçük boyutun, AgNP nin dentin tübülleri içinde rezidüel kalmış olabilecek bakterilere penetrasyonuna izin verdiği düşünülmektedir. AgNP lerinin materyal içinde iyi dağılarak az sayıda agregat oluşturduğu bildirilmiştir (223).

Çeşitli antibakteriyel etkili ajanların bir kısmı uzun süredir diş hekimliğinde kullanılmaktadır. Nanoteknolojinin gelişimi ile birlikte bu antibakteriyellerin etkisinin artırılarak toksisitesinin azaltılması hedeflenmektedir. Dental antibakteriyel bazlı yapılan çalışmalarda da en çok kullanılan nanopartiküllerden biri gümüş nanopartikülü olmuştur (224). Örneğin gümüş nitrat antibakteriyel özelliği nedeniyle çürük tedavisinde kullanılmıştır. *S. mutans* üzerine altın, gümüş ve çinkooksit nanopartiküllerinin etkisini inceleyen çalışmada gümüş nanopartiküllerin düşük konsantrasyonda ve düşük toksisite ile antimikrobiyal etki oluşturduğu bildirilmiştir (225). Kompozit ve restorasyon sınırlarında biyofilm birikimini önlemek veya azaltmak için, özellikle AgNP'lerin kompozit reçinelere ve yapıştırıcı sistemlere katılmasıyla antimikrobiyal restoratif materyaller geliştirilmiştir (222). Protez stomatitinin engellenmesi amacıyla polimetilmetakrilat içine AgNP eklenerek özellikle *Candida* ya yönelik antibakteriyel etkinlik araştırmaları yapılmaktadır (226). İmplant yüzeyinde biyofilm oluşumunu önlemek için antibakteriyel kaplamalar geliştirilmiştir. Ancak, çoğu uzun süreli zayıf antibakteriyel etki gösterir. Bu materyallerin uzun süreli kullanımından sonra dirençli suşların oluşma olasılığı

vardır. Bu nedenle, AgNP'lerin implant yüzeyine dahil edilmesi önerilmiştir. Ag salımını kontrol ederek uzun vadeli antibakteriyel özelliklere sahip kaplamalar üretmek amaçlanmıştır(227) (228).

Endodonti alanında AgNP kullanımını her geçen gün yapılan yeni çalışmalarla araştırılmaktadır. Özellikle kök kanallarının dezenfeksiyonunu sağlamak için AgNP dispersiyonlarının ya da jelinin antibakteriyel etkinlik çalışmaları bildirilmektedir. Sonuçlar umut verici olmakla birlikte, yeni araştırmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Kök kanallarının doldurulması esnasında kullanılan konvansiyonel gutta perkeyi AgNP ile kaplayarak antibakteriyel özelliğin geliştirilmesi hedeflenmiştir. Oluşturulan bu yeni materyel üzerinde belirgin olarak daha az *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli* saptanmıştır. Bunun yanında, Shantiaee ve ark, nanosilver kaplı gutta-perka ve normal gutta-perka'nın fare fibroblastları üzerindeki sitotoksitesini karşılaştırarak, bu yeni materyalin biyoyumluluğunu test etmişlerdir. Bu çalışmada, 24 saat sonra, nanosilver kaplı gutta-perka, normal gutta-perkaya benzer sitotoksitesite göstermiştir. 1 hafta sonra, test edilen materyaller arasında en düşük sitotoksitesite seviyesine ulaşmıştır (229).

### **Çalışma prensibi**

Bakterilerin hayati işlevlerini sürdürmelerinde hücre zarı önemli görevlere sahiptir. Gümüş nanopartiküllerinin hücre zarındaki respiratuvar zincir proteinleri, transport proteinleri gibi hücresel elemanlarla kararlı kompleksler oluşturarak zarın işlevini bozduğu, geçirgenliği arttırdığı ve hücre bileşenlerinin sızıntısına yol açtığı bilinmektedir. AgNP, bakteri hücresi içindeki çeşitli metabolik yollarla etkileşime girebilir. Hücre içinde reaktif oksijen bileşikleri oluşturarak, oksidatif stresi artırıp DNA hasarına ya da lipid degradasyonuna sebep olabilir. Replikasyon ve transkripsiyonun engellenmesine neden olabilir. Bakteri hücresinin protein sentezini engelleyebilir. Ayrıca hücre stoplazmasına giren gümüş iyonları DNA ya bağlanarak DNA yı gevşek hale getirmektedir. Bu sebeplerden dolayı gümüş antibakteriyel olarak kullanıldığında antibiyotiklere göre daha az direnç gelişimi gerçekleştiği düşünülmektedir (217).

#### 2.5.4.2.2.2. Kitosan Nanopartikülleri

Kitosan temel olarak kitinin (kabukluların dış iskeletini oluşturan polimer) bir çeşidi olup, doğada selülozdan sonra ikinci sırada en çok bulunan doğal biyopolimerdir. EPS komponentlerine benzer bir yapısı vardır. Katyonik özellik gösterir. Toz (mikro- nanopartiküller), kapsül, film, iskele, hidrojel, boncuk ya da bandaj gibi formlara sokulabilir. Kitosan ayrıca çok iyi antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklere sahiptir. Tüm bu sebeplerden dolayı biyomedikal alanda kullanımı yaygındır. Kitosan nanopartiküllerinin kök kanal sistemindeki enfekte kompleks anatomik bölgelere ve dentin tübüllerine ulaşarak burada dezenfeksiyonu artırmak için kullanılabilceği düşünülmektedir (217).

#### Çalışma prensibi

Kitosanın temel antibakteriyel mekanizması pozitif yüklü kitosan nanopartiküllerinin negatif yüklü bakteri membranı ile elektrostatik etkileşime girmesi, membran permeabilitesinin artması ve rüptüre olarak hücre içi elemanların hücre dışına sızmasıdır. Kitosanın ayrıca hücre çekirdeğine ulaşarak DNA ya bağlandığı böylece RNA ve protein sentezini engellediği düşünülmektedir (217).

Kishen ve ark. (230) çalışmalarının ilk bölümünde katyonik nanopartiküllerin tek başlarına ya da çinkooksit içerikli kanal patları ile birlikte kullanımın antibakteriyel etkinliklerini nasıl etkilediği araştırılmıştır. Çalışmanın ikinci bölümünde farklı nanopartiküllerle muamele edilmiş dentine *E.faecalis* in tutunmasını önlemedeki yeteneği incelenmiştir. Nanopartikül eklenmesinin patın akışkanlığını etkilemediğini ancak doğrudan antibakteriyel özelliğini ve antibakteriyel bileşenleri sızdırma kabiliyetini artırdığını bildirmişlerdir. Nanopartikül ile muamele edilen dentinde *E.faecalisin* tutunması belirgin derecede azalmıştır.

Da Silva ve ark. (231) kitosan nanopartikülü eklenmiş çinkooksit öjenol patının pat-dentin arayüzündeki biyofilme etkisini incelenmişlerdir. Çinkooksit öjenol patına kitosan nanopartikülü eklendiğinde pat-dentin arayüzünde biyofilm formasyonu oluşumu inhibe edilmiştir.

Kitosan nanopartikülü içeren solüsyonlarla 3 dk irrigasyon yapılarak kök kanallarındaki smear tabakasının etkin şekilde çözülebildiği bildirilmiştir (232, 233). Perochena ve ark. kitosan nanopartiküllerinin dentin üzerine şelasyon etkisini ve antibakteriyel kapasitesini araştırmışlardır. Kitosan nanopartiküllerinin smearı çözme ve şelasyon etkinliğinin etilendiamintetraasetik asit (EDTA) ile benzer olduğunu bildirmişlerdir. Fakat kitosan nanopartiküllerinin dentin üzerine bakteri yapışmasına direnç sağlaması ve erken dönem biyofilm formasyonuna engel olması nedeniyle EDTA ya alternatif olabileceği ve son irrigasyon ajanı olarak kullanımının mantıklı olacağı ileri sürülmüştür (234).

#### **2.5.4.2.2.3. Biyoaktif Cam Nanopartikülleri**

Biyoaktif cam hem osteoindüktif hem de antibakteriyel etkileri nedeniyle çeşitli ortopedik ve dental uygulamalarda kullanılmaktadır. Kök kanal tedavisinde dezenfeksiyonun artırılabilmesi için çeşitli mikro ve nanoformlarının etkileri araştırılmaktadır.

#### **Çalışma Mekanizması**

Biyoaktif cam nanopartiküllerinin antibakteriyel etkisi 3 temel mekanizmaya dayanmaktadır: Yüksek pH: Aköz bir çevreden salınan iyonlara bağlı artan pH seviyesi antibakteriyel etki oluşturur. Ozmotik etki: Ozmotik basıncın %1 den fazla artması bir çok bakteriyi inhibe eder. Ca/P çökmesi: Bakteri yüzeyindeki mineralizasyonu indükler (217).

Zehnder ve ark. (235) çalışmalarında *E.faecalis* ile enfekte edilmiş dentin bloklarına kalsiyum hidroksit ya da ortalama büyüklüğü 20 mikrometre olan biyoaktif cam toz süspansiyonunun dezenfeksiyon etkilerini karşılaştırmışlardır. Kalsiyum hidroksitin *E.faecalis* üzerine 1. ya da 5. günlerde sınırlı etkili olabildiğini gözlemlemişlerdir. Benzer şekilde biyoaktif cam uygulanan dentinde de 1 gün sonunda *E.faecalis* karşı sınırlı etki oluşmuştur. Fakat 3 gün sonunda biyoaktif cam uygulanan 6 dentin bloğundan birinde örneklenen tüm dentin katmanlarında dezenfeksiyon elde etmişlerdir. Bununla birlikte, 5 gün sonra, biyoaktif cam uygulanan altı test bloğunun tamamında örneklenen dentin tabakalarının tamamen dezenfekte olduğu gözlemlenmiştir. Bu bulgulara dayanarak biyoaktif camın uzun

sürede dezenfeksiyon etkisinin oluştuğunu bu nedenle kanal medikamanti olarak kullanımının daha mantıklı olabileceği bildirilmiştir.

Zehnder ve ark. (236) benzer bir çalışmada kontralateral insan premoları üzerine kalsiyum hidroksit ve biyoaktif camın dezenfeksiyon potansiyellerini karşılaştırmalı olarak incelemişlerdir. *E. faecalis* ile enfekte olan sıgır dentin bloklarını kullanan önceki araştırmanın aksine, mevcut *ex vivo* çalışmada kontralateral insan dişlerinde kalsiyum hidroksitin biyoaktif cam S53P4 süspansiyonuna kıyasla üstün bir dezenfeksiyon kapasitesi olduğu görülmüştür.

Waltimo ve ark. (237) nanometrik biyoaktif camın antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. Nanometrik biyoaktif cam, on kattan daha fazla spesifik yüzey alanına sahip olduğundan, daha fazla alkalın türevleri oluşturur. Bu nedenle daha önce uygulanmış olan mikron ölçülü malzemeden daha güçlü bir antimikrobiyal etki göstermesini beklemişlerdir. Antimikrobiyal etkinliği, persiste kök kanal enfeksiyonlarından izole edilmiş enterokoklara karşı değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak nanopartikül büyüklüğünde hazırlanan biyoaktif camın antibakteriyel etkisinin daha fazla olduğu gösterilmiştir.

#### **2.5.4.2.2.4. Fonksiyonize Antimikrobiyal Nanopartiküller**

Çeşitli reaktif moleküller içeren ve peptidler veya diğer ligandlarla fonksiyonel hale getirilmiş nanopartiküller, antimikrobiyal dirençle mücadele için yeni imkânlar sağlamaktadır. Nanopartiküllerle fotosensitizasyonun birlikte kullanımı;

1. Nanopartiküllerle kapsülize edilmiş fotosensitizasyon
2. Nanopartiküllere bağlı ya da yüklenmiş fotosensitizasyon
3. Kendisi fotosensitif olan nanopartiküller olarak değerlendirilebilir (217).

Pagonis ve ark. (238) nanopartikül temelli endodontik antimikrobiyal fotodinamik terapinin etkilerini incelemişlerdir. Fotosensitif metilen mavisi ile yüklenmiş poly(laktik-co-glikolik asit) nanopartiküllerinin ve ışığın *E.faecalis* üzerine etkisini karşılaştırmışlardır. Hem metilen mavisi ile yüklenmiş nanopartiküllerin bulunduğu hem de metilen mavisi yüklenmiş ve ışık kullanılmış

nanopartiküllerin bulunduğu gruplardaki koloni sayısı kontrol grubuna göre daha az bulunmuştur. Işık kullanılan gruptaki koloni sayısı kullanılmayan gruba göre daha az olmuştur. Nanopartiküllerin ve ışığın sinerjistik olarak kullanılması deneysel olarak enfekte edilmiş insan kök kanallarında *E. faecalis* biofilm türünün yaklaşık 1 log10 miktarında uzaklaştırılmasını sağlarken, metilen mavisi yüklenmiş nanopartiküllerin ışık kullanılmadan uygulanmasıyla bakteri görünürlüğü yaklaşık %44 ve %58 arasında azalmıştır. Sonuç olarak fotosensitif ilaçları kapsüllemiş PLGA nanopartiküllerinin kullanımının, antimikrobiyal endodontik tedavide umut verici olabileceği sonucuna varılmıştır.

Antibakteriyel irrigasyon ajanı olarak klorheksidin, kök kanal tedavisinde sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda matris metalloproteinaz inhibitörü ve antibakteriyel olduğundan adeziv diş hekimliğinde yaygın olarak tercih edilmektedir (239).

Priyadarshini ve ark. (239) çalışmada nanokapsüllenmiş klorheksidin ilaç taşınım sistemi olarak rezin dentin arayüzüne olan etkisini değerlendirmişlerdir. Daha önce klorheksidin epidermal uygulamalarda kullanımında poly(caprolactone) (PCL) ile nanokapsüllenmesinin etkili bir taşıyıcı olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada simüle edilmiş pulpal basınç karşısında PCL kaplı CHX nin dentin tübüllerine taşınımını incelenmiştir. Çekilmiş dişlerde hem *in vitro* hem de *ex vivo* olarak 25 güne kadar önemli derecede klorheksidin salınımı yaptıkları ve bu süre zarfında yavaş yavaş bozdukları bildirilmiştir. Adeziv dişhekimliğinde ilaç taşınım sistemi olarak rutin kullanımı için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğunu bildirmişlerdir.

Bu çalışmanın amacı, geleneksel kök kanal medikamentlerinin (Ca(OH)<sub>2</sub> patı, CHX jeli) gümüş nanopartikülü ile karışımının 1 ve 7 günlük uygulamalarının kök dentininde oluşturulan çok türlü (*E. Faecalis*, *S. Mutans*, *L. Acidophilus*, *A. naeslundii*) biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin kültür ve konfokal lazer taramalı mikroskopi yöntemleri ile değerlendirilmesidir.

Çalışmanın sıfır hipotezi; H<sub>0</sub> hipotezi: Tüm uygulama süreleri sonunda, kalsiyum hidroksit patı ya da klorheksidin jeli ile gümüş nanopartikülünün karıştırılarak uygulanması medikamentlerin çok türlü biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliğini değiştirmez.

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji AD Bakteriyoloji Laboratuvarı ve Süleyman Demirel Üniversitesi Göller Bölgesi Teknokenti BSN Sağlık Analiz Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 04.07.2018 /124 tarih ve sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

#### **Güç analizi ve örnek sayılarının belirlenmesi**

Çalışmaya başlamadan önce, güç analizi yapılarak %95 güç hedeflendiğinde, literatürdeki çalışmalarda (240) en küçük değer 0,49, en yüksek değer 8,61 alındığı ve standart sapmanın 0,5 olarak alındığı durumda her bir grupta örnek sayısının en az 3 olması gerektiği görüldü ve her bir gruptaki örnek sayısının 5 olmasına karar verildi.

#### **3.1. Dentin Bloklarının Hazırlanması**

Bu çalışmada Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Cerrahi Anabilim Dalı kliniği ve Isparta Ağız ve Diş Sağlığı Hastanesi'nin kliniklerinde çekilmiş, 29 adet çürüksüz, eğri olmayan tek kök ve tek kanal içeren, %0,5 lik timol solüsyonu içinde bekletilmiş alt premolar insan dişi kullanılmıştır. Kök kanallarının anatomisi periapikal radyograflar yardımıyla değerlendirilerek aşırı geniş kanal, internal rezorpsiyon, ilave kanal, kalsifikasyon bulunan dişler çalışmaya dahil edilmemiştir.

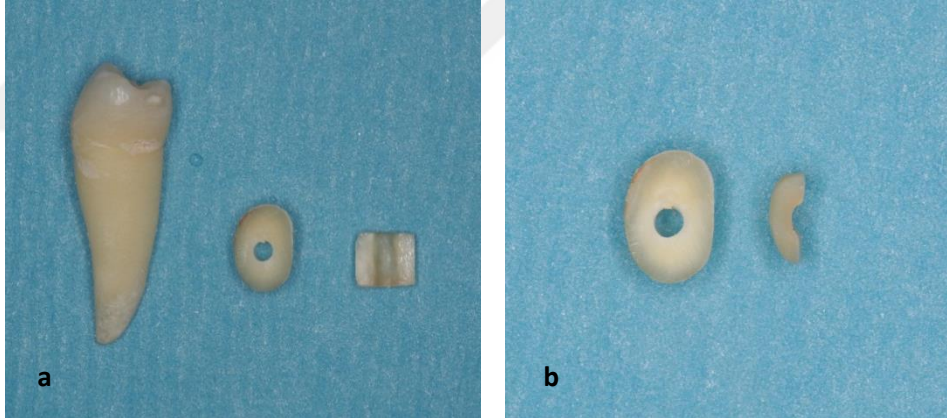
Çekilmiş dişler dekoranize edildikten sonra mine sement sınırının 1 mm altındaki kök kısmından horizontal olarak 4 mm lik tam silindir blok, karbon separe yardımı ile ayrıldı (Resim 1). Kanal boşluğu 1,5 mm çapa sahip 6 nolu gates glidden frez (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ile su soğutması altında 300 rpm hızda genişletildi. Tam silindirik dentin bloğu uca doğru incelen elmas frez (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ve aeratör yardımı ile ikiye bölünerek 2 adet yarım silindirik blok elde edildi (Resim 2a). Blokların dış yüzeyindeki sement dokusu elmas aeratör frezi ile uzaklaştırıldı. Yarım silindirik bloklar, dijital kumpas yardımıyla kalınlığı her yerinde eşit ve 1 mm olacak şekilde, 600,800 ve 1200 gridli



silikon karbit zımpara kağıtları ile inceltildi. Toplamda 58 adet boyu 4 mm, tüm yüzeylerde kalınlığı 1 mm olan dentin blokları elde edildi (Resim 2b).



**Resim 1.** İnsan alt premolar dişinin mine sement sınırının 1 mm altından separe yardımı ile kesilmesi



**Resim 2.** İnsan alt premolar dişinden elde edilmiş tam silindir dentin bloğu ve ikiye ayrılarak 1mm kalınlığa inceltilmiş yarı silindir dentin bloğu

Dentin bloklarının yüzeylerinde oluşan smear tabakası, ultrasonik banyoda 3 dk boyunca %5,25 NaOCl (Cerkamed, Stalowa Wola, Polanya) (lot no: 2102171) daha sonra 3 dk boyunca %17 lik EDTA (Cerkamed, Stalowa Wola, Polanya) (lot no: 1411161) ile muamele edilerek uzaklaştırıldı. Dentin yüzeylerindeki kimyasalların ve smearın uzaklaştırılması için bloklar, 10 dk boyunca steril distile su ile yıkandı.

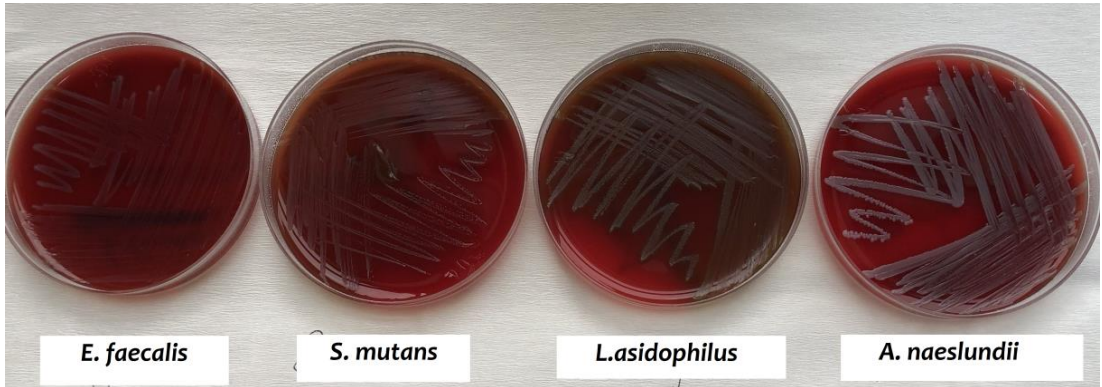
Dentin blokları 121 °C ve 15 psi de 20 dk süre ile steril edildi. Sterilizasyon sonrası dentin blokları 37°C de 2 saat süre ile etüvde bekletildi ve rastgele seçilen 4 örnekte sterilizasyon kontrolü yapıldı.

### 3.2. Çok Türlü Biyofilm Oluşturulması

*Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) suşları Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD Bakteriyoloji laboratuvarından, *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 11975) suşu Ankara Halk Sağlığı Mikrobiyoloji Referans Laboratuvarı ve Biyolojik Ürünler Dairesi Laboratuvarından, *Actinomyces naeslundii* (ATCC 12104) (Cect, İspanya) temin edildi.

*Enterococcus faecalis* ve *Streptococcus mutans* suşları beyin-kalp infüzyon (BHI) sıvı besiyeri içerisinde sulandırıldıktan (rehidrate edildikten) sonra BHI agara ekimleri yapıp 37°C’ de 24-48 saat inkübasyon sonrası, elde edilen saf koloniler çalışmada kullanıldı. *L. acidophilus* suşu 1 mL DeMan Rogosa Sharp (MRS) sıvı besiyeri ile sulandırıldıktan sonra MRS agara ekilip 37 °C 24-48 saat inkübe edildi. *Actinomyces naeslundii* suşu 1mL BHI sıvı besiyeri ile sulandırıldıktan sonra anaerob kanlı agar besiyerine ekildi, 37°C de anaerobik ortamda 48 saat inkübe edildi (Resim 3).

Çalışmada kullanılacak bu dört standart bakteri suşunun herbirinden densitometre cihazı (BD Phoenix Spec Nephelometer, Limhamn, İsveç) ile 1 ml steril sıvı besiyeri içerisinde 0,5 McFarland ( 10<sup>8</sup> CFU/mL) bulanıklığa eşit olacak şekilde süspansiyonları hazırlandı.



**Resim 3.** Kanlı agar besiyerinde kültüre edilmiş bakteri suşları

Steril dentin blokları her bir bakteri süspansiyonundan 300 mikrolitre ( $\mu$ l) olacak şekilde toplam 1200  $\mu$ l bakteri süspansiyonu içeren eppendorf tüplere yerleştirildi. Dentin tübüllerine bakteriyel penetrasyonun sağlanabilmesi için eppendorf tüpler mikrosantrifüj cihazına (Sigma, Osterode am Harz, Almanya) yerleştirildi. Daha önce tarif edilen protokole uygun olarak (256), santrifüj sekansı 5 dk olacak şekilde 1400g, 2000g, 3600g, 5600 g de 2 şer kez santrifüj edildi (Resim4). Her santrifüj siklusu arasında bakteriyel süspansiyon tazelandı. Daha sonra her bir blok 1 mL steril taze beyin-kalp infüzyon besiyeri ve %1 sükröz içeren eppendorf tüplere konuldu. Nem kaybını engellemek için tüplerin kapakları parafilm ile kaplandı. Eppendorf tüpler %5 CO<sub>2</sub>, 37 °C de 7 gün inkübe edildi. Her gün tüpler içindeki besiyeri tazesı ile değıştirildi.



**Resim 4.** Bakteriyel penetrasyonun arttırılması amacıyla kullanılan mikrosantrifüj cihazı

Beş adet dentin bloğu enfekte edilmedi ve deney süresince negatif kontrol grubu olarak 37 °C de etüvde saklandı.

#### **Çok türlü biyofilmin SEM ile görüntülenmesi**

Yedi günlük inkübasyon süresi sonunda rastgele seçilen 3 dentin bloğu çok türlü biyofilm oluşumunun kontrolü amacı ile % 10 luk formaldehit (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, ABD) içerisinde 1 hafta süre ile bekletildi. Bloklar etanol solüsyonları (%70, %95 ve %100) içerisinde dehidrate edildi ve SEM cihazı (Quanta

250 FEG; FEI Ltd., Çek Cumhuriyeti) ile 5.000, 10.000 ve 20.000 büyütmelemlerde görüntüleri alındı.

### **Dentin bloklarında başlangıç bakteri sayısının belirlenmesi**

Kalan 50 adet enfekte edilmiş dentin bloğu planktonik bakterilerin uzaklaştırılması amacıyla 1 dk boyunca 5 mL steril salin solüsyonu ile yıkandı. Dentin blokları yüzeyinde başlangıç bakteri sayısının belirlenmesi amacı ile, yıkamadan sonra kanal boşluğunda kalan salin solüsyonu 3 adet steril kağıt koniye (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) emdirildi ve kağıt koniler 1 mL steril salin solüsyonu bulunan eppendorf tüplere aseptik koşullar altında yerleştirildi. Bu tüplerden alınan salin örneklerinin seri sulandırılmılarından kanlı agar besiyerlerine ekimler yapıp inkübasyon süresi (24 saat) sonunda üreyen bakterilerin koloni sayıları belirlendi.

### **Dentin bloklarına medikamentlerin uygulanması**

Kök kanal yüzeylerinde çok türlü biyofilm oluşturulmuş 50 adet dentin bloğu rastgele test edilecek medikamentlere göre (salin, Ca(OH)<sub>2</sub>, Ca(OH)<sub>2</sub>+AgNP, CHX, CHX+AgNP) 5 gruba ardından medikamentlerin uygulanma süresine göre 2 alt gruba (1 ve 7 gün) ayrıldı.

Pozitif kontrol grubu (n=10): Dentin bloğunun kök kanalı boşluğuna 20 µl steril salin solüsyonu damlatıldı.

Ca(OH)<sub>2</sub> grubu (n=10): Dentin bloğunun kök kanalı boşluğuna 20 µl %35 kalsiyum hidroksit patı (UltraCal® XS, Ultradent, ABD) (lot: BFZCR) uygulandı (Resim 5).

Ca(OH)<sub>2</sub> ve AgNP karışımı grubu (n=10): 10 µl %35 kalsiyum hidroksit patı (UltraCal® XS, Ultradent, St Louis, ABD) ile 10 µl 210 ppm ortalama 2,5 nm boyutunda küresel gümüş nanopartikülü solüsyonu (Nanografi, ODTÜ Teknokent, Türkiye) (Resim 6) birebir (1:1) oranında karıştırıldı (Resim 7a). Bu karışım dentin bloğunun kök kanalı boşluğuna uygulandı.

CHX jel grubu (n=10): Dentin bloğunun kök kanalı boşluğuna 20 µl %2 klorheksidin jel (Gluko-Chex®, Cerkamed, Stalowa Wola, Polonya) (lot: 3011171) (Resim 5) uygulandı.

CHX jel ve AgNP karışımı grubu (n=10): 10 µl %2 klorheksidin jel (Gluc-Chex<sup>®</sup>, CerKamed) ile 10 µl 210 ppm ortalama 2,5 nm boyutunda küresel gümüş nanopartikülü solüsyonu (Nanografi, ODTÜ Teknokent, Türkiye) 1:1 oranında karıştırıldı (Resim 7b). Bu karışım dentin bloğunun kök kanalı boşluğuna uygulandı.

Dentin bloklarının %100 nemli ortamda saklanabilmesi için 50 adet eppendorf tüpüne 0,5 ml steril salin solüsyonu emdirilmiş 1cmx1cm boyutlarında steril gazlı bezler konuldu. Medikament uygulanmış dentin blokları kanal boşluğu üstte kalacak şekilde bu steril gazlı bez üzerine yerleştirildi. Dentin bloklarının üstüne nemli ortamın korunabilmesi için 300 µl steril salin solüsyonu emdirilmiş steril pamuk pelet konuldu (Resim 8). Tüm eppendorf tüpler nem kaybını engellemek amacıyla parafilm ile kaplandı.

Her gruptan 5 adet blok 1 gün, 5 adet blok 7 gün 37 °C'de %5 CO<sub>2</sub> li ortamda bekletildi.

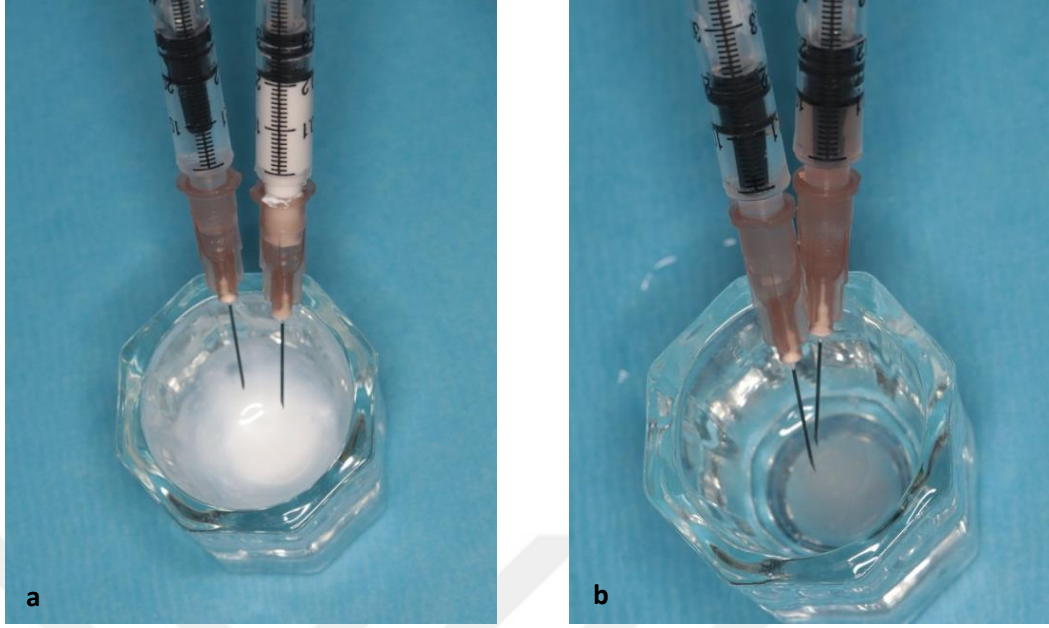


**Resim 5.** Deneyde kullanılan geleneksel medikamentler- klorheksidin jel ve kalsiyum hidroksit patı



**Resim 6.** Deneyde kullanılan gümüş nanopartikülü dispersiyonu





**Resim 7.** a) Kalsiyum hidroksit patı ve gümüş nanopartikülü solüsyonunun eşit miktarlarda karıştırılması, b) Klorheksidin jel ve gümüş nanopartikülü solüsyonunun eşit miktarlarda karıştırılması



**Resim 8.** Medikamentlerin uygulanmasından sonra örneklerin eppendorf içindeki görüntüsü

### 3.3. Kültür Yöntemi İle Mikrobiyolojik Değerlendirme

1. ve 7. günler sonunda kök kanal boşluğu 1 dk süre 10 mL steril salin solüsyonu ile yıkılarak medikamentler uzaklaştırıldı (Resim 9).

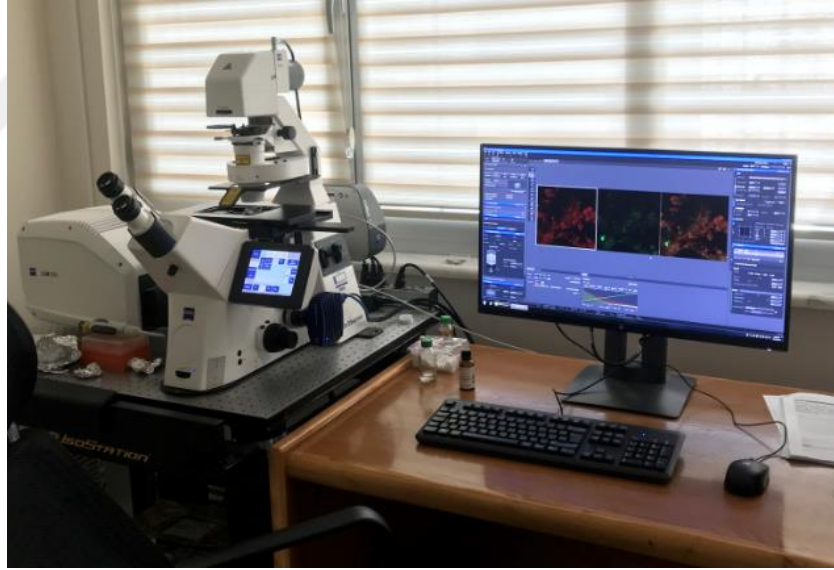
Kök kanal medikamentlerinin antibakteriyal etkisini değerlendirmek amacı ile yıkamadan sonra kanal boşluğunda kalan salin solüsyonu 3 adet steril kağıt koniye (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) emdirildi (Resim 10) ve kağıt koniler 1 mL steril salin solüsyonu bulunan eppendorf tüplere aseptik koşullar altında yerleştirildi





**Resim 11.** Steril salin içinde kağıt koniler

#### 3.4. KLTM incelemesi



**Resim 12.** SDÜ Teknokent BSN sağlık analiz laboratuvarında bulunan

KLTM (LSM 800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany)

Canlı ve ölü bakterilerin boyanmasında floresan LIVE/DEAD™ BacLight™ viability kit L-7012 ( Invitrogen, Thermo Fisher Scientific) (lot:1939603) kullanıldı (Resim 13).





**Resim 13.** LIVE/DEAD™ BacLight™ 7012 kiti (thermofisher.com)

Kit; SYTO 9 boyası, 3.34 mM (A komponenti); DMSO (dimetil sulfoksit) içinde 300 µL solüsyon ve propidium iodid (PI), 20 mM (B komponenti), DMSO içinde 300 µL solüsyon içermektedir. Daha önce dentin bloğunda ideal boyanma konsantrasyonunu bildiren çalışma ve yaptığımız ön çalışma dikkate alınarak her bir boyadan 1 µL mikropipet ile çekilerek 1 mL steril distile suyun içine eklendi (241). Elde edilen karışım iyice çalkalanarak boyaların homojenizasyonu sağlandı. Elde edilen karışımdan dentin bloğu üzerine 200 µL damlatıldı. Örnekler karanlık ortamda 30 dk bekletilerek boyaların bakterilere penetre olması sağlandı. 30 dk sonunda dentin blokları üzerindeki boya 3 mL steril salin ile yıkanarak uzaklaştırıldı. Örnekler dairesel petri içinde kök kanal boşluğu yukarıda kalacak biçimde KLTM objektifine yerleştirildi (Resim 14). Örnekler 40x objektifte ve immersiyon yağı kullanılarak, boyalara uygun olan lazer dalgaboyu değerleri ile KLTM (LSM 800, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) kullanılarak incelendi. Boyaların uyarım/emisyon maksimumu SYTO 9 boyası için 480/500 nm, PI boyası için 490/635 nm dir.



**Resim 14.** KLTM ye yerleştirilen dairesel petri içindeki dentin bloğunun kanal boşluğuna odaklanmış lazer ışını

Her bir kök kanalında biyofilmin rastgele seçilen  $159,73 \times 159,73 \mu\text{m}$  boyutlarında 5 farklı alanda,  $2203 \times 2203$  piksel değerlerinde tarama yapıldı ve elde edilen görüntüler kaydedildi. Ayrıca her bir dentin bloğunda biyofilmin 3 boyutlu olarak değerlendirilmesinde Z-stacks derinlik  $10 \mu\text{m}$ , adım aralığı  $0,5 \mu\text{m}$  ve toplam 20 tabaka olarak seçildi, tarama biyofilmin üst yüzeyinden başlayarak alt yüzeyine kadar gerçekleştirildi. Biyofilmin 2 boyutlu ve 3 boyutlu görüntülenmesinde ZEN lite (ZEISS, Oberkochen, Germany) yazılımı kullanıldı. Biyofilmin KLTM görüntüleri Image J (version 1.48, National Institute of Health, ABD) görüntü analiz programı ile analiz edildi. Her bir görüntüdeki canlı/ölü bakteri yüzdesi hesaplandı.

### **3.5. İstatistiksel Analiz**

#### **3.5.1. Kültür Yöntemi İle Elde Edilen Verilerin İstatistiksel Analizi**

Dentin blokları yüzeyinden, antibakteriyel medikamentlerin uygulanmasından önce ve sonra alınan örnekler ile elde edilen koloni sayıları log<sub>10</sub> tabanına dönüştürüldü. Test edilen medikamentler arasındaki farkların karşılaştırılmasında başlangıç ve uygulama sonrası CFU değerlerindeki azalma faktöriyel düzlemde

varyans analizi (ANOVA) ile değerlendirildi. Varyans analizi sonrası gruplar arasındaki farkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanıldı ( $P<0,05$ ).

### **3.5.2. KLTM Verilerinin İstatistiksel Analizi**

Örneklere ait canlı mikroorganizma yüzde verileri ters açı transformasyonuna (ark sinüs) tabi tutuldu. Verilerin parametrik testlerin ön şartlarını sağlayıp sağlamadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildi.

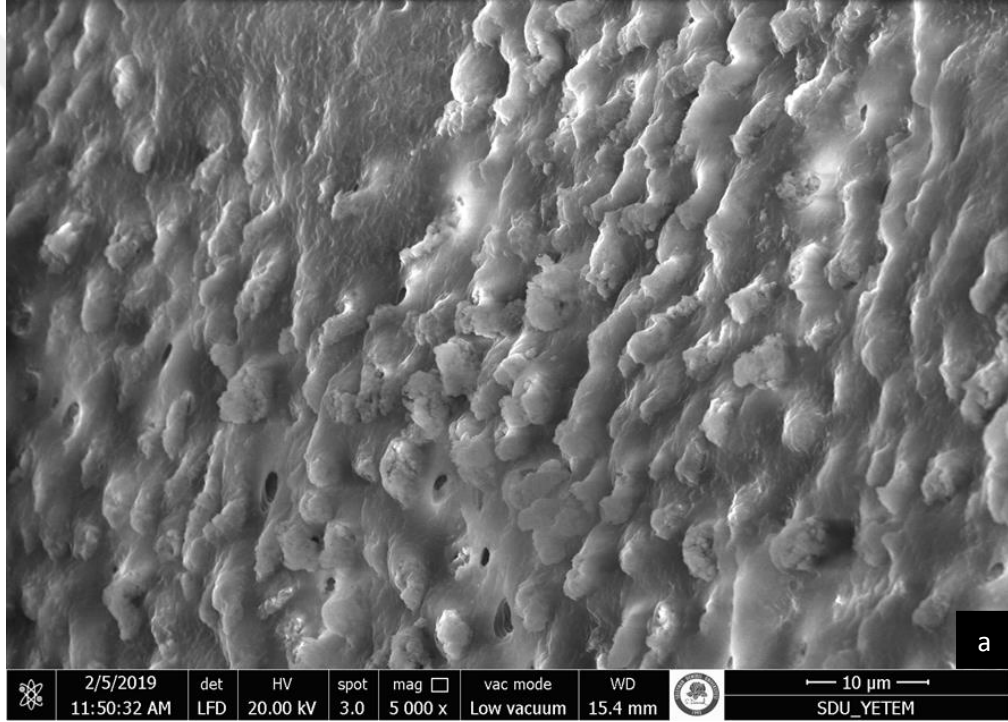
KLTM ile değerlendirme sonrası elde edilen ters açı transformasyonuna tabi tutulmuş yüzde verilerinin analizinde Kruskal-Wallis testi, grup ortalamaları arasındaki farkların belirlenmesinde Bonferroni (Dunn) testi kullanıldı ( $P<0,05$ ).

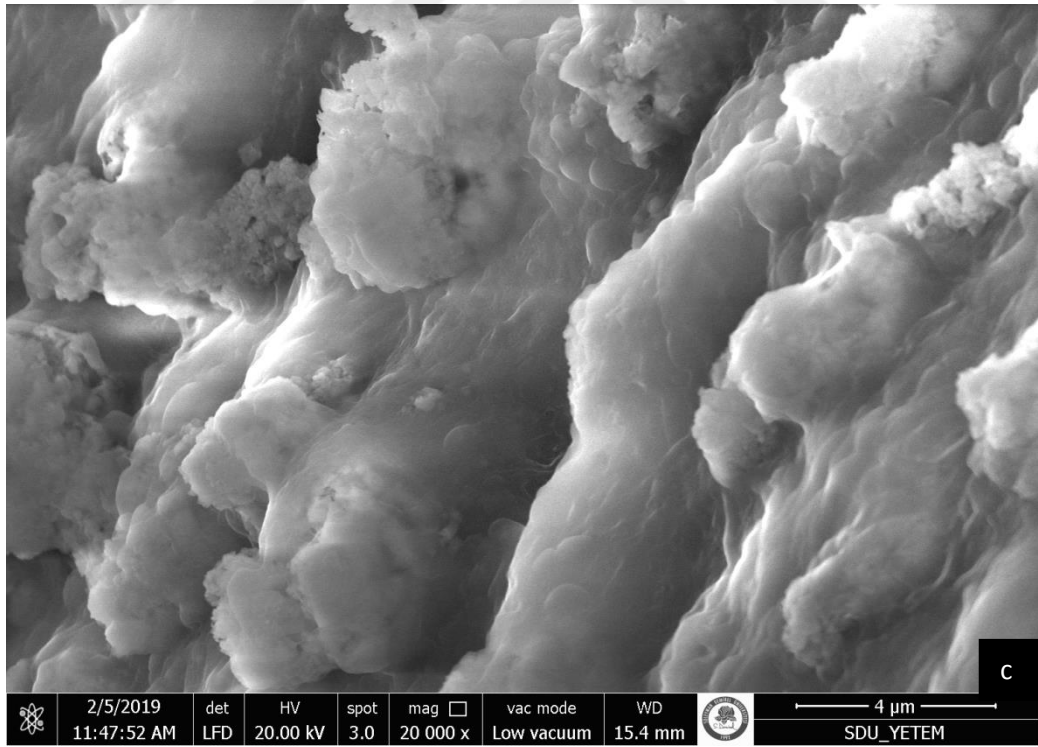
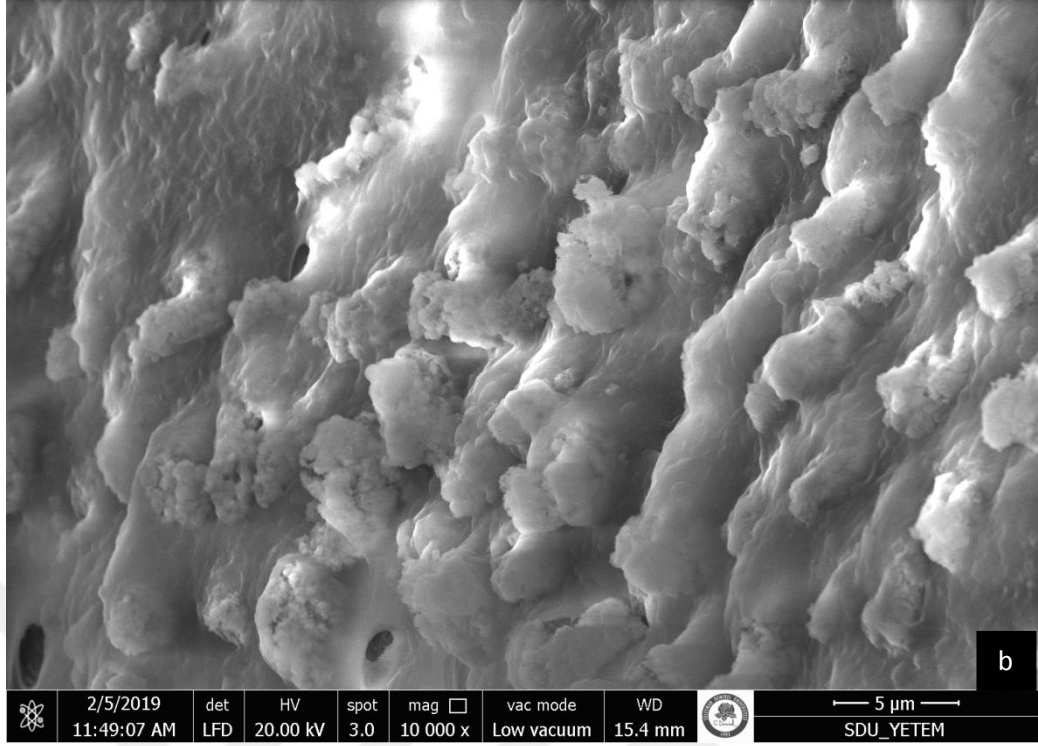
Her bir grup için uygulama süreleri (1. gün ve 7. gün) arasındaki fark Mann Whitney-*U* testi ile belirlendi ( $P<0,05$ ).

## 4. BULGULAR

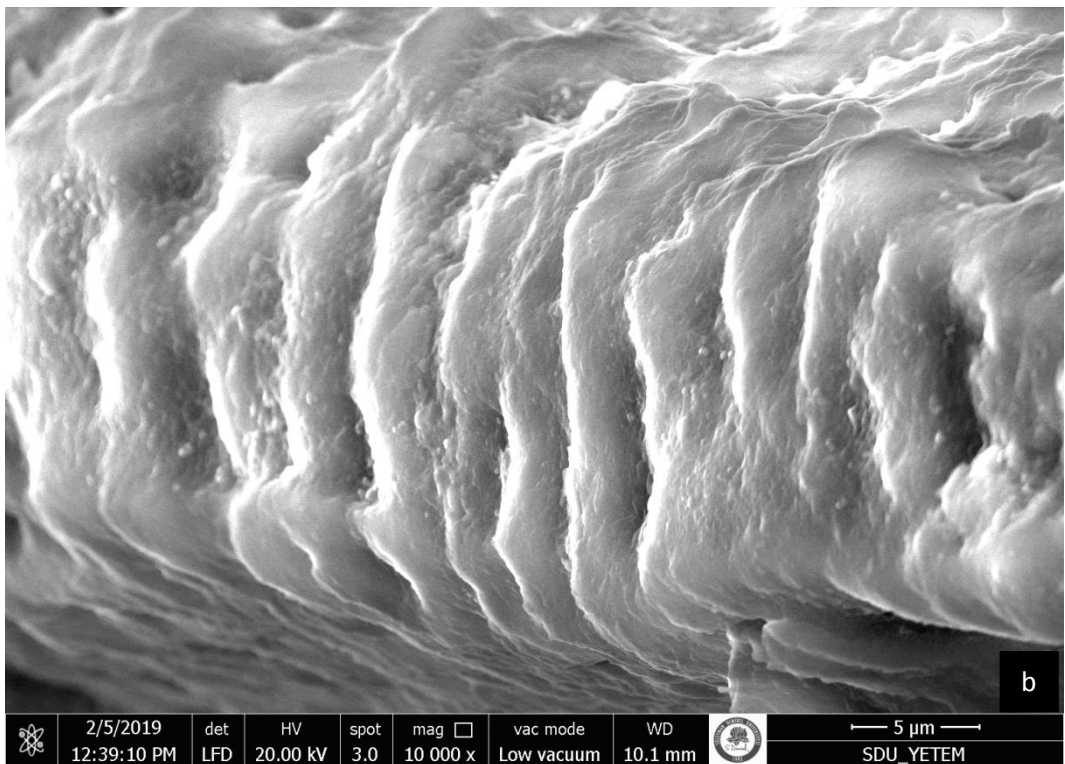
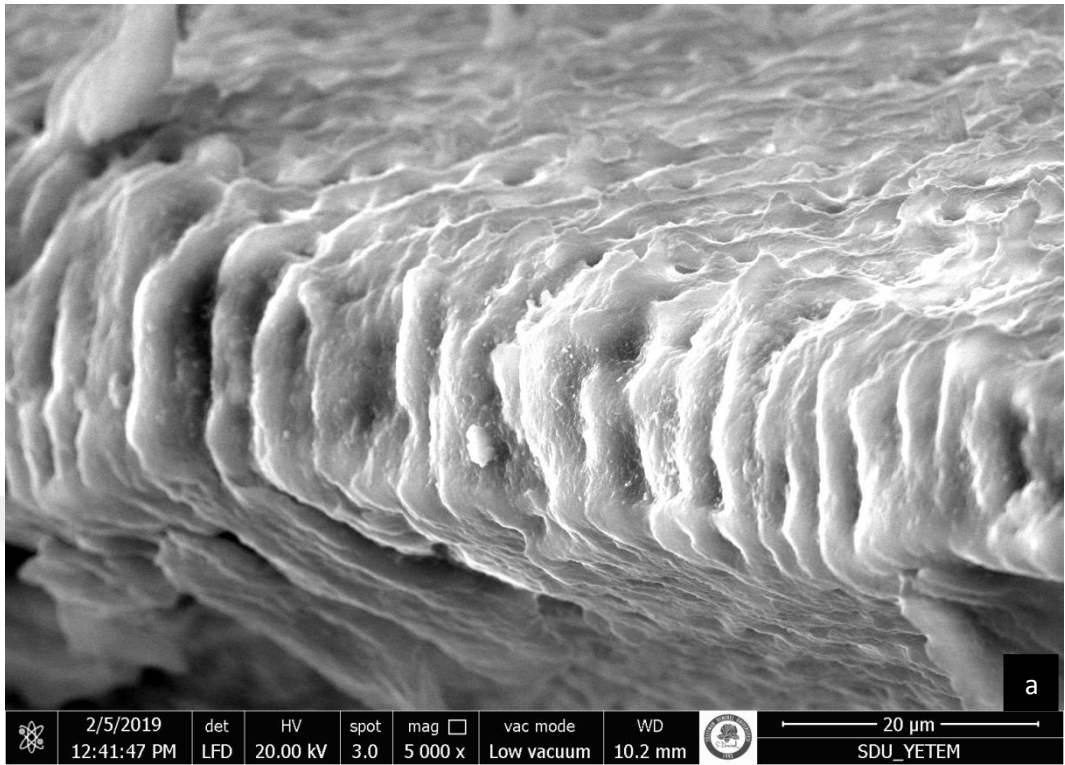
### 4.1. Çok Türlü Biyofilm Oluşumunun SEM ile Görüntülenmesi

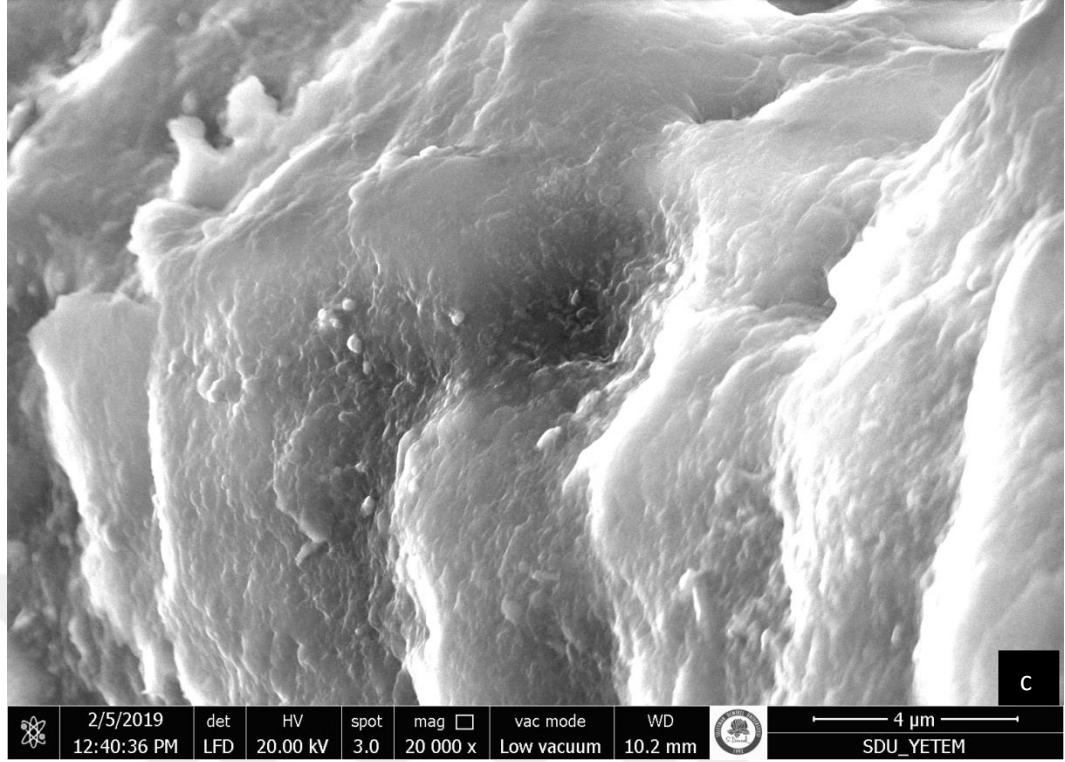
*E. faecalis*, *S. mutans*, *L. acidophilus*, *A. naeslundii* bakterileri ile 1 haftalık inkübasyon süresi sonunda biyofilm oluşumu SEM görüntüleri ile doğrulandı (Resim 15 a,b,c). SEM mikrograflarında kalınlığı yer yer değişen, dentin yüzeyinin tamamını kaplayan, EPS içine gömülü yoğun bakteri toplulukları içeren biyofilm oluşumu izlendi (Resim 16 a,b,c).





**Resim 15.** Dentin yüzeyini kaplayan çok türlü biyofilmin SEM mikrografileri  
a) X5000 b) X10000 c) X20000





**Resim 16.** Çok türlü biyofilm kesiti ve EPS içine gömülü bakteri kolonilerinin a) X5000 b) X10000 c) X20000 SEM mikrografileri

#### 4.2. Kültür Yöntemi İle Elde Edilen Verilere Ait Bulgular

Dentin blokları üzerinde 1 haftalık inkübasyon süresi sonrasında oluşan biyofilmlerde başlangıç mikroorganizma sayısı ortalama 7,47 log<sub>10</sub> CFU'dur. Grupların başlangıç bakteri sayıları arasında istatistiksel fark bulunmadı (P>0,05). Negatif kontrol grubunda hiçbir örnekte bakteri üremesi gözlenmedi.

Gruplara ait antibakteriyel medikamentlerin uygulama öncesi ve 1, 7 günlük uygulama sonrası bakteri sayısındaki ortalama değişim (log<sub>10</sub>) Tablo 3'de verildi. Her iki uygulama süresi (1 ve 7 gün) için test edilen medikamentler arasında bakteri sayısındaki azalma açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi (P<0,01).

Her iki uygulama süresinde de en fazla bakteriyel azalma CHX+AgNP ve Ca(OH)<sub>2</sub>+AgNP gruplarında görüldü (P<0,05) (Tablo 3). Her iki uygulama süresinde de en düşük bakteriyel azalma salin uygulanan örneklerde izlendi (P<0,05) (Tablo 3).

Her bir grup için bakteri sayısındaki azalma açısından 7 günlük uygulama süresi, 1 günlük uygulama süresinden istatistiksel olarak anlamlı derecede başarılı bulundu ( $P<0,01$ ) (Tablo 4).

**Tablo 3.** Medikament uygulaması sonrası bakteri sayısında azalma (ortalama, SS ve min-max  $\log_{10}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) değerleri.

Uygulama Süresi	Medikamentler	n	Ortalama $\pm$ SS	Standart hata	Min-Max
1 gün	Salin	4	0,47 $\pm$ 0,82 <sup>c</sup>	0,468	-0,47-1,42
	Ca(OH) <sub>2</sub>	5	5,17 $\pm$ 1,11 <sup>b</sup>	0,419	4,33-6,02
	Ca(OH) <sub>2</sub> +AgNP	5	7,07 $\pm$ 1,09 <sup>a</sup>	0,419	6,23-7,92
	CHX	5	6,18 $\pm$ 1,09 <sup>a,b</sup>	0,419	5,34-7,03
	CHX+ AgNP	5	7,31 $\pm$ 0,33 <sup>a</sup>	0,419	6,46-8,16
7 gün	Salin	5	2,29 $\pm$ 1,20 <sup>z</sup>	0,419	1,45-3,14
	Ca(OH) <sub>2</sub>	5	6,77 $\pm$ 1,28 <sup>y</sup>	0,419	5,93-7,63
	Ca(OH) <sub>2</sub> +AgNP	5	7,44 $\pm$ 0,96 <sup>x</sup>	0,419	6,60-8,29
	CHX	5	7,68 $\pm$ 0,26 <sup>x,y</sup>	0,419	6,84-8,54
	CHX+ AgNP	5	7,64 $\pm$ 0,40 <sup>x</sup>	0,419	6,79-8,49

*n*, her gruptaki örnek sayısı; SS, standart sapma;

\*Üst karakterdeki farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P<0.05$ )

**Tablo 4.** Medikament uygulama süreleri sonunda bakteri sayısında azalma (ortalama, SS ve min-max  $\log_{10}$  CFU  $\text{mL}^{-1}$ ) değerleri.

	Ortalama $\pm$ SS	Standart hata	min-max
1 gün uygulama	5,44 $\pm$ 2,55 <sup>b</sup>	0,192	4,86-5,63
7 gün uygulama	6,37 $\pm$ 2,26 <sup>a</sup>	0,187	5,99-6,75

\*Üst karakterdeki farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P<0.01$ )



### 4.3. KLTM Verilerine Ait Bulgular

#### 4.3.1. Bir Günlük Uygulama Süresi Sonunda Elde Edilen KLTM Verilerine Ait Bulgular

Medikamentlerin 1 günlük uygulama süresi sonunda dentin bloklarında oluşturulan çok türlü biyofilm tabakasındaki canlı bakteri yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi ( $P<0,01$ ). Gruplara ait antibakteriyel medikamentlerin 1 günlük uygulama sonrası canlı bakteri ortalama yüzde değerleri tablo 5 te verildi.

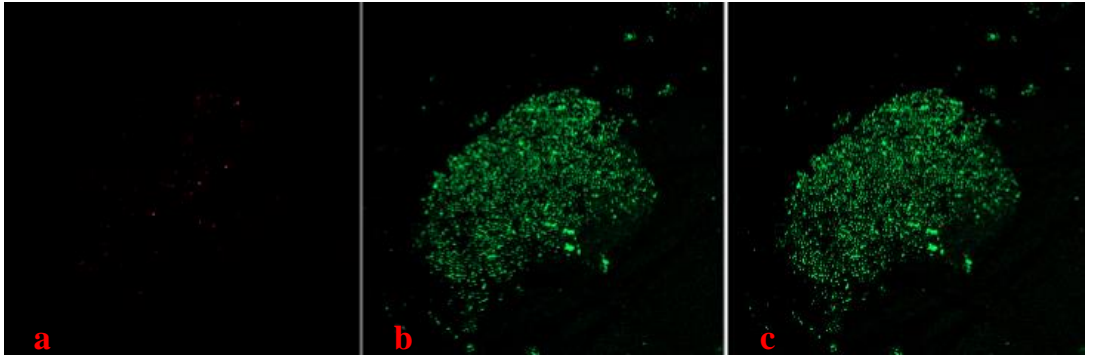
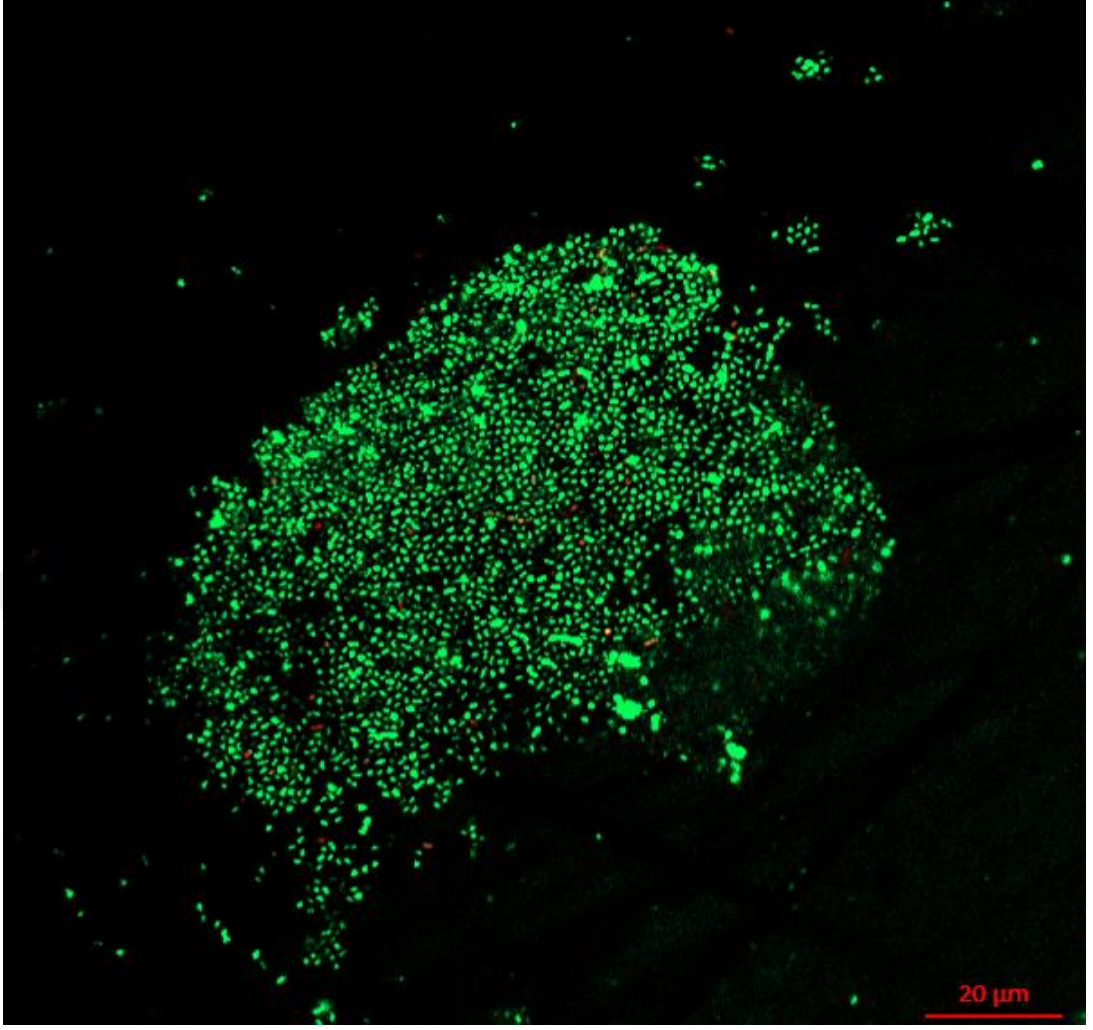
Bir günlük uygulama süresinde en az canlı bakteri CHX+AgNP grubunda izlendi ( $P<0,05$ ). AgNP'ün, CHX jel veya  $\text{Ca(OH)}_2$  patına karıştırılarak kullanıldığı gruplarda canlı bakteri yüzdesi, her iki medikamentin de tek başına uygulandığı gruplardan daha azdı ( $P<0,05$ ). Canlı bakteri yüzdesi en fazla salin grubunda tespit edildi ( $P<0,05$ ) (Tablo 5) (Şekil 17-31).

**Tablo 5.** Medikamentlerin 1 günlük uygulama sonrası çok türlü biyofilmdeki canlı bakteri yüzde değerleri

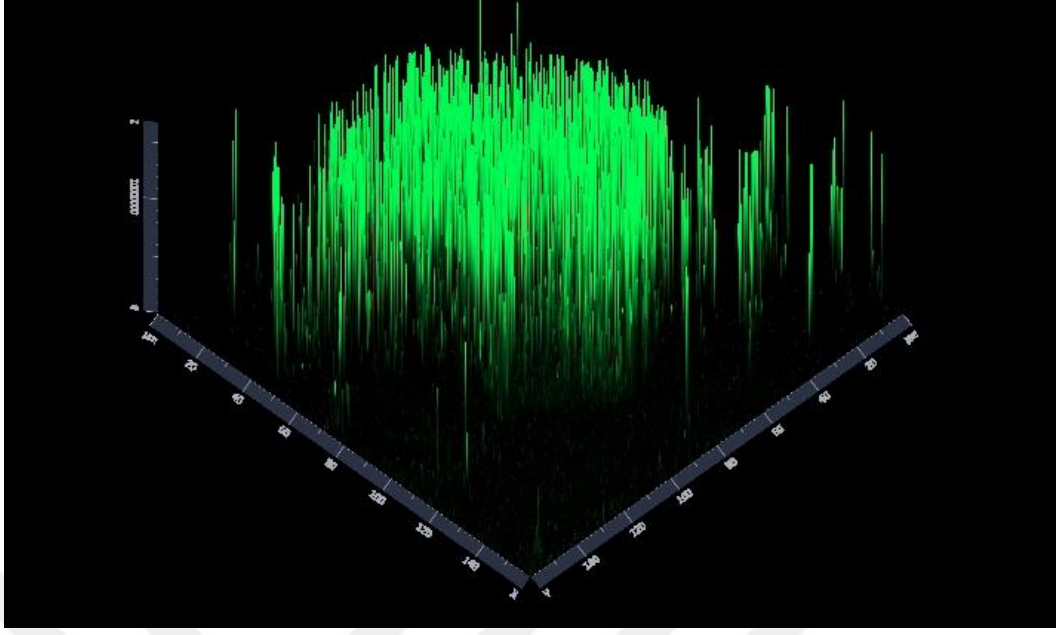
	Medikamentler	n	Ortalama±SS	Mean RANK	SE	Min-max
Canlı %	Salin	5	98,66±2,68	21,5 <sup>a</sup>	1,34	94,64- 100
	$\text{Ca(OH)}_2$	5	61,16±15,30	16,6 <sup>b</sup>	6,84	38,80- 80,81
	$\text{Ca(OH)}_2$ +AgNP	5	28,95±9,53	7,75 <sup>d</sup>	4,76	18,25- 37,69
	CHX	5	38,27±3,40	11,4 <sup>c</sup>	1,52	35,54- 43,70
	CHX+ AgNP	5	18,96±5,78	3,8 <sup>e</sup>	2,59	9,45- 24,42

*n*, her gruptaki örnek sayısı; *SS*, standart sapma; *SE*, standart hata

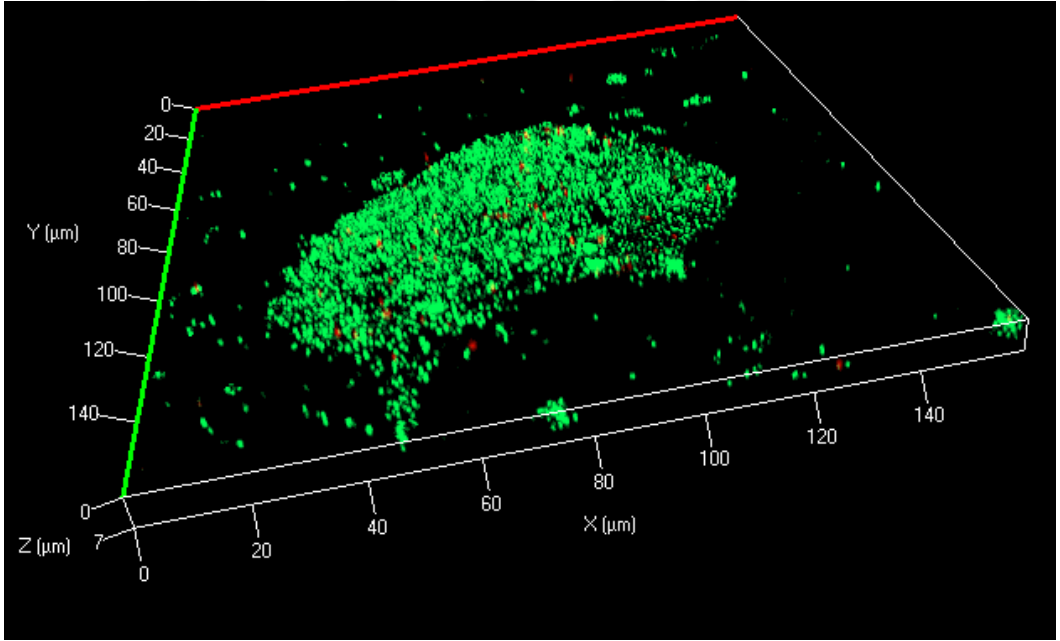
\*Üst karakterdeki farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P<0,05$ )



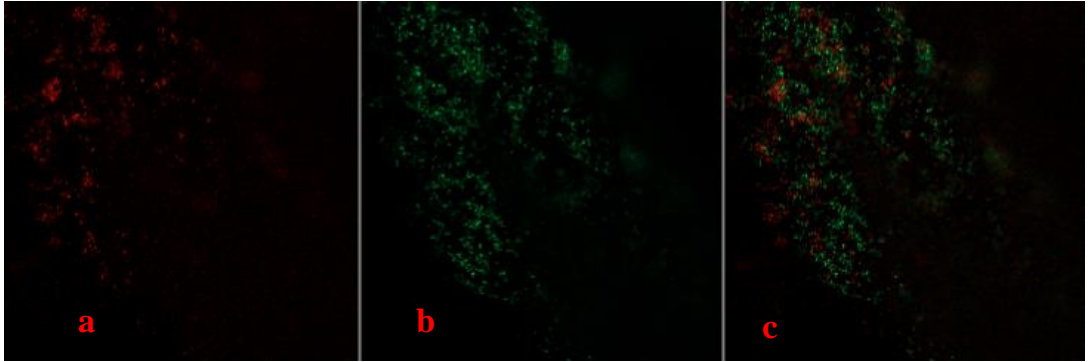
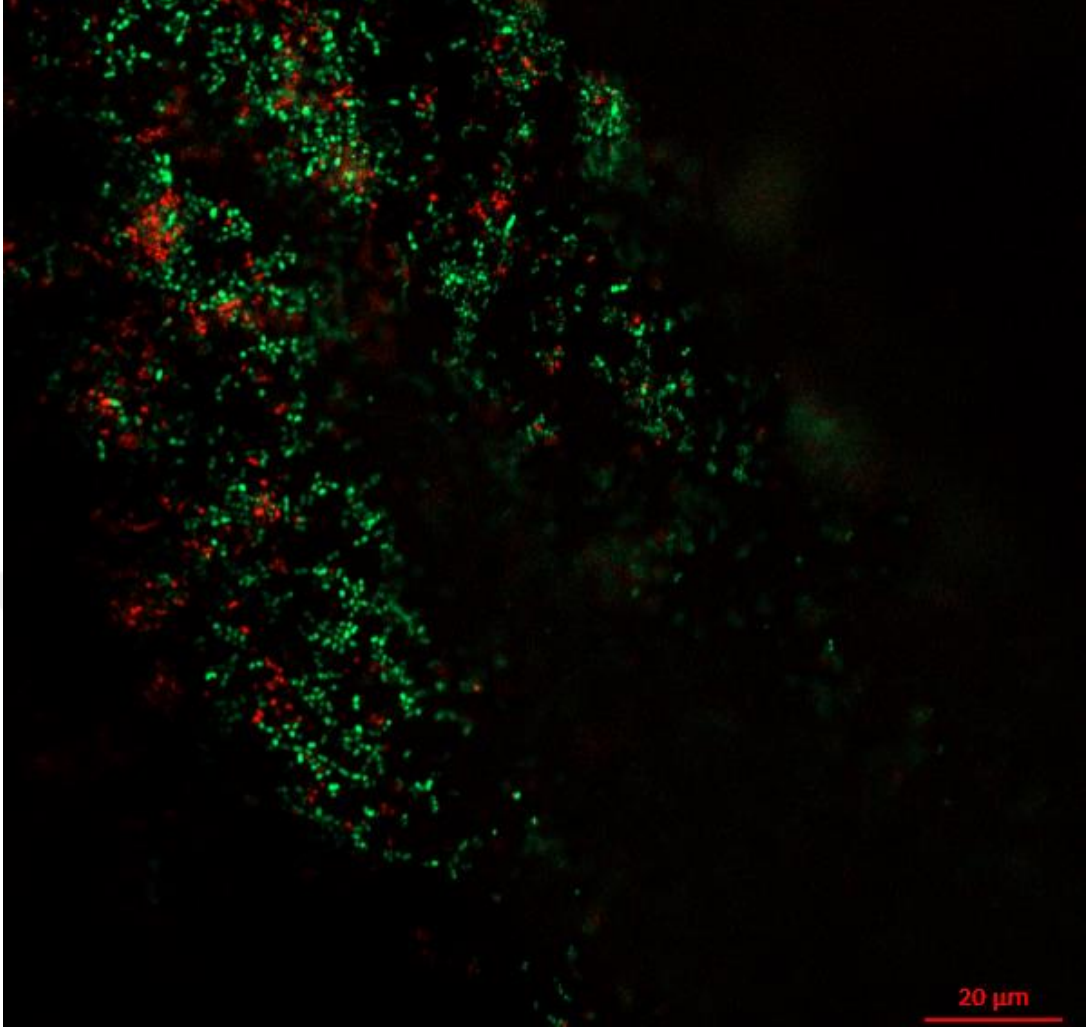
**Resim 17.** 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



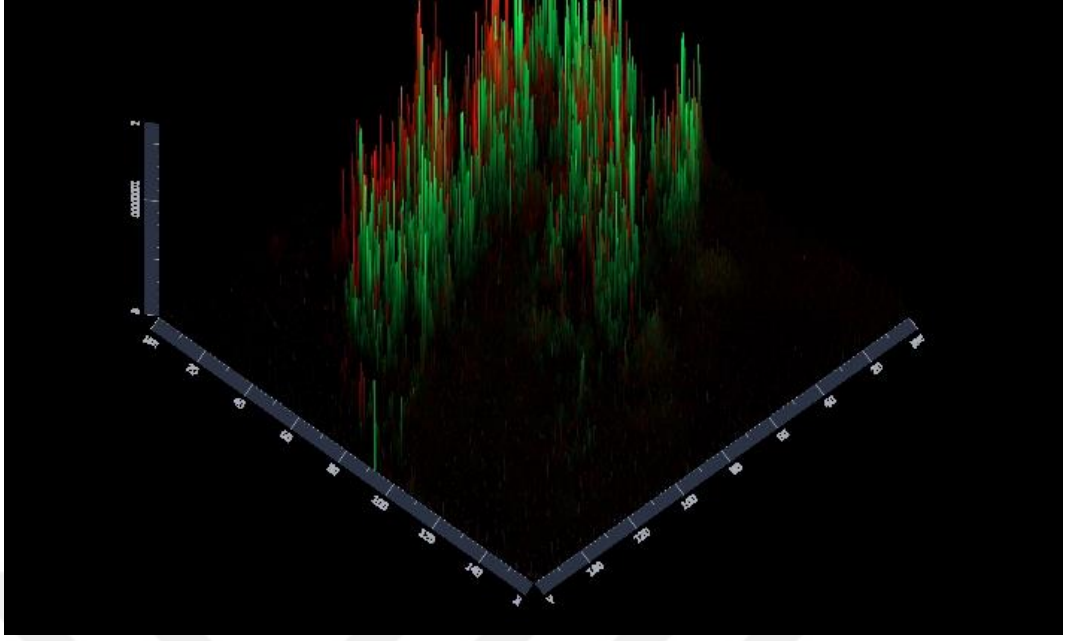
**Resim 18.** 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü.



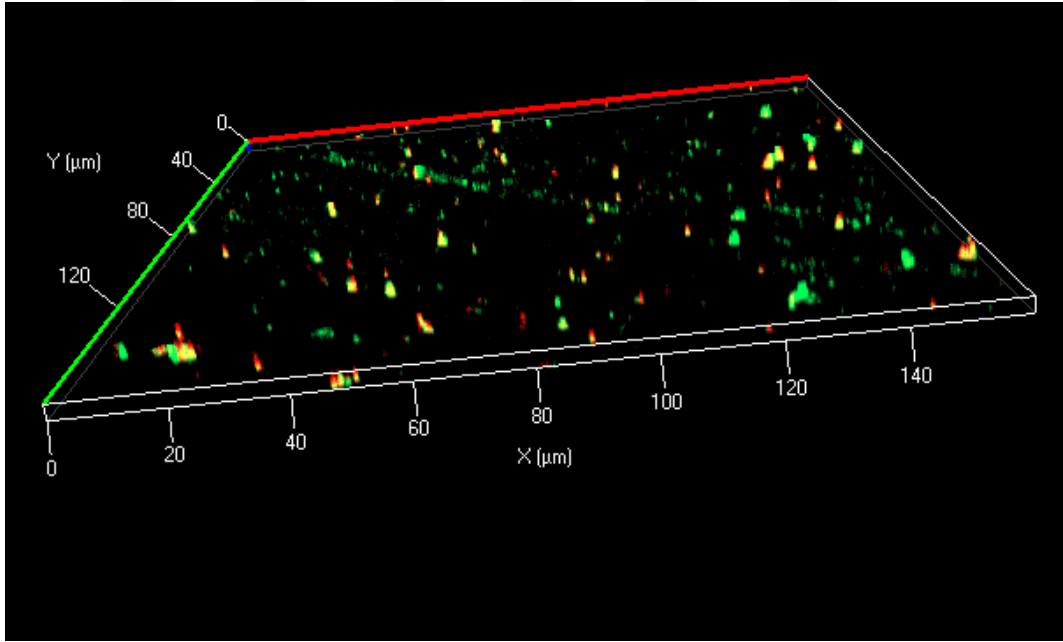
**Resim 19.** 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü.



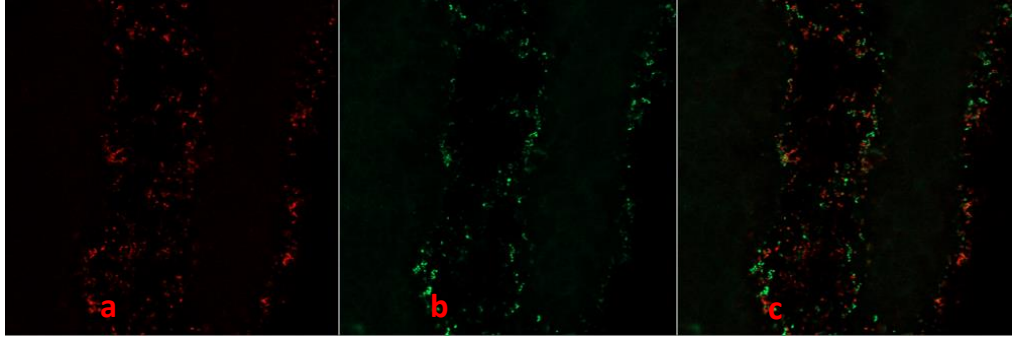
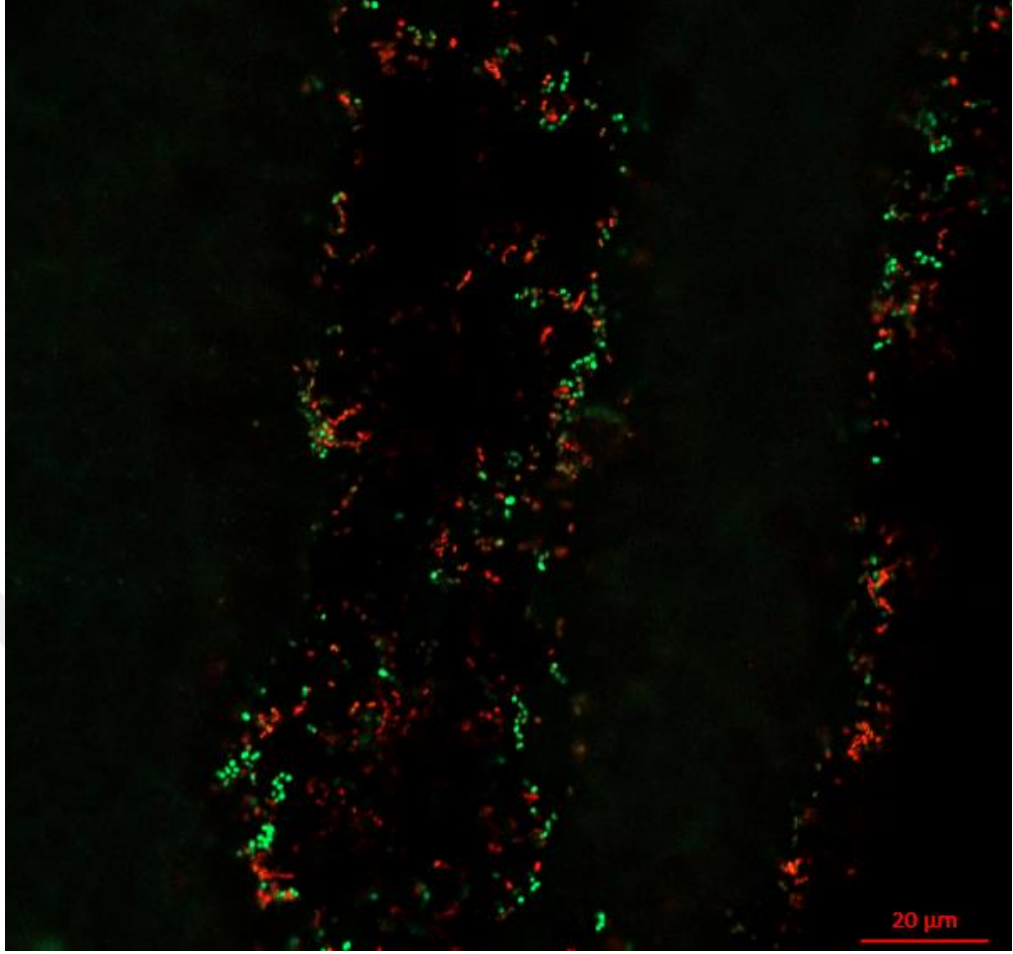
**Resim 20.** 1 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



**Resim 21.** 1 gün boyunca  $\text{Ca(OH)}_2$ 'e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü.

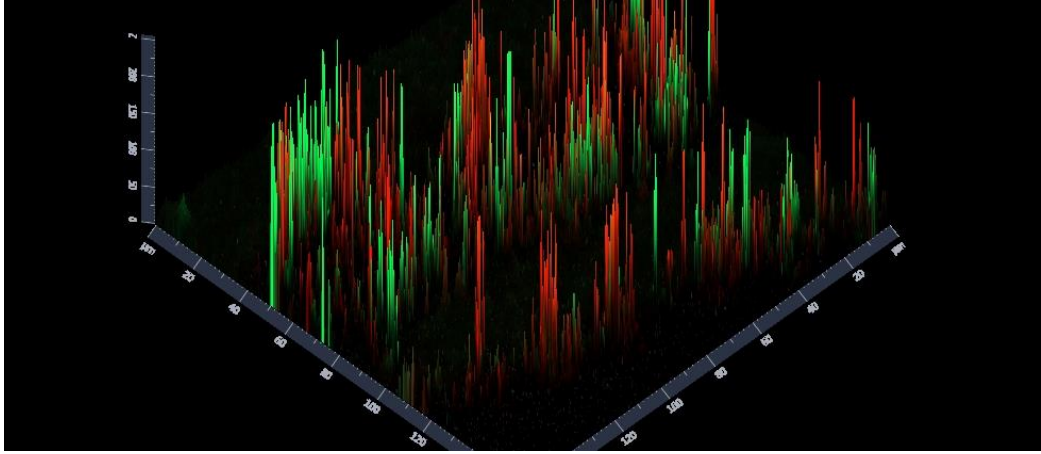


**Resim 22.** 1 gün boyunca  $\text{Ca(OH)}_2$ 'e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü.

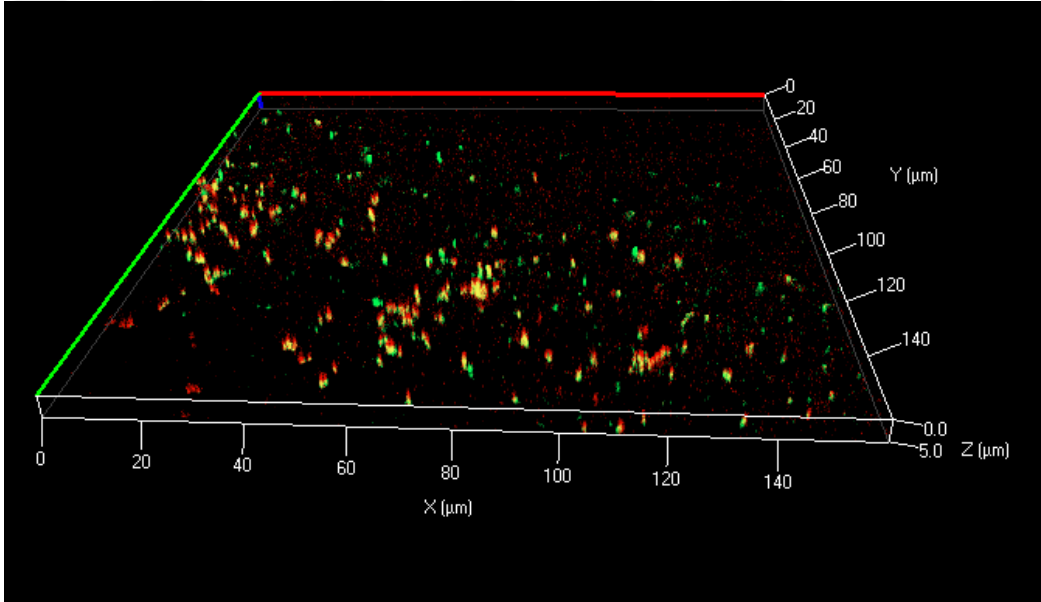


**Resim 23.** 1 gün boyunca  $\text{Ca(OH)}_2$  + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması

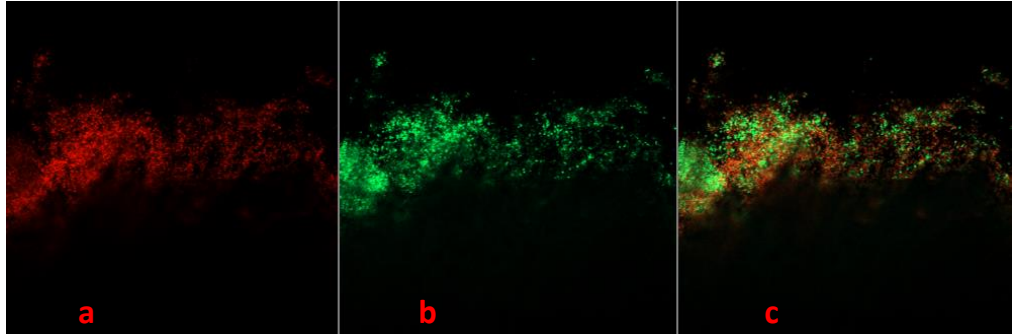
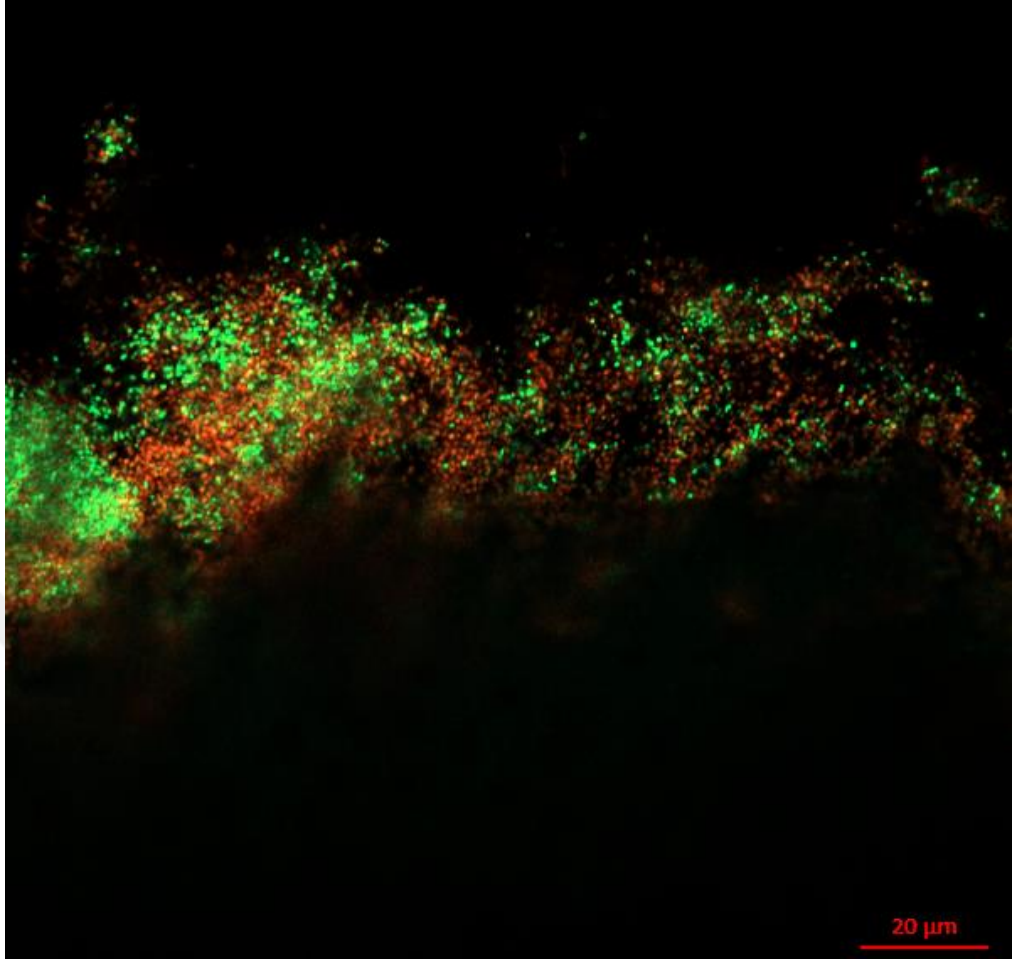




**Resim 24.** 1 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü.

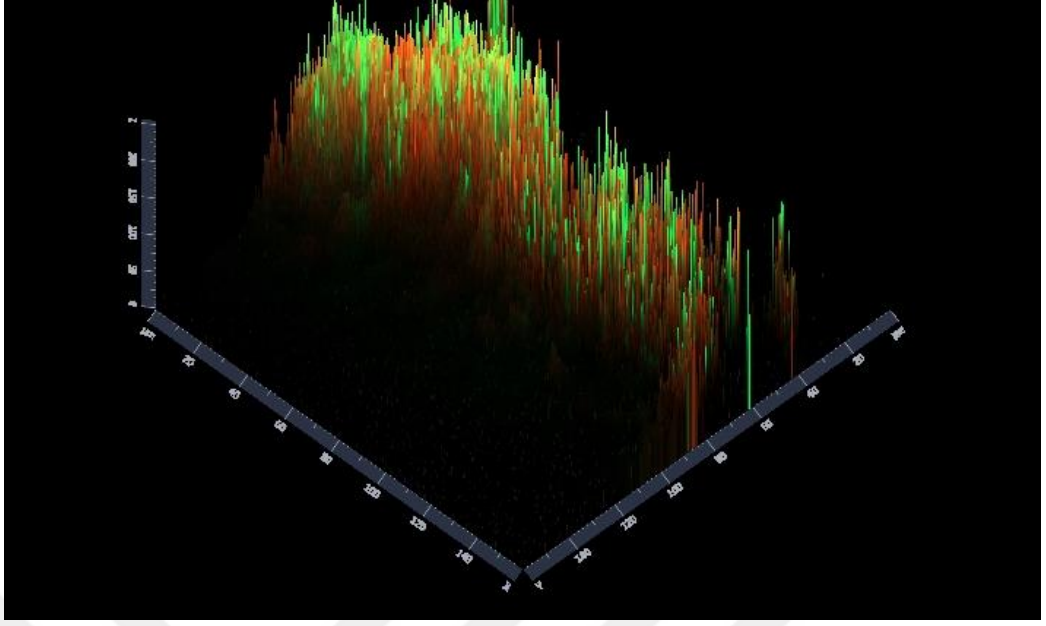


**Resim 25.** 1 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü

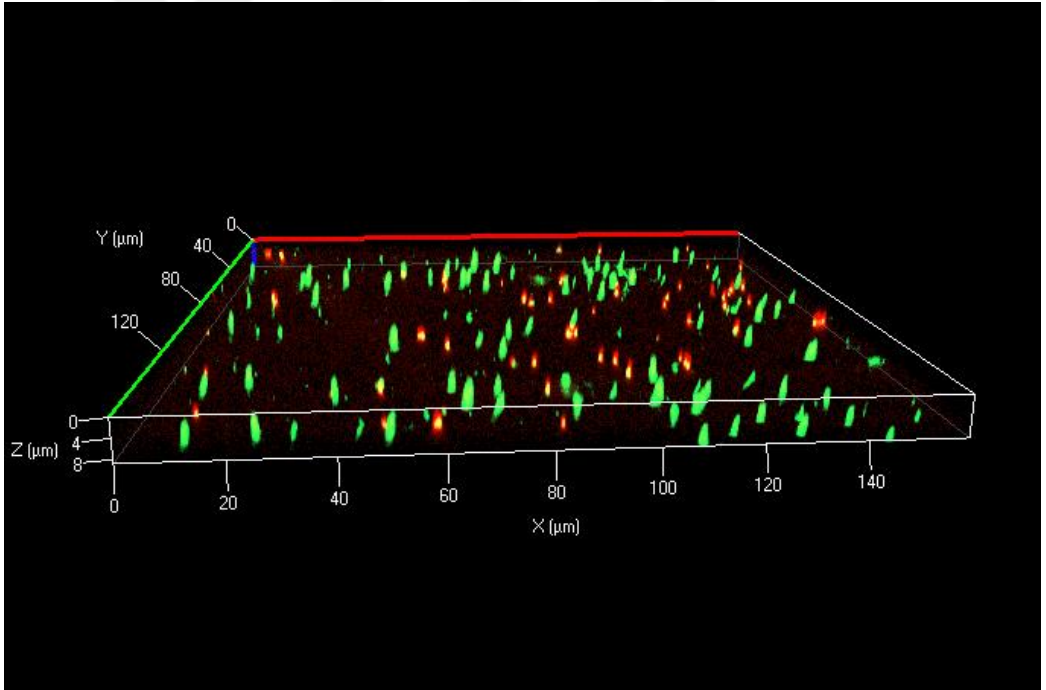


**Resim 26.** 1 gün boyunca CHX ne maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması

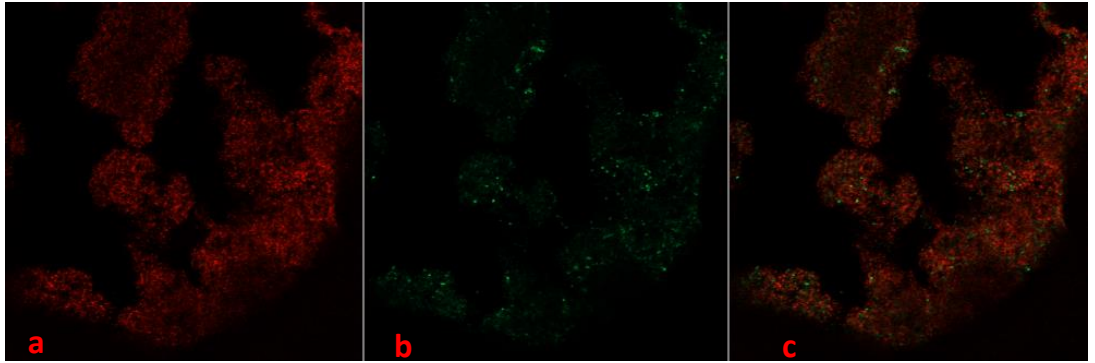
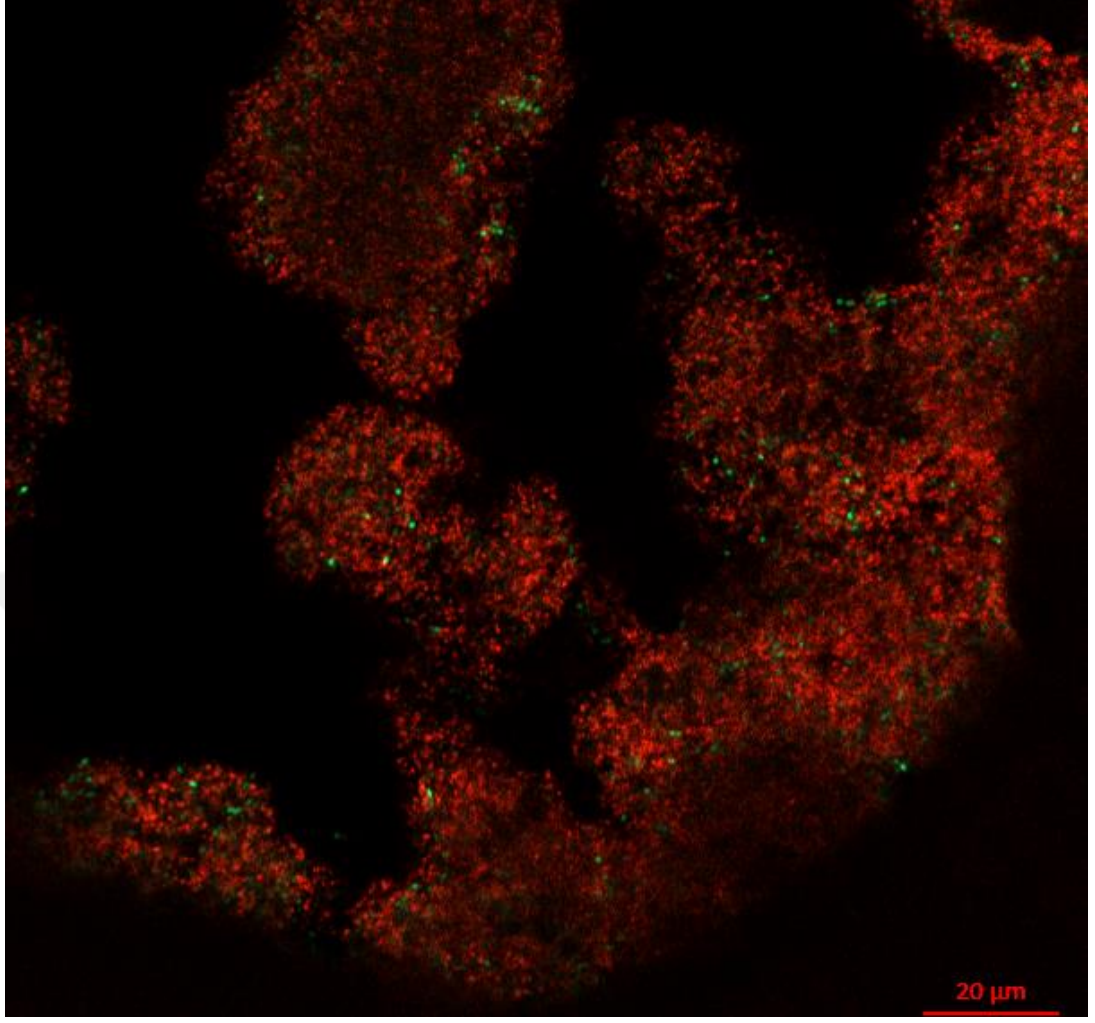




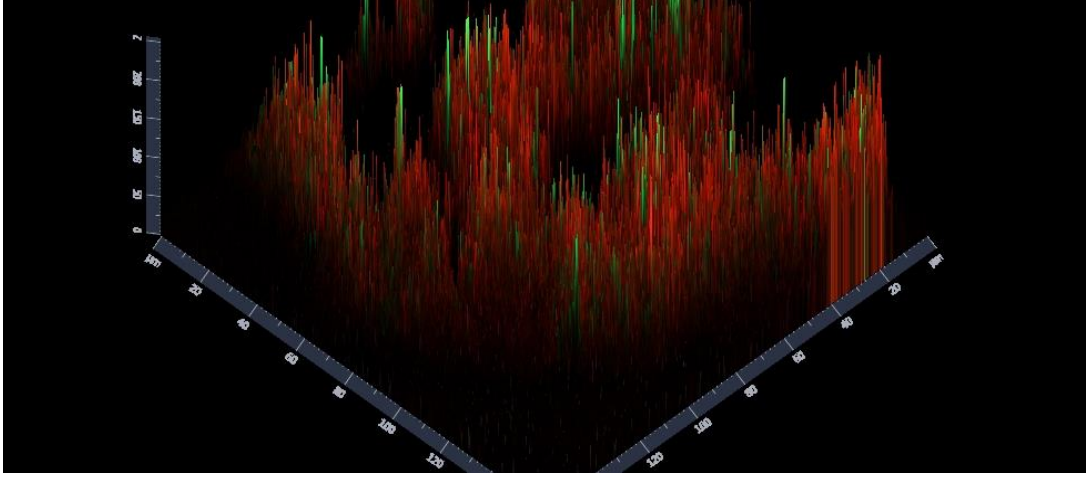
**Resim 27.** 1 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü



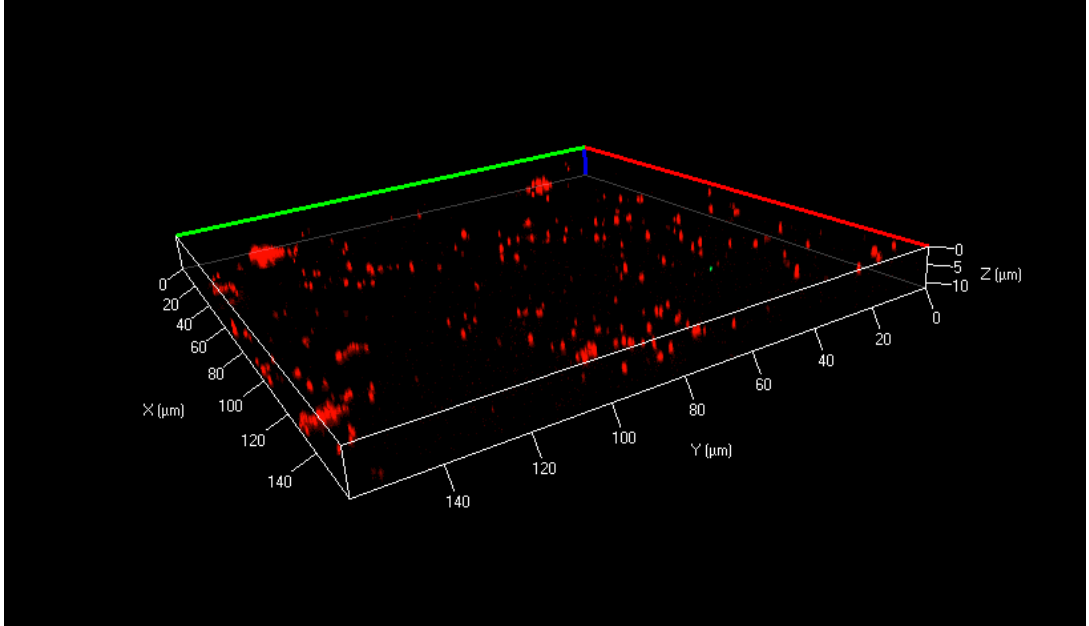
**Resim 28.** 1 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü



**Resim 29.** 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



**Resim 30.** 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü



**Resim 31.** 1 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü

### 4.3.2. Yedi Günlük Uygulama Süresi Sonunda Elde Edilen KLTM Verilerine Ait Bulgular

Medikamentlerin 7 günlük uygulama süresi sonunda dentin bloklarında oluşturulan çok türlü biyofilm tabakasındaki canlı bakteri yüzdesi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık belirlendi ( $P<0,01$ ). Gruplara ait antibakteriyel medikamentlerin 1 günlük uygulama sonrası canlı bakteri ortalama yüzde değerleri tablo 6 da verildi.

Yedi günlük uygulama süresinde en az canlı bakteri CHX+AgNP grubunda izlendi ancak CHX nin tek başına uygulandığı grup ile aralarında istatistiksel fark bulunmadı ( $P>0,05$ ). AgNP'ün  $\text{Ca(OH)}_2$  patına karıştırılarak kullanıldığı grupta canlı bakteri yüzdesi, medikamentin tek başına uygulandığı gruptan daha azdı ( $P<0,05$ ). Canlı bakteri yüzdesi en fazla salin grubunda tespit edildi ( $P<0,05$ ) (Tablo 6) (Resim 32-46).

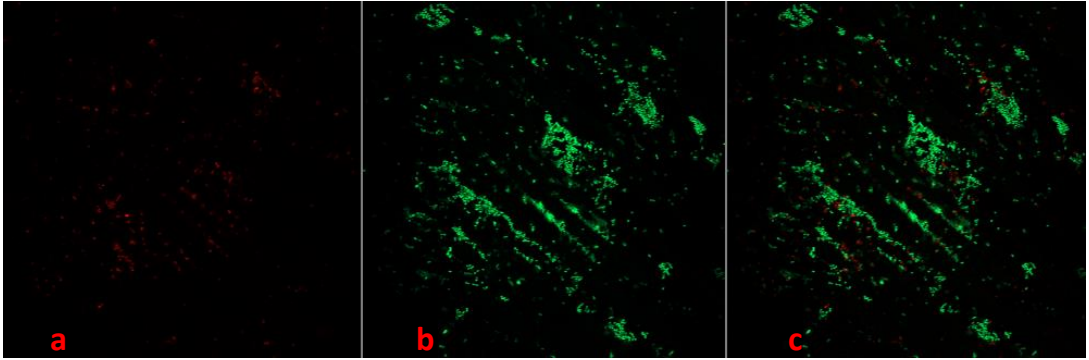
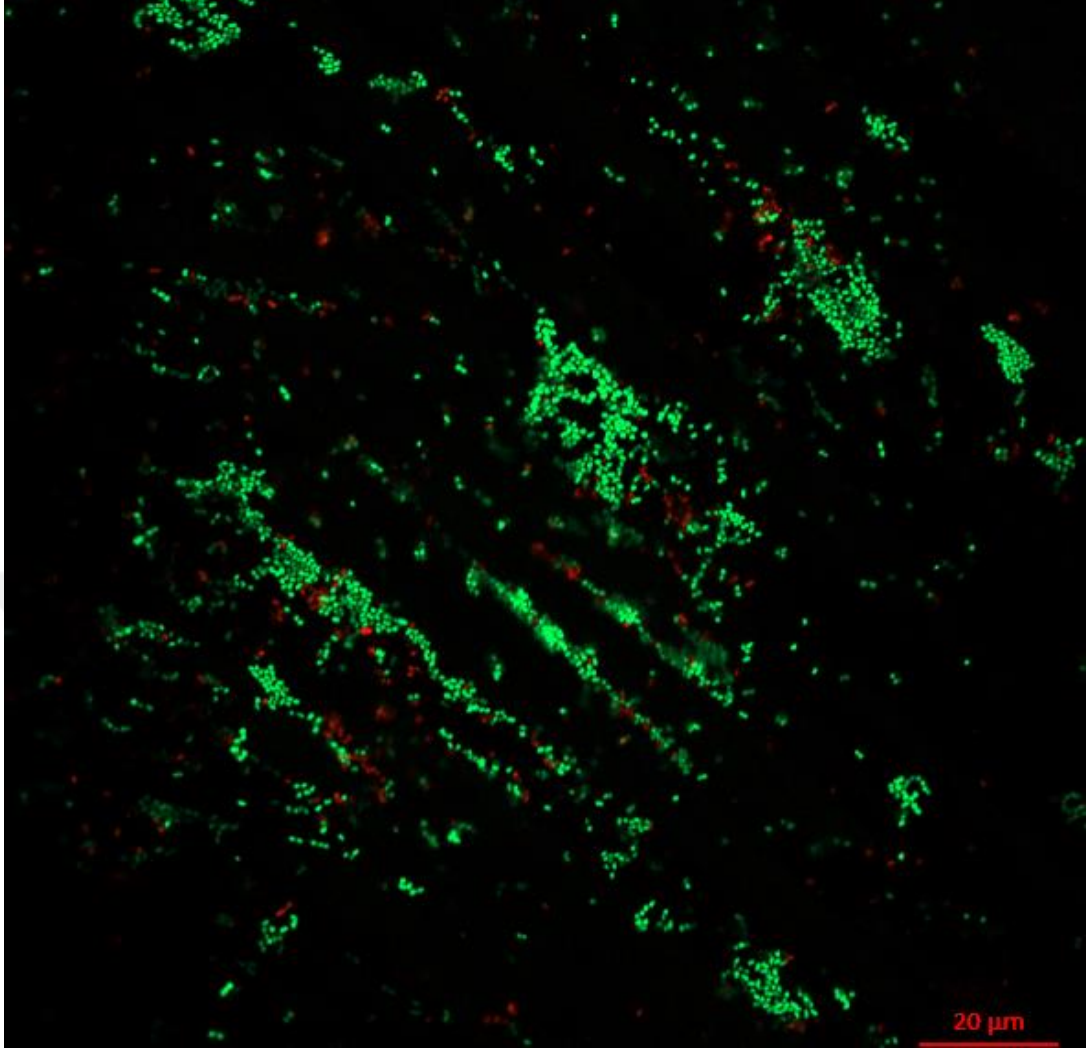
**Tablo 6.** Medikamentlerin 7 günlük uygulama sonrası çok türlü biyofilmdeki canlı bakteri yüzde değerleri

	Medikamentler	n	Ortalama $\pm$ SS	Mean RANK	SE	Min- max
Canlı %	Salin	5	92,99 $\pm$ 5,82	22,5 <sup>a</sup>	2,91	85,56-97,64
	$\text{Ca(OH)}_2$	5	53,16 $\pm$ 13,05	17,2 <sup>b</sup>	5,84	38,78-72,79
	$\text{Ca(OH)}_2$ +AgNP	5	35,12 $\pm$ 13,88	11,6 <sup>c</sup>	6,21	13,29-49,24
	CHX	5	27,19 $\pm$ 11,22	7,8 <sup>c,d</sup>	5,02	9,63-37,04
	CHX+ AgNP	5	20,72 $\pm$ 10,71	5,4 <sup>d</sup>	4,79	5,45-34,04

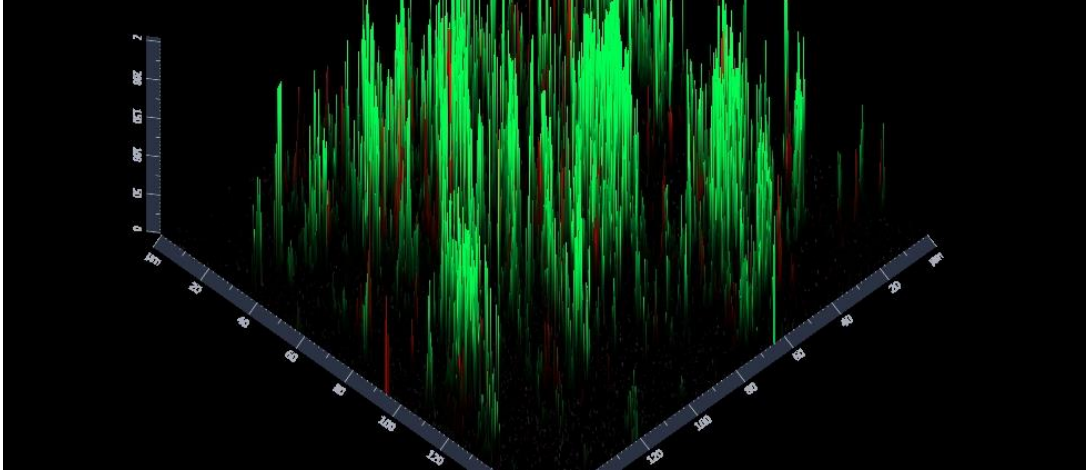
*n*, her gruptaki örnek sayısı; *SS*, standart sapma; *SE*, standart hata

\*Üst karakterdeki farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P<0,05$ )

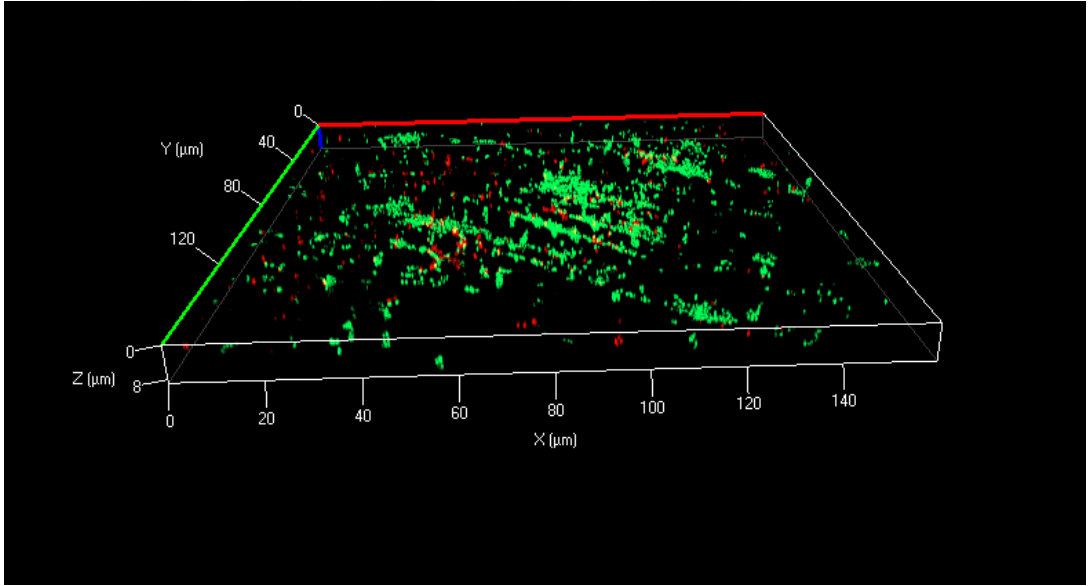
Her bir grup için canlı bakteri yüzdesi açısından 1 günlük ve 7 günlük uygulama süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $P>0,05$ ).



**Resim 32.** 1 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması

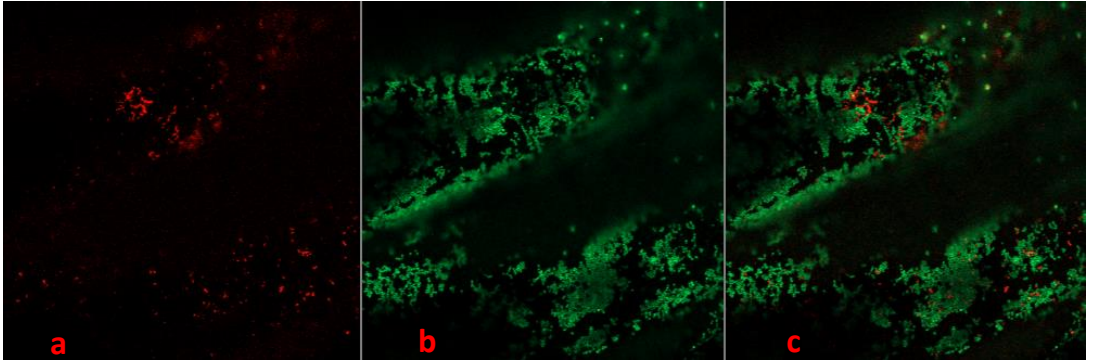
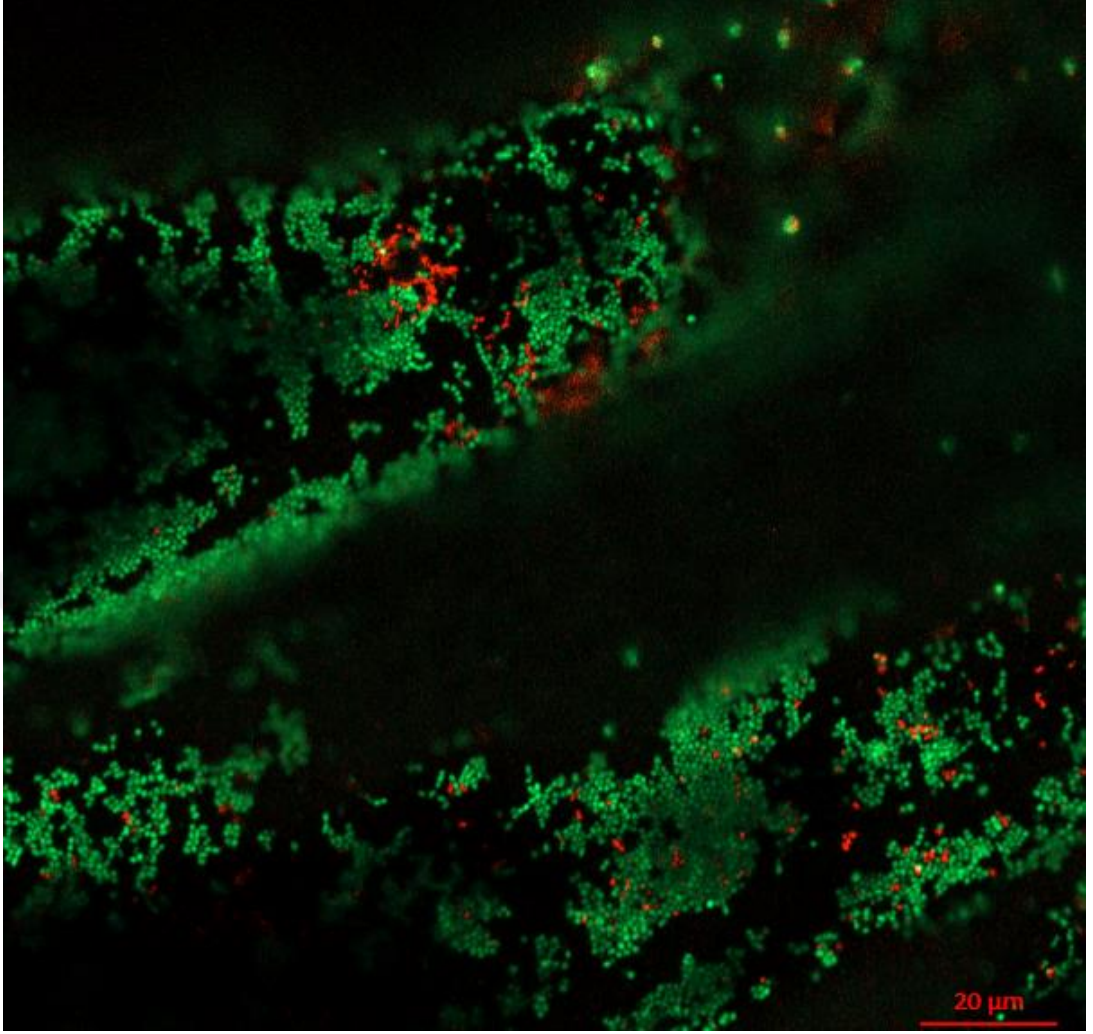


**Resim 33.** 7 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü

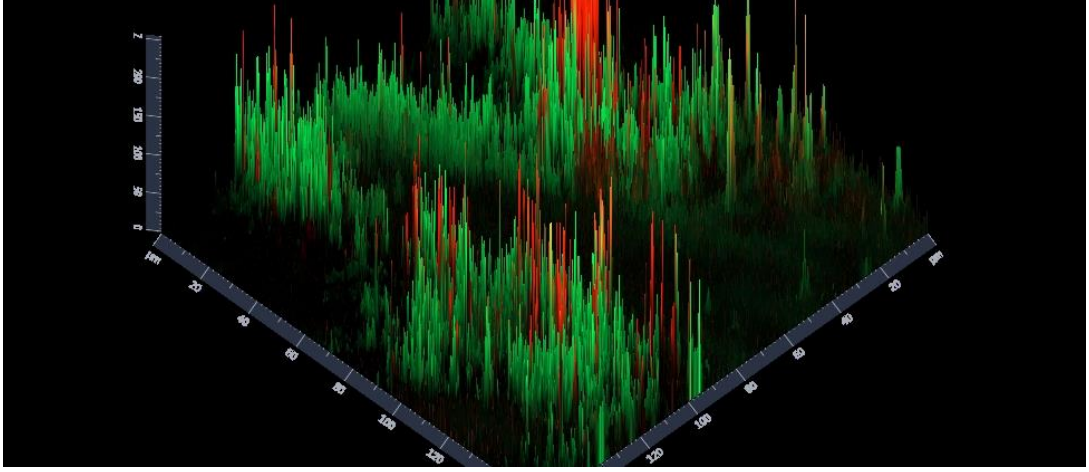


**Resim 34.** 7 gün boyunca saline maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü

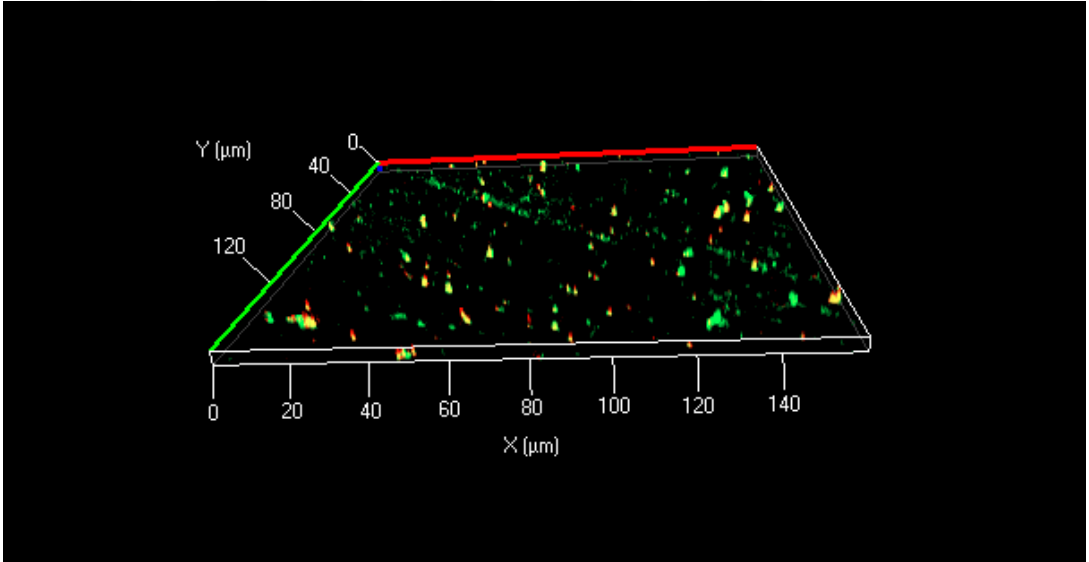




**Resim 35.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması

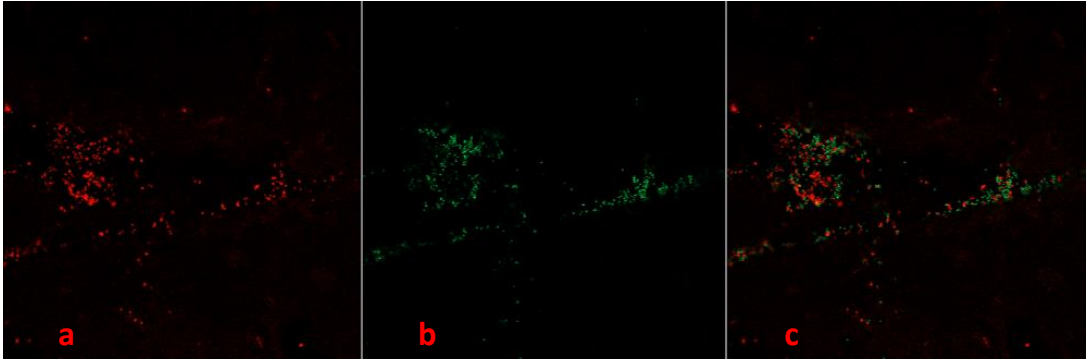
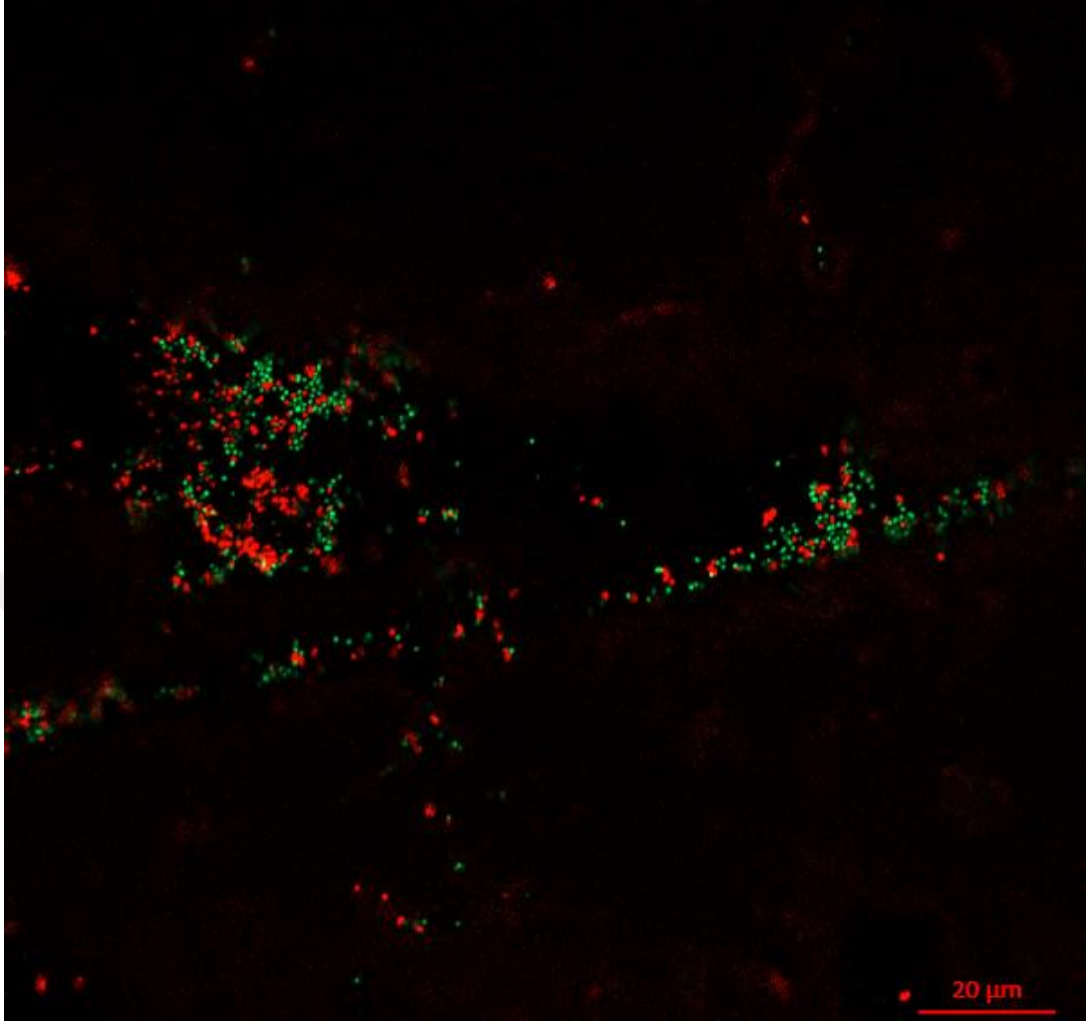


**Resim 36.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü

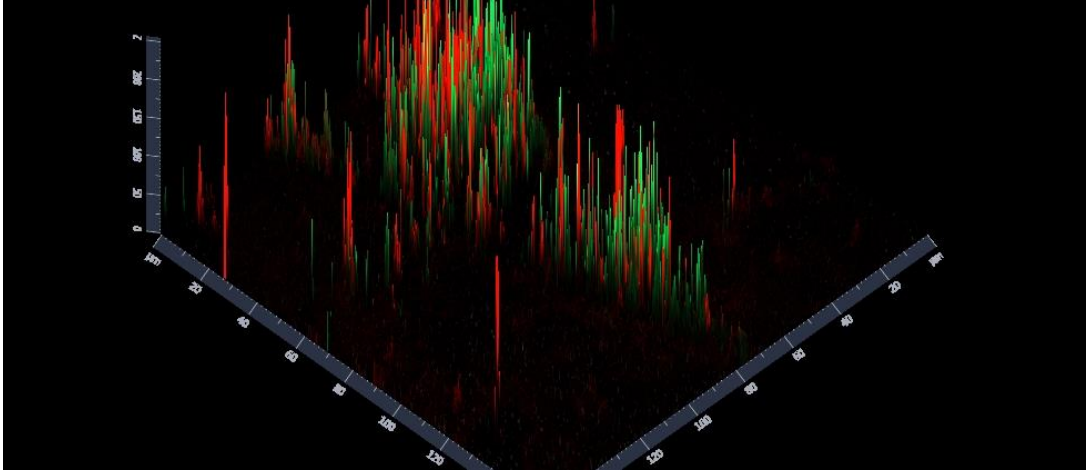


**Resim 37.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü

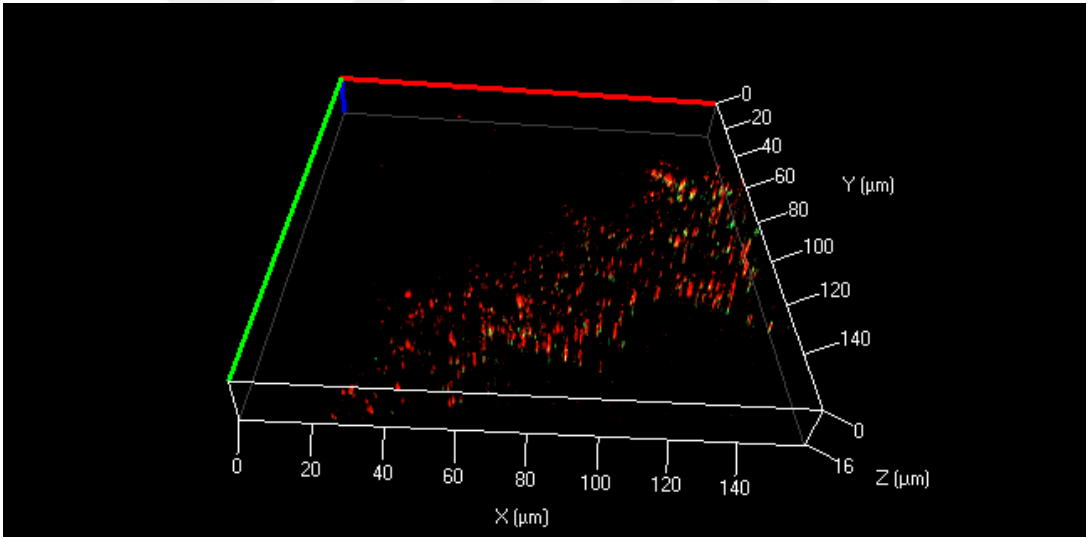




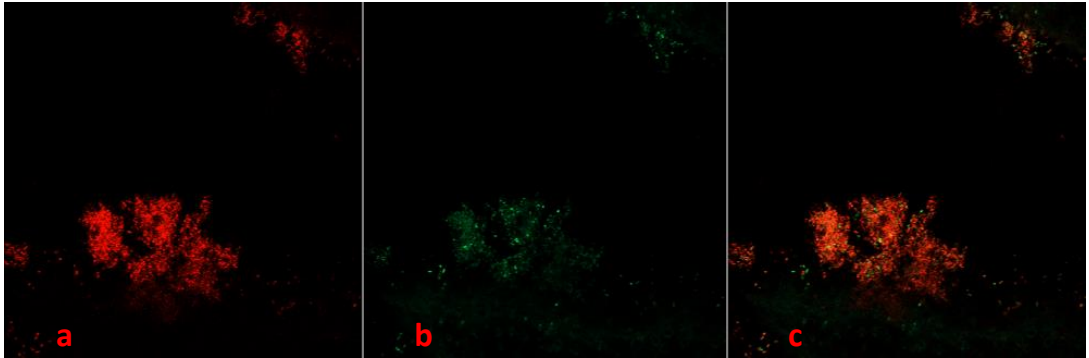
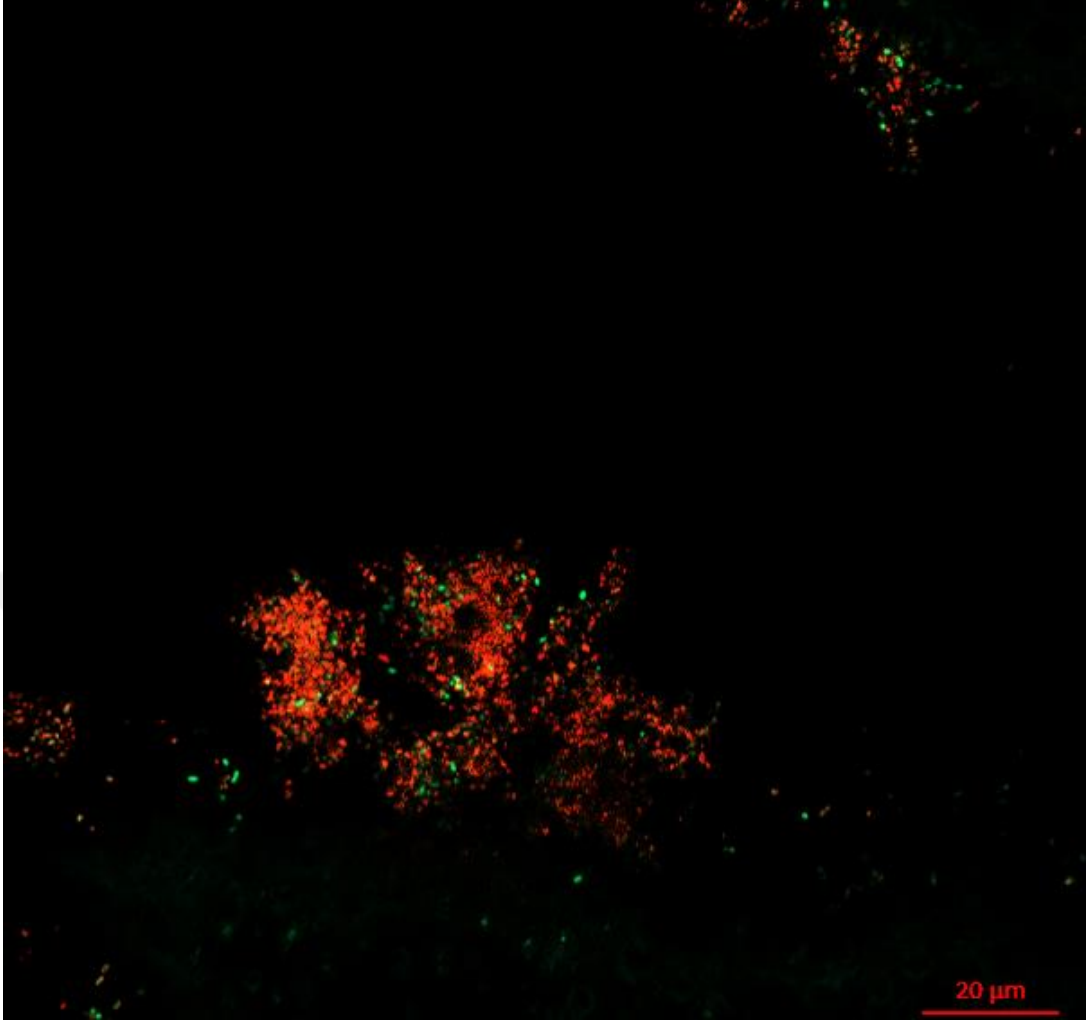
**Resim 38.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{AgNP}$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



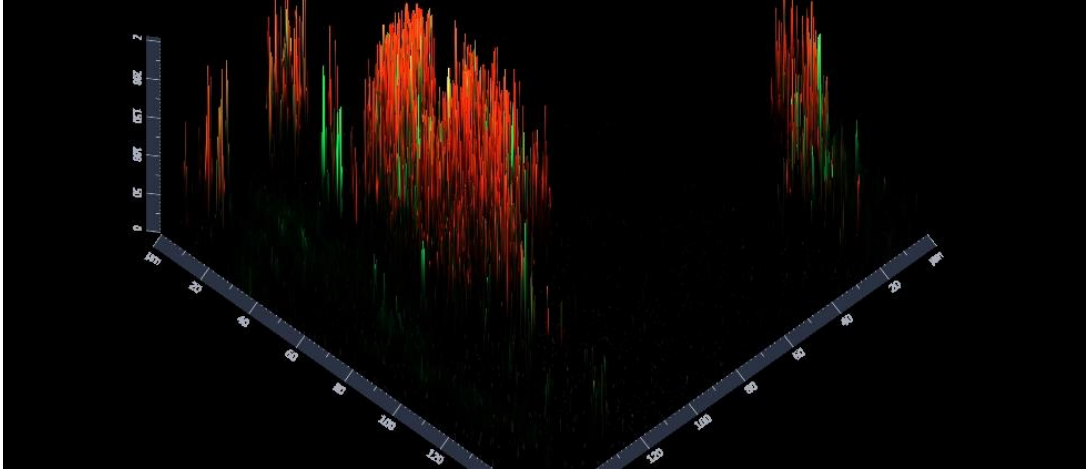
**Resim 39.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{AgNP}$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü



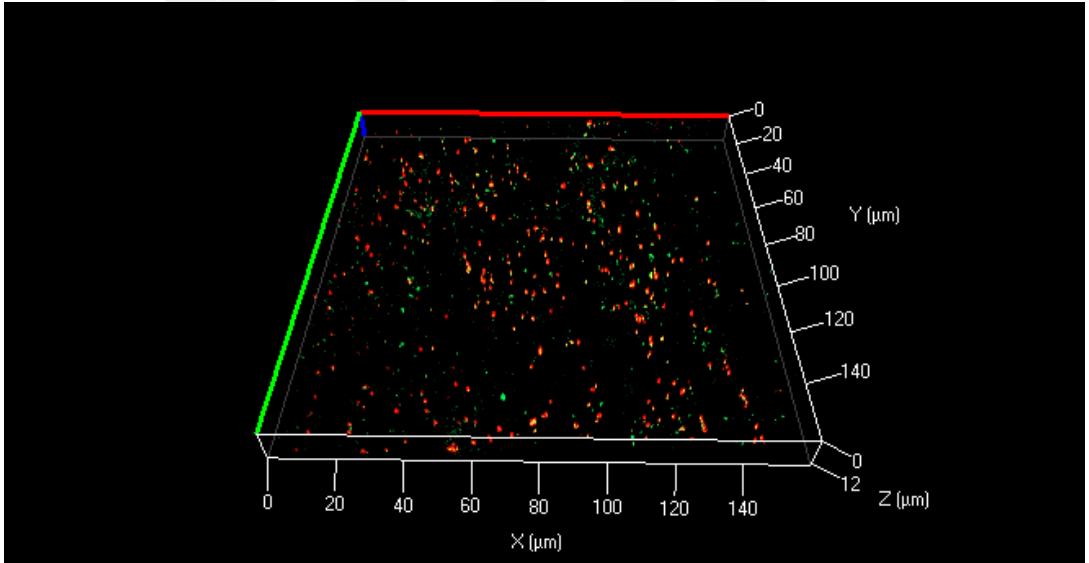
**Resim 40.** 7 gün boyunca  $\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{AgNP}$  ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü



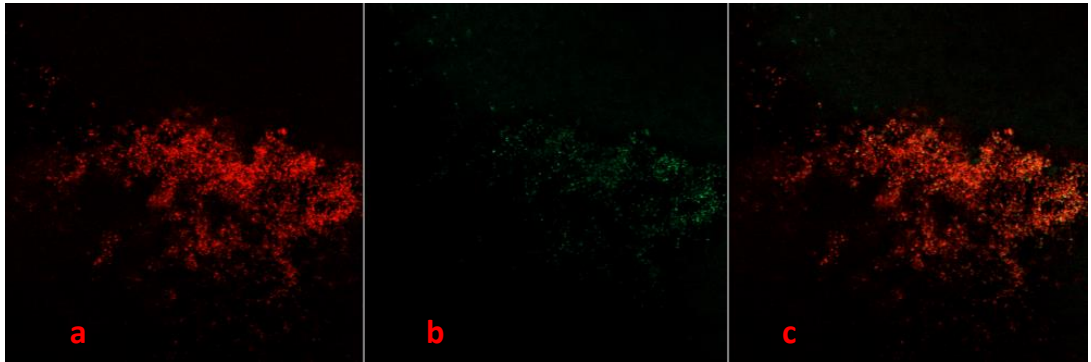
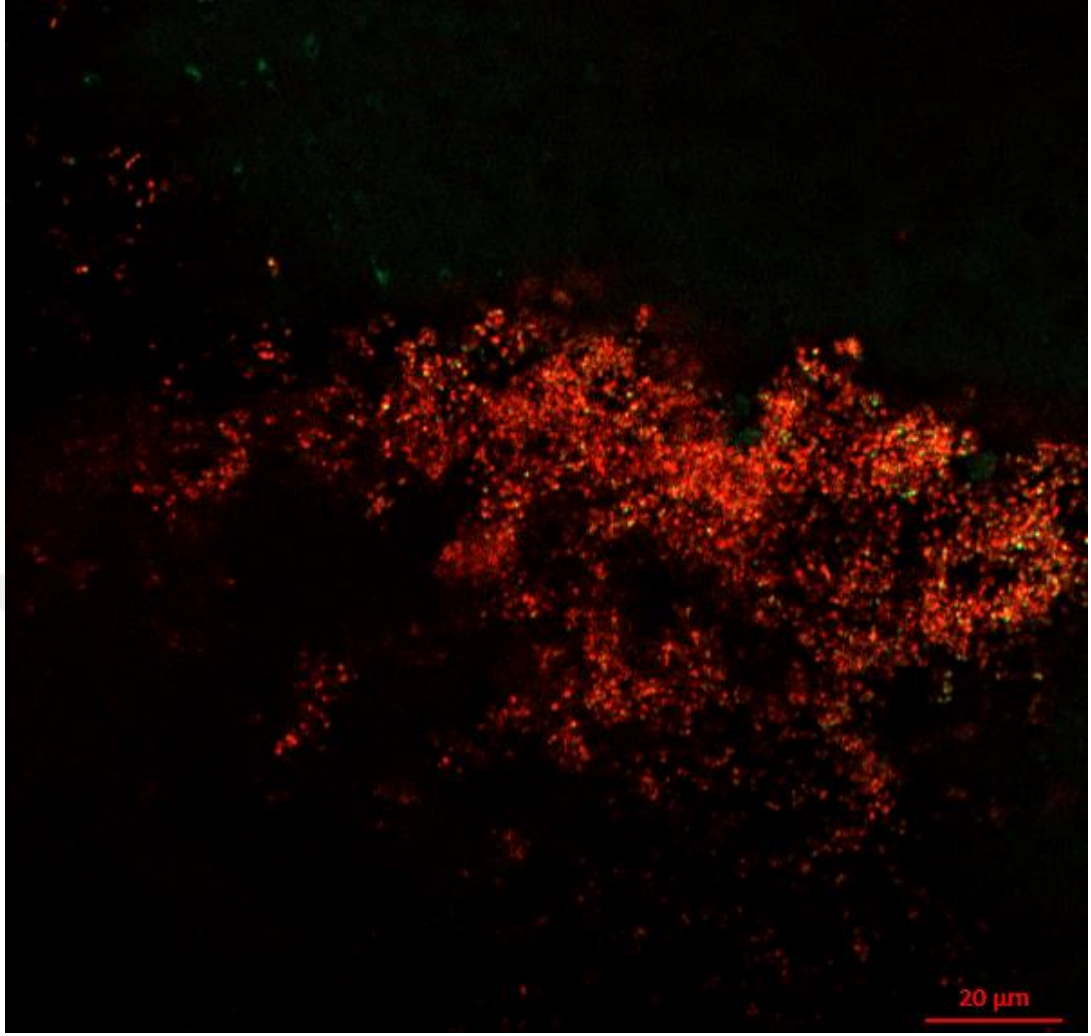
**Resim 41.** 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



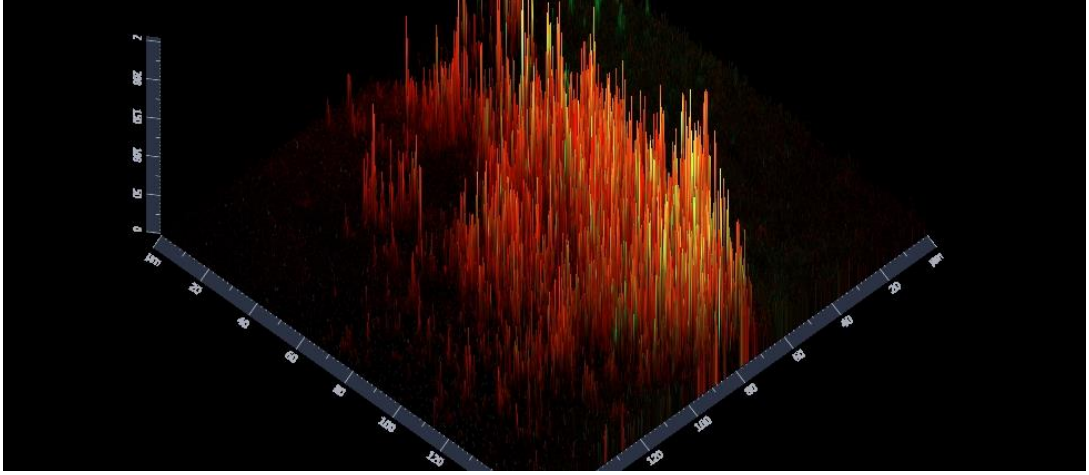
**Resim 42.** 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü



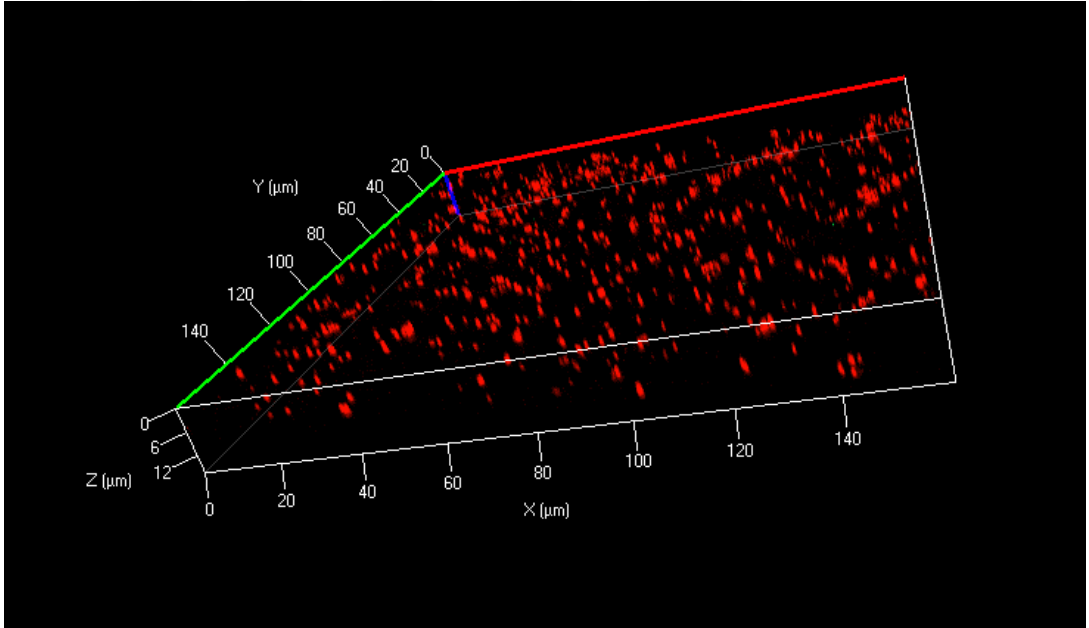
**Resim 43.** 7 gün boyunca CHX e maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü



**Resim 44.** 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2 boyutlu KLTM görüntüsü; (a) kırmızı alanlar ölü bakteriler (b) yeşil alanlar canlı bakteriler; (c) a ve b görüntülerinin çakıştırılması



**Resim 45.** 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 2,5 boyutlu KLTM görüntüsü



**Resim 46.** 7 gün boyunca CHX + AgNP ye maruz bırakılmış çok türlü biyofilmin 3 boyutlu KLTM görüntüsü

## 5. TARTIŞMA

### *Çalışmada insan dişi dentin bloğu kullanılması*

Haapasalo ve Orstavik (41), 1987 yılında kök kanalındaki dentin tübüllerinin enfeksiyonu için in vitro bir model tanıtmışlardır. Sığır kesici dişlerinden elde edilen silindirik dentin örnekleri *E. faecalis* ile enfekte edilmiş ve dentin bloklarının lümenine dezenfektanlar uygulanmıştır. Belirli bir süre sonra, steril yuvarlak frezlerle bakteriyel numuneler alınmış ve her bir örnek ayrı test tüplerine yerleştirilmiştir. Bu tüpler daha sonra inkübe edilmiş ve değerlendirilmiştir. O yıllardan itibaren, dentin tübüllerinin farklı derinliklerinde enfeksiyon durumunun değerlendirilmesinde bu model kullanılmaktadır. Bazı araştırmacılar modelin detaylarını değiştirmiş olsalar da, bu çalışmaların temel amacı, kök kanal sisteminin kendi yapıları ve bileşenleri üzerinde antimikrobiyal ajanların etkisini değerlendirmektir (242-244).

*In vitro* mikrobiyolojik çalışmalarda biyofilm oluşumu için yüzey oluşturma amaçlı çekilmiş sığır dişinden elde edilen dentin bloklarının yanısıra polimetilmetakrilat (245), metakrilat, polietilen glkol modifiye polidimetil siloksan gibi sentetik materyaller de kullanılmıştır (246, 247).

Biyofilmin oluşumundaki ilk basamak, bakterinin bir yüzey üzerine geri dönüşümsüz tutunmasıdır. Bakteriler dentine adezyon gösterirken, mineral bileşenden çok dentin matrisinin proteinli kısmını tercih ederler. *In vivo* primer dentin kolonizörleri olan oral streptokoklar, hücre yüzeyi adhezinlerinin yardımı ile dentinin tip I kollajenine bağlanır (248). Bu nedenle, hem organik hem de inorganik bileşenlerin özel oranları, tübüller, peri-, intra- ve intertübuler dentin gibi kendine özgü yapıları ile dentin, taklit edilmesi veya kopyalanması kolay olmayan çok spesifik bir substratı temsil eder.

Biyolojik olmayan materyaller substrat olarak kullanıldığında yapı ve kompozisyona bağlı farklılıklar olmayacağı için standardizasyon daha iyidir. Sentetik yapı transparan olduğunda, irrigasyonda akışkan dinamiklerinin ya da biyofilmin uzaklaştırılmasının eş zamanlı izlenebilmesini sağlayabilir. Fakat mikroorganizmaların yüzeye tutunması sentetik materyalde doğal materyale göre tamamen farklı olacağından biyofilm yapısı değişebilir. Dentinin kendine özgü

organik-inorganik yapısı irrigasyon ajanlarının etkilerini tamponlayabilme özelliği gösterir. Bu nedenle sentetik materyaller klinik koşulları tam anlamıyla taklit edebilme özelliğine sahip değildir (126).

Günümüzde bir çok çalışma, klinik koşulları daha iyi taklit edebilmesi amacıyla çekilmiş insan dişlerinden elde edilen dentin blokları üzerinde gerçekleştirilmektedir (249, 250). Ancak çekilmiş insan dişi bulmanın giderek zorlaşmasıyla, sığır dişleri laboratuvar çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Sığır dişleri kolayca temin edilebilir ve sığırların yaşı da kolaylıkla kontrol edilebilir. Sığır dentin morfolojisi, fiziksel özellikleri ve kimyasal bileşimi bakımından insan dentinine çok benzemektedir. Sığır kökü dentininde daha fazla sayıda tübül bulunurken, tübüllerin çapı insan dentinine benzerdir. Genel olarak, sığır dentini biyofilm gelişimi için bir substrat olarak insan dentinine bir alternatif gibi görünmektedir (251).

Çekilmiş insan dişleri biyofilm modeli oluşturulması için kullanılırken, genellikle farklı bireylerden ve farklı yaş gruplarından seçilir. Özdemir ve ark. (252) , *E. faecalis*'in genç ve yaşlı insan kök kanal dentinine yapışmasını incelemiş ve “yaşlı dentin” örneklerinde daha belirgin ve daha kalın biyofilm oluşumu gözlemlemişlerdir. Bu çalışmanın dışında, dentin kompozisyonunun, yapısının veya yaşının biyofilm oluşumu üzerindeki etkisi hakkında çok az kanıt bulunmaktadır.

Çekilmiş insan dişi kullanımının en önemli dezavantajlarından biri örneklerin standardizasyonunun sağlanamamasıdır. Dişlerin fizyolojik yaşı, anatomik varyasyonlar, diş çekimi sonrası örnek hazırlanana kadar geçen süre ve örneklerin bu süreçte saklandığı koşullar standardizasyonu etkileyen faktörlerdir. Fizyolojik yaş arttıkça, dentinin mineral içeriğindeki artışa bağlı olarak dentin tübüllerinin daralmaya başladığı ve zamanla tıkanacağı bilinmektedir. Bu nedenle standart bir örnekleme için okluzal streslere maruz kalmamış gömük 20 yaş dişlerinden elde edilen dentin diskleri tercih edilebilir (253).

Giudice ve ark. (254) ortodontik sebeple çekilmiş sağlıklı premolar dişlerin kök kanalında koronal, orta ve apikal üçlüdeki dentin tübülü genişliği, sayısı ve yoğunluğunu inceledikleri çalışmalarında kökün koronal üçlüsündeki dentin tübüllerinin daha geniş çapta olduğunu, dentin tübülü sayısının koronal ve apikal



bölgede benzer ve orta üçlüden daha fazla olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda, genç bireylerden ortodontik sebeplerle çekilmiş alt premolar dişler kullanılmıştır. Santrifüj ile dentin tübüllerine bakteri penetrasyonunun en iyi şekilde sağlanabilmesi için tübül çaplarının daha geniş, sayısının daha fazla olduğu kökün koronal kısmından elde edilen 4 mm uzunluğundaki insan dişi dentin bloklarının kullanılmasına karar verilmiştir.

Biyofilme bulunan canlı-ölü mikroorganizmaları tespit edebilmek için yapılan KLTM çalışmalarında kullanılan yarı silindirik dentin bloklarının kalınlığı; Ruiz Linares ve ark. (255) nın yaptıkları çalışmada 0,7 mm, Albuquerque ve ark. (256) yaptıkları çalışmada 1 mm, Ma ve ark. (257) yaptıkları çalışmada 2 mm olarak bildirilmiştir. Çalışmamızda ön çalışma ile optimal görüntünün elde edildiği 1 mm kalınlığındaki insan dişi dentin bloklarının kullanılmasına karar verilmiştir.

#### *Dentin bloğunun işlem öncesi hazırlanması:*

Klinik gerçekliği en iyi temsil edebilecek yöntem prepare edilmemiş kök kanallarında biyofilm oluşturulmasıdır. Ancak, genişletilmemiş kök kanallarını - özellikle de dar kanallar olmak üzere- inoküle etmek, inokülasyon materyalinin tüm kanal boşluğuna erişmesi gerektiği için zor olabilir. Ayrıca, mikrobiyolojik değerlendirme için kök kanalından örnek alınabilmesi amacıyla, tüm kanal duvarlarına erişim gereklidir. Bu nedenle, kök kanalları çoğunlukla biyofilm oluşumu öncesinde mekanik olarak genişletilir (126). Kök kanal preparasyonu sonucunda, kanal duvarında smear tabakası meydana gelir. Bu tabaka gevşek ve duvarlara yapışık bir yapıdır. Dentin tübüllerini tıkayarak gerçekte biyofilmin olduğu normal kök dentinin yüzeyel yapısını değiştirir. Bu nedenle, smear tabakasının ortadan kaldırılması ve kanal boşluğunun inokülasyonundan önce dentinin açığa çıkarılması tavsiye edilmektedir (258). Çalışmamızda smear tabakasının uzaklaştırılması amacıyla örnekler, ultrasonik banyoda 3 dakika %5,25 lik NaOCl, ardından 3 dakika %17 lik EDTA solüsyonu ile yıkanmıştır.

Bazı araştırmacılar, biyofilm oluşturulan yüzeyin farklı materyallerle kaplanmasının oluşan biyofilmi kantitatif olarak etkileyebildiğini bildirmişlerdir. Bu amaçla özellikle sentetik materyallerin tip 1 kollagen ile kaplanarak kullanılabilceği

iddia edilmiştir (248, 259). Fakat doğal dentin yüzeyinde biyofilm oluşumu için, ek bir kaplama işleminin herhangi bir yararının olup olmayacağı tartışma konusudur.

Buhar sterilizasyonu sırasında ortaya çıkan yüksek sıcaklık ve basınç, hidratlanmış proteinlerin denatürasyonuna neden olarak kolajenin fiziksel yapısını etkiler (260) . Otoklavlanmış dentin örneklerinde, taze bölünmüş dentin örneklerine kıyasla daha az bakteriyel adhezyonun (yaklaşık olarak üçte biri) gerçekleştiği gösterilmiştir (261). Bu nedenle, bakteriyel adezyonun başarısını arttırmak için, buhar sterilizasyonundan sonra örnekler kollajen kaplama ile güçlendirilebilir.

Bir başka sterilizasyon yöntemi olarak gama ışınının, dişleri yüksek sıcaklıklara ve basınçlara maruz bırakmadan ve dentinin fiziksel özelliklerini etkilemeden sterilizasyonda başarılı sonuçlar verdiği gösterilmiştir (262). Gama ışını ile muamele edilen dentinde adezyonun olumsuz olarak etkilenmediği bildirilmiştir (261). Gama ışınması, kolajen üzerindeki minimal zarar verici etkisi nedeniyle otoklavlama için ümit veren bir alternatif olabilir. Ancak, bu yöntemi doğrulamak için daha fazla araştırma yapılmalıdır. Sterilizasyon yönteminin seçimi genellikle çalışmanın yapıldığı laboratuvarın tesislerine bağlı olacaktır. Yöntemden bağımsız olarak, her deneyde bir sterilite kontrolü oluşturmak çok önemlidir. Bu şekilde, sterilize edilmiş dişlerin enfekte olmadığı ve enfekte dişler ile aynı mikrobiyolojik değerlendirmeye tabi tutulduğu gösterilmiş olur (126).

Çalışmamızda dentin blokları Albuquerque ve ark. (256) nın çalışmasına benzer şekilde 20 dk 121 °C de 15 psi de steril edildi. Sterilizasyon sonrası dentin blokları 37°C de 2 saat süre ile etüvde bekletildi ve rastgele seçilen 4 örnekte sterilizasyon kontrolü yapıldı.

#### *Çalışmada kullanılan mikroorganizmaların ve çok türlü biyofilmin seçimi*

Kanal dezenfeksiyon ajanlarının karşılaştırıldığı çalışmalarda sıklıkla *E. faecalis* mikroorganizması ile tek türlü biyofilm oluşturulmaktadır (126). Üç ya da daha fazla mikroorganizma içeren çok türlü biyofilmleri kullanan çalışma sayısı oldukça azdır (256, 263). Fakat endodontik biyofilm bir çok filanın bir arada bulunduğu oldukça kompleks bir yapıdır. *In vivo* koşulların taklit edilebilmesi için birden fazla mikroorganizma içeren kompleks biyofilmlere yönelik antibakteriyel etkinlik çalışmaları tasarlanmalıdır (26).

Peters ve ark. (264) dekoranize ve sterilize ettikleri dişleri gönüllü bir kişinin ağız ortamında, diş tutucu kap içerisinde 1 hafta tutarak oral mikrobiyota ile enfekte olmasını sağlamışlardır. Benzer şekilde Ordinola-Zapata ve ark. (265), dentin örneklerini, 72 saat boyunca gönüllülerin ortodontik apereyine sabitlemiştir. Diğer iki çalışmada, tek bir ağızdan alınan insan mikrobiyal örnekleri, çok türlü biyofilm oluşturmak için başlangıç kültürü olarak kullanılmıştır. Lin ve ark. (133) tek köklü dişleri inoküle etmek için insan subgingival plak örneği kullanmıştır. Schaudinn ve ark. (266), ise üç farklı dişin enfekte olmuş kök kanallarından alınan örnekleri karıştırmış ve sterilize edilmiş dişleri enfekte etmek için kullanmışlardır.

Tek türlü biyofilm modeli sistemleri; sadelik, standardizasyon ve kontrol avantajı sunar. Uygulaması oldukça kolaydır, tekrarlanabilirliği iyidir ve yüksek deneysel verimlilik sağlarlar. Fakat, tek türlü bir biyofilm modeli yerine, çok türlü modelin kullanımının birçok avantajı vardır. Örneğin, doğadaki biyolojik sistemler çok türlü topluluklardır. Çok türlü toplulukların tipik olarak bulunduğu yerlerden biri de enfekte kök kanallarıdır (126). Çok türlü biyofilmlerin, biyofilm biyokütlesinin, bu izolatların tek tür biyofilm olarak büyütüldüğünde oluşan biyokütleyle göre daha fazla olduğu gösterilmiştir. Böylece, biyofilm toplulukları (birden fazla türden oluşan gruplar) genellikle tek tür popülasyonlardan daha kalın biyofilm üretirler (267). Çok türlü biyofilmler ayrıca enfeksiyon sırasında artmış virülans gösterirler ve tek türdeki biyofilmlere kıyasla konakçı immün yanıtına karşı artan tolerans gösterirler(268). Türler konakçı immün yanıtını değiştirmek için işbirliği yapabilirler (269).

Çok sayıda çalışma, çok türlü biyofilmlerin tek türlü biyofilmlere kıyasla antimikrobiyal tedaviye (antibiyotiklerin yanı sıra dezenfektanlara) daha fazla direnç gösterdiğini bildirmiştir (116, 270). Özok ve ark. (271), çift türlü biyofilmlerin, tek tür biyofilmlere kıyasla NaOCI tedavisine daha dirençli olduğunu ortaya koymuştur. Antimikrobiyal direncin artırılmasında kullanılan mekanizmalardan biri, çok türlü biyofilmlerin EPS'nin kompozisyonundaki farklılık ile ilişkilidir. Çok türlü biyofilmin üyelerini koruyan bir başka mekanizma, diğer üyelerin hayatta kalmasını sağlayan koşulları oluşturan belirli bir üyeyi barındırmasıdır. Örneğin, anaerobik bakteriler, karışık bir biyofilm içinde büyütüldüklerinde aerobik koşullardan kurtulabilir. Çünkü aerobik bakteriler oksijeni tüketir ve böylelikle biyofilmin daha derin katmanları içinde anaerobik koşullar sağlanmış olur (272).

Çok türlü biyofilmler; daha fazla karmaşıklık, klinik koşullara daha fazla benzerlik, artırılmış metabolik kapasite ve stres toleransı ve biyofilm eradikasyonuna karşı daha fazla direnç sağlar. Fakat bu karmaşıklık, deneysel çalışmalarla ilgili bir takım sorunları beraberinde getirir. Örneğin çok türlü biyofilmin kültüre edilmesi daha fazla başlangıç kültürü, daha fazla ortam türü, daha fazla işleme aşaması gerektirir. Dolayısıyla bu model sistemler genellikle zaman alıcı ve maliyetlidir. Farklı türlerin biyofilm düzeneğinde birleştirilmesi, her türün büyüyeceği veya hepsinin eşit olarak iyi gelişeceği anlamına gelmez. Mikrobiyal topluluklarda, türler etkileşime girer ve bu etkileşimler sinerjik ya da rekabetçi olabilir. Türler arasındaki etkileşimin önemli bir etkisinin olmadığı nötr ilişkiler de vardır (273) . Sonuç olarak, çok türlü bir biyofilm modelinin kullanımı genellikle ortaya çıkan biyofilmin gelişimini ve bileşimini değerlendirmek için kapsamlı bir ön deney gerektirir. Çok türlü biyofilm sisteminin artan çeşitliliği ve karmaşıklığının bir sonucu olarak, deneyin tekrarlanabilirliği tipik olarak azalır.

Swimberghe ve ark. (126) ; son yıllarda yapılan dezenfeksiyon amaçlı biyofilm modeli sistemlerinde 77 çalışmayı inceledikleri derlemede %86 oranında tek tür mikroorganizma kullanıldığı ve bu mikroorganizmanın çoğunlukla (tüm çalışmaların %79 unda, tek türlü biyofilm çalışmalarının %92 sinde) *E.faecalis* olduğu bildirilmiştir. Çok türlü biyofilmlerde ise sıklıkla *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Enterobacteriaceae* ailelerinden, fakültatif anaerobik suşların kullanıldığı bildirilmiştir. Zorunlu anaerob bakteriler çalışmaların sadece %14 ünde kullanılmıştır. Kullanılan bakterilerin yüksek oranda gram pozitif olduğu bildirilmiştir. Endodontik biyofilm modeli için türlerin seçimi söz konusu olduğunda, kök kanal mikrobiyatasının ideal tipik üyeleri seçilir. Sadece belirli bir mikroorganizmalar kümesi nekrotik kök kanalının çevresinde geliştiğinden, kök kanal boşluğundan yaygın olarak izole edilmeyen bakterileri seçmek mantıksız olacaktır.

Birincil enfeksiyonlarda sıklıkla saptanan türler, Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilerin farklı cinslerine ait olmakla birlikte, bir çok çalışmada (214, 216) Gram-pozitif türler en çok kullanılanlardır. Tek türlü biyofilm modeli ile çalışırken, hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakteri kullanımı mantıklı bir seçim olabilir. Gram-negatif türlerin, enstrümantasyon veya medikasyon sonrası örneklerde yaygın

olarak bulunmaması, Gram-pozitif bakterilerden daha kolay elimine edildiğini gösterebilir. Bu sebeple, Gram-pozitif türlerin kullanımı elimine edilmeleri daha zor olduğu için mantıklı görünmektedir (1). Çok türlü biyofilm sistemlerinde Gram pozitif ve Gram negatif türlerin karışık olarak kullanılması, türlerin dezenfeksiyona olan yanıtını anlamak için mantıklı görünmektedir. Brändle ve ark. (274) mikroorganizmaların büyüme koşullarının alkali strese cevabını inceledikleri çalışmalarında *E. faecalis*, *S.sobrinus*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *C. albicans* ile tek tek ve çok türlü biyofilm oluşturmuşlar, özellikle *S.sobrinus* un çok türlü biyofilm ile birlikte  $Ca(OH)_2$  e direncinin arttığını bildirmişlerdir.

Primer endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla zorunlu anaerop bakteriler baskın olmasına rağmen çalışmalarda sıklıkla fakültatif anaerop bakteriler kullanılmaktadır. Persiste enfeksiyonlarda fakültatif anaerop bakterilerin sıklıkla görülmesi bu durumun başlıca sebebidir. Çok türlü bir biyofilm sisteminde zorunlu ve fakültatif anaerop türlerin birlikte kullanımı mantıklı görünmektedir. Zorunlu anaerop bakterilerin deneyde kullanımı için anaerobik kavanoz, anaerobik ortam ve ek ekipman gerekeceğinden deney prosedürleri oldukça karmaşıklaşır (126).

Kültür koleksiyonlarından suş şeklinde alınmış çok sayıda tür biyofilm oluşturmak için bir araya getirildiğinde, tanımlanmış bir biyofilm oluşturulur. Türler direk olarak doğal ortamdan alınmadığından dolayı yapay sayılabilirler. Biyofilm, doğrudan doğal çevreden alınan mikroorganizmalardan oluştuğunda, tanımlanmamış bir doğal biyofilm olarak adlandırılır (275). Çalışmalarda, biyofilm oluşturmak için çoğunlukla laboratuvar referans suşları kullanılmaktadır. Bu suşlar, iyi bilinen genom dizisine sahip olup kültür koleksiyonlarından elde edilebilirler. Fakat, bu tür laboratuvar referans suşlarının, klinik türlerine kıyasla önemli patofizyolojik özellikleri kaybetmiş oldukları bilinmektedir. Çünkü bu tür suşlar ilk izolasyonlarından onlarca yıldır çoğaltılıyor olabilirler (126). Klinik izolatların virülansının daha yüksek olması, belirli genlerin veya gen kümelerinin (patojenite adaları) varlığı ile ilişkilidir (276). *E. faecalis*in sıklıkla, ATCC 29212 suşu kullanılmaktadır. Bu laboratuvar referansı, klinik ve laboratuvar deneyleri için yaygın olarak kullanılan bir temsili test organizmasıdır ve insan idrarından izole edilmiştir. Sadece az sayıda çalışmada klinik izolat kullanımı bildirilmiştir (126).

Bilinen türlerle laboratuvarında oluşturulan biyofilmin kullanılmasının avantajları; elde edilen biyofilmin bileşiminin mükemmel bir şekilde bilinmesi, yeniden üretilebilir olması, manipüle edilmesinin kolay olması, zaman ve maliyet açısından avantajlı olması, analiz edilmesi ve yorumlanmasının daha kolay olmasıdır. Dezavantaj olarak, bu tip biyofilm sistemlerinin yapay olması gösterilebilir. Ağız boşluğu içinde büyütülen çok türlü bir biyofilm, ağız boşluğunda bulunabilen çok sayıda mikroorganizmanın bir çoğunu içerecektir. Bu oluşum, aynı zamanda, gıda alımı, salya bileşenleri, tükürük akışı, oral hijyen alışkanlıkları ve diğer kimyasal ya da fiziksel etkilerden etkileneceğinden, tanımlanmış biyofilme göre çok daha karmaşık ve tahmin edilemeyen bir yapıya sahiptir. Aynı durum, subgingival plak örneği veya kök kanal florası örneği gibi bir inokulumdan yetiştirilen biyofilm için de geçerlidir (255). Bu tanımlanmamış doğal biyofilm sistemleri, çevredeki tür kompozisyonunu, tanımlanmış biyofilm sistemlerine göre daha yakından taklit eder. Doğal biyofilmlerdeki türlerin tanımlanması, yeni nesil dizileme gibi modern mikrobiyolojik tekniklerle mümkün olabilir. Bu da genellikle üstün bir çaba ve maliyet gerektirmektedir. Bu biyofilmlerin bilinmeyen bileşimi nedeniyle, analiz genellikle daha karmaşık ve maliyetlidir (126). Dahası, biyofilmin tam bileşimi hakkındaki bu bilgi eksikliği, araştırmanın diğer araştırmacılar tarafından yeniden çalışılma olasılığını sınırlar.

Kontrollü koşullar altında yürütülen *in vitro* çok türlü biyofilm deneyleri, kök kanal bakterilerinin toplu yaşam tarzını ele almak ve stres etkilerini değerlendirmek için gereklidir. Bu çalışmada daha önce birlikte bulduklarında dentin tübüllerinde büyüyerek biyofilm oluşturdukları bildirilmiş farklı morfolojilere sahip *E.faecalis* (kok), *S.mutans* (kok, zincirler şeklinde), *L.acidophilus* (basil), *A.naestlundii* (rod) bakterileri kullanılarak biyofilm oluşturulmuştur (256, 277). Bu bakterilerin varlığı primer ve dirençli intraradiküler enfeksiyonlarda sıklıkla gösterilmiştir (278).

*E.faecalis*, endodontik biyofilm model sistemlerinde en sık kullanılan test organizmasıdır. *E. faecalis* birincil kök kanal enfeksiyonunda tipik bir izolat değildir. Bu tür, kök kanal tedavisi yapılmış, inatçı enfeksiyon bulunduran dişlerden izole edilmiş olup, bazı çalışmalarda % 80 in üzerinde prevalans bildirilmiştir (58, 279, 280). *E. faecalis*'in alkali ortam (281) ve uzun süreli açlık gibi zor koşullara direnç gösterdiği bilinmektedir (282). Dentin tübüllerine derinlemesine nüfuz etme ve

kalsiyum hidroksit ile tedavi edilenler de dahil olmak üzere, kök kanal duvarında biyofilm üretme kabiliyetine sahiptir (283). Esansiyel çevre koşullarında hayatta kalmasına ilişkin özellikleri ve epidemiyolojik çalışmalarda iddia edildiği üzere tedavi sonrası hastalık ile ilişkisi nedeniyle *E. faecalis*, uzun bir süre endodontide anahtar patojen olarak kabul edilmiştir. *E. faecalis* ile oluşturulmuş tek türlü biyofilm üzerinde tedavi etkinliğini değerlendiren birçok çalışma bunun olası sonucudur. Fakat, bu yaklaşım dikkatle değerlendirilmelidir. Son yıllarda *E. faecalis*'in endodontik tedavi başarısızlıklarının ana sebebi olarak statüsü gittikçe daha fazla sorgulanmaktadır. Bunun nedeni *E. faecalis*'in incelenen tüm başarısız kök kanallarından izole edilmemesidir (284). *E. faecalis*, nadiren bakteriyel topluluğun en baskın türlerinden biridir (285). Kanal dolgusu yapılmış lezyonlu dişlerde, kanal dolgusu yapılmış lezyonu bulunmayan dişlere oranla prevelansı daha fazla değildir (52). Bu nedenle *E. faecalis* artık kök kanalının temel patojenik türü olarak kabul edilmemektedir. *E. faecalis* hızlı büyüyen ve laboratuvar koşullarında hiç titiz olmayan bir türdür (286). Bu özellikler, yüksek izolasyon sıklığını ve laboratuvar çalışmalarında sıklıkla kullanılmasını açıklayabilir.

Streptokok türleri, endodontik tedavi gerektiren apikal periodontitisli dişlerin kök kanallarında sıklıkla saptanmaktadır. Chavez ve ark. (35) salgıladıkları güçlü ekstrasellüler proteinlerden ve apikal periodontitisli dişlerin kök kanallarından sıklıkla izole edilmelerinden dolayı streptokok türlerinin apikal periodontitiste önemli bir patojen olduğunu bildirmişlerdir. Roças ve ark. (147) kök kanal tedavisi sonrası yeniden tedavi gerektiren vakalardan elde ettikleri örnekleri gerçek zamanlı PCR ile değerlendirdikleri çalışmalarında *E. faecalis* türlerinin vakaların %38 inde, streptokok türlerinin vakaların %41 inde saptandığını bildirmişlerdir. Toplam bakteri sayımında *E. faecalis* sayısı %9, streptokok sayısı %66 olarak tespit edilmiştir. Bulgular, *E. faecalis*'in ikincil enfeksiyonlarda ana patojen olarak durumunu sorgulamaktadır. Diğer türlerin ikincil endodontik enfeksiyonlarla ilişkili aday patojenler olabileceğini düşündürmektedir. Anderson ve ark. (148) ikincil enfeksiyonlardaki türleri saptamak için kültür yöntemi ve ribozomal DNA ile PCR kullandıkları çalışmada kök kanallarında, çalışmamızda da kullanılan *S. mutans* in varlığını bildirmişlerdir.

Laktobasillerin enfekte kök kanallarında sıklıkla bulunabildiği bildirilmiştir (61). Sundqvist ve ark. (61) enfekte kök kanallarında en sık bulunan türleri *L.casei*, *L. salivarius*, *L. acidophilus*, *L. plantarum* and *L. Fermentum* olarak bildirmişlerdir. Lactobacillus'un tanımlanması için çeşitli yöntemler mevcut olmasına rağmen, türler düzeyinde tanımlamanın, cins içindeki genetik benzerlikler nedeniyle zor olduğu bilinmektedir. Son yıllarda, matris destekli lazer desorpsiyonu / kütle spektrometrisinin iyonlaşma süresi (MALDI-TOF MS), bakterilerin tanımlanması için yeni bir teknik olarak tanıtılmıştır. 16S rRNA gen sekansı ve MALDI-TOF kullanılarak enfekte kök kanallarındaki laktobasil prevelansını inceleyen çalışmada, enfekte dişlerin %22 oranında laktobasil içerdiği görülmüştür. Bu çalışmada, bizim çalışmamızda da kullanılan *L. acidophilus* varlığı bildirilmiştir (63).

Actinomyces türlerinin enfekte kök kanallarındaki varlığı uzun süredir bilinmektedir. Borssen ve ark. (287) enfekte kök kanalında en sık bulunan türleri *A. israelii*, *A. naeslundii*, *A. odontolyticus* ve *A. viscosus* olarak bildirmişlerdir. Xia ve ark. endodontik kaynaklı abse ve sellülit vakalarındaki Actinomyces prevelansını PCR ile incelemişlerdir. Örneklerin %9 unda *A.naeslundii* varlığı görülmüştür. Bu örneklerin %14 ü enfekte kök kanalı ile, %4 ü abse ile, %7 si sellülit ile ilişkili bulunmuştur (149). Albuquerque ve ark. (216) üçlü antibiyotik patını taklit eden scaffoldların antibakteriyel etkisini *A.naeslundii* biyofilmi üzerinde incelemişlerdir. Özellikle ekstradiküler biyofilmlerde sıklıkla saptanan dirençli bir tür olan *A.naeslundii* (78), çalışmamızdaki çok türlü biyofilme dahil edilmiştir.

Chavez ve ark. (277) *E.faecalis*, *S.gordonii* *L.salivarius*, *A.naeslundii* ile mikroskopik ve moleküler analizlere kolaylıkla tabi tutulan, azaltılmış bir değişkenliğe sahip çok türlü biyofilm örnekleri elde edilmesini sağlamıştır. Oluşturulmuş olan in vitro biyofilm topluluğunun karakterizasyonu KLTM, FISH ve floresans etiketli canlılık belirteçleri dahil olmak üzere kombine yöntemlerle değerlendirilmiştir. Bu çok türlü biyofilm sisteminde, aynı çevresel etkilere maruz kalan temsili kök kanal bakterilerinin birlikte biyofilm oluşturabildiği gösterilmiştir. Prospektif olarak, oluşturulmuş olan bu kök kanal biyofilm topluluğunun, *in vivo* koşulların temsilcisi olarak, bakteri üzerindeki simüle edilmiş stresleri veya stres kombinasyonlarını değerlendirmek için yararlı olabileceği bildirilmiştir.



### *İnkübasyon süresi*

Literatürde çok türlü biyofilm oluşturmak için gerekli inkübasyon süreleri 1 ila 70 gün arasında değişmektedir. Bir çok çalışma biyofilmleri 1 haftadan az ya da 1 hafta inkübe etmişken (256, 277, 288), bir kaç haftalık inkübasyon süresi de bildirilmektedir (289). Çalışmalar arasında inkübasyon süresi açısından farklılık dikkat çekicidir. Bu durum, araştırmacılar arasında, inkübasyon süresinin görece öneminin çok farklı yorumlandığını gösterir.

Biyofilm oluşumu bakteri yüzeyine tutunma, mikrokolon geliştirme, hücre dışı polimerik madde salgısı, biyofilm olgunlaşmasının farklı aşamaları ve ayrışma ile tanımlanır (87). “Genç” (birkaç saat - gün) ile “olgun” biyofilmleri karşılaştırırken biyofilm biyokütlesi/kalınlığı, hücre sayısı ve antimikrobiyal direncinde farklılıklar görülebilir. Seneviratne ve ark. (290), *E. faecalis* biyofilmlerini mikrotitre plak içinde büyütmüşlerdir. 72 saat sonra maksimum hücre kazanımı görülmüş ve 7. günden itibaren azalma fazı başlamıştır. Biyofilm yapısı ile ilgili olarak Shen ve ark. (259), kollajen kaplı hidroksiapatit diskler üzerinde büyüyen 2 günlük çok türlü biyofilmlerin (57 µm), 3 haftalık (155 µm) ve 6 haftalık biyofilmlere (190 µm) göre daha ince olduğunu SEM mikrografları ile göstermişlerdir. Benzer şekilde, Phee ve ark. (291), 96 saatlik *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin 24 saatlik biyofilmlerden çok daha fazla biyokütle içerdiğini bildirmişlerdir.

Biyofilm yaşının antimikrobiyal tedavinin etkinliği üzerindeki etkisi bir dizi çalışmada araştırılmıştır. Bu çalışmalar, tedavilerin genellikle daha olgun biyofilmlere karşı daha az etkili olduğunu göstermektedir. Stojicic ve ark. (292), farklı dezenfekte edici ajanların çok türlü biyofilm üzerindeki etkisini değerlendirmişler ve 3 haftalık biyofilmin, 1 veya 2 haftalık biyofilme göre antimikrobiyallere daha az duyarlı olduğunu bulmuşlardır. Modellerinde biyofilm olgunlaşmasının iki ila üç hafta arasında gerçekleştiğinin altını çizmişler ve kullanılan her bir biyofilm modelinin olgunlaşma zaman çizelgesini bilmenin önemini vurgulamışlardır. Lim ve ark. (293) ışıkla aktive dezenfeksiyon (LAD) ve kimyasal dezenfeksiyonun etkisini dört günlük ve dört haftalık *E. faecalis* biyofilmi üzerinde karşılaştırmışlardır. Dört haftalık örneklerde bakteri sağ kalımı, dört günlük örneklerden belirgin olarak daha yüksek bulunmuştur. Chau ve ark. (294),

hidroksiapatit diskler üzerinde oluşturulan 22, 46, 70 ve 94 saatlik *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde NaOCl'nin antibakteriyel aktivitesini araştırmışlardır. Genel olarak, test edilen tüm konsantrasyonlarda biyofilm yaşı arttıkça, NaOCl'nin antibakteriyel aktivitesinin azaldığını göstermişlerdir. Biyofilmin olgunlaşma aşaması ile antimikrobiyal ajanlara direnç arasındaki benzer ilişkiler genel mikrobiyoloji alanında da bildirilmiştir (295).

Reum Kim ve ark. (296) *L.plantarum* dan elde ettikleri lipoteikoik asitin (LTA) çok türlü biyofilme olan antibakteriyel etkisini incelemişlerdir. *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *L. salivarius*, *S. mutans* ile 3 gün inkübasyon süresi sonunda oluşan biyofilmi SEM ile göstermişlerdir. Lipoteikoik asitin kanal medikametlerine karıştırılarak uygulanması ile antibakteriyel etkinliğin arttırılabileceği bildirilmiştir. Wang ve ark. (297) yeni bir kanal patının antibakteriyel etkinliğini değerlendirmek için oluşturdukları çok türlü biyofilme; genç biyofilm oluşumu için 3 gün, olgun biyofilm oluşumu için 14 gün süreyle inkübasyon yapmışlardır. Chavez ve ark. (277) *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *L. salivarius*, *S. gordonii* ile 5 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşturdukları çok türlü biyofilmin antibakteriyel etkinlik çalışmaları için uygun olabileceğini bildirmişlerdir. Albuquerque ve ark. (216) üçlü antibiyotik kullanarak sentezledikleri iskelelerin antibakteriyel etkinliğini 7 gün süre ile inkübe ettikleri *A.naeslundii* biyofilmi üzerinde değerlendirmişlerdir. 7 günlük inkübasyon süresi sonunda tüm dentin yüzeyini kaplayan genç biyofilm oluşumunu SEM ile santrifuj yapılmamasına rağmen dentin tübüllerine penetre olabilmiş bakterilerin varlığını KLTM ile göstermişlerdir. Ertem ve ark. (298) *F. nucleatum*, *A. naeslundii*, *E. faecalis*, *S. sanguinis*, *S.sobrinus* ile 10 günlük inkübasyon süresi sonunda oluşturdukları çok türlü biyofilmi SEM ile incelemişler, dentin yüzeyini kaplayan biyofilm varlığını doğrulamışlardır. Kishen ve ark. biyofilm modellerini ve metodlarını inceledikleri çalışmalarında kollajen kaplı hidroksiapatit diskler üzerinde 7 günlük inkübasyon süresi sonunda çok türlü biyofilm varlığını SEM ile göstermişlerdir. Brändle ve ark. (274) alkali stresin mikroorganizmaların planktonik formdaki ya da çok türlü biyofilm üzerindeki etkilerini karışlaştırmak amacıyla *E. faecalis*, *S.sobrinus*, *A. naeslundii*, *F. nucleatum*, *C. albicans* mikroorganizmaları ile 5 günlük inkübasyon süresi sonunda çok türlü biyofilm oluşturmuşlardır. Albuquerque ve ark. (256) polimer nanofiberlerin antibakteriyel etkinliğini

değerlendirmek için 7 günlük inkübasyon süresi sonunda *A. naeslundii*, *S. sanguinis*, *E. faecalis* ile oluşturdukları çok türlü biyofilmi SEM ile doğrulamışlardır. Çalışmamızda *E.faecalis*, *S.mutans*, *L.acidophilus*, *A.naeslundii* bakterileri kullanılarak 7 günlük inkübasyon süresi sonunda dentin blokları üzerinde çok türlü biyofilm oluşturulmuş ve biyofilm oluşumu SEM ile gösterilmiştir.

#### *Çalışmada kullanılan dezenfektanların seçimi*

Kalsiyum hidroksit: Kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal aktivitesi, aköz sıvılarla temas halinde olan hidroksil iyonlarının salınması ile ilişkilidir. Hidroksil iyonları, biyomoleküller ile aşırı reaktivite gösteren yüksek oksidan serbest radikalleridir. Mikroorganizmalar üzerindeki öldürücü etki, sitoplazmik membranın hasar görmesi, protein denatürasyonu ve/veya DNA'nın hasar görmesi ile açıklanabilir (299).

Safavi ve ark. (300) *Streptococcus faecium* ile enfekte ettikleri dentin blokları üzerinde  $\text{Ca(OH)}_2$  ve iyodür potasyum iodid (IKI) in 1 dakika ile 24 saat arasındaki antibakteriyel etkinliklerini karşılaştırmışlardır. IKI'nin efektif dezenfeksiyon yapabildiği bildirilmiş,  $\text{Ca(OH)}_2$  grubunda rezidüel bakteriler tespit edilmiştir.  $\text{Ca(OH)}_2$  in etkili mikroorganizma dezenfeksiyonu yapamadığını bildiren başka çalışmalar da mevcuttur (301, 302). Hatta bazı çalışmalar kalsiyum hidroksitin hiç antimikrobiyal etkisinin olmadığını savunmaktadır. Ohara ve ark. (303) çeşitli irriganların dezenfeksiyon etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında  $\text{Ca(OH)}_2$  in salın kadar etkisiz olduğunu bildirmişlerdir.

Bununla birlikte, Stuart ve ark. (304) çekilmiş insan dişi kök kanallarında üç medikamentin antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında,  $\text{Ca(OH)}_2$  ile tedavi edilen dişlerde bakteri sayısında % 99.9 azalma bildirmişlerdir. Han ve ark. (305) aköz bir taşıyıcıya sahip  $\text{Ca(OH)}_2$  in, dentin tübüllerindeki bakterileri başarılı bir şekilde azaltabildiğini bildirmiştir. Noetzel ve ark. ve Valera ve ark.  $\text{Ca(OH)}_2$  in irrigasyon ve şekillendirme işlemlerinden sonra bile kalan mikroorganizmaları etkili bir şekilde azalttığını bildirmişlerdir (302, 306).

$\text{Ca(OH)}_2$  in bakteri sayısını kısmen azaltabilecek sınırlı antimikrobiyal etkisini bildiren yazarlar da bulunmaktadır. Tanrıverdi ve ark. (307)  $\text{Ca(OH)}_2$  in etkinliğinin diğer ajanların etkisinden daha düşük olduğunu, fakat yine de bakteri

sayısında önemli bir azalma gerçekleştiğini bildirmişlerdir.  $\text{Ca(OH)}_2$  patının 14 günde, *E. faecalis* biyofilminin % 70'ini ortadan kaldırdığını bildiren çalışmalar bulunmaktadır (308). Delgado ve ark. (309), Harrison ve ark. (310), Kandaswamy ve ark. (311) ve Madhubala ve ark. (312) sırasıyla % 75, % 83, % 55 ve % 59 oranında bakteriyel azalma bildirmişlerdir. Almyroudi ve ark. (313) ve Oncag ve ark. (314)  $\text{Ca(OH)}_2$  in antimikrobiyal etkinliğinin zamanla azalacağını savunmuşlardır.

$\text{Ca(OH)}_2$  'in etkisi farklı taşıyıcılarla arttırılmaya çalışılmıştır. Sukawat ve Srisuwan (161), CMCP ile karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  'in, dentin tübülleri içindeki tüm *E. faecalis*'leri öldürdüğünü, distile suyla veya CHX ile karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  'nin bu bakterilere karşı etkisiz olduğunu bildirmişlerdir. Cwikla ve ark. (315) üç farklı  $\text{Ca(OH)}_2$  formülasyonu ( $\text{Ca(OH)}_2$ ,  $\text{Ca(OH)}_2$ +IKI,  $\text{Ca(OH)}_2$ +Metapex) arasında dezenfeksiyon kabiliyetinde önemli farklılıklar olduğunu göstermişlerdir. Prabhakar ve ark. (316) IKI veya CHX'in  $\text{Ca(OH)}_2$  ile kombinasyonunun dezenfeksiyon kapasitesini arttırabileceğini bildirmişlerdir. Cook ve ark. (146) kök kanal obturasyonundan önce  $\text{Ca(OH)}_2$  veya CHX'in *E. faecalis* 'in sağkalımı üzerindeki etkisini kültür ve PCR teknikleri kullanılarak değerlendirmişlerdir. Kültürlerin hiçbirinde bakteri üremesi görülmemiş, fakat PCR sonuçları deney gruplarının çoğunda pozitif sonuç bildirmiştir.

Estrela ve ark. belirli taşıyıcılarla birlikte  $\text{Ca(OH)}_2$  'in antimikrobiyal etkinliğini incelemiş ve taşıyıcıların  $\text{Ca(OH)}_2$  'nin antimikrobiyal aktivitesini etkilemediği sonucuna varmıştır (317, 318). Fakat, Gomes ve ark. tarafından farklı sonuçlar gözlenmiştir. Su veya gliserinle karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  ' in çok az etkisinin olduğu veya hiç etkisinin olmadığını, oysa CMCP ile karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  'nin, önemli derecede daha etkili bulunduğunu bildirmişlerdir. Yağlı taşıyıcılar içeren patlar, sulu veya visköz taşıyıcı içeren patlara göre daha büyük inhibisyon alanı oluşturmuştur (160, 319).

Siqueira ve Uzeda'nın çalışmasında (320), damıtılmış su veya gliserinle karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$ , 7 günlük inkübasyondan sonra bile tüm bakteri suşlarına karşı etkisiz kalmıştır. Fakat, broth dilüsyon testi kullanılarak yapılan başka bir çalışmada  $\text{Ca(OH)}_2$  ile gliserin ya da distile su karışımının 1-3 gün sonra antibakteriyel aktivite gösterdiği bildirilmiştir (159).

Vianna ve ark. (321) test edilen tüm  $\text{Ca(OH)}_2$  patlarının bakterileri öldürebildiğini, ancak CMCP ile hazırlanan patın *E. faecalis* ve *Candida albicans*'ı elimine etmede daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Türk ve ark. ve Pacios ve ark. *E. faecalis* ve *C. albicans*'ın distile suyla karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  tarafından başarılı şekilde inhibe edilemediğini bildirmişlerdir (162, 322).

Bazı araştırmacılar  $\text{Ca(OH)}_2$ 'i CHX ile karıştırarak antibakteriyel etkinliği değerlendirmişlerdir. Basrani ve ark. (323), Lin ve ark. (157) ve Ballal ve ark. (324) CHX jelinin *E. faecalis* ve *C. albicans*'a karşı  $\text{Ca(OH)}_2$  patından daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. CHX ile karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  in, distile su ile karıştırılmış  $\text{Ca(OH)}_2$  e göre antibakteriyel etkisinin anlamlı derecede arttığını bildirilmiştir (325, 326). Saatchi ve ark. (327) tarafından 2014 yılında yayınlanan meta analizde;  $\text{Ca(OH)}_2$  in CHX ile karıştırıldığında *E. faecalis* yönelik antibakteriyel etkisinin değişip değişmediği irdelenmeye çalışılmıştır. *Ex vivo* çalışmaların dahil edildiği meta analizin sonucu, “ $\text{Ca(OH)}_2$  in antibakteriyel etkisinin CHX ile karıştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede değişmediği” şeklindedir.

Bu çalışmada  $\text{Ca(OH)}_2$  in çok türlü biyofilm üzerindeki dezenfeksiyon etkisi KLTM ve kültür yöntemleri ile incelenmiştir. 1 günlük  $\text{Ca(OH)}_2$  uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %61,16 dır. Ölü bakteri sayısı ortalama %38,84 tür. Bu sonuç,  $\text{Ca(OH)}_2$  in 1 günde sınırlı antibakteriyel etkisi olduğunu bildiren çalışmalarla paralellik göstermektedir. 7 günlük  $\text{Ca(OH)}_2$  uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %53,16, ölü bakteri sayısı ortalama %46,84 olmuştur. Bu sonuç,  $\text{Ca(OH)}_2$  in 7 gün kök kanalı içinde bekletilmesinin antibakteriyel etkinliğini arttırdığını bildiren bir çok çalışma ile paralellik göstermektedir. Ancak çalışmamızda  $\text{Ca(OH)}_2$  dentin yüzeyinde 7 gün bekletilmesine rağmen sınırlı bir antibakteriyel etki göstermiştir.

Çalışmamızın kültür sonuçları, 7 günlük  $\text{Ca(OH)}_2$  uygulamasının etkili bir dezenfeksiyon oluşturmuş olabileceğini düşündürmektedir. Fakat Cook ve ark. nın çalışmalarına benzer şekilde KLTM de örneklerin hiçbirinde bakterilerin tamamı ölü olarak değerlendirilemezken, kültür yöntemi ile değerlendirme sonucunda; hem 1.gün hem de 7. gün sonunda  $\text{Ca(OH)}_2$ +AgNP, CHX, CHX+AgNP gruplarında, hiç bakteri üremesi görülmeyen örnekler bulunmaktadır. Kök kanalı dezenfeksiyonu

sonrası mikrobiyal indirgeme konusundaki mevcut literatürde, dezenfeksiyon etkinliğini değerlendirmek için sıklıkla planktonik bakteri sayımları (CFU) kullanılmıştır. Fakat bir çok *in vitro* çalışma, bakterilerin kök kanal duvarlarında biyofilm oluşturma kabiliyetini göstermiştir (328, 329). Bizim çalışmamızdaki bu sonucun nedeni kültür yönteminde salin ile irrigasyon sonrası kanal boşluğunda kalan planktonik bakterilerin değerlendirilmesi, KLTM ile incelemede ise direk olarak kanal yüzeyindeki biyofilm bakterilerinin değerlendirilmesi olabilir. Literatürde Ca(OH)<sub>2</sub> in dezenfeksiyon kapasitesinin değerlendirilmesinde genellikle *E.faecalis* biyofilmi kullanılmıştır. Bizim çalışmamızda kullanılan çok türlü biyofilm, antibakteriyellere daha dirençli olduğundan Ca(OH)<sub>2</sub> in sınırlı dezenfeksiyon etkisi göstermesine neden olmuş olabilir.

KLTM sonuçlarında Ca(OH)<sub>2</sub> hem 1. hem de 7.günde CHX den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha başarısız bulunmuştur (p<0,01). Kültür sonuçlarında hem 1. hem de 7. günde Ca(OH)<sub>2</sub>, CHX den daha başarısız olmasına rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Bu sonuç, CHX in Ca(OH)<sub>2</sub> e üstün olduğunu bildiren çalışmalarla örtüşmektedir.

#### *Klorheksidin*

Delany ve ark. (330) enfekte olmuş kök kanallarında % 0.2'lik CHX nin etkisini değerlendirmişlerdir. Bakteriyolojik örnekler, enstrümantasyonun ardından CHX ya da salin ile muamele edildikten sonra toplanmıştır. CHX uygulanan kanallarda bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı azalma gerçekleşmiştir. Basson ve Tait (331); Ca(OH)<sub>2</sub>, IKI ve CHX solüsyonlarının dezenfeksiyon etkisini *Actinomyces israelii* ile enfekte edilmiş kök kanallarında *ex vivo* olarak incelemişlerdir. Kök kanallarına 3,7 ve 60 günlük sürelerde Ca(OH)<sub>2</sub>, CHX ve IKI uygulanmıştır. Tüm zamanlarda ve tüm örneklerde *A.israelii* yi tamamen ortadan kaldıran tek dezenfektan CHX olmuştur. IKI uygulanan örneklerde tüm zamanlarda %25 oranında, Ca(OH)<sub>2</sub> te %50 oranında bakteri varlığı gözlenmiştir. Önçağ ve ark. (332) *E.faecalis* ile enfekte edilmiş çekilmiş insan dişi kök kanallarında %5,25 NaOCl, %2 CHX , %2CHX+%0,2 setrimid karışımının 5 dakika ve 48 saatteki dezenfeksiyon etkilerini değerlendirmişlerdir. Tüm zaman periyotlarında %2CHX+ %0,2 setrimid karışımı, %5,25 NaOCl den daha başarılı

dezenfeksiyon göstermiştir. İki çalışma (333, 334), farklı konsantrasyonlarda (0.2%, 1% ve 2%) ve farklı formlarda (jel ve solüsyon) CHX i, farklı konsantrasyonlarda (%0.5 %1, %2.5, %4, %5.25) NaOCl ile endodontik patojenlere olan dezenfeksiyon etkisi bakımından karşılaştırmışlardır. CHX % 2 jel ve % 2 sıvı formülasyonlarının her ikisi de *Staphylococcus aureus* ve *Candida albicans* ı 15 sn de ortadan kaldırmıştır. CHX jel formu *E.faecalis* 1 dakikada yok etmiştir. Test edilen ajanların tümü, 15 s içinde *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella intermedia* yı ortadan kaldırmıştır. Tüm mikroorganizmaları ortadan kaldırmak için % 1.0 ve % 2.0 CHX solüsyonları için gereken süre, % 5.25 NaOCl için gereken süre ile aynı olmuştur . Bu çalışmalar, antimikrobiyal etkinin, ajanların türü, konsantrasyonu ve sunum şekli ile birlikte kullanılan formülasyonun mikrobiyal duyarlılığı ile ilgili olduğunu doğrulamaktadır.

Manzur ve ark. (155) randomize bir klinik çalışmada, Ca(OH)<sub>2</sub> , %2 CHX jel ve ikisinin kombinasyonunun kanal medikamenti olarak antibakteriyel etkinliğini değerlendirmişlerdir. İlk tedavi seansında enstrümantasyon öncesi ve sonrası operasyon alanından ve kök kanallarından bakteriyolojik örnekler alınmış, 1 hafta sonra yapılan ikinci seansın başlangıcında örnek alımı tekrarlanmıştır. Ca(OH)<sub>2</sub>, CHX ve Ca(OH)<sub>2</sub> / CHX karışımlarının antibakteriyel etkilerinin karşılaştırılabilir olduğu sonucuna varmışlardır. Zerella ve ark. (335) % 2 CHX solüsyon ile Ca(OH)<sub>2</sub> i karıştırarak elde edilen bir Ca(OH)<sub>2</sub> patının, kök kanalının yeniden tedavisini gerektiren dişler üzerindeki dezenfeksiyon etkisini araştırmışlardır. Deneysel medikament, üçüncü randevunun başlangıcında, 20 dişin 16'sının (% 80) dezenfeksiyonunu sağlamıştır. Başlangıçta enterokok içeren dişlerin hiçbirinde bakteriyel büyüme gözlenmemiştir. % 2 CHX ve Ca(OH)<sub>2</sub> karışımının, enfekte olmuş kök kanallarının dezenfeksiyonu üzerinde Ca(OH)<sub>2</sub> kadar etkili olduğu sonucuna varmışlardır. Tanomaru ve ark. (336), *in vivo* çalışmalarında bakteriyel endotoksin içeren köpeklerin dişlerinin kök kanallarında % 5 NaOCl, % 2 CHX ve fizyolojik salin solüsyonlarının ve Ca(OH)<sub>2</sub> patının etkisini değerlendirmişlerdir. İrrigasyon solüsyonları ile birlikte yapılan biyomekanik preparasyonun endotoksini etkisizleştiremediğini fakat Ca(OH)<sub>2</sub> patı uygulamasının endotoksini inaktive edebildiğini bildirmişlerdir. Heling ve Chandler(337), yıkama solüsyonlarının *E. faecalis*'e karşı *ex vivo* antimikrobiyal etkinliğini araştırmışlardır. Tek başına CHX

ya da NaOCl ile karşılaştırıldığında, antibakteriyel aktivite açısından, hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) ve CHX'in spesifik kombinasyonunun üstün olduğunu göstermişlerdir. Steinberg ve ark., çeşitli CHX ve  $H_2O_2$  kombinasyonlarının triptikaz soya (peptitler açısından zengin bir kültür ortamı) içindeki *E. faecalis* süspansiyonları üzerindeki dezenfeksiyon etkisini araştırmışlardır. İki maddenin kombinasyonunun her bir bileşen için gerekenden çok daha düşük konsantrasyonlarda bile tamamen *E. faecalis*'i öldürdüğü bildirilmiştir (338).

Athanassiadis ve ark. (167) %2 CHX i kanal medikamenti olarak kullandıklarında, dentin tübüllerine yerleşmiş olan *E. faecalis* i elimine etmede  $Ca(OH)_2$  den daha başarılı olduğunu iddia etmişlerdir. Almyroudi ve ark. (313), CHX /  $Ca(OH)_2$  in 50:50 karışımı da dahil olmak üzere kullanılan tüm CHX formülasyonlarına göre, tek başına kullanılan %1 CHX jelin antibakteriyel etkisinin daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgular *E. faecalis* biyofilmine yönelik Gomes ve ark.nın (325) sığır dentini ile yaptıkları çalışma ve Schafer ve Bossmann (339) in insan dentini ile yaptıkları çalışma ile kuvvetlendirilmiştir. Bu çalışmalarda en etkili ajan CHX olarak bildirilmiş, onu CHX/ $Ca(OH)_2$  karışımı ve  $Ca(OH)_2$  in tek başına kullanımı izlemiştir. İnsan dişlerini kullanan in vitro çalışmada, Ercan ve ark. (249), % 2 CHX jelinin, dentin tübüllerinin içindeki *E. faecalis*'e karşı en etkili ajan olduğunu, ardından  $Ca(OH)_2$  ve % 2 CHX karışımının takip ettiğini,  $Ca(OH)_2$  tek başına kullanıldığında ise 30 gün sonra bile tamamen etkisiz olduğunu göstermişlerdir. Schafer & Bossmann (339), *E. faecalis*'e karşı % 2 CHX nin, tek başına kullanılan  $Ca(OH)_2$  'den veya ikisinin karışımından çok daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. Lin ve ark. (157), Evans ve ark. (340) sığır dentini kullanarak,  $Ca(OH)_2$  ile % 2 CHX karışımının tek başına  $Ca(OH)_2$  den daha etkili olduğu göstermişlerdir. Bir hayvan çalışmasında, Lindskog ve ark. (341), 4 hafta boyunca CHX ile bekletilmiş dişlerin periodonsiyumunda (hem apikal hem de marjinal olarak) inflamatuvar reaksiyonların azaldığını ve daha az kök rezorpsiyonu olduğunu bildirmiştir.

Genel olarak, *in vitro* çalışmalar CHX ve NaOCl' nin benzer konsantrasyonda kullanıldığında karşılaştırılabilir antibakteriyel etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, CHX son irrigant olarak kullanılabilir umut verici bir ajan olarak bildirilmektedir. Klinik bir çalışmada Zamany ve ark. (169), son irrigasyon



solüsyonu olarak kullanılan % 2 CHX nin, kanal preparasyonu sırasında NaOCl ile yıkanan kök kanallarındaki bakteri yüklerini önemli ölçüde azalttığını göstermiştir. CHX'in ek avantajları kök kanal dentinindeki antibakteriyel aktivitesinin belirli bir süre kalıcı olması ve göreceli olarak düşük toksisitesidir (342). Bir çok avantajına rağmen, CHX aktivitesi organik madde varlığında büyük ölçüde azalır (343). Sodyum hipokloritin aksine, doku eritici özelliklere sahip değildir (344). Jel formülasyonunda %2 CHX, kök kanalı dezenfeksiyonu için % 5,25 NaOCl çözeltilisine alternatif olarak önerilmiştir . Bu jel; %2 CHX ve antibakteriyel özelliği olmayan, iyonik olmayan, inert, suda çözünebilen bir jel bazdan oluşur. Ferraz ve ark. (345) CHX jelinin daha dezenfekte bir kök kanalı yüzeyi oluşturduğunu ve test edilen diğer çözeltilere göre (% 5,25 NaOCl ve % 2 CHX solüsyon) karşılaştırılabilir bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Yazarlar, %2 CHX jelin, kök kanal duvarlarına ve anatomik karmaşıklıklara, jelin viskozitesi nedeniyle etkili bir şekilde ulaşabildiğine inanmaktadır. % 2 CHX jeli ayrıca iyi antimikrobiyal aktiviteye ve enstrümantasyon sırasında lubrikant etkiye sahiptir. Dolayısıyla, çözelti formuyla karşılaştırıldığında, jel formu, enstrümantasyon sırasında dentin tübüllerini ve anatomik karmaşıklıkları daha iyi dezenfekte edebilir. Diğer bir avantajı, enstrümantasyon sırasında döner aletler üzerinde daha az stres oluşmasını sağlayan lubrikant etkisidir (172). Jel formundaki CHX 'nin, mikroorganizmaları öldürmek için sıvı formda karşılık gelen konsantrasyondan daha uzun bir zaman gerektirdiği bildirilmiştir (334). Vianna ve ark. (346), nekrotik pulpa dokusu içeren insan dişi kök kanallarının kemomekanik preparasyonundan sonra mikrobiyal yükün azalmasını değerlendirmiştir. Bu çalışma için 32 ayrı hastadan nekrotik pulpalı ve apikal periodontitisli 32 tek köklü diş seçilmiştir. Kök kanal enstrümantasyonu sırasında bir grup % 2.5 NaOCl ile yıkanırken, diğer grup % 2 CHX jel ile muamele edilmiştir. Bakteriyel yük, gerçek zamanlı PCR ve geleneksel kültür yöntemleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Gerçek zamanlı kantitatif-PCR analizi, bakteriyel azalmanın NaOCl grubunda, CHX grubundan daha fazla olduğunu göstermiştir. Kültür tekniğine göre, NaOCl grubunda vakaların % 75'i kemomekanik dezenfeksiyon sonrası bakteri içermezken, CHX grubunda vakaların % 50'si bakteri içermemektedir. Araştırmacılar, % 2.5'lik NaOCl'nin % 2 CHX jelinden daha etkili bir kök kanalı irrigantı olduğu sonucuna varmıştır. Buna karşılık, Wang ve ark. (172)

çalışmalarında % 2 CHX jelinin etkili bir kök kanalı dezenfektanı olduğunu ve vakaların % 90'ının kemomekanik preparasyondan sonra bakteri bulundurmadığını göstermişlerdir. İki çalışma arasındaki metodolojik farklılık sebebiyle farklı sonuçların elde edilmiş olabileceği düşünülmektedir. Wang ve ark.(172) kök kanalını prepreparasyon esnasında CHX jel ile doldurarak işlem yapmışlardır. Bu nedenle CHX jelin dentin ile temas süresi arttığından dezenfeksiyon etkisinin artmış olabileceğini bildirmişlerdir. % 2 CHX jelinin, bu yöntemle kullanıldığında % 1.5 ila % 5.25 NaOCl'den daha etkili bir dezenfektan olduğu gösterilmiştir (172). Gomes ve ark. (325), *in vitro* çalışmalarında % 2 CHX jeli ile karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  'nin, steril suyla karıştırılan  $\text{Ca(OH)}_2$  'den daha iyi antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Klinik bir çalışmada, Siqueira ve ark. (347),  $\text{Ca(OH)}_2$  / CHX jeli ile 7 günlük kanal içi medikament uygulamasının, negatif kültür veren kök kanallarının sayısını artırabileceğini göstermiştir. Başka bir randomize klinik çalışma  $\text{Ca(OH)}_2$ , % 2 CHX jeli ve  $\text{Ca(OH)}_2$  / % 2 CHX jelin antibakteriyel etkinliğinin kanal içi medikament olarak kullanıldığında benzer olduğunu iddia etmektedir (155).

Bu çalışmada CHX jelin dezenfeksiyon etkisi KLTM ve kültür yöntemleri ile değerlendirilmiştir. 1 günlük CHX jel uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %38,27, ölü bakteri sayısı ortalama %61,73 tür. 7 günlük CHX jel uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %27,19 dur. Ölü bakteri sayısı ortalama %72,81 dir. Çalışmamızın sonuçları %2 CHX jelin dezenfeksiyon kapasitesini bildiren diğer çalışmalarla paralellik göstermektedir.

#### *Gümüş nanopartikülü*

%10  $\text{Ca(OH)}_2$  patı içerisine 70 nm boyutlarında 200 ppm AgNP solüsyonu ilavesinin *E.faecalis* üzerinde etkisinin değerlendirildiği araştırmada; bu karışımın 1 günlük uygulanmasında bile antibakteriyel başarısı dikkat çekicidir (348). Önceki çalışmalarda  $\text{Ca(OH)}_2$  in antibakteriyel etkinliği için en az 1 hafta süreye ihtiyaç duyulacağı işaret edilirken (300, 349), AgNP ile karıştırıldığında kısa dönem intrakanal medikament olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (348).

Afkhami ve ark. (350); 1:1 oranında %30 Ca(OH)<sub>2</sub> patı ile %2 CHX jel karışımının antibakteriyel etkinliğini, 1:1 oranında %30 Ca(OH)<sub>2</sub> patı ile 100 ppm 20 nm AgNP karışımı ile karşılaştırmış ve 1 hafta sonunda AgNP içeren karışımın *E.faecalis* karşı en etkili medikament olduğunu bildirmişlerdir. Ancak 1 aylık uygulama süresi sonunda medikamentler arasındaki bu farklılık ortadan kalkmıştır.

Wu ve ark. (263) gümüş nanopartiküllerini irrigasyon solüsyonu ve kanal medikamenti olarak kullanmışlardır. %0,2 lik AgNP solüsyonu, %2 NaOCl ve steril salin *E.faecalis* biyofilmini uzaklaştırması için irrigasyon solüsyonu olarak 2 dk süre ile test edilmiştir. %0,2 AgNP ile irrije edilen örneklerde *E.faecalis* biyofilmi bozulmamıştır. Biyofilme gözlenebilen bakteri miktarı salin ile irrije edilen gruptan farklı değildir. Çalışmanın 2. aşamasında biyofilm üzerinde %0,01 ve %0,02 AgNP jel ve Ca(OH)<sub>2</sub> 7 gün bekletilmiştir. %0,02 AgNP jel ile 7 gün bekletilen örneklerde biyofilm bozulmuş, gözlenebilen bakteri sayısı %0,01 AgNP jel ya da Ca(OH) ile bekletilen gruplardan daha az olmuştur. Çalışmanın sonuçlarına göre, AgNP irrigasyon solüsyonu olarak değil, kanal medikamenti olarak daha etkilidir.

Samiei ve ark. (351) 2014 yılında yaptıkları çalışmada kök kanallarının dezenfeksiyonunda gümüş nanopartikülleri içeren çapraz bağlı hidrojel nanokompozitinin , %2.5 NaOCl solüsyonunun ve %2 CHX solüsyonunun antibakteriyel etkinliğini karşılaştırmışlardır. Kontrol grubu olarak gümüş nanopartikülü içermeyen çapraz bağlı hidrojel kullanılmıştır. *E.faecalis* ile enfekte edilen ilk grupta %2.5 NaOCl ve %2 CHX ile bakteriyel eliminasyon tam olarak sağlanırken gümüş nanopartikülleri içeren çapraz bağlı hidrojel nanokompoziti ve kontrol grubunda tam eliminasyon sağlanamamıştır. Fakat *E.faecalis* ile ikinci kere enfekte edilen kanallarda gümüş nanopartikülleri içeren çapraz bağlı hidrojel nanokompoziti , %2.5 NaOCl ve %2 CHX solüsyonuna göre çok daha iyi bakteriyel eliminasyon sağlamıştır. Gümüş nanopartikülleri içeren çapraz bağlı hidrojel nanokompozitinin antibakteriyel etkinliğini, düşük toksisite göstererek ve tekrar enfekte edilen kanallarda NaOCl ve CHX ile karşılaştırıldığında daha iyi koruduğu bildirilmiştir.

Mineral trioksit agregat (MTA) ın antibakteriyel etkisinin sınırlı olduğu, CHX eklenerek bu etkinin artırılacağı fakat bu şekilde de MTA'nın

biyoyumluluğunun ve basınç dayanımının azalabileceği bilinmektedir (352). Samiei ve ark. (353) MTA'nın AgNP eklendiğinde *E.faecalis*, *P.aeruginosa*, *S.aureus* ve *C.albicans* üzerindeki antibakteriyel etkisinde oluşabilecek değişimi araştırmışlardır. Bu çalışmada %1 oranında AgNP eklenmiş MTA'nın *E.faecalis*, ve *P.aeruginosa* antibakteriyel etkinliğinin anlamlı derece arttığını fakat *S.aureus*'e karşı antibakteriyel etkinliğinin değişmediği bildirilmiştir. MTA'nın iyi antifungal özellikleri olduğu ve AgNP ilave edilmiş MTA'nın *C.albicans* a karşı antifungal etkisinin arttığı gösterilmiştir.

*E.faecalis* in 4 hafta süre ile inkübe edilmesi ile oluşturulan biyofilmin uzaklaştırılmasını diyot lazer; ortalama 30 nm 100 ppm AgNP süspansiyonu; fotodinamik tedavi ile birlikte diyot lazer; fotodinamik tedavi ile birlikte diyot lazer ve AgNP; ve %2,5 NaOCl kültür yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Fotodinamik tedavi ile birlikte diyot lazer ve AgNP nin birlikte uygulandığı örneklerde en iyi bakteriyel eliminasyon sağlanmasına karşın yöntemler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (354).

Bo ve ark. (355) *E.faecalis* biyofilmi üzerinde %0,05 AgNP jel, %0,1 AgNP jel %0,2 AgNP jel, CHX, CMCP ve salinin 24 saatlik uygulanması sonucu oluşan antibakteriyel etkiyi KLTM ile incelemişlerdir. %0,1 ve %0,2 AgNP jel in CHX ve CMCP den istatistiksel olarak anlamlı derecede daha etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Mozayeni ve ark. (356) Ca(OH)<sub>2</sub>, %2 CHX jel, üçlü antibiyotik patı ve AgNP jelin *E.faecalis* biyofilmi üzerindeki etkilerini değerlendirdikleri çalışmalarında kağıt koni ve gates glidden frezler ile örnek almışlar ve bakteri sayımlarını gerçekleştirmişlerdir. CHX jel ve üçlü antibiyotik patı etkili şekilde dezenfeksiyon sağlayabilirken Ca(OH)<sub>2</sub> patı, AgNP jel ve salinin *E.faecalis* biyofilmine etkili olamadığı görülmüştür.

Lotfi ve ark. *E.faecalis* biyofilmine AgNP, %2 CHX ve %5,25 NaOCl nin antibakteriyel etkilerini karşılaştırmışlardır. AgNP ile benzer antibakteriyel etkiyi gösterebilmesi için NaOCl nin 70 kat daha yoğun olması gerektiğini göstermişlerdir. Çalışmanın sonuçları, AgNP nin çok daha düşük konsantrasyonlarda bile %5,25 NaOCl ye benzer antibakteriyel etkiye sahip olduğuna dikkat çekmektedir (357).

Rodrigues ve ark. (358) sığır dentin bloklarında 21 gün inkübasyon ile oluşturdukları *E.faecalis* biyofilmine 94 ppm AgNP solüsyonu, %2,5 NaOCl ve %2 CHX nin antibakteriyel etkisini 5,15 ve 30. dk uygulama süresi sonunda KLTM ile incelemiştir. AgNP solüsyonunun daha az bakteriyi uzaklaştırdığını ancak CHX ile kıyaslandığında biyofilmi daha iyi bozduğunu bildirmişlerdir. NaOCl en iyi antibakteriyel etkiyi gösteren ve biyofilmi en iyi bozan irrigasyon solüsyonu olmuştur. Rutin endodontik prosedürlerde kullanılmak üzere AgNP nin irrigasyon solüsyonu olarak etkili bir antibakteriyel ajan olmadığı gösterilmiştir.

Monteiro ve ark. (359) AgNP nin, dental stomatitlerin en önemli etkenlerinden biri olan *Candida albicans* üzerindeki antifungal etkisini araştırmışlar ve nistatin ya da CHX ile kombine olarak AgNP kullanıldığında *Candida albicans* biyofilmini bozabileceğini ve stomatit tedavisinde umut verici yeni bir yöntem olabileceğini bildirmişlerdir.

Ertem ve ark. (298) pöröz silika ile kapladıkları AgNP yi, kök kanallarının yeniden enfeksiyonunu engellemek için uzun dönem antibakteriyel etki göstermesi amacıyla irrigasyon solüsyonları ile karıştırmışlardır. Pöröz silika kaplı AgNP nin karışımlarının tek ve çok türlü biyofilme daha iyi antibakteriyel etki gösterdiği bildirilmiştir. Silika kaplı AgNP ile hazırlanmış bu karışımların geleneksel irrigasyon solüsyonlarına göre daha az sitotoksik olduğu bildirilmiştir.

Daha önceki bir çok çalışmada özellikle düşük dozda kullanılan gümüş partiküllerinin hafif bir doku reaksiyonu oluşturduğu bildirilmiştir (360). Ancak, Gomes-Filho ve ark. (361) 2 farklı AgNP konsantrasyonunun (23ppm ve 47 ppm) oluşturduğu doku reaksiyonu seviyesini, %2,5 NaOCl ve solüsyon uygulanmayan kontrol grubuyla karşılaştırılmışlardır. 15. günde NaOCl nin oluşturduğu doku reaksiyonu ile 23 ppm AgNP nin oluşturduğu doku reaksiyonu; 30. günde 47 ppm AgNP ve %2,5 NaOCl nin oluşturduğu doku reaksiyonu benzer bulunmuştur. Özellikle düşük konsantrasyonlarda AgNP dispersiyonunun, irrigasyon solüsyonu olarak ortalama doku reaksiyonu oluşturması önemlidir.

Ökaryotik hücreler için gümüş iyonlarının toksik konsantrasyonları yaklaşık 1-10 mg/L ve AgNP' ler için 10-100 mg/L'dir (362). Araştırmalar, spesifik antibakteriyel aktiviteye ve konakçı hücrelere daha düşük sitotoksositeye sahip

AgNP'lerin modifikasyonuna ve geliştirilmesine yöneliktir. AgNP'lerin büyüklüğü ve yapısı dışında, biyolojik ortamda proteinlerin varlığının, nanopartiküllerin hücrelere olan etkileşimini ve toksisitesini büyük ölçüde etkilediği gösterilmiştir (220).

Zand ve ark. (363) %1 AgNP eklenmiş ve eklenmemiş MTA'nın rat subkütanöz dokusundaki enflamasyon cevabını *in vivo* olarak karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada MTA ve AgNP içeren MTA arasında 7,15,30,60 ve 90. günlerdeki oluşturdukları enflamasyonda istatistiksel açıdan farklılık gözlenmemiştir.

Takamiya ve ark. (364) 2 farklı stabilize edici ajan (amonyak ve polivinilprolidon) ile sentezlenmiş AgNP'nin (SNA ve SNP) fare fibroblast hücresine olan etkilerini ve Wistar ratlarına implante edildiğinde oluşan enflamasyon cevabını incelemiştir. Önceki çalışmalarda AgNP'nin doz bağımlı olarak toksikolojik cevap oluşturabildiği, morfolojik anormallikleri indükleyebildiği, mitokondriyal solunum zincirinde bozulmaya yol açabildiği, DNA hasarı ve apoptoza neden olabildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada sentezlenen AgNP'lerin konsantrasyon bağımlı olarak fibroblast hücre görünürlüğüne etkileyebildiği gösterilmiştir. SNA, SNP'den daha fazla toksik etki oluşturmuştur. SNA ve SNP 1 mikrogram/mL oranında hazırlandığında ratların subkütanöz dokularındaki enflamasyon cevabını indüklememişlerdir. Bu sonuçlara dayanarak SNA ve SNP'nin düşük dozlarda biyouyumlu olduğu fakat daha fazla *in vivo* araştırmaya ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

AgNP'nin endodontik tedavide antibakteriyel ajan olarak kullanılmasındaki en önemli diğer dezavantaj dentin renklenmesine neden olmasıdır. Afkhami ve ark. (365) 2017 yılında yaptıkları çalışmada Ca(OH)<sub>2</sub> patı, 100 ppm 20 nm AgNP solüsyonu ile karıştırılmış Ca(OH)<sub>2</sub> patı ya da salini 3 ay süre ile dentin bloklarına uygulamışlardır. 3 ay sonunda renk değişimini spektrofotometre ile değerlendirmişlerdir. AgNP ve Ca(OH)<sub>2</sub> karışımının dentinde oluşturduğu renk değişiminin, Ca(OH)<sub>2</sub>'in tek başına oluşturduğu renk değişiminden istatistiksel olarak anlamlı derecede farklı olmadığı bildirilmiştir. Endodontik tedavi için kullanılacak medikamentlerin sadece kanal boşluğu ile sınırlı olması gerektiği, mine sement sınırının koronal yönde aşılması gerektiği, protetik ve restoratif

uygulamalardan önce pulpa odasındaki medikamentlerin mutlaka temizlenmesi gerektiği yeniden vurgulanmıştır.

Geçmiş yıllarda antibakteriyel etkinlik çalışmalarında farklı büyüklüklerde AgNP ler kullanılmıştır. Afkhami ve ark. (350) ortalama 20 nm büyüklüğünde AgNP kullanırken, Javidi ve ark. (348) ortalama 70nm büyüklüğünde AgNP kullanmıştır. Cheng ve ark. (223) çalışmalarında 3nm büyüklüğündeki AgNP nin bulunduğu ortamda iyi derecede disperse olabildiğini ve 2-5 nm büyüklüklerindeki AgNP lerin dentin tübülleri içinde rezidüel kalmış bakterilere ulaşarak antibakteriyel etki gösterebileceğini vurgulamıştır. Morones ve ark. (221) çalışmalarında gram (-) bakterilere yönelik olarak 1-10 nm aralığındaki büyüklükte AgNP lerin en iyi antibakteriyel etkiyi gösterebildiğini bildirmişlerdir. Bakterisidal etkinin büyüklüğe bağımlı olduğunu; daha küçük boyutta olan AgNP lerin bakteri membranına rahatlıkla tutunarak permeability ve respiratuar mekanizmaları bozduğunu, bakterinin içine girebilecekleri için DNA ya tutunarak DNA nın işlevini bozduğunu ve gümüş iyonları saldıklarını bildirmişlerdir. Bu çalışmada antibakteriyel etkiyi ve dentin tübüllerine penetrasyonu arttırabilmek amacıyla 2,5 nm büyüklüğünde 210 ppm derişimde AgNP kullanılmıştır.

Bu çalışmada 1 günlük  $\text{Ca(OH)}_2$ +AgNP uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %28,95, ölü bakteri sayısı ortalama %71,05 tir. 7 günlük uygulama sonrasında canlı bakteri sayısı ortalama %35,12, ölü bakteri sayısı ortalama %64,88 dir.  $\text{Ca(OH)}_2$  e AgNP i eklendiğinde antibakteriyel etkisi istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p<0,01$ ). Bu sonuç,  $\text{Ca(OH)}_2$  in AgNP ile karıştırıldığında antibakteriyel etkisinin arttığını bildiren Javidi ve ark. (348) ve Afkhami ve ark. (350) sonuçları ile benzerlik göstermektedir. AgNP nin potansiyel sitotoksik etkileri ve dentini renklendirmesi ile ilgili daha fazla çalışma yapılarak, AgNP eklenmiş  $\text{Ca(OH)}_2$  in rutin endodontik prosedürlerde kullanılmak üzere kapasitesi değerlendirilmelidir.

Bu çalışmada 1 günlük CHX+AgNP uygulaması sonrası KLTM sonuçlarında canlı bakteri sayısı ortalama %18,96, ölü bakteri sayısı %81,04 tür. Bu uygulama diğer tüm uygulamalardan istatistiksel olarak anlamlı derecede başarılı bulunmuştur. 7 günlük uygulama sonrası canlı bakteri sayısı ortalama %20,72, ölü bakteri sayısı

ortalama %79,28 dir. Daha önce yapılan çalışmalarda CHX ile Ag birlikte kullanıldığında antibakteriyel etki açısından sinerjistik bir etki oluşabileceği bildirilmiştir (366, 367). Çalışmamızın sonuçları da böyle bir etki varlığını desteklemektedir. AgNP ile karıştırılmış CHX, kök kanal tedavisi esnasında ara seans medikamenti olarak antibakteriyel açıdan umut vaatetmektedir. Dentin renklenmesi ve sitotoksosite açısından daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

#### *Biyofilmin değerlendirilmesi*

Endodontide uygulanan bir tedavi aşamasının veya tekniğin kök kanalındaki biyofilm üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla birçok *in vitro* biyofilm modeli geliştirilmiştir. Biyofilmin eliminasyonunu değerlendirirken bir veya bir kaç metod bir arada kullanılabilir (135). Antimikrobisidler uygulanmasından sonra hayatta kalan intrakanal mikroorganizmaların sayısı, kök kanalı örnekleme sonrasında kantitatif olarak bakteriyel kültür yöntemi kullanılarak değerlendirilebilir. Biyofilm, mikroskop kullanılarak doğrudan görsel yöntemlerle de kantitatif veya yarı kantitatif olarak da incelenebilir (126).

Kültür yöntemi: Biyofilmin uzaklaştırılmasının değerlendirildiği 2018 yılına kadar yapılmış çalışmalara bakıldığında bunların %87 sinde mikrobiyal kültür yöntemi tek değerlendirme yöntemi olarak kullanılmıştır (126). Kök kanalından örnek alınması uygulamasının bir takım eksiklikleri vardır. Kök kanalındaki sıvının varlığı, tutunmuş bakterilerin yüzeyden kopmasını sağlayamaz. Dolayısıyla kağıt koniler, örnekleme sıvısında yüzen, sadece bağlı olmayan bakterileri toplar. Bu yaklaşım, basit kök kanal anatomisi olan dişlerde etkili olabilmesine rağmen, doğruluğu kesin olarak ortaya konulamamıştır. Çünkü, mikrobiyal yükün hangi oranda kanaldan uzaklaştırıldığı açık değildir. Daha karmaşık kök anatomisine sahip dişlerde, aksesuar kanallar gibi ulaşılması güç anatomik bölgelere enstrümanlarla erişilemez ve bu nedenle yeterince iyi örnekleme yapılamaz (329). Ayrıca örnek alınması esnasında tüm kanal yüzeyine temas edildiğinden koronal, orta veya apikal bölge arasında bakteriyel yükün ne kadar azaldığının ayırımı yapmak mümkün olmayacaktır. Diğer taraftan, steril besiyeri hazırlanmasını gerektirdiği için zaman alıcıdır. Kolonilerin gelişmesi için çok fazla işlem adımı gerektirir. Ayrıca, sadece laboratuvar ortamında kültürlenebilen mikroorganizmaların tespit edilmesine izin verir. Bu



yöntem, kültüre edilemeyen mikroorganizmaları da içerebilecek klinik numuneden türetilen bir biyofilmin incelenmesi için uygun değildir (126).

Ayrıca, biyofilm hücrelerinin bir alt popülasyonu görülebilir ancak üretilemez olabilir. Yani, bakteriler, planktonik duruma benzer şekilde düşük bir metabolik aktivite durumunda olabilirler. Tüm bu nedenlerle negatif bir kanal kültürü, steril bir kanalı temsil etmeyebilir (368).

Zhang ve ark. (369) iki farklı irrigasyon sisteminin çok türlü biyofilme yönelik antibakteriyel etkisini gerçek zamanlı PCR ve kültür yöntemi ile değerlendirmişlerdir. Gerçek zamanlı PCR ile yapılan değerlendirmenin kültür yöntemi ile yapılan değerlendirmeye göre çok daha hassas olduğunu, örnekte az sayıda bakteri bulunduğu kültür etmenin çok zor ya da imkansız olabileceğini vurgulamışlardır.

Shen ve ark. (368) farklı büyüme fazlarındaki çok türlü biyofilmde bulunan bakterilerin canlılığını kültür yöntemi ya da KLTM ile değerlendirmişlerdir. Çok türlü biyofilm 3 hafta boyunca haftada bir besiyeri değiştirilerek (faz 1), sonraki 9 hafta boyunca hiç besiyeri eklenmeden (faz 2: açlık) ve son olarak 4 hafta boyunca tekrar besiyeri eklenip reaktivasyon yapılarak kültür ve KLTM ile incelenmiştir. Besin azlığında bakterilerin VBNC fazında bulunabildiğini, tekrar besin eklendiğinde ise bakterilerin kültüre edilebilir safhaya geçiş yapabildiğini göstermişlerdir. Özellikle uzun dönem açlık periodunda daha çok VBNC fazında bulunan bakteriler KLTM ile %75 canlı olarak tespit edilebilirken, aynı örneklerin kültürlerinde bakteriler %0,01 oranında canlılık göstermiştir. Endodontik mikrobiyoloji çalışmalarında antibakteriyel etkinlik karşılaştırmasının klinik koşullara daha yakın sonuçlar verebilmesi ve biyofilm bakterilerinin gerçek canlılığının daha iyi yansıtılabilmesi için canlılık boyalarının kullanıldığı KLTM çalışmalarının, kültür yöntemine tercih edilebileceği konusuna dikkat çekmişlerdir.

Kishen ve ark. (370) *E.faecalis* üzerine antimikrobiyal fotodinamik inaktivasyonun artırılmasında effluks pompa inhibitörlerini kullandıkları çalışmalarında etkiyi planktonik bakteriler, biyofilmden kaynaklı bakteriler ve biyofilm bakterileri üzerinde kültür yöntemi ve KLTM kullanarak ayrı ayrı incelemişlerdir. Planktonik kültürlerin antimikrobiyal testler için kullanımının,

genellikle klinik bulgularla bağdaşmayan oldukça iyi antimikrobiyal sonuçlar verdiğini bildirmişlerdir. Biyofilmin değerlendirildiği KLTM sonuçlarında antimikrobiyal başarı daha düşük bulunmuştur.

Shrestha ve ark. (371) kitosan ve çinko oksit nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliklerini iki farklı *E.faecalis* izolatında değerlendirdikleri çalışmalarında kültür ve KLTM yöntemlerini birlikte kullanmışlardır. Kültür sonuçlarında kitosan nanopartikülleri ile muamele edilen grupta 8-10 saat sonra, çinko oksit nanopartikülü ile muamele edilen grupta 12 saat sonra total bakteri eliminasyonu gözlenmiştir. Fakat KLTM sonuçlarında hiç bir örnekte tam eliminasyon gözlenememiştir. Özellikle biyofilmin antibakteriyellerden daha uzak kalan derin katmanlarında canlı bakteri varlığı bildirilmiştir.

Çalışmamızda kültür sonuçlarına göre hem 1, hem de 7 gün süre ile antibakteriyel uygulaması sonucu  $Ca(OH)_2+AgNP$ ,  $CHX+AgNP$ ,  $CHX$  gruplarında hiç bakteri üremesi gerçekleşmeyen örnekler bulunmaktadır. Fakat KLTM sonuçlarında taranan örneklerin hepsinde canlı bakteri varlığı tespit edilmiştir. Shrestha ve ark. (371) nin çalışmalarına benzer şekilde KLTM ile yapılan 3 boyutlu analizde, canlı bakterilerin özellikle biyofilmin antibakteriyellerle temas etmeyen derin tabakalarında buldukları gözlenmiştir. Çalışmamız, kültür yöntemi ile tespit edilemeyen canlı bakterilerin canlılık boyaları ile boyanarak KLTM ile değerlendirilebileceğini Shrestha ve ark. (371) ve Shenve ark. (368) in çalışmalarında olduğu gibi kanıtlamıştır.

Konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM): Yapılan literatür taramasında son yıllarda yapılan endodontik antibakteriyel etkinlik çalışmalarında sahip olduğu avantajlar nedeniyle kültür yönteminin yanısıra KLTM nin de sıklıkla kullanılmaya başlandığı görülmüştür (Tablo 7).

Schaudinn ve ark. (135) endodontik biyofilmi görüntülemek için kombine olarak SEM, KLTM ve FISH yöntemlerini kullanmışlardır. Başarısız olmuş kök kanal tedavisi sebebiyle çekilmiş dişler SEM de değerlendirilmiştir. SEM mikrograflarında kök kanallarının amorf matris ile kaplı olduğunu, çok az bölgede bakterilerin gözlenebildiğini bildirmişlerdir. Amorf matrisin bakteriden yoğun bir biyofilm tabakası ya da alttaki hücrelere ait steril bir ürün olup olmadığını anlamak

için örnekler EUB338 etiketlendikten sonra KLTM ve FISH ile incelenmiştir. KLTM de amorf matris kaplı alanlarda yoğun floresan ışığa gerçekleşmiştir. FISH incelemesi de amorf matris kaplı alanlardaki bakteri varlığını doğrulamıştır. Gelişmiş bir ışık mikroskobu olan KLTM nin, SEM in (örneğe invaziv uygulamalar yapılması, biyofilm içine gömülü kalmış bakterilerin ayırt edilememesi, vb.) kısıtlılıklarını ortadan kaldırmada etkili bir yöntem olabileceğini ve yöntemlerin kombine kullanımlarının tek başlarına kullanıma göre avantajlı olduğunu bildirmişlerdir.

Nagayoshi ve ark. (372) geleneksel floresans mikroskobu kullanılarak dentin tübüllerinde bakteri canlılığının kontrol edilebildiğini göstermişlerdir. Ancak odak dışı düzlemlerden kaynaklanan arka plan bulanıklığı kontrastı azalttığından tek tek hücrelerin, boyanın ya da artefakların ayırt edilmesini zorlaştırdığını bildirmişlerdir. Ayrıca, geleneksel floresan mikroskobu, dentin örneklerinin demineralizasyonunu gerektirdiğinden dentin tübüllerinde bakteri dağılımını görselleştirmek için en iyi yöntem değildir.

Zapata ve ark. (373) çalışmalarında, enfekte dentindeki *E.faecalis* in görüntülenmesinde KLTM nin uygun bir yöntem olduğunu bildirmişlerdir. Kültüre edilemeyen safhadaki rezidüel bakterilerin ve dentin tübüllerinin derinliklerine yerleşmiş bakterilerin etkili şekilde saptanmasında KLTM kullanımının gerekli olduğunu göstermişlerdir.

Ma ve ark. (374) dentin dezenfeksiyonunun etkinliğini saptamak için KLTM çalışmalarında kullanılmak üzere, yeni bir non invaziv metod geliştirmişlerdir. Uzun süreli inkübasyon periyotlarından sonra bile bakterilerin dentin tübüllerinin derinliklerine iyi derecede invaze olamadığı bilinmektedir. Bu çalışmada klinik koşulların daha iyi taklit edilebilmesi için, dentine invazyon santrifüj ile arttırılmıştır. Daha sonra dentin blokları uzunlamasına bölünerek antibakteriyellerin dentin tübülü içindeki bakterilere etkisi KLTM ile incelenmiştir. Tübüllerin yüzeylerinde ölü bakteriler daha sıklıkla gözlenebilirken, derinlere inildikçe canlı bakteri miktarının arttığı görülmüştür (257). KLTM sadece yüzeydeki bakterileri değil, dentin tübüllerine penetre olmuş bakterileri de saptayabildiğinden, uygulanan antibakteriyel ajanın tübül içindeki dezenfeksiyon etkisi hakkında yorum yapılabilmesine olanak sağlar. Çalışmamızda dentin bloklarının enfekte edilmesinde santrifüj yapılmasına

rağmen, dentin blokları uzunlamasına bölünerek incelenmediğinden gümüş nanopartikülü ile karıştırılmış geleneksel dezenfektanların dentin tübüllerinin derinliklerindeki antibakteriyel etkisini bilememekteyiz. Yapılacak yeni çalışmalarla oldukça küçük boyutlardaki AgNP lerin dentin tübüllerine invazyonu ve antibakteriyel etkisi değerlendirilebilir.

Bukhari ve ark. (375) demiroksit nanopartiküllerinin antibakteriyel etkinliğini *E.faecalis* biyofilmi üzerinde KLTM ile incelemişlerdir. Örnekleri iç-orta-dış bölge olarak ayrı ayrı değerlendirip, nanopartiküllerin dentin tübüllerinin derin katmanlarındaki antibakteriyel etkinliğini irdelemişlerdir. Özellikle orta ve iç bölgede demiroksit nanopartikülü ile karıştırılmış hidrojen peroksitin antibakteriyel etkisinin geleneksel irrigasyon ajanlarına kıyasla daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. KLTM ile nanoboyuttaki bu partiküllerin dentinin derin katmanlarındaki etkisi değerlendirilebilmiştir. Özellikle dentine invaze olabilen nanoboyuttaki materyallerin dezenfeksiyon etkisinin saptanmasında klasik kültür metodlarının, biyofilmin uzaysal durumunu belirlemede yetersiz olmasından dolayı tercih edilmediği vurgulanmıştır.

Perochena ve ark. (240)  $\text{Ca(OH)}_2$  e kitosan nanopartikülü ya da propolis ekleyerek tek ve çok türlü biyofilmlere yönelik antibakteriyel etkinlik karşılaştırmasını KLTM ve kültür yöntemlerini kombine kullanarak değerlendirmişlerdir. Çalışmamıza benzer şekilde,  $\text{Ca(OH)}_2$  in tek başına antibakteriyel etkinliği kültür yöntemi ile irdelendiğinde başarılı bulunmasına rağmen, KLTM sonuçlarında iyi bakteriyel eliminasyon sağlayamadığı gösterilmiştir.  $\text{Ca(OH)}_2$  e kitosan nanopartikülü eklendiğinde antibakteriyel etkinliği artmıştır.

Bu çalışmada geleneksel antibakteriyel medikamentlerin ve onlara AgNP karıştırılmasının çok türlü biyofilm üzerindeki etkinlikleri hem kültür hem de KLTM yöntemleri ile değerlendirmiştir. 1. gün KLTM sonuçlarında tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark ( $p<0,01$ ) saptanabilirken, kültür sonuçlarında  $\text{Ca(OH)}_2$  +AgNP, CHX, CHX+AgNP grupları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı çıkmamıştır. Bu durum, kültür yöntemi uygulanırken örnekleme sıvısındaki planktonik bakterilerin sayılması, KLTM de ise biyofilm içerisindeki canlı/ölü bakterilerin direk olarak sayılması ile açıklanabilir. Ayrıca, KLTM ile kültüre edilemeyen ancak canlı fazdaki bakterilerin de görüntülenebiliyor olması

medikamentlerin daha hassas bir şekilde karşılaştırılabilmesine olanak tanımaktadır. Tüm bu nedenlerden dolayı biyofilm eliminasyonun KLTM ile değerlendirilmesi daha hassas sonuçlar verdiği için antibakteriyel ajanların etkinliği ile ilgili olarak daha doğru yorumlar yapılabilmesine olanak sağlar.



**Tablo 7.** Son 5 yıl içinde endodonti alanında yapılmış bazı antibakteriyel etkinlik çalışmaları

Araştırmacı	Yıl	Biyofilm tipi- İnkübasyon süresi	Biyofilm Substrat	Antimikrobiyal ajan	Değerlendirme Yöntemi
Javidi ve ark. (348)	2014	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 21 gün	İnsan dentin bloğu	AgNP ile karıştırılmış Ca(OH) <sub>2</sub>	Kültür
Bo ve ark. (355)	2014	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 1 gün	Polistren plak	AgNP jel, CHX, CMCP	Metil tiazol tetrazolium (MTT) test KLTM
Wu ve ark. (263)	2014	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 4 hafta	İnsan dentin bloğu	AgNP solüsyon, NaOCl, AgNP jel ve Ca(OH) <sub>2</sub>	SEM KLTM
Shrestha ve ark. (289)	2014	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> ) ve çok türü ( <i>P.intermedia</i> , <i>A.naeslundii</i> , <i>S.oralis</i> )-21 gün	İnsan dentin bloğu	Kitosan NP ve fotodinamik terapi	KLTM
Mozayeni ve ark. (356)	2014	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )	İnsan dentin bloğu	AgNP jel, Ca(OH) <sub>2</sub> ve CHX jel	Kültür
Albuquerque ve ark. (216)	2015	Tek türü ( <i>A.naeslundii</i> )- 7gün	İnsan dentin bloğu	Üçlü antibiyotik patı (TAP), TAP içerikli fiber	KLTM
Fan ve ark. (376)	2015	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )	İnsan dentin bloğu	Ag yüklü mezopöröz biyoaktif cam, Ca(OH) <sub>2</sub>	SEM KLTM
Afkhami ve ark. (350)	2015	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 21 gün	İnsan dentin bloğu	AgNP + Ca(OH) <sub>2</sub> , CHX ve Ca(OH) <sub>2</sub>	Kültür
Ruiz-Linares ve ark. (255)	2015	Çok türü biyofilm (apikal peridontitisi dişlerden)- 3 hafta	İnsan dentin bloğu	NaOCl, CHX, Alexidin, Cetrimid	KLTM
Afkhami ve ark. (354)	2016	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 4 hafta	İnsan dentin bloğu	AgNP, fotodinamik terapi, diyet lazer, lazer aktive NP	Kültür
González- Luna ve ark (377)	2016	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 3 gün	İnsan dentin bloğu	AgNP, NaOCl, EDTA	Sıvı mikrodilüsyon testi
Albuquerque ve ark. (256)	2017	Çok türü biyofilm ( <i>A.naeslundii</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>S.sanguinis</i> )- 7 gün	İnsan dentin bloğu	TAP, TAP içerikli fiber	KLTM
Bukhari ve ark. (375)	2017	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )- 3 hafta	İnsan dentin bloğu	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ve demiroksit NP	KLTM

Perochena ve ark. (240)	2017	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )-21 gün ve çok türü (intraoral ortodontik aperey ile) biyofilm-2 gün	İnsan dentin bloğu	Kitosan NP, propolis ile karıştırılmış Ca(OH) <sub>2</sub>	Kültür KLTM
Hoedke ve ark. (378)	2017	Çok türü biyofilm ( <i>E.faecalis</i> , <i>S.oralis</i> , <i>P.intermedia</i> )-4 gün	İnsan dentin bloğu	Fotodinamik terapi, NaOCl ve CHX	Kültür
Ertem ve ark. (298)	2017	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> ) ve çok türü biyofilm ( <i>F.nucleatum</i> , <i>A. naeslundii</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S.sanguinis</i> , <i>S.sobrinus</i> )-10 gün	HA diskler ve insan dentin bloğu	Poröz silika kaplı AgNP ve NaOCl, EDTA kombinasyonları	Kültür
Zhou ve ark. (379)	2017	Tek türü ( <i>S.aureus</i> - <i>E.coli</i> )-1 gün	Poliüre-tan film	AgNP ya da CHX asetat ile kombine edilmiş PLLA mikrokapsülleri	Kültür
De Meyer ve ark. (245)	2017	İki türü ( <i>E. faecalis</i> ve <i>S.mutans</i> )-2 gün	Yapay kök kanalı-rezin	Lazer –Ultrasonik aktivasyon, NaOCl	Kültür
Wang ve ark. (380)	2018	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> ) –1 hafta ve çok türü biyofilm (dental plak)-1 hafta	İnsan dentin bloğu	DJK-5 peptidi, EDTA, NaOCl	KLTM
Rodrigues ve ark. (358)	2018	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )-21 gün	Sığır dentin bloğu	AgNP, NaOCl, CHX	KLTM
Reum Kim ve ark. (296)	2019	Çok türü biyofilm ( <i>A.naeslundii</i> , <i>E.faecalis</i> , <i>S.mutans</i> <i>L.salivarius</i> )-5 gün	İnsan dentin bloğu	LTA, CHX, Ca(OH) <sub>2</sub>	KLTM
Oda ve ark. (381)	2019	Tek türü ( <i>E.faecalis</i> )-21 gün	Sığır dentin bloğu	LED ışık, curcumin, carbopol gel	KLTM

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dâhilinde elde edilen sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur.

1. *E.faecalis*, *S.mutans*, *L.acidophilus*, *A.naeslundii* bakterileri 7 gün süre ile uygun koşullarda inkübe edildiğinde insan dentin bloğu üzerinde dentin yüzeyinin tamamını kaplayan, ekstraselüler matriks içine gömülü yoğun bakteri toplulukları içeren çok türlü biyofilm oluşmaktadır.
2. Deneyde kullanılan hiç bir medikament 1 günlük ya da 7 günlük uygulama süresi sonunda dentin bloğunda tam bakteri eliminasyonu sağlayamamaktadır.
3. Geleneksel medikamentler olan  $\text{Ca(OH)}_2$  ya da CHX nin AgNP ile karıştırılarak uygulanması, medikamentlerin antibakteriyel etkinliğini hem 1. hem de 7.günde arttırmıştır.
4. CHX+AgNP karışımı 1 günlük ve 7 günlük uygulama süresi sonunda en başarılı antibakteriyel etkiyi göstermiştir.
5. Deneyde kullanılan medikamentler arasında  $\text{Ca(OH)}_2$  1 günlük ve 7 günlük uygulama süresi sonunda en başarısız antibakteriyel etkiyi göstermiştir.
6. Tüm uygulama zamanlarında CHX,  $\text{Ca(OH)}_2$  den daha başarılı antibakteriyel etki göstermiştir.
7. KLTM sonuçlarına göre deneyde kullanılan medikamentlerin uygulama süresinin arttırılması (1, 7 gün) antibakteriyel etkinliklerinde artışı sağlamamıştır.
8. Kültür sonuçlarına göre deneyde kullanılan medikamentlerin uygulama süresinin arttırılması (1, 7 gün) antibakteriyel etkinliklerinde artışı sağlamıştır.
9. 1 ve 7 günlük uygulama süreleri sonunda; deneyde kullanılan medikamentler arasındaki farklılığı belirlemede kültür yöntemi KLTM yönteminden yetersizdir.
10.  $\text{Ca(OH)}_2$ +AgNP, CHX+Ag, CHX uygulanan dentin bloklarında hem 1. hem de 7. gün sonunda kültür yönteminde hiç bakteri üremesi görülmeyen örnekler mevcutken, aynı örnekler KLTM ile değerlendirildiğinde tüm örneklerde canlı bakteri tespit edilmiştir. Kültür yöntemi canlı bakterilerin tespit edilmesinde KLTM yönteminden yetersizdir.



11. Geleneksel dezenfektanlarla karıştırılan AgNP nin uygulandığı örneklerde farklı derecelerde renklenme meydana gelmiştir. Klinik uygulamalarda kullanımı öncesi AgNP nin oluşturduğu dentin renklenmesi ve memeli hücrelerine oluşturabileceği potansiyel toksik etkisi ile ilgili daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.



## 7.ÖZET

### **Gümüş Nanopartikülü İlave Edilmiş Kanal İçi Medikamentlerin Çok Türü Biyofilm Üzerine Antibakteriyel Etkinliklerinin Karşılaştırılması- *ex vivo* Çalışma**

**Amaç:** Kalsiyum hidroksit ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) veya klorheksidin jel (CHX) ile karıştırılmış gümüş nanopartiküllerin (AgNP) kök kanal dentini üzerindeki çok türlü biyofilm üzerine antibakteriyel etkisini konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM) ve kültür yöntemleri ile araştırmak.

**Yöntemler:** Dentin blokları *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* ve *Actinomyces naeslundii* den oluşan bakteriyel süspansiyonun dentin tübüllerine santrifüjlenmesi yoluyla inokule edildi. Bir haftalık inkübasyon süresi sonunda 50 enfekte dentin bloğu uygulanacak medikamentlere göre: salin solüsyonu (SS),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Ultracal XS Ultradent),  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +AgNP (Nanografi) (1:1), 2% CHX jel (Glucio-Chex Cercamed) ve 2% CHX jel+AgNP (1:1) ve uygulama süresine göre: 1 ve 7 gün olarak rastgele ayrıldı (n=5). Kök kanalı yüzeyinde bakteri miktarını ölçmek için medikament uygulaması öncesi ve sonrasında bakteri örnekleri steril kağıt konlar ile toplandı. Biyofilm eliminasyonu Live / Dead BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti boyası ve KLTM ile kantitatif olarak analiz edildi. Tüm görüntüler, canlı bakterilerin yüzdesini ölçmek için ImageJ yazılımı kullanılarak incelendi ve veriler Kruskal-Wallis ve Dunn hoc post testleriyle ( $\alpha = 0.05$ ) istatistiksel olarak analiz edildi. Bakteriyel azalma faktoriyel düzlemde Varyans Analizi (ANOVA) ve Tukey testleri kullanılarak hesaplandı ve analiz edildi ( $\alpha = 0.05$ ).

**Bulgular:** 1 haftalık inkübasyon süresi sonunda dentin bloklarında oluşan yoğun çok türlü biyofilm, taramalı elektron mikroskobu ile görüntülendi. Kültür sonuçları; AgNP'nin CHX veya  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  'e eklenmesinin, her iki medikamentin de bakteriyel azalma ( $P > 0,05$  ve  $P < 0,05$ ) açısından etkinliğini her iki uygulama süresinde de (1 ve 7 gün) arttırdığını ortaya koydu. KLTM görüntüleri, AgNP'nin CHX ile karışımının, kök kanalı yüzeylerinde 1 ve 7 günlük uygulama periyodlarında, diğer

tüm medikamentlerle karşılaştırıldığında önemli ölçüde daha fazla bakteri öldürdüğünü ortaya koydu. 1 günlük uygulama süresi sonunda AgNP ile karıştırılan CHX veya Ca(OH)<sub>2</sub> 'nin etkinliği, tek başına kullanılan CHX veya Ca(OH)<sub>2</sub>'den üstündü (P <0.05). 7 günlük uygulama süresi sonunda bakteriyel canlılık; CHX+AgNP ≤ CHX ≤ Ca(OH)<sub>2</sub>+AgNP < Ca(OH)<sub>2</sub> < SS sırasıyla gerçekleşti.

**Sonuç:** Gümüş nanopartiküllerinin kalsiyum hidroksit veya klorheksidin jel ile karıştırılarak kullanılması, medikamentlerin çok türlü biyofilm üzerindeki antibakteriyel etkinliğini arttırdı. AgNP ve CHX karışımı, özellikle kısa süreli uygulamalarda en etkili medikament oldu.

**Anahtar Kelimeler:** Çok türlü biyofilm, Gümüş nanopartikülü, Kalsiyum hidroksit, Klorheksidin, Konfokal lazer taramalı mikroskop

## ABSTRACT

### **Comparison of Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles Mixed with Intracanal Medicaments on Multispecies Biofilms – An *ex vivo* Study**

**Aim:** To investigate the antibacterial effect of silver nanoparticles (AgNP) mixed with calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>) or chlorhexidine gel (CHX) against a multispecies biofilm on root canal dentin, by confocal laser scanning microscopy (CLSM) and culture-based analysis.

**Methodology:** Dentin blocks were inoculated with *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* and *Actinomyces naeslundii* by centrifugation of the bacterial suspension into the dentinal tubules. After one week of cultivation, fifty infected dentin blocks were randomly divided into groups according to medication; saline solution (SS), Ca(OH)<sub>2</sub> (Ultracal XS Ultradent), Ca(OH)<sub>2</sub>+AgNP (Nanografi) (1:1), 2% CHX gel (Gluco-Chex CerkaMed) and 2% CHX gel+AgNP (1:1) and time of application: 1 and 7 days (all groups, n=5). Samples for bacterial culture were collected with sterile paper points before and after medication to quantify the bacterial load. Biofilm elimination was quantitatively analysed by Live/Dead BacLight Bacterial Viability staining and CLSM. All images were processed using ImageJ software to measure the percentage of viable bacteria and the data were analysed statistically by the Kruskal-Wallis and Dunn post hoc tests ( $\alpha=0.05$ ). The bacterial reduction was calculated and analysed statistically using the factorial Analysis of Variance (ANOVA) and Tukey tests ( $\alpha=0.05$ ).

**Results:** Scanning electron microscope revealed a dense multispecies biofilm on dentin blocks after 1 week of cultivation. Culture-based analysis revealed that the addition of AgNP to CHX and Ca(OH)<sub>2</sub> increased the effectiveness of both medicaments in terms of bacterial reduction ( $P>0,05$  and  $P<0,05$ , respectively) in both application times (1 and 7 day). The CLSM images revealed that mixture of AgNP with CHX killed significantly more bacteria on the root canal surfaces when compared with all other medicaments at 1 and 7 day application periods. The efficacy of CHX or Ca(OH)<sub>2</sub> mixed with AgNP was superior to CHX or Ca(OH)<sub>2</sub>

used alone in 1 day of application ( $P < 0.05$ ). A significant decrease in bacterial viability occurred in the following order:  $\text{CHX} + \text{AgNP} \leq \text{CHX} \leq \text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNP} < \text{Ca(OH)}_2 < \text{SS}$  in 7 day of application.

**Conclusions:** The use of silver nanoparticles as a mixture with calcium hydroxide or chlorhexidine gel increased the medicaments' antibacterial effectiveness on multispecies biofilms. The mixture of AgNP and CHX is the most effective medicament especially in short term applications.

**Keywords:** Calcium hydroxide, Chlorhexidine, Confocal laser scanning microscopy, Multispecies biofilm, Silver nanoparticles

## 8. KAYNAKLAR

1. Siqueira JF Jr. Treatment of Endodontic Infections. Berlin, Germany: Quintessence Publishing, 2011.
2. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CR. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. *Journal of Applied Oral Science*. 2009;17(1):1-7.
3. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial nanoparticles in endodontics: a review. *Journal of endodontics*. 2016;42(10):1417-26.
4. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu H-J, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *Journal of Endodontics*. 1995;21(2):70-3.
5. Siqueira Jr J. Microbiology of apical periodontitis. *Essential endontology*. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard, 2008
6. Pashley DH. Clinical correlations of dentin structure and function. *The Journal of prosthetic dentistry*. 1991;66(6):777-81.
7. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. 1996;7(2):104-33.
8. Ackermans F, Klein J, Frank R. Ultrastructural localization of immunoglobulins in carious human dentine. *Archives of oral biology*. 1981;26(11):879-86.
9. Pashley DH. Dentin-predentin complex and its permeability: physiologic overview. *Journal of Dental Research*. 1985;64 Spec No:613-20.
10. Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *International Endodontic Journal*. 1992;25(1):2-5.
11. Michelich VJ, Schuster GS, Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin in vitro. *Journal of Dental Research*. 1980;59(8):1398-403.
12. Pashley DH. Clinical considerations of microleakage. *Journal of Endodontics*. 1990;16(2):70-7.
13. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps: Umeå University; 1976.
14. Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *Journal of Dental Research*. 1967;46(3):551-3.
15. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *Journal of Endodontics*. 1982;8(9):391-7.
16. Langeland K, Rodrigues H, Dowden W. Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 1974;37(2):257-70.
17. Gier RE, Mitchell DF. Anachoretic effect of pulpitis. *Journal of Dental Research*. 1968;47(4):564-70.
18. Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF, Jr. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral Microbiology and Immunology*. 2007;22(5):320-5.
19. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 2004;97(5):632-41.

20. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of Dental Research*. 2009;88(11):969-81.
21. Alenezi HE. Microbiological analysis of root canal infections using high throughput sequencing on the Illumina MiSeq platform: University of Leeds; 2015.
22. Dobell C. A Collection of Writings by the Father of Protozoology and Bacteriology, Antony Van Leeuwenhoek and His "Little Animals": Dover Publications; 1960.
23. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos*. 1894;36:505-28.
24. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* 1965;20:340-9.
25. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1981;89(6):475-84.
26. Baumgartner JC, Falkler WA, Jr. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *Journal of Endodontics*. 1991;17(8):380-3.
27. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008;46(11):3599-606.
28. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1982;90(2):134-44.
29. Blome B, Braun A, Sobarzo V, Jepsen S. Molecular identification and quantification of bacteria from endodontic infections using real-time polymerase chain reaction. *Oral Microbiology Immunology*. 2008;23(5):384-90.
30. Fouad AF, Barry J, Caimano M, Clawson M, Zhu Q, Carver R, et al. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002;40(9):3223-31.
31. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International Endodontic Journal*. 2003;36(7):500-8.
32. Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *Journal of Endodontics*. 2006;32(1):17-23.
33. Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *International Endodontic Journal*. 2002;35(1):13-21.
34. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*. 1985;18(1):35-40.
35. Chavez de Paz L, Svensater G, Dahlen G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology* 2005;100(2):232-41.
36. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics*. 2004;30(5):315-20.

37. Gilmore MS, Clewell DB. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance: Zondervan; 2002.
38. Ceci M, Delpech G, Sparo M, Mezzina V, Sanchez Bruni S, Baldaccini B. Clinical and microbiological features of bacteremia caused by *Enterococcus faecalis*. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2015;9(11):1195-203.
39. Engstrom B. The significance of Enterococci in root canal treatment. *Odontologisk Revy*. 1964;15:87-105.
40. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*. 1997;30(2):91-5.
41. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research*. 1987;66(8):1375-9.
42. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1985;1(5):170-5.
43. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 1998;85(1):86-93.
44. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994;7(4):462-78.
45. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *Journal of Applied Microbiology*. 2001;91(6):1095-102.
46. Baumgartner JC, Siqueira JF, Jr., Xia T, Rocas IN. Geographical differences in bacteria detected in endodontic infections using polymerase chain reaction. *Journal of Endodontics*. 2004;30(3):141-4.
47. Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *Journal of Endodontics*. 2004;30(4):209-12.
48. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiology Immunology*. 2004;19(2):95-101.
49. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*. 2001;34(5):399-405.
50. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology Immunology*. 2003;18(4):234-9.
51. Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, et al. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001;39(9):3282-9.
52. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. *Enterococcus* spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. *Journal of Endodontics*. 2005;31(12):851-6.
53. Loesche WJ. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiological Reviews*. 1986;50(4):353-80.
54. Beighton D, Russell RR, Hayday H. The isolation and characterization of *Streptococcus mutans* serotype h from dental plaque of monkeys (*Macaca fascicularis*). *Journal of General Microbiology*. 1981;124(2):271-9.



55. Alaluusua S, Myllarniemi S, Kallio M. Streptococcus mutans infection level and caries in a group of 5-year-old children. *Caries Research*. 1989;23(3):190-4.
56. Takahashi N, Yamada T. Acid-induced acid tolerance and acidogenicity of non-mutans streptococci. *Oral Microbiology and Immunology*. 1999;14(1):43-8.
57. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal of Dental Research*. 1981;89(4):321-8.
58. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International Endodontic Journal*. 1998;31(1):1-7.
59. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse Lactobacillus species present in advanced dental caries. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004;42(7):3128-36.
60. Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues in Intestinal Microbiology*. 2007;8(2):44-61.
61. Sundqvist G, Carlsson J. Lactobacilli of infected dental root canals. *Odontologisk Revy*. 1974;25(3):233-8.
62. Naser SM, Dawyndt P, Hoste B, Gevers D, Vandemeulebroecke K, Cleenwerck I, et al. Identification of lactobacilli by pheS and rpoA gene sequence analyses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2007;57(Pt 12):2777-89.
63. Sjöholm B, Bahrami B. Prevalence and Identification of Lactobacillus Species Isolated from Infected Root Canals by MALDI-TOF Mass Spectrometry, 16S rRNA Gene Sequencing and API 50 CHL. 2014.
64. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies*. *Odontologisk Tidskrift*. 1966;74(5):Suppl:1-380.
65. Petrone LR, Sivalingam JJ, Vaccaro AR. Actinomycosis--an unusual case of an uncommon disease. *Journal of the American Board of Family Medicine*. 1999;12(2):158-61.
66. Wilson GS MA. Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. Vol 1. Baltimore: The Williams & Wilkins Co; 1964.
67. Howell A, Jr., Stephan RM, Paul F. Prevalence of Actinomyces israelii, A. naeslundii, Bacterionema matruchotii, and Candida albicans in selected areas of the oral cavity and saliva. *Journal of Dental Research*. 1962;41:1050-9.
68. Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Microbial composition of supra- and subgingival plaque in subjects with adult periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*. 2000;27(10):722-32.
69. Stenhouse D, MacDonald DG. Low grade osteomyelitis of the jaws-with actinomycosis. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1974;3(2):60-4.
70. Silbermann M, Chiminello FJ, Doku HC, Maloney PL. Mandibular actinomycosis: report of case. *Journal of the American Dental Association*. 1975;90(1):162-5.
71. Rud J. Cervicofacial actinomycosis. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 1967;25(3):229-35.
72. Main JH, Macphee IT. Actinomycosis of the Maxilla in Relation to a Periodontal Abscess. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 1964;17:299-304.

73. Oppenheimer S, Miller GS, Knopf K, Blechman H. Periapical actinomycosis. An unusual case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 1978;46(1):101-6.
74. Figdor D, Sjogren U, Sorlin S, Sundqvist G, Nair PN. Pathogenicity of *Actinomyces israelii* and *Arachnia propionica*: experimental infection in guinea pigs and phagocytosis and intracellular killing by human polymorphonuclear leukocytes in vitro. *Oral Microbiology and Immunology*. 1992;7(3):129-36.
75. Behbehani MJ, Jordan HV. Comparative pathogenicity of *Actinomyces* species in mice. *Journal of Medical Microbiology*. 1982;15(4):465-73.
76. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces* species, streptococci, and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infections. *Journal of Endodontics*. 2002;28(3):168-72.
77. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK, Chu FC, Tsang PC, Cheung BP. Direct detection of *Actinomyces* spp. from infected root canals in a Chinese population: a study using PCR-based, oligonucleotide-DNA hybridization technique. *Journal of Dentistry*. 2003;31(8):559-68.
78. Happonen RP. Periapical actinomycosis: a follow-up study of 16 surgically treated cases. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1986;2(5):205-9.
79. Gerencser MA, Slack JM. Serological identification of *Actinomyces* using fluorescent antibody techniques. *Journal of Dental Research*. 1976;55:A184-91.
80. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *Journal of Endodontics*. 2008;34(9):1124-9.
81. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*. 2000;26(12):695-8.
82. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006;44(4):1274-82.
83. Glick M, Trope M, Bagasra O, Pliskin ME. Human immunodeficiency virus infection of fibroblasts of dental pulp in seropositive patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 1991;71(6):733-6.
84. Sabeti M, Simon JH, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus are associated with symptomatic periapical pathosis. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003;18(5):327-8.
85. Sabeti M, Valles Y, Nowzari H, Simon JH, Kermani-Arab V, Slots J. Cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA transcription in endodontic symptomatic lesions. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003;18(2):104-8.
86. de Paz LEC, Marsh PD. Ecology and physiology of root canal microbial biofilm communities. *The Root Canal Biofilm*: Springer; 2015. s. 3-22.
87. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *The Annual Review of Microbiology*. 1995;49:711-45.
88. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999;284(5418):1318-22.
89. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*. 2015;5(1):1-12.
90. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. *Infection and Immunity*. 1986;53(3):616-20.

91. Al-Hashimi I, Levine MJ. Characterization of in vivo salivary-derived enamel pellicle. *Archives of Oral Biology*. 1989;34(4):289-95.
92. Handley PS, Carter PL, Wyatt JE, Hesketh LM. Surface structures (peritrichous fibrils and tufts of fibrils) found on *Streptococcus sanguis* strains may be related to their ability to coaggregate with other oral genera. *Infection and Immunity*. 1985;47(1):217-27.
93. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. *Journal of Dairy Science*. 2001;84(6):1294-309.
94. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Journal of Bacteriology*. 1987;169(7):2995-3000.
95. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 1998;9(1):54-85.
96. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research*. 1997;11(1):24-32.
97. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in Microbiology*. 2003;11(2):94-100.
98. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and Immunity*. 1989;57(10):3194-203.
99. Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and Immunity*. 1995;63(12):4584-8.
100. Kaplan JB. Antibiotic-induced biofilm formation. *The International Journal of Artificial Organs*. 2011;34(9):737-51.
101. Stewart PS. Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling*. 2012;28(2):187-98.
102. Lawrence JR, Korber DR, Hoyle BD, Costerton JW, Caldwell DE. Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of Bacteriology*. 1991;173(20):6558-67.
103. Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. The bacterial glycocalyx in nature and disease. *The Annual Review of Microbiology*. 1981;35:299-324.
104. Sutherland I. Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiology*. 2001;147(Pt 1):3-9.
105. Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'Toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003;426(6964):306-10.
106. Vuong C, Voyich JM, Fischer ER, Braughton KR, Whitney AR, DeLeo FR, et al. Polysaccharide intercellular adhesin (PIA) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cellular Microbiology*. 2004;6(3):269-75.
107. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science*. 2002;295(5559):1487.

108. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, et al. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology*. 2007;153(Pt 7):2083-92.
109. Barnes AM, Ballering KS, Leibman RS, Wells CL, Dunny GM. *Enterococcus faecalis* produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *MBio*. 2012;3(4):e00193-12.
110. Elias S, Banin E. Multi-species biofilms: living with friendly neighbors. *FEMS Microbiology Reviews*. 2012;36(5):990-1004.
111. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*. 2005;13(1):34-40.
112. Clewell DB. Tales of conjugation and sex pheromones: A plasmid and enterococcal odyssey. *Mobile Genetic Elements*. 2011;1(1):38-54.
113. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet*. 2001;358(9276):135-8.
114. Li XZ, Nikaido H. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs*. 2009;69(12):1555-623.
115. Lewis K. Persister cells. *The Annual Review of Microbiology*. 2010;64:357-72.
116. Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006;72(6):3916-23.
117. Kara D, Luppens SB, Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula* in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. *The European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(1):58-63.
118. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic topics*. 2004;9(1):27-36.
119. Adam B, Baillie GS, Douglas LJ. Mixed species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Medical Microbiology*. 2002;51(4):344-9.
120. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics*. 2009;35(4):493-502.
121. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005;43(7):3314-9.
122. Li L, Hsiao WW, Nandakumar R, Barbuto SM, Mongodin EF, Paster BJ, et al. Analyzing endodontic infections by deep coverage pyrosequencing. *Journal of Dental Research*. 2010;89(9):980-4.
123. Sedgley CM, Lee EH, Martin MJ, Flannagan SE. Antibiotic resistance gene transfer between *Streptococcus gordonii* and *Enterococcus faecalis* in root canals of teeth ex vivo. *Journal of Endodontics*. 2008;34(5):570-4.
124. Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections. *Journal of Endodontics*. 2011;37(10):1337-44.

125. Hannig C, Follo M, Hellwig E, Al-Ahmad A. Visualization of adherent micro-organisms using different techniques. *Journal of Medical Microbiology*. 2010;59(Pt 1):1-7.
126. Swimerbergh RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *International Endodontic Journal*. 2019;52(5):604-628
127. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *Journal of Endodontics*. 2010;36(8):1277-88.
128. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning*. 1997;19(5):324-36.
129. Okte E, Sultan N, Dogan B, Asikainen S. Bacterial adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes to titanium implants: SEM evaluation. A preliminary report. *Journal of Periodontology*. 1999;70(11):1376-82.
130. Richardson N, Mordan NJ, Figueiredo JA, Ng YL, Gulabivala K. Microflora in teeth associated with apical periodontitis: a methodological observational study comparing two protocols and three microscopy techniques. *International Endodontic Journal*. 2009;42(10):908-21.
131. Baldasso FE, Sturmer CP, Luisi SB, Petruzzi MN, Scarparo RK, De Figueiredo JA. Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. *Microscopy Research and Technique*. 2012;75(11):1557-63.
132. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1995;11(1):6-9.
133. Lin J, Shen Y, Haapasalo M. A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model. *Journal of Endodontics*. 2013;39(5):658-63.
134. Grundling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *Journal of Endodontics*. 2011;37(8):1128-33.
135. Schaudinn C, Carr G, Gorur A, Jaramillo D, Costerton JW, Webster P. Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/CLSM - SEM). *Journal of Microscopy*. 2009;235(2):124-7.
136. Bridier A, Meylheuc T, Briandet R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron*. 2013;48:65-9.
137. Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS Microbiology Ecology*. 2010;72(1):1-21.
138. Netuschil L, Auschill TM, Sculean A, Arweiler NB. Confusion over live/dead stainings for the detection of vital microorganisms in oral biofilms--which stain is suitable? *BMC Oral Health*. 2014;14:2.
139. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *The Journal of Microbiological Methods*. 2010;82(1):64-70.

140. Watson TF. Fact and artefact in confocal microscopy. *Advances in Dental Research*. 1997;11(4):433-41.
141. Brileya KA, Camilleri LB, Fields MW. 3D-fluorescence in situ hybridization of intact, anaerobic biofilm. *Methods in Molecular Biology*. 2014;1151:189-97.
142. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *Journal of Endodontics*. 2010;36(1):45-52.
143. Brundin M, Figdor D, Roth C, Davies JK, Sundqvist G, Sjogren U. Persistence of dead-cell bacterial DNA in ex vivo root canals and influence of nucleases on DNA decay in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 2010;110(6):789-94.
144. Klein MI, Scott-Anne KM, Gregoire S, Rosalen PL, Koo H. Molecular approaches for viable bacterial population and transcriptional analyses in a rodent model of dental caries. *Molecular Oral Microbiology*. 2012;27(5):350-61.
145. Alvarez G, Gonzalez M, Isabal S, Blanc V, Leon R. Method to quantify live and dead cells in multi-species oral biofilm by real-time PCR with propidium monoazide. *AMB Express*. 2013;3(1):1.
146. Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*. 2007;33(6):690-2.
147. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012;50(5):1721-4.
148. Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, Wittmer A, Schmid M, Karygianni L, et al. Comprehensive analysis of secondary dental root canal infections: a combination of culture and culture-independent approaches reveals new insights. *PLoS One*. 2012;7(11):e49576.
149. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of *Actinomyces* in infections of endodontic origin. *Journal of Endodontics*. 2003;29(9):549-52.
150. Siqueira JF, Jr. Strategies to treat infected root canals. *Journal of the California Dental Association*. 2001;29(12):825-37.
151. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *Journal of Endodontics*. 2000;26(12):751-5.
152. Siqueira JF, Jr., Guimaraes-Pinto T, Rocas IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):800-5.
153. Trope M, Delano EO, Orstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *Journal of Endodontics*. 1999;25(5):345-50.
154. Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011;44(8):697-730.
155. Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and

- different intracanal medications: a randomized clinical trial. *Journal of Endodontics*. 2007;33(2):114-8.
156. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Orstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *Journal of Endodontics*. 2005;31(12):863-6.
157. Lin YH, Mickel AK, Chogle S. Effectiveness of selected materials against *Enterococcus faecalis*: part 3. The antibacterial effect of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2003;29(9):565-6.
158. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 2002;35(3):221-8.
159. Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*. 1998;24(10):663-5.
160. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *Journal of Endodontics*. 2002;28(11):758-61.
161. Sukawat C, Srisuwan T. A comparison of the antimicrobial efficacy of three calcium hydroxide formulations on human dentin infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2002;28(2):102-4.
162. Turk BT, Sen BH, Ozturk T. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 2009;108(2):297-301.
163. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *International Endodontic Journal*. 2001;34(3):184-8.
164. Upadya M, Shrestha A, Kishen A. Role of efflux pump inhibitors on the antibiofilm efficacy of calcium hydroxide, chitosan nanoparticles, and light-activated disinfection. *Journal of Endodontics*. 2011;37(10):1422-6.
165. de Paz LEC, Sedgley, C. M., Kishen, A. *The Root Canal Biofilm (Vol. 9)*. : Springer. S. ; 2015.
166. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of Periodontology*. 1986;57(6):370-7.
167. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian Dental Journal*. 2007;52(1):S64-82.
168. Gomes BP, Souza SF, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. *International Endodontic Journal*. 2003;36(4):267-75.
169. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 2003;96(5):578-81.
170. Salzgeber RM, Brilliant JD. An in vivo evaluation of the penetration of an irrigating solution in root canals. *Journal of Endodontics*. 1977;3(10):394-8.

171. Barthel CR, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Gobel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *Journal of Endodontics*. 2002;28(6):427-30.
172. Wang CS, Arnold RR, Trope M, Teixeira FB. Clinical efficiency of 2% chlorhexidine gel in reducing intracanal bacteria. *Journal of Endodontics*. 2007;33(11):1283-9.
173. Paquette L, Legner M, Fillery ED, Friedman S. Antibacterial efficacy of chlorhexidine gluconate intracanal medication in vivo. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):788-95.
174. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Australian Endodontic Journal*. 2006;32(3):112-5.
175. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics*. 1999;25(3):167-71.
176. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *Journal of Endodontics*. 1997;23(4):229-31.
177. Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 2004;98(4):488-92.
178. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*. 2009;42(4):288-302.
179. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *International Endodontic Journal*. 2003;36(9):604-9.
180. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1993;9(6):243-8.
181. Basrani B, Santos JM, Tjaderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 2002;94(2):240-5.
182. Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2009;42(7):555-67.
183. Mohammadi Z, Jafarzadeh H, Shalavi S, Yaripour S, Sharifi F, Kinoshita JI. A Review on Triple Antibiotic Paste as a Suitable Material Used in Regenerative Endodontics. *Iranian Endodontic Journal*. 2018;13(1):1-6.
184. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *Journal of Endodontics*. 2012;38(10):1372-5.
185. Pereira MS, Rossi MA, Cardoso CR, da Silva JS, Bezerra da Silva LA, Kuga MC, et al. Cellular and molecular tissue response to triple antibiotic intracanal dressing. *Journal of Endodontics*. 2014;40(4):499-504.
186. Yassen GH, Eckert GJ, Platt JA. Effect of intracanal medicaments used in endodontic regeneration procedures on microhardness and chemical structure of dentin. *Restorative Dentistry and Endodontics*. 2015;40(2):104-12.



187. Windley W, 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *Journal of Endodontics*. 2005;31(6):439-43.
188. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *International Endodontic Journal*. 1996;29(2):118-24.
189. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatology*. 2001;17(4):185-7.
190. Abbott PV, Heithersay GS, Hume WR. Release and diffusion through human tooth roots in vitro of corticosteroid and tetracycline trace molecules from Ledermix paste. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1988;4(2):55-62.
191. Bryson EC, Levin L, Banchs F, Abbott PV, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste(R) on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dental Traumatology*. 2002;18(6):316-21.
192. Ehrmann EH. The Effect of Triamcinolone with Tetracycline on the Dental Pulp and Apical Periodontium. *Journal of Prosthetic Dentistry*. 1965;15:144-52.
193. Kim ST, Abbott PV, McGinley P. The effects of Ledermix paste on discolouration of immature teeth. *International Endodontic Journal*. 2000;33(3):233-7.
194. S. Cıracı. Metrenin bir milyarda birinde bilim ve teknoloji. *Bilim ve Teknik. Türkiye'de Nanoteknoloji. (Ağustos-2005 eki) s:6-10.*
195. Aeran H, Kumar V, Uniyal S, Tanwer P. Nanodentistry: Is just a fiction or future. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. 2015;5(3):207-11.
196. Freitas RA, Jr. Nanodentistry. *Journal of the American Dental Association*. 2000;131(11):1559-65.
197. Sharma S, Srivastava D, Grover S, Sharma V. Biomaterials in tooth tissue engineering: a review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2014;8(1):309-15.
198. Drexler KE. *Nanosystems. Molecular machinery, manufacturing and computation*. New York: Wiley, 1992.
199. Bhardwaj A, Bhardwaj A, Misuriya A, Maroli S, Manjula S, Singh AK. Nanotechnology in dentistry: Present and future. *Journal of International Oral Health*. 2014;6(1):121-6.
200. Horst OV, Chavez MG, Jheon AH, Desai T, Klein OD. Stem cell and biomaterials research in dental tissue engineering and regeneration. *Dental Clinics of North America*. 2012;56(3):495-520.
201. Kim JY, Xin X, Moioli EK, Chung J, Lee CH, Chen M, et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Engineering Part A*. 2010;16(10):3023-31.
202. Wang J, Liu X, Jin X, Ma H, Hu J, Ni L, et al. The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds in vitro and in vivo. *Acta Biomaterialia*. 2010;6(10):3856-63.
203. Kuang R, Zhang Z, Jin X, Hu J, Gupte MJ, Ni L, et al. Nanofibrous spongy microspheres enhance odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells. *Advanced Healthcare Materials*. 2015;4(13):1993-2000.

204. Li WJ, Laurencin CT, Caterson EJ, Tuan RS, Ko FK. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2002;60(4):613-21.
205. Yang X, Yang F, Walboomers XF, Bian Z, Fan M, Jansen JA. The performance of dental pulp stem cells on nanofibrous PCL/gelatin/nHA scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2010;93(1):247-57.
206. Dreesmann L, Mitnacht U, Lietz M, Schlosshauer B. Nerve fibroblast impact on Schwann cell behavior. *European Journal of Cell Biology*. 2009;88(5):285-300.
207. Guo T, Li Y, Cao G, Zhang Z, Chang S, Czajka-Jakubowska A, et al. Fluorapatite-modified scaffold on dental pulp stem cell mineralization. *Journal of Dental Research*. 2014;93(12):1290-5.
208. Liu L, Shu S, Cheung GS, Wei X. Effect of miR-146a/bFGF/PEG-PEI Nanoparticles on Inflammation Response and Tissue Regeneration of Human Dental Pulp Cells. *BioMed Research International*. 2016;2016:3892685.
209. Bellamy C, Shrestha S, Torneck C, Kishen A. Effects of a Bioactive Scaffold Containing a Sustained Transforming Growth Factor-beta1-releasing Nanoparticle System on the Migration and Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. *Journal of Endodontics*. 2016;42(9):1385-92.
210. Shrestha S, Torneck CD, Kishen A. Dentin Conditioning with Bioactive Molecule Releasing Nanoparticle System Enhances Adherence, Viability, and Differentiation of Stem Cells from Apical Papilla. *Journal of Endodontics*. 2016;42(5):717-23.
211. Kaushik SN, Scofield J, Andukuri A, Alexander GC, Walker T, Kim S, et al. Evaluation of ciprofloxacin and metronidazole encapsulated biomimetic nanomatrix gel on *Enterococcus faecalis* and *Treponema denticola*. *Biomaterials Research*. 2015;19:9.
212. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *Journal of Dental Research*. 2013;92(11):963-9.
213. Palasuk J, Kamocki K, Hippenmeyer L, Platt JA, Spolnik KJ, Gregory RL, et al. Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*. 2014;40(11):1879-84.
214. Albuquerque MT, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC. Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on *enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics*. 2015;41(5):710-4.
215. Albuquerque MT, Evans JD, Gregory RL, Valera MC, Bottino MC. Antibacterial TAP-mimic electrospun polymer scaffold: effects on *P. gingivalis*-infected dentin biofilm. *Clinical Oral Investigations*. 2016;20(2):387-93.
216. Albuquerque MT, Ryan SJ, Munchow EA, Kamocka MM, Gregory RL, Valera MC, et al. Antimicrobial Effects of Novel Triple Antibiotic Paste-Mimic Scaffolds on *Actinomyces naeslundii* Biofilm. *Journal of Endodontics*. 2015;41(8):1337-43.
217. Shrestha A, Kishen A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *Journal of Endodontics*. 2016;42(10):1417-26.
218. Lide DR. Physical Constant of Inorganic Compound. *Handbook of Chemistry and Physics*. 2005;474.
219. Barillo DJ, Marx DE. Silver in medicine: a brief history BC 335 to present. *Burns*. 2014;40 Suppl 1:S3-8.

220. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends in Biotechnology*. 2010;28(11):580-8.
221. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramirez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*. 2005;16(10):2346-53.
222. Correa JM, Mori M, Sanches HL, da Cruz AD, Poiate E, Jr., Poiate IA. Silver nanoparticles in dental biomaterials. *International Journal of Biomaterials*. 2015;2015:485275.
223. Cheng L, Zhang K, Melo MA, Weir MD, Zhou X, Xu HH. Anti-biofilm dentin primer with quaternary ammonium and silver nanoparticles. *Journal of Dental Research*. 2012;91(6):598-604.
224. Palza H. Antimicrobial polymers with metal nanoparticles. *International Journal of Molecular Sciences*. 2015;16(1):2099-116.
225. Hernandez-Sierra JF, Ruiz F, Pena DC, Martinez-Gutierrez F, Martinez AE, Guillen Ade J, et al. The antimicrobial sensitivity of *Streptococcus mutans* to nanoparticles of silver, zinc oxide, and gold. *Nanomedicine*. 2008;4(3):237-40.
226. Acosta-Torres LS, Mendieta I, Nunez-Anita RE, Cajero-Juarez M, Castano VM. Cytocompatible antifungal acrylic resin containing silver nanoparticles for dentures. *International Journal of Nanomedicine*. 2012;7:4777-86.
227. Flores CY, Diaz C, Rubert A, Benitez GA, Moreno MS, Fernandez Lorenzo de Mele MA, et al. Spontaneous adsorption of silver nanoparticles on Ti/TiO<sub>2</sub> surfaces. Antibacterial effect on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Colloid and Interface Science*. 2010;350(2):402-8.
228. Lu X, Zhang B, Wang Y, Zhou X, Weng J, Qu S, et al. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition. *Journal of the Royal Society Interface*. 2011;8(57):529-39.
229. Shantiaee Y, Maziar F, Dianat O, Mahjour F. Comparing microleakage in root canals obturated with nanosilver coated gutta-percha to standard gutta-percha by two different methods. *Iranian Endodontic Journal*. 2011;6(4):140-5.
230. Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG. An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *Journal of Endodontics*. 2008;34(12):1515-20.
231. DaSilva L, Finer Y, Friedman S, Basrani B, Kishen A. Biofilm formation within the interface of bovine root dentin treated with conjugated chitosan and sealer containing chitosan nanoparticles. *Journal of Endodontics*. 2013;39(2):249-53.
232. Silva PV, Guedes DF, Nakadi FV, Pecora JD, Cruz-Filho AM. Chitosan: a new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. *International Endodontic Journal*. 2013;46(4):332-8.
233. Silva PV, Guedes DF, Pecora JD, da Cruz-Filho AM. Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. *Brazilian Dental Journal*. 2012;23(4):357-61.
234. Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A. Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restorative Dentistry and Endodontics*. 2015;40(3):195-201.
235. Zehnder M, Soderling E, Salonen J, Waltimo T. Preliminary evaluation of bioactive glass S53P4 as an endodontic medication in vitro. *Journal of Endodontics*. 2004;30(4):220-4.

236. Zehnder M, Luder HU, Schatzle M, Kerosuo E, Waltimo T. A comparative study on the disinfection potentials of bioactive glass S53P4 and calcium hydroxide in contra-lateral human premolars ex vivo. *International Endodontic Journal*. 2006;39(12):952-8.
237. Waltimo T, Brunner TJ, Vollenweider M, Stark WJ, Zehnder M. Antimicrobial effect of nanometric bioactive glass 45S5. *Journal of Dental Research*. 2007;86(8):754-7.
238. Pagonis TC, Chen J, Fontana CR, Devalapally H, Ruggiero K, Song X, et al. Nanoparticle-based endodontic antimicrobial photodynamic therapy. *Journal of Endodontics*. 2010;36(2):322-8.
239. Priyadarshini BM, Selvan ST, Lu TB, Xie H, Neo J, Fawzy AS. Chlorhexidine Nanocapsule Drug Delivery Approach to the Resin-Dentin Interface. *Journal of Dental Research*. 2016;95(9):1065-72.
240. Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Felitti R, Bhagirath AY, Medapati MR, Lai C, et al. Antibacterial Properties of Chitosan Nanoparticles and Propolis Associated with Calcium Hydroxide against Single- and Multispecies Biofilms: An In Vitro and In Situ Study. *Journal of Endodontics*. 2017;43(8):1332-6.
241. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, et al. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *International Endodontic Journal*. 2012;45(2):162-8.
242. Fuss Z, Mizrahi A, Lin S, Cherniak O, Weiss EI. A laboratory study of the effect of calcium hydroxide mixed with iodine or electrophoretically activated copper on bacterial viability in dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. 2002;35(6):522-6.
243. Lynne RE, Liewehr FR, West LA, Patton WR, Buxton TB, McPherson JC. In vitro antimicrobial activity of various medication preparations on *E. faecalis* in root canal dentin. *Journal of Endodontics*. 2003;29(3):187-90.
244. Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP, Magalhaes FA, de Uzeda M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *Journal of Endodontics*. 2003;29(8):501-4.
245. De Meyer S, Meire MA, Coenye T, De Moor RJ. Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. *International Endodontic Journal*. 2017;50(5):472-9.
246. Mohammed SA, Vianna ME, Penny MR, Hilton ST, Mordan N, Knowles JC. A novel experimental approach to investigate the effect of different agitation methods using sodium hypochlorite as an irrigant on the rate of bacterial biofilm removal from the wall of a simulated root canal model. *Dental Materials Journal*. 2016;32(10):1289-300.
247. Layton G, Wu WI, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *Journal of Endodontics*. 2015;41(6):884-9.
248. Love RM, McMillan MD, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral streptococci is associated with collagen recognition mediated by the antigen I/II family of polypeptides. *Infection and Immunity*. 1997;65(12):5157-64.
249. Ercan E, Dalli M, Dulgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against

- Enterococcus faecalis and Candida albicans. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics. 2006;102(2):e27-31.
250. Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW, Kaufman B, et al. Antimicrobial efficacy of a human beta-defensin-3 peptide using an Enterococcus faecalis dentine infection model. International Endodontic Journal. 2013;46(5):406-12.
251. Camargo CH, Siviero M, Camargo SE, de Oliveira SH, Carvalho CA, Valera MC. Topographical, diametral, and quantitative analysis of dentin tubules in the root canals of human and bovine teeth. Journal of Endodontics. 2007;33(4):422-6.
252. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on Enterococcus faecalis biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. Journal of Endodontics. 2010;36(5):842-6.
253. Guldaz HE, Kececi AD, Cetin ES, Ozturk T, Kaya BU. Evaluation of antimicrobial efficacy of cetrimide and Glycyrrhiza glabra L. extract against Enterococcus faecalis biofilm grown on dentin discs in comparison with NaOCl. Dental Materials Journal. 2016;35(5):721-7.
254. Lo Giudice G, Cutroneo G, Centofanti A, Artemisia A, Bramanti E, Militi A, et al. Dentin Morphology of Root Canal Surface: A Quantitative Evaluation Based on a Scanning Electronic Microscopy Study. BioMed Research International. 2015;2015:164065.
255. Ruiz-Linares M, Aguado-Perez B, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. International Endodontic Journal. 2017;50(1):77-83.
256. Albuquerque MTP, Nagata J, Bottino MC. Antimicrobial Efficacy of Triple Antibiotic-eluting Polymer Nanofibers against Multispecies Biofilm. Journal of Endodontics. 2017;43(9S):S51-S6.
257. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. Journal of Endodontics. 2011;37(10):1380-5.
258. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. Journal of Endodontics. 1984;10(10):477-83.
259. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. Journal of Endodontics. 2009;35(7):981-5.
260. Wiegand C, Abel M, Ruth P, Wilhelms T, Schulze D, Norgauer J, et al. Effect of the sterilization method on the performance of collagen type I on chronic wound parameters in vitro. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2009;90(2):710-9.
261. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by Enterococcus faecalis. International Endodontic Journal. 2008;41(10):873-82.
262. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterilization of teeth by gamma radiation. Journal of Dental Research. 1994;73(9):1560-7.
263. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. Journal of Endodontics. 2014;40(2):285-90.

264. Peters OA, Bardsley S, Fong J, Pandher G, Divito E. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. *Journal of Endodontics*. 2011;37(7):1008-12.
265. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *International Endodontic Journal*. 2014;47(7):659-66.
266. Schaudinn C, Jaramillo D, Freire MO, Sedghizadeh PP, Nguyen A, Webster P, et al. Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth. *International Endodontic Journal*. 2013;46(10):930-7.
267. Madsen JS, Roder HL, Russel J, Sorensen H, Burmolle M, Sorensen SJ. Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. *Environmental Microbiology*. 2016;18(8):2565-74.
268. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, et al. Interactions of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* USA300 and *Pseudomonas aeruginosa* in polymicrobial wound infection. *PLoS One*. 2013;8(2):e56846.
269. Tay WH, Chong KK, Kline KA. Polymicrobial-Host Interactions during Infection. *Journal of Molecular Biology*. 2016;428(17):3355-71.
270. Schwering M, Song J, Louie M, Turner RJ, Ceri H. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. *Biofouling*. 2013;29(8):917-28.
271. Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):819-22.
272. Bradshaw D, Marsh P, Watson G, Allison C. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. *Letters in Applied Microbiology*. 1997;25(6):385-7.
273. West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS. The social lives of microbes. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2007;38:53-77.
274. Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *Journal of Endodontics*. 2008;34(5):579-82.
275. Tan CH, Lee KW, Burmolle M, Kjelleberg S, Rice SA. All together now: experimental multispecies biofilm model systems. *Environmental Microbiology*. 2017;19(1):42-53.
276. Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, et al. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Research*. 2001;8(1):11-22.
277. Chavez de Paz LE. Development of a multispecies biofilm community by four root canal bacteria. *Journal of Endodontics*. 2012;38(3):318-23.
278. Tang G, Samaranayake LP, Yip HK. Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine. *Oral Diseases*. 2004;10(6):389-97.
279. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*. 2003;36(1):1-11.

280. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Aboim MC, Rosado AS. Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology and Endodontics*. 2004;98(6):741-9.
281. Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Applied and Environmental Microbiology*. 1997;63(2):812-4.
282. Hartke A, Lemarinier S, Pichereau V, Auffray Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in seawater microcosms is limited in the presence of bacterivorous zooflagellates. *Current Microbiology*. 2002;44(5):329-35.
283. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of Endodontics*. 2002;28(10):689-93.
284. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiology and Immunology*. 2001;16(6):332-7.
285. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF, Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *Journal of Endodontics*. 2008;34(8):926-31.
286. Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *The European Journal of Oral Sciences*. 2004;112(4):326-31.
287. Borssen E, Sundqvist G. Actinomyces of infected dental root canals. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, and Oral Radiology*. 1981;51(6):643-8.
288. Tabenski L, Maisch T, Santarelli F, Hiller KA, Schmalz G. Individual growth detection of bacterial species in an in vitro oral polymicrobial biofilm model. *Archives of Microbiology*. 2014;196(11):819-28.
289. Shrestha A, Kishen A. Antibiofilm efficacy of photosensitizer-functionalized bioactive nanoparticles on multispecies biofilm. *Journal of Endodontics*. 2014;40(10):1604-10.
290. Seneviratne CJ, Yip JW, Chang JW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Archives of Oral Biology*. 2013;58(10):1327-34.
291. Phee A, Bondy-Denomy J, Kishen A, Basrani B, Azarpazhooh A, Maxwell K. Efficacy of bacteriophage treatment on *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Endodontics*. 2013;39(3):364-9.
292. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *Journal of Endodontics*. 2013;39(4):473-7.
293. Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, et al. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Australian Dental Journal*. 2009;54(2):108-14.
294. Chau NP, Chung NH, Jeon JG. Relationships between the antibacterial activity of sodium hypochlorite and treatment time and biofilm age in early *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal*. 2015;48(8):782-9.
295. Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S. Increased antibiotic resistance of *Escherichia coli* in mature biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75(12):4093-100.

296. Kim AR, Ahn KB, Yun CH, Park OJ, Perinpanayagam H, Yoo YJ, et al. Lactobacillus plantarum Lipoteichoic Acid Inhibits Oral Multispecies Biofilm. *Journal of Endodontics*. 2019;45(3):310-5.
297. Wang L, Xie X, Li C, Liu H, Zhang K, Zhou Y, et al. Novel bioactive root canal sealer to inhibit endodontic multispecies biofilms with remineralizing calcium phosphate ions. *Journal of Dentistry*. 2017;60:25-35.
298. Ertem E, Gutt B, Zuber F, Allegri S, Le Ouay B, Mefti S, et al. Core-Shell Silver Nanoparticles in Endodontic Disinfection Solutions Enable Long-Term Antimicrobial Effect on Oral Biofilms. *ACS Applied Materials and Interfaces*. 2017;9(40):34762-72.
299. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal*. 1999;32(5):361-9.
300. Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *Journal of Endodontics*. 1990;16(5):207-10.
301. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*. 1999;25(6):416-8.
302. Valera MC, de Moraes Rego J, Jorge AO. Effect of sodium hypochlorite and five intracanal medications on *Candida albicans* in root canals. *Journal of Endodontics*. 2001;27(6):401-3.
303. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1993;9(3):95-100.
304. Stuart KG, Miller CH, Brown CE, Jr., Newton CW. The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1991;72(1):101-4.
305. Han GY, Park SH, Yoon TC. Antimicrobial activity of Ca(OH)<sub>2</sub> containing pastes with *Enterococcus faecalis* in vitro. *Journal of Endodontics*. 2001;27(5):328-32.
306. Noetzel J, Nonhoff J, Bitter K, Wagner J, Neumann K, Kielbassa AM. Efficacy of calcium hydroxide, Er:YAG laser or gaseous ozone against *Enterococcus faecalis* in root canals. *American Journal of Dentistry*. 2009;22(1):14-8.
307. Tanriverdi F, Esener T, Erganis O, Belli S. An in vitro test model for investigation of disinfection of dentinal tubules infected with *Enterococcus faecalis*. *Brazilian Dental Journal*. 1997;8(2):67-72.
308. Krithikadatta J, Indira R, Dorothykalyani AL. Disinfection of dentinal tubules with 2% chlorhexidine, 2% metronidazole, bioactive glass when compared with calcium hydroxide as intracanal medicaments. *Journal of Endodontics*. 2007;33(12):1473-6.
309. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2010;36(8):1389-93.
310. Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH. The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. *International Endodontic Journal*. 2010;43(11):968-77.
311. Kandaswamy D, Venkateshbabu N, Gogulnath D, Kindo AJ. Dentinal tubule disinfection with 2% chlorhexidine gel, propolis, morinda citrifolia juice, 2%



- povidone iodine, and calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*. 2010;43(5):419-23.
312. Madhubala MM, Srinivasan N, Ahamed S. Comparative evaluation of propolis and triantibiotic mixture as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2011;37(9):1287-9.
313. Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders WP. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *Journal of Endodontics*. 2002;28(3):163-7.
314. Oncag O, Cogulu D, Uzel A, Sorkun K. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *General Dentistry*. 2006;54(5):319-22.
315. Cwikla SJ, Belanger M, Giguere S, Progulske-Fox A, Vertucci FJ. Dentinal tubule disinfection using three calcium hydroxide formulations. *Journal of Endodontics*. 2005;31(1):50-2.
316. Prabhakar AR, Hadakar SG, Raju OS. Comparative evaluation of pH and antibacterial effect of various calcium hydroxide combinations on *E. faecalis* and its effect on root strength: An in vitro study. *Contemporary Clinical Dentistry*. 2012;3(1):42-7.
317. Estrela C, Bammann LL, Pimenta FC, Pecora JD. Control of microorganisms in vitro by calcium hydroxide pastes. *International Endodontic Journal*. 2001;34(5):341-5.
318. Estrela C, Rodrigues de Araujo Estrela C, Bammann LL, Pecora JD. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *Journal of Endodontics*. 2001;27(12):720-3.
319. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, et al. In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dental Journal*. 2002;13(3):155-61.
320. Siqueira JF, Jr., de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics*. 1997;23(3):167-9.
321. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Brazilian Dental Journal*. 2005;16(3):175-80.
322. Pacios MG, Silva C, Lopez ME, Cecilia M. Antibacterial action of calcium hydroxide vehicles and calcium hydroxide pastes. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*. 2012;3(4):264-70.
323. Basrani B, Tjaderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2003;96(5):618-24.
324. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. *Australian Dental Journal*. 2007;52(2):118-21.
325. Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2006;102(4):544-50.
326. Neelakantan P, Sanjeev K, Subbarao CV. Duration-dependent susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide and chlorhexidine gel used as

- intracanal medicament: an in vitro evaluation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2007;104(4):e138-41.
327. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, Maracy MR, Shojaei H. Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Applied Oral Science*. 2014;22(5):356-65.
328. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *Journal of Endodontics*. 2010;36(1):100-4.
329. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics*. 2010;22(1):58-78.
330. Delany GM, Patterson SS, Miller CH, Newton CW. The effect of chlorhexidine gluconate irrigation on the root canal flora of freshly extracted necrotic teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1982;53(5):518-23.
331. Basson NJ, Tait CM. Effectiveness of three root canal medicaments to eliminate *Actinomyces israelii* from infected dentinal tubules in vitro. *South African Dental Journal*. 2001;56(11):499-501.
332. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *International Endodontic Journal*. 2003;36(6):423-32.
333. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal*. 2001;34(6):424-8.
334. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2004;97(1):79-84.
335. Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS. Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 2005;100(6):756-61.
336. Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *International Endodontic Journal*. 2003;36(11):733-9.
337. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. 1998;31(1):8-14.
338. Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Oral Rehabilitation*. 1999;26(2):151-6.
339. Schafer E, Bossmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2005;31(1):53-6.
340. Evans MD, Baumgartner JC, Khemalelakul SU, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *Journal of Endodontics*. 2003;29(5):338-9.

341. Lindskog S, Pierce AM, Blomlof L. Chlorhexidine as a root canal medicament for treating inflammatory lesions in the periodontal space. *Endodontics and Dental Traumatology*. 1998;14(4):186-90.
342. MT Filho LM, Silva L, Aníbal F, Faccioli L. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal*. 2002;35:735-9.
343. Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *Journal of Hospital Infection*. 1993;25(4):229-38.
344. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *Journal of Endodontics*. 2004;30(11):785-7.
345. Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics*. 2001;27(7):452-5.
346. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *International Endodontic Journal*. 2006;39(6):484-92.
347. Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *Journal of Endodontics*. 2007;33(5):541-7.
348. Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Australian Endodontic Journal*. 2014;40(2):61-5.
349. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal*. 1991;24(3):119-25.
350. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJ. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Dentistry*. 2015;43(12):1573-9.
351. Samiei M, Davaran, S., Valipour, F., Davari, A., Ghiasian, T., & Lotfipour, F. . Antibacterial Efficacy Of Silver-Crosslinked Hydrogel Nanocomposite Versus Sodium Hypochlorite And Chlorhexidine On *Enterococcus Faecalis* For Use In Root Canal Infection. *International Journal of Biology, Pharmacy and Allied Sciences*. 2014;3(11):2316-32.
352. Holt DM, Watts JD, Beeson TJ, Kirkpatrick TC, Rutledge RE. The antimicrobial effect against *enterococcus faecalis* and the compressive strength of two types of mineral trioxide aggregate mixed with sterile water or 2% chlorhexidine liquid. *Journal of Endodontics*. 2007;33(7):844-7.
353. Samiei M, Aghazadeh M, Lotfi M, Shakoei S, Aghazadeh Z, Vahid Pakdel SM. Antimicrobial Efficacy of Mineral Trioxide Aggregate with and without Silver Nanoparticles. *Iranian Endodontic Journal*. 2013;8(4):166-70.
354. Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N. *Enterococcus faecalis* Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. *Journal of Endodontics*. 2017;43(2):279-82.
355. Bo D, Kayombo CM. Effect of Nanosilver Gel, Chlorhexidine Gluconate, and Camphorated Phenol on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *International Scholarly Research Notices*. 2014;2014:380278.

356. Mozayeni MA, Haeri A, Dianat O, Jafari AR. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on enterococcus faecalis: an in vitro study. *Iranian Endodontic Journal*. 2014;9(3):195-8.
357. Lotfi M, Vosoughhosseini S, Ranjkesh B, Khani S, Saghiri M, Zand V. Antimicrobial efficacy of nanosilver, sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate against *Enterococcus faecalis*. *African Journal of Biotechnology*. 2011;10(35):6799-803.
358. Rodrigues CT, de Andrade FB, de Vasconcelos L, Midená RZ, Pereira TC, Kuga MC, et al. Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against *Enterococcus faecalis* biofilm and infected dentinal tubules. *International Endodontic Journal*. 2018;51(8):901-11.
359. Monteiro DR, Silva S, Negri M, Gorup LF, de Camargo ER, Oliveira R, et al. Antifungal activity of silver nanoparticles in combination with nystatin and chlorhexidine digluconate against *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms. *Mycoses*. 2013;56(6):672-80.
360. Zhang FQ, She WJ, Fu YF. Comparison of the cytotoxicity in vitro among six types of nano-silver base inorganic antibacterial agents. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2005;40(6):504-7.
361. Gomes-Filho JE, Silva FO, Watanabe S, Cintra LT, Tendoro KV, Dalto LG, et al. Tissue reaction to silver nanoparticles dispersion as an alternative irrigating solution. *Journal of Endodontics*. 2010;36(10):1698-702.
362. Chernousova S, Epple M. Silver as antibacterial agent: ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 2013;52(6):1636-53.
363. Zand V, Lotfi M, Aghbali A, Mesgariabbasi M, Janani M, Mokhtari H, et al. Tissue Reaction and Biocompatibility of Implanted Mineral Trioxide Aggregate with Silver Nanoparticles in a Rat Model. *Iranian Endodontic Journal*. 2016;11(1):13-6.
364. Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabe DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, et al. In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *Journal of Endodontics*. 2016;42(6):953-60.
365. Afkhami F, Elahy S, Mahmoudi-Nahavandi A. Spectrophotometric analysis of crown discoloration following the use of silver nanoparticles combined with calcium hydroxide as intracanal medicament. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*. 2017;9(7):e842-e7.
366. Lu MM, Wang QJ, Chang ZM, Wang Z, Zheng X, Shao D, et al. Synergistic bactericidal activity of chlorhexidine-loaded, silver-decorated mesoporous silica nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*. 2017;12:3577-89.
367. Ben-Knaz R, Pedahzur R, Avnir D. Bioactive doped metals: high synergism in the bactericidal activity of chlorhexidine silver towards wound pathogenic bacteria. *Royal Society of Chemistry Advances*. 2013;3(21):8009-15.
368. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *Journal of Endodontics*. 2010;36(11):1820-3.
369. Zhang D, Shen Y, de la Fuente-Nunez C, Haapasalo M. In vitro evaluation by quantitative real-time PCR and culturing of the effectiveness of disinfection of multispecies biofilms in root canals by two irrigation systems. *Clinical Oral Investigations*. 2019;23(2):913-20.

370. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochemistry and Photobiology*. 2010;86(6):1343-9.
371. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of Endodontics*. 2010;36(6):1030-5.
372. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *Journal of Endodontics*. 2004;30(11):778-81.
373. Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, et al. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. *Journal of Endodontics*. 2008;34(10):1198-201.
374. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *Journal of Dental Research*. 1982;61(2):435-8.
375. Bukhari S, Kim D, Liu Y, Karabucak B, Koo H. Novel Endodontic Disinfection Approach Using Catalytic Nanoparticles. *Journal of Endodontics*. 2018;44(5):806-12.
376. Fan W, Wu D, Ma T, Fan B. Ag-loaded mesoporous bioactive glasses against *Enterococcus faecalis* biofilm in root canal of human teeth. *Dental Materials Journal*. 2015;34(1):54-60.
377. González-Luna IV P, Martínez-Castañón G-A, Zavala-Alonso N-V, Patiño-Marin N, Niño-Martínez N, Morán-Martínez J, et al. Bactericide effect of silver nanoparticles as a final irrigation agent in endodontics on *Enterococcus faecalis*: an ex vivo study. *Journal of Nanomaterials*. 2016;(2016).
378. Hoedke D, Enseleit C, Gruner D, Dommisch H, Schlafer S, Dige I, et al. Effect of photodynamic therapy in combination with various irrigation protocols on an endodontic multispecies biofilm ex vivo. *International endodontic journal*. 2018;51:23-34.
379. Zhou Y, Hu K, Guo Z, Fang K, Wang X, Yang F, et al. PLLA microcapsules combined with silver nanoparticles and chlorhexidine acetate showing improved antibacterial effect. *Materials Science and Engineering*. 2017;78:349-53.
380. Wang D, Shen Y, Hancock REW, Ma J, Haapasalo M. Antimicrobial Effect of Peptide DJK-5 Used Alone or Mixed with EDTA on Mono- and Multispecies Biofilms in Dentin Canals. *Journal of Endodontics*. 2018;44(11):1709-13.
381. Oda DF, Duarte MAH, Andrade FB, Moriyama LT, Bagnato VS, de Moraes IG. Antimicrobial action of photodynamic therapy in root canals using LED curing light, curcumin and carbopol gel. *International Endodontic Journal*. 2019;52:1010-1019

## 9. EKLER

### Ek 1: ÖZGEÇMİŞ

#### Kişisel Bilgiler

**AD / SOYAD :** Güzin TÜLÜ

**ADRES :** Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Endodonti Anabilim Dalı / ISPARTA

**E-POSTA :** tuluguzin@hotmail.com

**UYRUK :** T.C.

**DOĞUM TARİHİ VE YERİ:** 26.03.1991/ İZMİR

**CİNSİYET :** Kadın

#### Eğitim ve Öğretim

**LİSE :** İzmir Atatürk Lisesi / İZMİR (2005-2009)

**ÜNİVERSİTE :** Ege Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi/ İZMİR (2009-2014)

**UZMANLIK :** Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi

Endodonti Anabilim Dalı / ISPARTA (2015-2019)

**YABANCI DİL :** İngilizce

## Ek 2: Etik Kurul Onay Formu



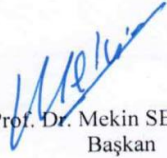
T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 72867572.050.01.04- 185139  
Konu : Etik Kurul Kararı

12 -07- 2018

Sayın Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA  
Diş Hekimliği Fakültesi  
Endodonti Anabilim Dalı

Sorumlu araştırmacı olduğunuz “Gümüş nanopartiküllü ilave edilmiş kanal içi medikamentlerin çok türlü biyofilm üzerine antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması-ex vivo çalışma” isimli çalışmanızın kurulumuz tarafından uygun görüldüğüne ilişkin 04/07/2018 tarih ve 124 sayılı Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Kararı yazımız ekinde gönderilmiştir.  
Bilgilerinize rica ederim.

  
Prof. Dr. Mekin SEZİK  
Başkan

Eki : Etik Kurulu Kararı (2 Sayfa)

S.D.Ü. Tıp Fakültesi Dekanlığı Doğu Kampusu 32260 - ISPARTA  
Tel : 0 (246) 2113704 Faks : 0 (246) 2371165  
e-posta : [tipetik@sdu.edu.tr](mailto:tipetik@sdu.edu.tr) İnternet Adresi : [www.tip.sdu.edu.tr](http://www.tip.sdu.edu.tr)

Bilgi için : İ.Etem YETİŞEN  
Bilgisayar İşletmeni  
Tel : 0 (246) 2113704



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Araştırmanın Açık Adı		Gümüş nanopartikülü ilave edilmiş kanal içi medikamentlerin çok türlü biyofilm üzerine antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması-ex vivo çalışma.			
Araştırmanın Protokol Kodu		(04.07.2018 tarih ve 124 sayılı karar)			
<b>ETİK KURULU BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanlığı - (2012-KAEK-38)			
	AÇIK ADRESİ	S.D.Ü. Doğu Kampüsü Tıp Fakültesi Dekanlığı Binası – ISPARTA			
	TELEFON	246.2113704			
	FAKS	246.2371165			
	E-POSTA	tipetik@sdu.edu.tr			
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Endodonti			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ	Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 : <input type="checkbox"/>	FAZ 2 : <input type="checkbox"/>	FAZ 3 : <input type="checkbox"/>	FAZ 4 : <input type="checkbox"/>
		Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz : Deneysel					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	03.07.2018	01.001	Türkçe <input checked="" type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
<b>DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER</b>	Belge Adı	Açıklama			
	SİGORTA	<input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input type="checkbox"/>	SDÜ / BAP Birimine Müracaat Edilecek		
	BIYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input checked="" type="checkbox"/>			
	İLAN	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>			
DİĞER	<input checked="" type="checkbox"/>	- Anabilim Dalı Akademik Kurul Kararı			

Prof. Dr. Mekin SEZİK  
Etik Kurul Başkanı





KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Araştırmanın Açık Adı Araştırmanın Protokol Kodu		Gümüş nanopartiküllü ilave edilmiş kanal içi medikamentlerin çok türlü biyofilm üzerine antibakteriyel etkinliklerinin karşılaştırılması-ex vivo çalışma					
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 124	Tarih: 04.07.2018					
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.						
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU							
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Mekin SEZİK					
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi	Katılım *	İmza
Prof. Dr. Mekin SEZİK	Kadın Hast. ve Doğum	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Mustafa TÜZ	Kulak Burun Boğaz Hast.	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Buket ARIDOĞAN	Tıbbi Mikrobiyoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Prof. Dr. Ahmet Nesimi KİŞİOĞLU	Halk Sağlığı	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Mehmet Fahrettin ÖNDER	Hukuk	SDÜ Hukuk Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Derya YILDIRIM	Ağız Diş ve Çene Radyoloji	SDÜ Diş Hek. Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	İZİNLI
Doç. Dr. Halil AŞCI	Farmakoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Derya CEYHAN	Pedodonti	SDÜ Diş Hek. Fak.	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Abdullah Meriç ÜNAL	Ortopedi ve Travmatoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Mehtap SAVRAN	Farmakoloji	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğretim Üyesi Giray KOLCU	Aile Hekimliği	SDÜ Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Uzman Dr. Ümmü Gül YILDIZ	Kadın Hast. Ve Doğum	Özel Isparta Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	GÖREVLİ
Uzman Dr. Tuğba GÜRSOY KOCA	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Isparta Şehir Hastanesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	GÖREVLİ
Öğr. Gör. Mehmet Erhan ŞAHİN	Biyomedikal ve Cihaz Teknoloji	SDÜ Teknik Bil. M.Y.O.	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	
Osman PARÇAOĞLU	Sivil Üye	Esnaf	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/> H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/> H <input type="checkbox"/>	

\* : Toplantıda Bulunma