



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI
BAŞKANLIĞI

MATRİKS İLE DESTEKLENMİŞ LAZER DESORPSİYON
İYONİZASYON UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ
ARACILIĞIYLA PERİAPİKAL İNDEKSE GÖRE
SINIFLANDIRILMIŞ PERİAPİKAL DOKU HASTALIKLARINDAKİ
KÖK KANAL MİKROBİYOTA PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ

Dt. Mete AHLAT

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

ANKARA

2019



T.C.

SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI
BAŞKANLIĞI

**MATRİKS İLE DESTEKLENMİŞ LAZER DESORPSİYON
İYONİZASYON UÇUŞ ZAMANI KÜTLE SPEKTROMETRESİ
ARACILIĞIYLA PERİAPİKAL İNDEKSE GÖRE
SINIFLANDIRILMIŞ PERİAPİKAL DOKU HASTALIKLARINDAKİ
KÖK KANAL MİKROBİYOTA PROFİLLERİNİN İNCELENMESİ**

Dt. Mete AHLAT

Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Gülhane DİŞ Hekimliği Fakültesi'nin
Endodonti Programı için öngördüğü

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

olarak hazırlanmıŐtır.

DANIŞMAN

Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN

ANKARA

2019

**T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Dekanlığı'na;**

“Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi Aracılığıyla Periapikal İndekse Göre Sınıflandırılmış Periapikal Doku Hastalıklarındaki Kök Kanal Mikrobiyota Profillerinin İncelenmesi” konulu bu çalışma jürimiz tarafından Endodonti Anabilim Dalı'nda Diş Hekimliğinde Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



Üye: Prof. Dr. Özgür UZUN
Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



Üye: Doç. Dr. Kadriye DEMİRKAYA
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD.



ONAY: Dt. Mete AHLAT'ın 16.05.2019 tarihinde savunduğu bu tez, Akademi Kurulu'na belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Serpil KARAÖĞLANOĞLU
Sağlık Bilimleri Üniversitesi
Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Dekanı



BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Dekanlığının uygun gördüğü Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Mete AHLAT

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin MALDI-TOF MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) aracılığıyla tanımlanmasını araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Ana Bilim Dalı'na tedavi amacıyla başvuran sistemik olarak sağlıklı 150 hastanın dahil edilmesi planlandı. Hastalar, alınan ilk periapikal radyografilerine, anamnezlerine, çalışmaya alınma kriterlerine göre teşhis ve tedavi planlaması yapılarak periapikal doku hastalıklarına göre 5 gruba ayrıldı. Gruplarına göre ayrılan her hastanın kök kanal tedavisine başlarken nekrotik pulpal kök kanalından "paper point" ile örnekler toplandı. Örnekler sıvı tiyoglikolat besiyerine alınarak vakit kaybetmeden hem anaerob hem de aerob kültür işlemlerinin yapılması için Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji kliniği laboratuvarına gönderildi. Sıvı besiyerine alınan örnekler 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra aerob ve anaerob kültür işlemine alındı. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürde üreyen farklı morfolojideki bakteri kolonilerinin subkültürü yapıldı. Subkültürlerin etanol-formik asit ekstraksiyon ile Microflex LT sistemi (Bruker Daltonics Inc.Bremen,Germany) MALDI-TOF MS cihazında tanımlamaları yapıldı.

Bulgular: Bu çalışmada, 6 filum ve 1 mantarı temsil eden, 77 tür bakteri ve 3 tür Candida tanımlandı. Periapikal doku hastalıklarını, periapikal indekslerini (PAI), hastaların yaşını, cinsiyetlerini laboratuvarından gelen sonuçlardaki tanımlanmış mikroorganizma türleriyle bir veri oluşturduk. Bu verilerin istatistiksel analizleri için kümeleme analizi yöntemi olarak hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır.

Sonuç: MALDI-TOF MS, oral mikrobiyolojinin daha spesifik, kolay, hızlı ve ekonomik bir şekilde geliştirilmesinde potansiyel bir yöntem olabilir.

Anahtar kelimeler: Endodonti, Periapikal İndeks (PAI), periapikal doku hastalıkları, anaerob bakteriler, MALDI-TOF MS.

ABSTRACT

Aim: The purpose of this study was to investigate the identification of root canal microbiota profiles in periapical tissue diseases classified according to the periapical index (PAI) by MALDI-TOF MS (Matrix Desired Laser Desorption Ionization Flight Time Mass Spectrometry).

Materials (Patients) and Methods : The study was planned to include systemically healthy 150 patients admitted to the Department of Endodontics, Gülhane Dentistry Faculty. The patients were divided into 5 groups according to periapical tissue diseases by making diagnosis and treatment planning according to the first periapical radiographs, anamnesis, and inclusion criteria. While planning the root canal treatment of each patient divided according to the groups, samples were collected with the paper point is from the necrotic pulp root canal. The samples were transport to the laboratory of medical microbiology at Gülhane Training and Research Hospital in order to perform both anaerobic and aerobic culture processes without any delay by taking the liquid into thioglycolate medium. After incubation at 37 ° C for 24 hours, aerobic and anaerobic culture samples were taken. At the end of the incubation period, subculture of the bacterial colonies of different morphologies produced in each culture was performed. The subcultures were identified in the Microflex LT system (Bruker Daltonics Inc.) MALDI-TOF MS with ethanol-formic acid extraction.

Results: In the present study, 77 species of bacteria and 3 species of Candida were identified, representing 6 phyla and 1 fungus. We created a data with the microorganism species defined in the results of periapical tissue diseases, periapical index (PAI), age and gender of the patients. Hierarchical clustering method is used as the clustering analysis method for the statistical analysis of this data.

Conclusion: MALDI-TOF MS could be a potential method of developing oral microbiology in a more specific, easy, rapid and economical way.

Keywords: Endodontics, Periapical Index (PAI), periapical tissue diseases, anaerobic bacteria, MALDI-TOF MS.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tezimin her aşamasında her zaman yanımda olan büyük bir sabır ve hoşgörüyü bana yardımcı olan ve yol gösteren, danışman hocam sayın Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN'a,

Tez çalışmamın Tıbbi Mikrobiyoloji kliniği laboratuvarı safhasında bakteri örneklerinin tanımlama yapılmasını destekleyen Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanı sayın Prof. Dr. Mehmet BAYSALLAR'a, tezimin laboratuvar kısmındaki çalışmalardan sorumlu Uzm.Biyolog Sinem KAYA' ya,

Hayatım boyunca bana destek olup bugünlere gelmemi sağlayan canım anneme, babama, kardeşime, her zaman yanımda olan ve beni hep destekleyen yardımını hiç esirgemeyen fedakar eşim Ayşegül AHLAT' a ve canım oğlum Mert Alp AHLAT'a sonsuz teşekkür eder, sevgi ve saygılarımı sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde maddi imkan sağlayan Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) birimine desteklerinden dolayı teşekkür ederiz.

Mete AHLAT

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL ONAYI.....	Hata! Yer işareti tanımlanmamış.
BEYAN.....	ii
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
TABLolar DİZİNİ	xvi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xix
KISALTMALAR	xxiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. ENDODONTİDE TEŞHİS VE TEDAVİ PLANLAMASI.....	5
2.1.1. Endodontide Pulpa Hastalıklarının Tanısı	9
2.1.2. Endodontide Periapikal Doku Hastalıkları Tanısı	12
2.2. PULPA VE PERİAPİKAL DOKU İRRİTANLARI.....	14
2.2.1. Mikrobiyal İrritanlar	14
2.2.2. Mekanik İrritanlar	15
2.2.3. Kimyasal İrritanlar.....	16
2.3. PERİAPİKAL DOKU HASTALIKLARI.....	16
2.3.1. Periapikal Doku Hastalıklarının Sınıflandırılması	17
2.3.1.1. Normal Periapikal Dokular	20
2.3.1.2. Semptomatik Apikal Periodontitis (Akut Apikal Periodontitis).....	20

2.3.1.3. Aseptomatik Apikal Periodontitis (Kronik Apikal Periodontitis).....	21
2.3.1.4. Condensing Osteitis	23
2.3.1.5. Akut Apikal Apse (Semptomatik Apikal Apse)	23
2.3.1.6. Kronik Apikal Apse (Aseptomatik Apikal Apse).....	24
2.4. KÖK KANAL TEDAVİSİNDEN SONRA PERİAPİKAL LEZYONLARIN İYİLEŞMESİ.....	25
2.4.1. İyileşme Derecesi.....	26
2.4.2. İyileşme Süreci.....	26
2.4.3. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler	27
2.5. ENDODONTİK AÇIDAN SONUÇLARI DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ.....	28
2.5.1. Histolojik Değerlendirme	28
2.5.2. Klinik Değerlendirme	29
2.5.3. Radyografik Değerlendirme	29
2.5.4. Son Durumun Değerlendirilmesinde Kullanılan İndeksler	31
2.6. BAŞARI VE BAŞARISIZLIĞIN TANIMI.....	33
2.6.1. Başarı ve Başarısızlığın Histolojik Değerlendirilmesi	35
2.6.2. Başarı ve Başarısızlığın Klinik Değerlendirilmesi	36
2.6.3. Başarı ve Başarısızlığın Radyografik Değerlendirilmesi.....	37
2.6.4. Endodontik Tedavinin Değerlendirilmesi Ne Zaman Yapılmalıdır? .	40
2.7. İYİLEŞME SAĞLANAMAMIŞ (BAŞARISIZ) KÖK KANALI TEDAVİSİNİN NEDENLERİ.....	42
2.7.1. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlem Öncesi Faktörler.....	43
2.7.2. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlemsel Sorunlar	43

2.7.3. Kök Kanal Tedavisinin Mekanik Hedefler	43
2.7.4. Kök Kanal Tedavisinin Biyolojik Hedefler	45
2.7.5. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlem Sonrası Faktörler.....	45
2.8. CERRAHİ OLMAYAN TEDAVİ TEKRARI (RETREATMENT)....	45
2.8.1. Cerrahi Olmayan Endodontik Başlangıç Tedavisinin İyileşmeme Nedenleri.....	45
2.8.2. Tedavi Seçenekleri.....	46
2.8.3. Cerrahi Olmayan Retreatment'ın Endikasyonları.....	47
2.8.4. Cerrahi Olmayan Retreatment'ın Kontraendikasyonları.....	47
2.8.5. Retreatment'ın Faydaları Ve Riskleri.....	48
2.8.6. Retreatment İşlemlerinde Restorasyon Sökümü veya Korunması için Kriterler.....	48
2.8.7. Retreatment İşlemlerinde Kanaldaki Engellerin Kaldırılması... ..	49
2.8.8. Retreatment İşlemlerinde Kalsifikasyonların Kaldırılması.....	49
2.8.9. Retreatment İşlemlerinde Basamakların Kaldırılması.....	49
2.8.10. Retreatment İşlemlerinde Alet Parçalarının Çıkarılması	50
2.8.11. Retreatment İşlemlerinde Gutta Perkanın Çıkarılması	50
2.8.12. Retreatment İşlemlerinde Taşıyıcı Bazlı Gutta Perka Tıkaçların Çıkarılması.....	51
2.8.13. Retreatment İşlemlerinde Yumuşak ve Sert Patların Çıkarılması	52
2.8.14. Retreatmentta İyileşme Prognuzu.....	52
2.9. KÖK KANAL ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYOLOJİSİ.....	53
2.9.1. Tarihçesi.....	53
2.9.2. Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşma Yolları	55

2.9.3. Kök Kanalındaki Mikrobiyal Ekosistem	56
---	----

2.10.ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA BAKTERİYEL PATOJENİTE.....60

2.10.1. Mikrobiyal Virülans Faktörler.....	61
2.10.1.1.Lipopolisakkarit (LPS) (Endotoksin):.....	62
2.10.1.2.Peptidoglikan Tabaka:	62
2.10.1.3.Lipoteioik asit:	63
2.10.1.4.Dış zar proteinleri:	63
2.10.1.5.Ekstraselüler veziküller:	64
2.10.1.6.Lipoproteinler:	64
2.10.1.7.Fimbria (pili):.....	64
2.10.1.8.Kapsül:.....	64
2.10.1.9.Flagel:.....	64
2.10.1.10.Bakteriyel DNA:	64
2.10.1.11.Enzimler:.....	65
2.10.1.12.Eksotoksinler:	65
2.10.1.13.Bakteriyel peptid (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP):.....	65
2.10.1.14.Isı şok proteinleri:	65
2.10.1.15.Metabolik son ürünler:	66
2.10.2. Biofilm.....	67
2.10.3. Quorum Sensing... ..	68
2.10.4. Endodontik Biyofilm	69
2.10.5. Bakterilerin gram boyama yöntemine göre sınıflandırılması... ..	71

2.10.6. Temel Mikrobiyolojide Anaerop Bakterilerin Oksijen İhtiyacına Göre Sınıflandırılması.....	72
2.10.6.1.Zorunlu anaeroplard:	72
2.10.6.2.Mikroaerofilik bakteriler:	73
2.10.6.3.Mikroaerotolerant anaeroplard:.....	73
2.10.6.4.Fakültatif anaerop bakteriler:.....	74
2.10.6.5.Kapnofiller:.....	74
2.10.7. Anaeroplardn kaynağı:.....	74
2.10.8. Anaeroplardn normal floradaki dağılımd	74
2.10.8.1.Deri:.....	75
2.10.8.2.Üst solunum sistemi:	75
2.10.8.3.Vajina:.....	75
2.10.8.4.Barsak:	76
2.11. ENDODONTİK FLORA (MİKROBİYOTA ÇEŞİTLİLİĞİ).....	77
2.11.1. Primer İnteradiküler Enfeksiyonlar	79
2.11.2. İnatçı / İkincil İnteradiküler Enfeksiyonlar.....	83
2.11.3. Kök – Kanal Tedavili Dişlerde Mikrobiyota (Retreatment Örnekleri).....	83
2.11.4. Ekstradiküler Enfeksiyonlar	85
2.12. ANAEROP BAKTERİLERİN TANI VE İDENTİFİKASYONU.....	87
2.12.1. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Geleneksel Yöntemler.....	87
2.12.2. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Mikrosistemler .	89
2.12.3. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Hızlı Enzimatik Sistemler:.....	91

2.12.4. Anaerob Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Moleküler Yöntemler.....	92
2.12.4.1.Mikroorganizmayı saptamaya yönelik moleküler yöntemler....	93
2.12.4.2.Mikroorganizmayı tiplendirmeye yönelik moleküler yöntemler.....	95
2.12.4.3.Mikroorganizmaya özgü ürünleri saptamaya yönelik moleküler yöntemler.....	97
2.12.5. Moleküler Yöntemlerde Son Gelişmeler	98
2.12.5.1.Oligonükleotid Array:	98
2.12.5.2.Matrix-aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS):.....	99
2.13. MALDI-TOF MS (Matriks Assisted Laser desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry)	99
2.13.1. Tarihçesi.....	99
2.13.2. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry=MS)	103
2.13.3. Kütle Spektroskopisinin Temel Prensipleri	104
2.13.4. Kütle Spektrometresi ve Bileşenleri	105
2.13.5. Gaz Faz İyon Kaynağı Tipleri	109
2.13.5.1.Elektron İmpakt Kaynağı (EI)	109
2.13.5.2.Kimyasal İyonlaştırma (CI).....	109
2.13.5.3.Alan İyonlaştırma (FI).....	110
2.13.6. Desorpsiyon İyon Kaynağı Tipleri	110
2.13.6.1.Alan Desorpsiyonu (FD)	110
2.13.6.2.Plazma Desorpsiyon (PD)	110
2.13.6.3.Hızlı Atom Bombardımanı (FAB)	110
2.13.6.4.Termosprey İyonlaştırma (TSP)	111

2.13.6.5.Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)	112
2.13.6.6.Matriks ile Destekli Lazer Desorpsiyon İyonlaştırması (MALDI).....	113
2.13.6.7.Protein Tanımlama İşlemlerinde MALDI İçin Örnek Hazırlanmasında Farklı Yaklaşımlar	116
2.13.7. Kütle Analizörü.....	120
2.13.7.1.Manyetik Sektör Analizörleri	120
2.13.7.2.Kuadropol Kütle Spektrometreleri.....	121
2.13.7.3.Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri (Time Of Flight,TOF).....	122
2.13.7.4.İyon Tuzaklı Analizörler	123
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	126
3.1. Endodonti Anabilim Dalı Kliniği'ndeki Çalışma Metodunun Ayrıntıları.....	127
3.1.1. Hastadan Demografik Anamnez Bilgileri ile Tedavi Onam Formlarının Alınması.....	127
3.1.2. Hastaların Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri	128
3.1.3. Kriterlere Uygun Olan Hastaların Endodonti Kliniği Çalışma Safhası.....	129
3.1.3.1. Zenginleştirilmiş tiyoglikolat besiyeri	132
3.2. Endodonti kliniğinden alınan örneklerin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında çalışılma safhası.....	133
3.2.1. Anaerobik İnkübasyon ve Denetlenmesi	135
3.2.2. Koyun Kanı (5%), Hemin ve Vitamin K1 ihtiva eden Brucella Agar.....	136
3.2.3. α - Siyano- 4- Hidroksisinnamik Asit.....	136
3.2.4. Etanol-Formik Asit Ekstraksiyonu	137

3.3. Mikroorganizmaların MALDI-TOF MS sistemi ile tanımlanması.....	138
4.BULGULAR.....	143
4.1. İstatistiksel Analizler.....	154
4.1.1. Grup 1 Retreatment Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:.....	155
4.1.2. Grup 2 Semptomatik Apikal Apse Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:.....	156
4.1.3. Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:.....	157
4.1.4. Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontit Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:.....	158
4.1.5. Grup 5 Asemptomatik Apikal Periodontit Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:.....	159
4.2. Validasyon Sonuçları	160
4.2.1. Grup 1 Retreatment Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları.....	160
4.2.2. Grup 2 Semptomatik Apikal Apse Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları	161
4.2.3. Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları	162
4.2.4. Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontitis Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları.....	163
4.2.5. Grup 5 Asemptomatik Apikal Periodontitis Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları.....	164
5.TARTIŞMA.....	165

6.SONUÇ VE ÖNERİLER.....	176
KAYNAKLAR.....	178



TABLolar DİZİNİ

Tablo 1. Endodontik tanı koymak için gerekli muayene prosedürleri	9
Tablo 2. Amerikan Derneği Endodontisleri ve Amerikan Endodonti Birliği tarafından 2009 yılında onaylanan tanı terminolojisi	11
Tablo 3. McClannahan ‘nın belirttiği pulpal hastalıkların tanısı	13
Tablo 4. McClannahan ‘nın belirttiği periapikal doku hastalıkların tanısı	13
Tablo 5 Periapikal doku hastalıklarının klinik sınıflandırılması	19
Tablo 6. Periapikal indeks puanlarının Brynolf kategorilerine olan ilişkisi.....	32
Tablo 7. Endodontik tedavi başarısında etkenler.....	34
Tablo 8. Klinik çalışmalarda başarı oranları	41
Tablo 9. Bakterilerin virulans faktörleri.....	63
Tablo 10. Mukoza yüzeylerindeki endojen floranın anaerop oranları	76
Tablo 11. Endojen florada yer alan anaerop bakteriler	76
Tablo 12. Ağız florasının mikroorganizmaları	77
Tablo 13. Endodontik enfeksiyonlarda bulunan bakteri filumları ve yaygın temsilcileri	78
Tablo 14. Farklı endodontik enfeksiyon tiplerinde bakteri türlerinin / filotip (takson) zenginliğinin genel bulguları	79
Tablo 15. Primer endodontik enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği.....	80
Tablo 16. İnataçlı Apikal Periodontitis Sonucu Kök Kanalı Tedavisi Yapılmış Dişlerde Bulunan Mikroorganizmalar	84
Tablo 17. Tedavi başarısızlığına bağlı inataçlı / ikincil enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği	85

Tablo 18 Ekstraradiküler enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği	86
Tablo 19. Antimikrobiyal disklerle anaerop bakterilerin ön tanısı	88
Tablo 20. İyon kaynakları.....	108
Tablo 21 MALDI'de yaygın olarak kullanılan bazı lazerler	115
Tablo 22 Yaygın olarak kullanılan bazı UV-MALDI matriksler	116
Tablo 23 Kütle analizörlerinin karşılaştırılması.	124
Tablo 24. Zenginleştirilmiş tiyoglikolat besiyeri içeriği	132
Tablo 25. 5% koyun kanı, hemin and vitamin K1 ihtiva eden Brucella Agarın içeriği.	136
Tablo 26. MALDI-TOF skor değerlerinin anlamı	142
Tablo 28. Retreatment vakalarından alınan örneklerle uygulanan anaerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	149
Tablo 29 Retreatment vakalarından alınan örneklerle uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	149
Tablo 30. Semptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklerle uygulanan anaerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	150
Tablo 31. Semptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklerle uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	150
Tablo 32. Asemptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklerle uygulanan anerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	151

Tablo 33. Asemptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	151
Tablo 34. Semptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere anaerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	152
Tablo 35. Semptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere aerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	152
Tablo 36. Asemptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere anaerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	153
Tablo 37. Asemptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere aerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.	153

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. PAI endeksi radyografik ve histopatolojik bulguların bir kombinasyonu	32
Şekil 2. 2. CBCT-PAI (Konik Işın Bilgisayarlı Tomografi-Periapikal İndeks) Skorları.....	33
Şekil 2. 3. İlk ticari elektrosprey kütle spektrometresi.	101
Şekil 2. 4. Metanol Molekülünün Kütle Spektrumu.....	105
Şekil 2. 5 Manyetik sektörlü kütle spektrometresinin kısımları.	106
Şekil 2. 6. Kütle spektrometresinin bölümleri (şematik olarak)	107
Şekil 2. 7. Termosprey kaynağının şeması	111
Şekil 2. 8. Elektrosprey kaynağının şeması	112
Şekil 2. 9. MALDI'nin temel prensibinin görünümü.....	114
Şekil 2. 10. AP-MALDI şeması	119
Şekil 2. 11. Manyetik sektörlü kütle analizörü şeması	121
Şekil 2. 12. Kuadropol Kütle Spektrometreleri.....	122
Şekil 2. 13. TOF analizörlü kütle spektrometresi.....	123
Şekil 2. 14. İyon tuzaklı kütle analizörünün şeması.....	124
Şekil 3. 1. Periapikal radyografisiyle birlikte akut apikal apseli bir vaka	128
Şekil 3. 2. PAI sınıflandırması yapılan periapikal lezyonlu diş radyografi örnekleri	129
Şekil 3. 3. povidon-iodine %10' luk ve etil alkol %70' lik	129
Şekil 3. 4. Hastaya rubber dam uygulaması ile işleme başlama	130

Şekil 3. 5. Steril bir pamuk pelet ile %70 lik etil alkol sürülen dişin giriş kavitesi açımı.....	130
Şekil 3. 6. H tip kanal eğesinde sökülmüş gutta perka.....	131
Şekil 3. 7. Üreme gözlenmeyen ve gözlenen sıvı tiyoglikolat besiyerleri.....	131
Şekil 3. 8. Sıvı tiyoglikolat besiyerlerinin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında toplanması	132
Şekil 3. 9. Hastalardan kağıt koni yöntemiyle alınan örneklerin tiyoglikolat (vitamin K ₁ ve hemin içeren) sıvı besiyerinin laboratuvarında toplanması.	133
Şekil 3. 10. Brucella kanlı agara ekim yapılırken.	134
Şekil 3. 11. Anaerop kavanoz (jar).....	135
Şekil 3. 12. Brucella kanlı agarda üreyen bakteri kolonileri.....	138
Şekil 3.13. Bruker Daltonics GmbH HCCA Matriks= α -Siyano-4-hidroksisinnaminik asit.....	139
Şekil 3. 14. Otomatik pipette hazırlanmış 1 μ L matriks çözeltisi	139
Şekil 3. 15. MSP 96 Target üzerine matriks eklenmesi ve kurumasının beklenmesi	139
Şekil 3. 16. MSP 96 Targetin MALDI-TOF MS sistemi haznesine yerleştirilmesi	140
Şekil 3. 17. MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics Microflex LT) sistemi ve MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)	141
Şekil 3. 18. Cihazın analiz ettiği örneklerden tanımlanmış <i>Enterococcus faecalis</i> 'e ait kütle spektrometresi.....	142
Şekil 4. 1. Retreatment vakalarından birindeki <i>E.faecalis</i> 'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi.	145

Şekil 4. 2. Retreatment vakalarından başkabirindeki <i>E.faecalis</i> 'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi. 145	145
Şekil 4. 3. Retreatment vakalarından farklı birindeki <i>E.faecalis</i> 'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi. 145	145
Şekil 4. 4. Retreatment vakalarından üç farklı <i>E.faecalis</i> 'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de flexAnalysis program ile elde edilen kütle spektrometreleri. 146	146
Şekil 4. 5. Çalışmaya dahil etmediğimiz ≤ 1.700 cut-off skorunun altında olanlardan 146	146
Şekil 4. 6. MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen edilen 1.700-1.999 olan bakterilerden <i>E.faecalis</i> 'in cins düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi..... 147	147
Şekil 4.7. <i>E.faecalis</i> 'in Biotyper system v.3.1 flexAnalysis programında gösterilen spektrumu. 147	147
Şekil 4. 8. <i>E.faecalis</i> 'in R programı MALDIquant 'da gösterilen spektrumu. 147	147
Şekil 4. 9. R programı ile spektrumunun yoğunluk aralığında değişiklik yapıldıktan önce..... 148	148
Şekil 4. 10. R programı ile spektrumunun yoğunluk aralığında değişiklik yapılmadan sonra..... 148	148
Şekil 4. 11. R programı ile herhangi bir spektrumunun base-line tespiti 148	148
Şekil 4. 12. Grup 1 retreatment vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı... 155	155
Şekil 4. 13. Grup 2 semptomatik apikal apseli vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı..... 156	156

Şekil 4. 14. Grup 3 asemptomatik apikal apseli vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.....	157
Şekil 4. 15. Grup 4 semptomatik apikal periodontitis vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.....	158
Şekil 4. 16. Grup 5 asemptomatik apikal periodontitis vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.....	159
Şekil 4. 17. Grup 1 retreatment vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları.....	160
Şekil 4. 18. Grup 2 semptomatik apikal apseli vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları.....	161
Şekil 4. 19. Grup 3 asemptomatik apikal apseli vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları.....	162
Şekil 4. 20. Grup 4 semptomatik apikal periodontitis vakaların kümeleme analiz validasyon analiz sonuçları.....	163
Şekil 4. 21. Grup 5 asemptomatik apikal periodontitis vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları.....	164

KISALTMALAR

MALDI-TOF MS	: Matriksle Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanlı Kütle Spektrometresi
PAI	: Periapikal İndeks
PCR (PZR)	: Polymerase Chain Reaction (Polimeraz Zincir Reaksiyonu)
AAE	: Amerikan Endodontistler Birliği
PMN	: Polimorfonükleer monositler
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
SAP	: Semptomatik Apikal Periodontitis
AAP	: Asemptomatik Apikal Periodontitis
AAA	: Akut Apikal Apse
KAA	: Kronik Apikal Apse
PRI	: Periapikal Olasılık İndeksi
CBCT	: Konik Işınlı Bilgisayarlı Tomografi
ESE	: Avrupa Endodonti Derneği
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetikası
Eh	: Okside - redüksiyon potansiyeli
LPS	: Lipopolisakkarit
IL	: İnterlökinler
TNF-α	: Tümör nekroz faktör-alfa
LTA	: Lipoteikoik asit
CpG	: Dinükleotirli DNA dizisi

fMLP	: N-Formyl- Methionil Lösil Fenilalanin
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
RAPD	: Random Amplified polymorphic DNA
AP-PZR	: Arbitrarily primed PCR
TMS	: Tandem Kütle Spektrometresi
ESI	: Elektro Sprey İyonizasyon
FDA	: Food and Drug Administration (Yiyecek ve İlaç idaresi)
ASMS	: Amerikan Kütle Spektrometresi Derneği
EI	: Elektron İmpakt Kaynağı
CI	: Kimyasal İyonlaştırma
FI	: Alan İyonlaştırma
FD	: Alan Desorpsiyonu
PD	: Plasma Desorpsiyonu
FAB	: Hızlı Atom Bombardımanı
TSP	: Termosprey İyonlaştırma
LD	: Lazer Desorpsiyonu
SIMS	: Sekonder İyon Kütle Spektrometresi
CHCA	: α -Siyano-4-hidroksisinnamik asit
DHB	: 2,5-Dihidroksibenzoik asit
SA	: 3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit
AP-MALDI	: Atmosfer Basıncılı MALDI
MS	: Mass Spectrometry (Kütle Spektrometresi)

TOF : Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri

EtOH : Etanol

ACN : Asetonitril

FA : Formik Asit

IVD : İn Vitro Diagnosis



1. GİRİŞ VE AMAÇ

Ağız, diş ve çene hastalıklarında veya travmatik yaralanmalarda tedavi protokollerinin uygulanmasının ana amacı, en yüksek düzeyde hasta rahatlığının, uzun ömürlü tedavinin ve estetik beklentilerinin sağlanmasıdır. Bu beklentilerinin sağlanabilmesi de gerekli görülen dişlere başarılı bir kök kanal tedavisi yapılması temeline dayanmaktadır. Bu temel kök kanallarının temizlenmesi ve şekillendirilmesi esnasında bakterilerin ortadan kaldırılması veya büyük oranda insidanslarının düşürülmesi, kök kanallarının üç boyutlu bir biçimde doldurulması ve yeniden kontamine olmasının engellenmesiyle gerçekleştirilir.

Günümüz endodonti literatürlerinde tanımlamalar yapılarak "başarı ve başarısızlığın" belirteçlerine dikkat çekildiği görülüyor. Başarılı kök kanalı tedavisi için klinik semptomların ve apikal lezyonun olmamasını, başarısız kök kanalı tedavisi için apikal periodontitin semptomsuz ve sadece radyografide görülebilir olmasını belirteç örnekleri olarak verebiliriz.

Endodontik açıdan sonuçları değerlendirilme yöntemleri arasında klinik muayene, radyografik bulgular ve histolojik değerlendirmeleri sayabiliriz. Histolojik değerlendirme, periapikal dokuların kök kanalı tedavisinden sonra pratik değildir ve cerrahi olmaksızın imkansızdır. Histolojik bulgularla olumsuz radyografik görünüm arasındaki ilişki derecesi belirsizdir. Brynolf yapmış olduğu histolojik çalışmada, radyografilerdeki başarılı görünüme rağmen belli oranda periradiküler iltihap olduğunu gösterirken, Green ve arkadaşları iltihapsiz olduğunu göstermişlerdir. Bu yüzden de klinik bulgularla radyografik değerlendirmeler, kök kanalı tedavisinden sonra iyileşme derecesini belirlemek açısından en pratik yöntemlerdir [1, 2].

Klinik muayenede ağrı veya şişliğin, fistül yolunun, sondalama defektlerinin ve yumuşak doku harabiyetlerinin olup olmamasına dikkat edilir. Ørstavik ve arkadaşları radyografik olarak kök kanal tedavisi sonuçlarını yorumlarken "periapikal indeks" in kullanılmasını önermişlerdir. Brynolf 1967'de tanımladığı bu periapikal indekste 5 farklı radyografik görünümü karşılaştırmaktadır. Sağlıklı periapikal dokudan (PAI 1), geniş periapikal lezyona (PAI 5) doğru değişik durumları

simgeleyen görüntülere sahiptir. İşlem öncesi ve takip röntgenlerine göre bu beş skordan biri verilerek başlanır. Sonuçlar sınıflandırıldığında, eğer lezyonun boyutu azalırsa "iyileşmekte", lezyon tamamen ortadan kalktıysa "iyileşmiş" ve yeni bir lezyon oluşmuşsa "gelişmekte" olan bir lezyon olarak adlandırılır [3].

Gelişmekte olan bu lezyon başarısız olan endodontik tedavi veya post-endodontik hastalık (tedavi sonrası hastalık) olarak ifade edilebilir. Böyle bir durumda, başarılı bir endodontik tedavinin ortaya çıkması için kanal tedavisinin başarısızlık nedenlerini iyi tanımlamak, hastalığın etyolojisini belirlemek ilk şart olmalıdır. Başarısızlığın nedenlerine yoğunlaştığımızda, yabancı maddelerin yanı sıra kök kanal sisteminin tekrar enfekte olması ve inatçı mikroorganizmaların varlığını görmekteyiz [4].

Günümüzde kök kanal enfeksiyonları polimikrobiyal kaynaklıdır. Primer enfeksiyonlar, 10'dan 30'a kadar değişen bakteri türleri ve kanal başına 10^3 - 10^8 bakteri hücresinden oluşan karışık bir ortamın olmasıyla karakterizedir [5, 6].

Primer endodontik enfeksiyonlarda ve bunlarla ilişkili semptomatik ve asemptomatik endodontik enfeksiyonlarda, apikal periodontitle ilişkili apseye sebep olan kök-kanal sisteminin sterilizasyonunu bozan mikroorganizmalardan en sık görüleni anaerob gram-negatif bakterilerdir. Primer intraradiküler enfeksiyonlarda Gram-pozitif bakteriler daha nadir görülür [7-9].

İntraradiküler enfeksiyona bağlı en sık görülen ekstraradiküler enfeksiyon tablosu akut apikal apsedir. İntraradiküler enfeksiyondan bağımsız en sık görülen ekstraradiküler enfeksiyon şekli ise apikal aktinomikozdur. Bu bağımsızlıktan dolayı apikal aktinomikozun başarılı tedavi şekli sadece periradiküler cerrahidir. Özenle yapılmış kök-kanal tedavisine rağmen ortaya çıkan inatçı apikal periodontit lezyonlarının nedenlerinden biri olarak ekstraradiküler mikroorganizmalar sorumlu tutulmuştur [10].

Periradiküler lezyon, primer olarak kök kanal sisteminde bulunan bakteri, mantar veya endotoksin (lipopolisakkarit) kaynaklı enfeksiyon ile buna karşı gelişen konak cevabının sonucu olarak oluşur [11, 12].

Bununla birlikte mikroorganizmaların apeksin ilerisinde üreyebildiklerini gösteren çalışmalar vardır [13-15].

Kök kanalının apikal 1/3'ünde uzaklaştırılmayan ve apikal foramene yakın sement lakünlerinde varlığını sürdürmekte olan mikroorganizmalar, kök kanal tedavilerinin başarısızlık nedenleri arasında yer almaktadır [16].

Endodontide ağırlı alevlenmeler, periapikal yıkım ve inatçı enfeksiyonlar ile ilişkili spesifik bakteriler ve bu bakterilerin tanımlanması son derece önemli ve güncel konulardır [10].

Endodontik hastalıklara neden olan patojenlerin tanımlanma gerekliliği kanal tedavilerinin başarı oranını yükseltmede önem arz eder. Bu mikroorganizmaların tespiti için moleküler biyolojide kısa sürede yanıt veren çeşitli yöntemlerin olduğu belirtilmiştir [17].

Kök kanal patojenlerinin tespit edilmesinde mikroskopi, kültür yöntemleri, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır. Çalışmalarda bu yöntemler arasında en çok polimeraz zincir reaksiyonu (PZR)'nun kullanıldığını görüyoruz. Ancak zahmetli ve pahalı bir yöntem olması, canlı hücrelerle birlikte ölü hücrelerin de tespit edilmesi gibi bir çok dezavantajının bulunması moleküler biyolojide gelişmeleri matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) 'ne odaklamıştır. MALDI-TOF MS'nin yumuşak iyonizasyon yaklaşımı ve bakteri proteinlerinin iyonlara desorpsiyonu yoluyla belirli kütle spektrumları tanımlanmakta ve dakikalar içerisinde bakterinin kimliği tespit edilmektedir. Moleküler ve immünolojik temelli yöntemlere göre daha ucuz, hızlı ve doğru saptama yöntemlerinden birisidir [18-22].

Enfekte kök kanalından izole edilen anaerob bakterilerin MALDI-TOF MS ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanması, rutin klinik tedavilere yanıt vermeyen inatçı enfeksiyonlara, endodontik tedavilere ve diğer endodontik çalışmaların başarılarına katkı sağlama potansiyeline sahiptir.

Kök kanal tedavisi yapılmasına rağmen inatçı apikal periodontit lezyonlarına neden olan anaerob türlerin dakikalar içinde hızlı bir şekilde MALDI-TOF MS

aracılığıyla doğru tanımlanması, uygulanması gereken tedavilerin şekillenmesine, tedaviler esnasında hastaya verilecek doğru antibiyotik ve ilaç seçiminin yapılabilmesine, kök kanal tedavilerinin başarısına önemli bir katkı sağlayacaktır.

MALDI-TOF MS'ın mikrobiyolojideki kullanımı ekonomik açıdan rekabetçi bir seviyededir. Hatta, düşük ayrıca maliyetleri ve teknisyenlerin kütle spektrometrisi için daha az zaman harcamaları sebebiyle, VITEK kartları ve PCR sekanslaması gibi yaklaşımlardan daha ucuzdur.

Ayrıca görece kolay kullanımı ve ortaya çıkardığı sonuçların kolayca açıklanabiliyor ve sensitiviteilerinin yüksek olması sebebiyle de, bu teknoloji laboratuarlarda tercih edilmeye başlamıştır.

Bu çalışmada periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin MALDI-TOF MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) aracılığıyla tanımlanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ENDODONTİDE TEŞHİS VE TEDAVİ PLANLAMASI

Yaklaşık üç yılda bir yenileyerek yazmış olduğu resimli tıp sözlüğünde 1900 yılından beri diagnoz (tanı) terimini Dorland “bir hastalığı diğerinden ayırt etme sanatı” olarak betimlemiştir [23].

Pulpal ve periapikal hastalıkların saptanıp sınıflandırılmaları için çeşitli tanısal sınıflandırma sistemleri geliştirilmeye çalışılmıştır [24]. Ancak, birçok çalışmadaki klinik bulgulardan çok histopatolojik bulgulara dayandırılan tanımlar çoğu kez kafa karışıklığına, yanıltıcı terminolojiye ve yanlış tanımlara neden olmakla beraber, bu klinik durum ile histopatolojisi arasında büyük bir ilişki olmadığı sonucunu göstermiştir [25].

Pulpa dokusunun histolojik olarak incelenmesi için çıkarılması pratik değildir. Bu yüzden tedavi planı seçeneklerini formüle etmek için klinik sınıflamalar geliştirilmiştir [26].

Endodontistlerin pulpal ve periapikal hastalık tanısını uygun şekilde koyabilmelerinin temel amacı hastaya hangi klinik tedavinin gerekli olduğunu belirlemektir. Yanlış bir değerlendirmeyle teşhis ve tedavi planlamasının yanlış yönlendirilmesi endodontistlerin asla istemeyeceği bir durumdur. Evrensel bir sınıflandırma sisteminin kurulmasının amacı, uluslararası endodonti alanındaki eğitimciler, klinisyenler, öğrenciler ve araştırmacılar arasında iletişimi kolaylaştırmaktır. Böylelikle basit ve pratik sistemin kullanılması klinik ortamda en uygun tedavi yaklaşımına klinisyenin yönlendirilmesini kolaylaştıracaktır [26].

Teşhis zaten kendi başına karmaşık ve zorlu bir süreçtir. Klinik semptomatoloji ve pulpa histopatolojisi arasında zayıf korelasyonlar mevcut olması nedeniyle karmaşıklığa yol açabilecek görüş ayrılıklarını değerlendirmek yanıltıcı olabilir. Biyolojik ve metrik temelli bir terminoloji dizisi bulunmadığından, Amerikan Endodontistler Birliği (AAE) Yönetim Kurulu, terminolojiye uyum sağlamak için endodontik tanı için ortak görüş odaklı, kanıta dayalı bir sınıflandırma sisteminin kurulmasını ve benimsenmesini önermiştir.

Amerikan Endodontistler Birliği (AAE) 3 Ekim 2008'de Chicago Illinois'de pulpa ve periapikal hastalık durumlarının sınıflandırılmasında kullanılan terminolojiyi standartlaştırma girişimi için 'Endodontide Diagnostik Terminoloji üzerine bir Ortak Görüş Konferansı' düzenledi. 2008–2009 yılları arasında başkanlık yapan Louis E. Rossman'ın uyarısı üzerine AAE Yönetim Kurulu, özellikle Amerika Birleşik Devletleri ve Kanada dış hekimliği okullarında, endodontik ders kitaplarında, standartlaştırılmış tanı koyma terimlerinin eksikliği konusundaki kaygılarını ele almak için bir mutabakat konferansı yapılmasını uygun gördü. Buna göre, konferansı kavramsallaştırmak, tasarlamak ve uygulamak üzere Dr. Gerald N. Glickman, Leif K. Bakland, Ashraf F. Fouad, Kenneth M. Hargreaves ve Scott A. Schwartz'dan oluşan özel bir komite görevlendirildi [24].

Beş yıllık uzun vadeli süreçte komitenin almış olduğu hedefleri şöyleydi:

1. Biyolojik ve metrik temelli standart terminoloji için alınan kararların kabulünü gerçekleştirmek,
2. Bilinen prognostik etkileriyle optimal tedavi kararları için temel oluşturan metrik tabanlı klinik tanı kategorilerini geliştirmek ve doğrulamak,
3. Uzun vadeli hedef # 2'yi ele almak için araştırmayı tanımlamak, yönetmek ve desteklemek,
4. Metrik tabanlı klinik tanı kategorilerine yeni araştırma bulgularını dahil etmek için ortak görüş konferansı yaklaşımını tekrar bir araya getirmek; travmatize dişlerle ilgili temanın bir sonraki fikir birliği konferansında yer alan soruları belirlerken önceliği ve dikkate almasını sağlamak,
5. 2015 yılından önce tüm hasta sağlık kayıtlarının elektronik ortamda mevcut olması için Ulusal Sağlık Bilgi Altyapısı girişimi ile uyumlu olarak 2015 yılından önce teşhis kodları oluşturmak,
6. Tedaviye verilecek iyileştirme yanıtını tahmin etmek için biyolojik olarak, klinik olarak yararlı belirteçler geliştirmek ve doğrulamak,

7. Pulpa ve periradiküler dokuların patolojik koşullarını daha iyi anlamak için gelecekteki araştırma çalışmalarında izlenmesi gereken verileri tanımlamak

a. Uygun görüntüleme araçları.

b. Spesifik patolojik koşulları ve / veya tedavi sonuçlarını öngören uygun biyolojik işaretleyiciler, enflamatuar mediyatörler ve / veya mikrobiyal DNA sekansları.

c. Rutin tedavi planlaması sırasında hastanın ağızındaki herhangi bir diş üzerinde endodontik testler için klinik endikasyonlar.

d. Tanı kategorilerini semptomlara, tedaviye ve / veya prognoza bağlama.

e. Hastanın sistemik sağlığı ve endodontik tanı üzerindeki etkisi

8. Travmatik yaralanmaların tanısının endodontik tanıya nasıl dahil edileceğinin belirlenmesi.

9. Dişlerin çatlak tanısı (çatlaklar ve düşey kırıklar, yüzeysel çürükler, dentin hipersensitivitesi, apikal radyofasiteler ve şimdiye kadar iyi tanımlanmamış, travma ile ilgili durumlar) pulpa tanısını tanımlar.

10. Metrik tabanlı klinik tanı kategorilerinin geliştirilmesini ve onaylanmasını desteklemek için bilgi alanındaki her iki alanı ve bilgi boşluklarını tanımlayan soruları formüle etmek,

11. Bu hedeflerle ilgili finansman önceliklerini, akademik endodontik topluluğa ve AAE Vakfı'na tanımlamak,

12. Mevcut bir komiteyi tanımlamak veya uzun vadeli hedeflerin planlanmasını, gözetimini ve yönetimini yeniden bir araya getirmek için yeni bir komite atamak.

Amerikan Endodontistler Birliği (AAE) ' nin yukarıda bahsettiğimiz hedeflerini gerçekleştirmek için;

1. Endodontik tanı sırasında kullanılan tüm parametrelerin ve / veya ölçümlerin metriklerini, hiyerarşisini ve tahmini değerini belirlemek,
2. Pulpal sağlık ve hastalık durumları için tüm tanı terimlerini tanımlamak,
3. Periapikal / periradiküler sağlık ve hastalık durumları için tüm tanı terimlerini tanımlamak,
4. Endodontik tedavi modalitelerini tanımlamak, için 4 alt komite görevlendirildi [24, 27].

Akut ve kronik, semptomatik ve asemptomatik, geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz, nonvital, nekrotik, apikal, periapikal ve periradiküler gibi terimler benzer klinik tabloları tanımlamak için kullanılır. Konferans, ders kitabı yazarları, klinisyenler ve endodontik tanısal sınıflamaları öğreten dişhekimliği fakülteleri için ortak bir tanısal terminoloji oluşturmak üzere düzenlenmiştir [26].

Muayene ve tanı prosedürleri, hastanın varolan esas şikayetiyle birlikte medikal ve dental geçmişini kaydetmenin yanı sıra radyografik ve klinik muayenelerin gözden geçirilmesini de içeren mantık çerçevesinde her bakımdan uygun ve tutarlı bir düzeni izlemelidir. Radyografik incelemeler sıklıkla en az bir periapikal filmle birlikte mezial ve distal açılı filmleri içeren konvensiyonel yöntemler ile sınırlandırılırken teknolojinin hızlı gelişmesiyle Koni-Işınlı Volümetrik Görüntüleme (CBVI) ve Koni-Işınlı Bilgisayarlı Tomografi (CBCT) olarak bilinen üç boyutlu görüntülemelerden de faydalanılır. Klinik muayene ekstraoral ve intraoral değerlendirmeler ve diğer tanı testlerini içerir. Muayene prosedürleri sırasında hastanın esas şikayetinin değerlendirilmesi ve yorumlanması gerekir. Sonuçlar hem pulpa hem de apikal bir tanıyı içeren iki bölümlük bir endodontik tanı ile sonuçlanmalıdır [6, 26].

Abott ve arkadaşları endodontik tanı koymak için gerekli muayene prosedürlerini Tablo 1 'de kısa ve öz bir şekilde tanımlamışlardır [28].

Tablo 1. Endodontik tanı koymak için gerekli muayene prosedürleri [28]

Tıp / dental geçmişi	Geçmiş / son tedavi, ilaçlar
Temel(Ana) şikayet (varsa)	Ne kadar sürdüğü, semptomlar, ağrı süresi, yeri, başlangıcı, uyarıcı, rahatlama, sevk, ilaçlar
Klinik muayene	Yüz simetrisi, sinüs kanalı, yumuşak doku, periodontal durum (tarama, hareketlilik), çürük, restorasyonlar (kusurlu, yeni yerleştirilmiş?)
Klinik test:pulpa testleri	Soğuk, elektrikli pulpa testi, ısı
Klinik test:periapikal testleri	Perküsyon, palpasyon, Tooth Slooth (ısıma)
Radyografik analiz	Yeni periapikaller (en az 2), bitewing, konik ışın bilgisayarlı tomografi
Ek testler	Transilluminasyon, seçici anestezi, test boşluğu

Amerikan Derneği Endodontistleri ve Amerikan Endodonti Birliği tarafından onaylanan tanı terminolojisinde (Tablo 2) pulpa hastalıkları ve periapikal doku hastalıkları tanımlarını şu şekilde bahsetmiştir:

2.1.1. Endodontide Pulpa Hastalıklarının Tanısı

2.1.1.1. Normal Pulpa:

Pulpanın semptomsuz olduğu vitalite testine duyarlılığının normal sınırlar içinde olduğu bir klinik tanı kategorisidir. Pulpa histolojik olarak normal olmamasına rağmen, klinik olarak normal bir pulpa, termal soğuk testine hafif veya geçici bir yanıt verir ancak uyarıcı kaldırıldıktan sonra bir ila iki saniyeden fazla bu yanıt sürmez. Söz konusu diş bitişik ve kontralateral dişlerle karşılaştırılmadan olası bir tanıya ulaşamaz. İlk olarak komşu dişleri ve kontralateral dişleri test etmek en iyisidir, böylece hasta soğuğa karşı normal yanıtın deneyimini bilir.

2.1.1.2. Reversible (geri dönüşümlü) Pulpitis :

Etiyolojinin uygun yönetiminin ardından inflamasyonun düzelmesi ve pulpanın normale döndüğünü gösteren subjektif ve objektif bulgulara dayanır. Soğuk ya da tatlı gibi bir uyarıcı uygulandığında ve uyarıcının çıkarılmasından sonra birkaç saniye içinde kaybolduğu, rahatsızlık yaşandığı anlardandır. Bu tipik etiyolojilerde açığıdaki dentini, çürüğü veya derin restorasyonu içerebilir. Şüpheli dişin periapikal bölgesinde önemli bir radyografik değişiklik yoktur ve hastanın bahsettiği ağrı kendiliğinden değildir. Etiyolojilerin giderilmesini takiben (örneğin çürüğün temizlenmesi ve restorasyon, maruz kalan dentinin kapatılması), hastanın şikayeti olan dişinin “geri dönüşümlü pulpitisin” normal bir duruma döndüğünü belirlemek için daha fazla değerlendirme gerektirir. Kendi başına dentin hassasiyeti inflamatuvar

bir süreç olmamasına rağmen, bunun tüm belirtileri geri dönüşümlü bir pulpitisinkileri taklit eder.

2.1.1.3. Semptomatik irreversible (geri dönüşümsüz) Pulpitis :

Vital iltihaplı pulpanın iyileşemediği ve kök kanal tedavisinin endike olduğu subjektif ve objektif bulgulara dayanır. Özellikle hasta termal uyarın üzerinde keskin ağrı, acı (genellikle uyarın kaldırıldıktan sonra 30 saniye veya daha uzun süren), kendiliğinden (provoke ağrı) oluşan ağrıdan şikayet edebilir. Bazen ağrı, yatarak ya da bükülme gibi postüral değişiklikler ile vurgulanabilir ve tezgah üstü analjezikler tipik olarak etkisizdir. Yaygın etiyojiler arasında derin çürükler, geniş çaplı restorasyonlar veya pulpal dokuları ortaya çıkaran kırıklar bulunabilir. Semptomatik geri dönüşü olmayan pulpitisine sahip dişlerin teşhis edilmesi güç olabilir çünkü inflamasyon periapikal dokulara henüz ulaşmamıştır, bu nedenle perküsyona ağrı veya rahatsızlık vermez. Bu gibi durumlarda, dental öyküsü ve termal testler, pulpa durumunun değerlendirilmesinde temel araçlardır.

2.1.1.4. Asemptomatik irreversible (geri dönüşümsüz) Pulpitis :

Vital iltihaplı pulpanın iyileşemediğini ve kök kanal tedavisinin endike olduğunu gösteren subjektif ve objektif bulgulara dayanan bir klinik tanıdır. Bu vakalarda klinik semptom görülmez ve genellikle normal olarak termal testlere cevap verir, ancak travma veya derin çürüklerin çıkarılmasıyla ortaya çıkması muhtemeldir.

2.1.1.5. Pulpa Nekrozu:

Diş kanalının ölümünü gösteren ve kök kanal tedavisini gerektiren bir klinik tanı kategorisidir. Pulpa, pulpa testine cevap vermez ve asemptomatiktir. Pulpa nekrozu, kanal enfekte olmadıkça apikal periodontite (perküsyon veya osseous bozukluklar ile ilgili radyografik kanıtlara) neden olmaz. Bazı dişler, kalsifikasyon, yakın zamanda travma öyküsü veya sadece dişin yanıt vermemesi nedeniyle pulpa testine cevap vermeyebilir.

2.1.1.6. Önceden tedavi edilen:

Dişin endodontik olarak tedavi edildiğini ve kanalların intrakanal ilaçlar dışında çeşitli dolgu maddeleri ile doldurulduğunu gösteren bir klinik tanı kategorisidir. Diş genellikle termal veya elektrik pulpa testine cevap vermez.

2.1.1.7. Önceden Başlatılan Tedavi:

Dişin daha önce pulpotomi veya pulpektomi gibi kısmi endodontik tedavi ile tedavi edildiğini gösteren bir klinik tanı kategorisidir. Tedavi seviyesine bağlı olarak, diş pulpa test yöntemlerine cevap verebilir veya vermeyebilir.

Tablo 2. Amerikan Derneği Endodontisleri ve Amerikan Endodonti Birliği tarafından 2009 yılında onaylanan tanı terminolojisi [24, 27].

Pulpal Hastalıkların Tanısı	
Normal pulpa	Pulpanın semptomsuz olduğu ve normal olarak pulpa testine duyarlı olduğu bir klinik teşhis kategorisi.
Reversible pulpitis	Enflamasyonun düzelmesi ve normale döndüğünü gösteren subjektif ve objektif bulgulara dayanan bir klinik tanı.
Semptomatik irreversible pulpitis	Vital iltihaplı pulpanın iyileşemediğini gösteren subjektif ve objektif bulgulara dayanan bir klinik tanı. Kalıcı termal ağrı, spontan ağrı, bahsedilen ağrı.
Aseptomatik irreversible pulpitis	Vital iltihaplı pulpaların iyileşemediğini gösteren subjektif ve objektif bulgulara dayanan bir klinik tanı. klinik semptom olmayan, iltihap, çürük, travma.
Pulpa nekrozu	Diş pulpası nekrozunu gösteren bir klinik tanı kategorisi. Pulpa genellikle pulpa testine cevap vermez.
Önceden tedavi edilmiş	Dişin endodontik olarak tedavi edildiğini ve kanalların intrakanal ilaçlar dışında çeşitli dolgu maddeleri ile doldurulduğunu gösteren bir klinik teşhis kategorisi.
Önceden tedaviye başlanmış	Dişin daha önce kısmi endodontik tedavi ile tedavi edildiğini gösteren bir klinik tanı kategorisi (örneğin, pulpotomi, pulpektomi).
Periapikal Doku Hastalıkları Tanısı	
Normal apikal dokular	Perküsyon veya palpasyon testine duyarlı olmayan normal periradiküler dokuları olan dişler. Kökü çevreleyen lamina dura sağlamdır ve periodontal ligament alanı muntazamdır.
Semptomatik apikal periodontitis	Genellikle apikal periodonsiyumdan kaynaklanan iltihaplanma, ısırma ve / veya perküsyon veya palpasyona acı veren bir yanıt dahil olmak üzere klinik semptomlar üretir. Apikal bir radyolüsent bölge ile ilişkili olabilir veya olmayabilir.
Aseptomatik apikal periodontitis	Apikal periodontiumun pulpa kaynaklı inflamasyon ve destrüksiyonu apikal bir radyolüsent alan olarak ortaya çıkar ve klinik semptomlara neden olmaz.
Akut apikal apse	Hızlı başlangıçlı, kendiliğinden ağrı, dişin baskıya hassasiyeti, irin oluşumu ve ilişkili dokuların şişmesi ile karakterize olan pulpa enfeksiyonuna ve nekroza bağlı iltihabik bir reaksiyon.
Kronik apikal apse	Pulpa enfeksiyonu ve nekroza karşı enflamatuvar bir reaksiyon, yavaş yavaş başlangıçlı, az ya da hiç rahatsızlık ve ilişkili sinüs traktusundan aralıklı irin akıntısı ile karakterize edilir.
Condensing osteitis	Diffüz radyopak lezyon, genellikle dişin apeksinde görülen, düşük dereceli inflamatuvar uyarılara lokal kemik reaksiyonunu temsil eder.

2.1.2. Endodontide Periapikal Doku Hastalıkları Tanısı

2.1.2.1. Normal Apikal Dokular :

Perküsyona veya palpasyon testine duyarlı değildir ve radyografik olarak kökün etrafını saran lamina dura sağlamdır ve periodontal ligament alanı üniformdur. Pulpa testinde olduğu gibi, perküsyon ve palpasyon testine öncelikle normal apikal dokuya sahip dişlerden başlanmalıdır.

2.1.2.2. Semptomatik Apikal Periodontitis:

Genellikle apikal periodonsiyumun inflamasyonunu temsil eder. Bu tabloda hastanın, ısırıldığı zaman ve / veya perküsyonda veya palpasyonda acı verici bir yanıt içeren klinik semptomlar ürettiği gözlenir. Bu tablodaki radyolojik değişiklikler hastalığın evresine bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Periodontal ligaman normal genişlikte veya bir periapikal radyolüzens olabilir. Perküsyon ve / veya palpasyondaki şiddetli ağrı, dejeneratif bir pulpa ve kök kanal tedavisine ihtiyaç olduğunu gösterir.

2.1.2.3. Asemptomatik Apikal Periodontitis:

Pulpal kaynaklı apikal periodonsiyumun inflamasyonu ve yıkımıdır. Apikalde bir radyolüsen görüntü verirken, klinik semptomlar göstermez. Perküsyon veya palpasyonda ağrı yoktur.

2.1.2.4. Kronik Apikal Apse:

Pulpa enfeksiyonu ve nekroza karşı inflamatuvar bir reaksiyon olup, yavaş başlangıçlı, az ya da hiç rahatsızlık vermeyen ve ilişkili sinüs traktusundan aralıklı pü akıntısı ile karakterize bir hastalıktır. Radyografik olarak, tipik radyolüsen kemik yıkımı belirtileri vardır. Sinüs yolunun kaynağını belirlemek için, bir guttaperka konisi stomaya kadar dikkatlice yerleştirilir ve bir radyografi alınır.

2.1.2.5. Akut Apikal Apse:

Hızlı başlangıçlı, spontan ağrı, dişin aşırı baskısı, iltihap oluşumu ve ilişkili dokuların şişmesi ile karakterize pulpal enfeksiyon ve nekroz için inflamatuvar bir

reaksiyondur. Radyografik yıkım belirtileri olmayabilir ve hastada sıklıkla keyifsizlik, ateş ve lenfadenopati görülür.

McClannahan'nın 2011 yılında pulpal ve periapikal doku hastalıklarında tanı koymada ayırt edici verileri Tablo3-4 belirtmiştir.

Tablo 3. McClannahan 'nın belirttiği pulpal hastalıkların tanısı [29]

Pulpal Diağnoz	Ana Şikayeti	Geçmişi	Radyografik Bulgu	EPT	TT	Per	Pal	M	Diğer	
Normal Pulpa	Yok	-	Normal	R	R,NL	-	-	-		
Reversible Pulpitis	Sıcak Soğuk Hassaslık	-	Normal	R	NL	-	-	-		
Semptomatik Irreversible Pulpitis	Kalıcı Soğuk Hassaslık	Sıcak Spontan Ağrı	N, DRL	Geniş PDL,	R	L	-	-	-	Çürük, Kırık Restoratif Yöntemler veya Travma
Aseptomatik Irreversible Pulpitis	Yok	-	N, DRL	Geniş PDL,	R	R	-	-	-	
Nekrotik Pulpa	Değişken	Değişken	N, DRL	Geniş PDL,	NR	NR	-	-	-	
Önceden Tedavi Edilen	Değişken	Önceki RCT	N, DRL	Geniş PDL,	NR	NR	-	-	-	
Önceden Başlatılan Tedavi	Değişken	Önceki Pulpotomi Pulpektomi	N, DRL	Geniş PDL,	NR	NR	-	-	-	Koronal Mikrosizinti

Tablo 4. McClannahan 'nın belirttiği periapikal doku hastalıkların tanısı [29]

Apikal Diağnoz	Ana Şik.	Geçmişi	Rad.Bulgu	EPT	TT	Per	Pal	M	Diğer
Semptomatik Apikal Periodontitis	Konforsuz Isırma ve Çiğneme	Önceki Restor?	Normal, ARL or Genişlemiş PDL	R NR	R, NR	S	S or NS	±	Okluzal Travma
Aseptomatik Apikal Periodontitis	Yok	Asemt.	ARL	NR	NR	NS	NS	±	Nek. Veya önceden yap. tedavi
Akut Apikal Apse	Ağrı ve Şişlik	Koronal mikrosz?	Normal, Genişlemiş PDL or ARL	NR	NR	S +++	S Değ.	Değ.	Nek. Veya önceden yap. tedavi
Kronik Apikal Apse	Kötü tat "Dişeti yumrusu"	Asemt.	ARL	NR	NR	NS	NS	Fiz.	Nek. Pulpasız

EPT (electric pulp tester): Elektrikli Pulpa Test cihazı NL (Non-linger): Kalıcı değil RCT (Root Canal Therapy): Kök Kanal Tedavisi DRL (distinct radiolucency): Farklı Radyolüsent R (Response): Tepki var ARL (Apical radiolucency): Apikal radyolüsenzi NR (Non-responsive): Tepki yok S (Sensitive): Hassaslık var NS (Non-sensitive): Hassaslık yok L (Linger): Kalıcı M (Mobilite): Mobilite Per : Perküsyon Pal: Palpasyon TT: Termal Test N: Normal

2.2. PULPA VE PERİAPİKAL DOKU İRRİTANLARI

Pulpanın veya periradiküler dokuların irritasyonunun sonucunda iltihapla karşılaşılabilir. Bakteriler ve virüsler canlı irritanları meydana getirirken, mekanik, termal ve kimyasal olanlar cansız irritanları oluşturur.

2.2.1. Mikrobiyal İrritanlar

Pulpa ve periradiküler dokuların ana irritasyon kaynağı mine defektiyle dentini etkileyip çürük kavitesine yerleşen mikroorganizmalardır. Periapikal enfeksiyonların çoğu bu mikroorganizmaların pulpayı enfekte etmesiyle başlar. Daha ender olarak ise de periodontal cepten apikal bölgeye ulaşan mikroorganizmalar nedeniyle oluşur [30, 31]. Öncelikle diş üzerinde bulunan bakteri plağındaki mikroorganizmalar besinlerle alınan sakkarozu sindirerek asit oluşturur. Bu asit dişin temel sert tabakası olan mine ve sementi zayıflatır. Diş çürüğü oluşumunu başlatır. Bu fazda plakta görülen *Streptococcus mutans*, *Actinomyces* ve *Lactobacillus* bakterilerinin ürettiği hücre dışı polisakkaritin salgılanması diş yüzeyine diğer bakterilerin tutunmalarını artırıcı rol oynar [32, 33]. Ağız florasında mantarlar, arkea ve virüsler de bulunmasına rağmen bakteriler konakçıda oluşan enfeksiyonda metabolizma ürünleri, sebep olduğu fizikokimyasal değişimler, virülans faktörleri ile bağışıklık sistemini hızla zayıflatır çürüklere ve abseye sebep olurlar [30].

Dentin, mikroorganizmaların bulunması sonucu zayıflar, dentinin en derin tabakasında bu mikroorganizmaların popülasyonu azalır [34]. Buna rağmen çürük pulpaya doğru ilerledikçe infiltrasyonun özelliği değişir. Pulpa dokusuna ulaşan mikroorganizmalar polimorfonükleer monositler (PMN) ile karşılaştığı alanda bir likefaksiyon nekrozu alanı oluşmaya başlar [35]. Pulpal doku lokal olarak kronik enflamatuar hücreler (makrofaj, lenfosit, plazma hücreleri gibi) ile infiltre olur. Çürük pulpaya ilerledikçe kronik enflamasyon yaygınlaşır ve akut lezyonlar periapikale doğru enflamasyon cevap (ağrı, diş etinde şişme, sızlama gibi) oluşumuyla ilerler [31, 36]. Pulpanın açılmasından sonra bakteriler nekroz bölgesinde kolonize olur ve kalırlar. Pulpa dokusu uzun zaman boyunca iltihaplı kalabilir veya hızlıca nekroza dönüşebilir. Bu durum çeşitli faktörlere bağlıdır: (1) bakterilerin virülansı, (2) pulpa içi basıncındaki belirgin artışı önlemek için

enflamatuar sıvıları serbest bırakma yeteneği, (3) konak direnci, (4) dolaşım miktarı ve (5) lenf drenajı [31].

Yamasaki ve arkadaşları, nekrozun pulpanın üst kısmından apikal kısımlarına doğru giderek yayıldığını, apikal lezyonun, pulpa iltihabı ve nekrozun ardından geliştiğini ve lezyonların önce yatay olarak ve daha sonra genişlemeleri durunca dikey olarak yayıldıklarını yaptıkları çalışmalarda göstermişlerdir [37].

Pulpa bu zarar veren irritanları yok edemediği gibi ağız boşluğuna ve çürüğe açılması sonucunda bakterileri ve yan ürünlerini barındırır hale gelir. İritanlar devam ederse, sonrasında gelen zarar geniş olur ve pulpanın her yerine yayılır. Daha sonra, bakteriler, yan ürünleri veya nekrotik pulpadaki diğer irritanlar, kanaldan periapikale doğru yayılarak enflamatuar lezyonların oluşumuna neden olur. Bakteriler, pulpa ve periradiküler hastalıkların patogeneğinde önemli bir rol oynarlar. Araştırmalar, bakteriyel kontaminasyon olmadan pulpal veya periradiküler patozun oluşmayacağını göstermiştir [38-40]. Bazı çalışmalarda semptomatik periapikal lezyonlar ile belirli virüs enfeksiyonları arasında pozitif bir korelasyon olduğu gösterilmiştir [41].

2.2.2. Mekanik İritanlar

Bakteriyel irritasyona ilaveten pulpa ve periradiküler dokular mekanik olarak da irrite edilebilir. Derin kavite preparasyonu, yeterli soğutma olmadan diş yapısının kaldırılması, güçlü travma, oklüzal travma, derin periodontal küretaj, dişlerin ortodontik hareketleri ve kanal tedavisi yapım aşamasında aşırı enstrümantasyon pulpa dokusunun temel termal ve fiziksel irritanlarıdır. Pulpaya yaklaştıkça dentin kanalcıklarının birim yüzey alanına düşen sayısı ve çapı arttığından dolayı dentin geçirgenliği mine-dentin veya mine-sement birleşiminden pulpaya doğru yaklaştıkça artar [42].

Bu mekanik irritanlar sonucu uzaklaşan dentin miktarı arttıkça pulpanın da irrite olma olasılığı artar. Pulpa hasarının derecesi kaldırılan diş yapısı miktarıyla ve derinliğiyle doğru orantılıdır [43]. Su soğutmasız dental tedavi işlemleri, su spreyi altında soğutmalı olarak yapılan dental tedavi işlemlerinden daha fazla irritasyona sebep olurlar [44]. Enflamasyon boyunca pulpal vaskülaritesinde değişikliklerle

karakterize akut ve kronik pulpitis tanısı konulduğu olgularda, kan damarlarında geçirgenliğin arttığı ve genişlemelerin olduğu gösterilmiştir [45].

Travmanın kuron ya da kök kırığı içerip içermediği şiddetli vakalarda pulpa hasarına neden olabilir. Pulpanın iyileşmesi travmanın şiddetli olup olmadığı veya kök ucunun kapalı olup olmadığı gibi faktörlere bağlıdır. Hafif ya da orta şiddetli travmadan etkilenen kök ucu daha kapanmamış genç sürekli dişler, kök ucu kapanmış veya şiddetli travmadan etkilenen dişlerle kıyaslanınca pulpanın canlı kalma ihtimali daha çoktur [31].

Periodontal ligamentin fizyolojik toleransını aşan ortodontik kuvvetlerin dişlere uygulanması pulpa dokusundaki kan ve sinir iletiminde değişikliklere neden olur ve hatta apeks rezorbsiyonu başlatabilir [46, 47]. Aşırı derin küretaj işlemleri de pulpa hasarına neden olarak apikal damarları ve sinirleri zedeleyebilir. Kanal uzunluğunun yanlış hesaplanması, gereğinden fazla uzun tutularak overenstrumantasyon sonucu apikal direnç formunun kaybedilmesiyle dolgu maddesi periapikal dokularda fiziksel ve kimyasal hasar oluşturur [31].

2.2.3. Kimyasal İrritanlar

Bazı çalışmalarda kök kanal tedavisi esnasında uygulanan kanal içi irrigasyon solüsyonlarının, antibakteriyel ajanların, kanal içi medikamentlerin toksik oldukları veya biyouyumlu olmadıkları hakkında iddialar ileri sürülmüştür [48, 49]. Diğer irritasyon ajanları arasında alkol, kloroform, hidrojen peroksit ve çeşitli asitler gibi kavite temizleyicileri, hassasiyet gidericilerin içindeki kimyasallar, kavite astarları ve kaideleleri, geçici ve daimi restorasyon materyallerini sayabiliriz. Kavite preparasyonlarından sonra dentini sterilize etmek için kullanılan gümüş nitrat, kafurlu veya kafursuz fenol, öjenol gibi antibakteriyel ajanlar tartışma konusudur ve sitotoksiteleri pulpada iltihapsal değişikliklere neden olabilir [50].

2.3. PERİAPİKAL DOKU HASTALIKLARI

Kök kanal enfeksiyonları çoğunun kaynağı tedavi edilmemiş olan çürük, kırılmış ya da çatlamış bir diş veya dental cepten buraya gelen mikroorganizmalardır. Enfeksiyon nedenleri minede hasara yol açar ve bakterilerin diş pulpasına doğru

girmesine izin verir. Kök kanal enfeksiyonu başlangıcında bakteriler kendileri için iyi bir besiyeri olan pulpaya girer, çoğunlukla pulpa nekroze olur ve kanal boyunca ilerleyerek foramen apikalden dışarıya çıkar, periapikal dokulara yayılır ve burada iltihabi olaylara neden olur. Pulpanın kron kısmı devital olduktan sonra kök kısmında dış kökünün alttan 1/3 'lük kısmı apse formasyonuna girer. Periapikal iltihaplar, yani kök ucu etrafındaki dokuların zararlı etkenlere karşı reaksiyonu akut veya kronik şekilde olur. Periapikal apseler, akut fazda ya da düşük ölçekli sürekli (kronik) enfeksiyon şeklinde minimal semptomlarla geçirilebilir. Ancak enfeksiyon temizlenmediği sürece periapikal apseler kronik olarak devam edecektir [51, 52].

En sık görülen periapikal doku hastalığı pulpal kaynaklı olan 'apikal periodontitis' kök kanal sistemindeki mikroorganizma varlığına karşı gelişen bir reaksiyondur. İltihabi reaksiyon bölgesinde immün reaksiyonun sonucu olarak akut bir şekilde görülebilir. Kök kanalındaki mikroorganizmaların ve konak yanıtı arasındaki denge, kronik periapikal iltihap olarak ifade edilir. Bu denge bozulduğunda, pek çok semptom ile birlikte akut iltihabi reaksiyon gelişir [53]. Periapikal bölgedeki zengin kollateral dolaşım, bölgenin korunması açısından yararlı olmasına rağmen bu bölgede oluşan iltihabik bir reaksiyon çevre dokulara kolayca yayılabildiği için zararlı olabilir [54].

2.3.1. Periapikal Doku Hastalıklarının Sınıflandırılması

Birçok araştırmacı, periapikal doku hastalıklarını farklı sınıflandırmaktadır. Örneğin; Torabinejad, pulpa hastalıklarının histopatolojik bulgular ile karşılaştırıldığında lezyonların süresi ile klinik belirtileri ve semptomları arasında çok az benzerlik olduğunu belirtmiştir. Bu farklılıklar nedeniyle ve kolaylık açısından bu lezyonlar 6 farklı sınıfa ayrılmıştır: normal periapikal dokular, semptomatik apikal periodontitis, asemptomatik (kronik) apikal periodontitis, condensing osteitis, akut apikal apse ve kronik apikal apse. Ağrı ve şişlik gibi belirgin semptomlarla ilişkili lezyonlar akut (semptomatik) sınıfına girdiği gibi, hafif semptom içerenler veya hiç semptom içermeyenler kronik (asemptomalik) lezyonlar olarak adlandırmıştır [31, 55].

Diger bir sınıflandırma Dünya Sağlık Örgütü (WHO, 1995) tarafından yapılmıştır. Buna göre periapikal doku hastalıkları aşağıdaki şekilde sınıflandırılmıştır:

- Periodontitis
 - Pulpal kaynaklı akut apikal periodontitis
 - Pulpal kaynaklı kronik apikal periodontitis
- Apse
 - Fistülsüz periapikal apse
 - Fistüle olmuş periapikal apse
- Radiküler kist

Bu sınıflandırma, periapikal lezyonların klinik belirti ve bulgularına ilişkin olarak yapılmıştır. Kullanışlı bir sınıflandırma olmakla beraber eksikleri olduğu söylenebilir.

Nair, 1997 yılında apikal lezyonların dinamiğini ve histopatolojisini esas alan alternatif bir sınıflandırma önermiştir. Nair' in kriterleri, iltihabi hücrelerin tipi ve dağılımını, epiteliyal hücrelerin varlığını veya yokluğunu, lezyonun kistik bir form alıp almadığını; kistik bir form almışsa etkilenen dişin kök kanalının apikal forameni ile kist kavitesi arasındaki ilişkiyi içermektedir.

Nair'in periapikal doku hastalıklarının sınıflandırması şöyle özetlenebilir:

- Akut apikal periodontitis
 - primer veya sekonder
- Kronik apikal periodontitis
- Apikal apse
 - akut veya kronik
- Periapikal kist
 - paket veya gerçek [53]

Sınıflandırmanın; klinik belirtilere göre, klinisyenin tedaviye gitmesine yardımcı olacak şekilde algılanması doğru olacaktır. Klasik olarak periapikal doku hastalıkları sınıflandırılması aşağıdaki gibidir.

Periapikal doku hastalıkları:

- Akut periapikal doku hastalıkları

- Akut apikal periodontitis
- Akut apikal apse

- Kronik periapikal doku hastalıkları

- Kronik apikal apse
- Kronik apikal periodontitis

- Kist [56]

Son yıllarda Abbott isimli araştırmacı, yayınladığı makalesinde, hastanın klinik ve radyografik muayenesi sırasında elde edilebilecek bulgulara dayalı terminoloji kullanarak bir sınıflandırma sistemi yapmıştır. Bu sınıflandırma Tablo 5'te görülmektedir .

Tablo 5. Periapikal doku hastalıklarının klinik sınıflandırılması [57]

A) Klinik olarak normal periapikal / periradiküler doku	D)Periapikal kist -Gerçek kist -Paket kist
B) Apikal periodontitis -Akut: Akut primer apikal periodontitis Akut sekonder apikal periodontitis (akut alevlenme) -Kronik: Kronik apikal periodontitis (Granülom) Condensing osteitis	E) Fasiyal selülit F) Ekstra-radiküler enfeksiyon G) Yabancı cisim reaksiyonu H) Periapikal skar
C)Periapikal apse: -Akut periapikal apse Akut primer periapikal apse Akut sekonder periapikal apse -Kronik periapikal apse	I) Dış kök rezorbsiyonu -Yüzeysel -İltihabi -Yer değiştirme

Nair'in önerilerini de içeren bu sınıflandırma, periradiküler dokuların (periapikal ve lateral periodontal) durumunun klinik tanısı için kullanılabilir uygun bir yapıya sahip gibi görünmektedir. Kök rezorpsiyonları, periradiküler dokuları etkilediğinden, sınıflamaya dahil edilmiştir. Dişin periapikal durumu değerlendirilirken, rezorptif lezyonların doğru olarak tanımlanması klinisyenler için önemlidir. Ancak burada akut ve kronik terimleri, hastanın ağrı hissini algılayışına ilişkin klinik koşulların göstergesi olarak bu sınıflandırmada kullanılmıştır; dokuların gerçek histopatolojik safhasının bilinmesi klinik olarak mümkün olmadığından ve olgudan olguya, hatta aynı dişte farklı zamanlarda değişkenlik gösterebildiğinden histopatolojik tanımlama kullanılmamıştır. Gerçek anlamda düşünüldüğünde, histopatolojik safhaların bilinmesi, tedavi seçeneklerinde fazla bir farklılık sergilemeyecektir [57].

2.3.1.1. Normal Periapikal Dokular

Bu durum, dişin normal apikal dokuya sahip olduğu, perküsyonda ve palpasyonda anormal hassasiyet göstermediği, klinik ve radyografik tanı kategorisi ile ifade edilir. Bu kategorideki dişlerin normal lamina duraları ve periodontal ligamentleri vardır.

2.3.1.2. Semptomatik Apikal Periodontitis (Akut Apikal Periodontitis)

Etiyolojisi: Pulpa nekrozu sonrası iltihabın periradiküler dokular içine ilk yayılmasıyla oluşan durum semptomatik apikal periodontitis (SAP) olarak adlandırılır. Nekrotik pulpa dokusunda yerleşmiş olan mikroorganizmaların sebep olduğu periodontal membranda ortaya çıkan bir seröz iltihaplanmasıdır. Dişin destek yapılarının hızla yıkılmasına yol açan akut bir lezyondur [30]. Pulpa iltihabının periradikular dokulardaki ilk gelişimi, "akut apikal periodontitis" olarak adlandırılır. Nedeni dönüşümsüz iltihaplı pulpadan gelen bakteriyel endotoksinler, kimyasallar (irrigasyon solüsyonları ya da dezenfeksiyon ajanları gibi), yüksek kalmış olan restorasyonlar, kanal aletlerinin apekten dışarı çıkması ve taşkın kanal dolgusu olabilmektedir [58]. Pulpa irreversibl iltihaplı veya nekrotik olabilir. Etiyolojik faktörlerin cinsine göre iltihap alanı septik veya aseptik olabilir. Septik ve aseptik rahatsızlıklardaki mikrobiyolojik yönden en büyük farklılık ise bir kanaldaki ortalama tür çeşitliliğidir [59].

Belirtileri ve Semptomları: Apikal periodonsiyumda biriken seröz eksuda, dişi alveolünden dışarı doğru yükseltmiştir. Sinir uçları basınç altındadır ve devamlı spontan bir ağrı vardır. Ağrı, zaman zaman kendiliğinden azalır veya çoğalır, zonklama tarzındadır ve tamamen ortadan kalkmaz [59].

SAP'ın klinik özellikleri, orta derecede veya şiddetli spontan rahatsızlığa ek olarak da çığneme ve perküsyonda ağrıdır. Eğer SAP, pulpitisin genişlemiş haliyse belirtileri ve semptomları, soğucu, sıcak ve elektriksel cevapları kapsayacaktır. Nekrotik pulpadan kaynak alan SAP vitalite testlerine cevap vermez. Parmak ucuyla veya ayna sapıyla hafifçe vurularak (perküsyon) uygulanan basınç belirgin dayanılmaz ağrılara neden olabilir. SAP, apikal radyolüsent bir alanla ilişkili olabilir veya olmayabilir. Periodontal ligamanın "kalınlaşması", SAP'ın radyografik özelliği olabilir. Buna rağmen, genelde normal periodontal ligaman bölgesi ve kesintisiz lamina dura vardır.

Histolojik Özellikleri: SAP tablosunda pulpanın apikal bölgesininin lokalize bir alanında PMN lökositler ve makrofajlar görülür. Zaman zaman, küçük likefaksiyon nekrozu alanları olabilir (apse). Radyografik olarak rezorpsiyon genelde görülme de histolojik olarak kemik ve kök rezorpsiyonu görülebilir.

Tedavisi: Oklüzal uyumlandırma (hiperoklüzyon varsa), iritanların ya da patolojik pulpanın kaldırılması ve periapikal eksudanın kaldırılması genelde rahatlatır.

2.3.1.3. Asemptomatik Apikal Periodontitis (Kronik Apikal Periodontitis)

Etyolojisi: Asemptomatik apikal periodontitis (AAP) pulpa nekrozundan kaynaklanır ve genelde SAP'ın sekeleridir. Devamlı pulpal irritasyonların uzun süreli etkileri sonucu periapekte yavaş yavaş genişleyen kronik bir iltihaptır. Genellikle pulpa kaynaklı apekte konumlanmış yaygın enflamatuvar yanıt mevcuttur. Dokularda oluşan abse kendine yol bularak fistül ile drenaj olursa en az dirençle karşılaştığı vücut yüzeylerinden birine tutunabilir. Bu yüzden diğer enfeksiyon hastalıklarına da sebep olmaktadır [60].

Belirtileri ve Semptomları: Tanı olarak AAP, iltihap ve periapikal dokuların yıkımıyla alakalı, pulpa kaynaklı, klinik olarak asemptomatik bir durumdur. Pulpa nekrotik olduğundan, AAP' li bir diş elektriksel ya da termal uyaranlara cevap vermez. Perküsyonda ya az ağrı oluşur ya da hiç ağrı oluşmaz. Palpasyonda, kemiğin konikal tabakasının değiştiğini ve AAP' nin yumuşak dokuların içine yayıldığını belirten hafif hassasiyet olabilir [61].

Radyografik Özellikleri: Lamina duranın kesintiye uğramasından periapikal ve interradiküler dokuların geniş alanda yıkımına kadar değişebilir.

Histolojik Özellikleri: AAP lezyonları histolojik olarak granülomlar ve kistler olarak sınıflandırılırlar. Bir periapikal granülom, mast hücreleri, makrofajlar, lenfositler, plazma hücreleri ve bazen de PMN lökositler ile infiltre edilen granümatöz dokudan meydana gelir. Çok çekirdekli dev hücreler, köpüklü histiyosit, kolesterol bantları ve epitel sıklıkla bulunur.

Apikal (radiküler) kistin eozinofilik sıvı ya da yarı katı madde ile dolu merkezi boşluğu vardır ve bu boşluk çok katlı yassı epitel ile çevrilmiştir. Epitel, periapikal granülomda bulunan bütün hücresel elemanlarını içeren bağ dokusu ile çevrelenmiştir. Bundan dolayı, bir apikal kist epitel ile döşenmiş kavite ya da kaviteler içeren bir granülomdur. Epitel kaynakları; Hertwig epitel kılıfının kalıntıları ve Malassez epitel artıklarıdır. Bu hücre artıkları iltihapsal uyarana yanıt olarak prolifer olurlar. Kist oluşumunun güncel açıklaması belirsizdir.

Devamlı pulpal irritasyonlara karşı tepki olarak granülasyon dokusu (periapikal granülom) genişlemektedir. Şiddetli irritasyonların uzun süre etkileri sonucu periapekte uzun süreli kronik ilerler [62]. Bu oluşumlar bakteri kolonileri, nekrotik doku kalıntıları, antijen, ekzotoksin, endotoksin ve çeşitli bakteri enzimlerine karşı bağışıklık cevabının sonucu olarak kendi kendine oluşmaktadır [63]. Periapikal kistler de oluşur. Bunlar merkezi bölümü eozinofilik sıvı veya yarıkatı bir maddeyle dolu bir kavitedir. Pulpa kaynaklı periapikal kistler; iltihabi kistlerdir ve iltihabi kompleksin de bir parçasıdır [64]. Kronik lezyonların çoğunda lökosit hücreleri olan lenfosit, plazmozid ve makrofajlar çok sayıda bulunmaktadır .

Tedavisi: İrritanların (nekrotik pulpa) uzaklaştırılması ve kök kanal sisteminin tam olarak tıkanması genelde AAP' nin çözülmesiyle sonuçlanır. Yeterli kök kanalı tedavisi ya da çekimden sonra apikal kistin çözülmeye karşı direndiğini gösteren hiç bir kanıt yoktur.

2.3.1.4. Condensing Osteitis

Etyolojisi: Asemptomatik apikal periodontitisin değişik bir çeşidi olan condensing osteitis, inatçı irritasyona yanıt olarak trabeküler kemikte artışla ifade edilir [61]. Periapikal dokuların ileri derecede harabiyetidir. Pulpadaki enfeksiyon nekroza dönüşerek alveolar kemiğe yayılır ise osteitis adı verilir . Bu durum kemikteki mineral madde yoğunluğunun artmasından değil osteoblastik aktivitenin artmasından kaynaklanmaktadır [65]. Kemik trabeküllerinin kalınlıkları artar ve kemik iliği boşlukları ortadan kalkar. Birim alanda daha fazla kemik dokusu vardır [61]. Condensing osteitisin ana nedeni, kök kanalından periradiküler dokulara yayılan iritanlardır. Bu lezyon genelde, pulpa iltihabı veya nekrozu olan alt arka dişlerin apeksleri etrafında bulunur. Ancak, condensing osteitis herhangi bir dişin apeksiyle de ilgili olarak gelişebilir.

Belirtileri ve Semptomları: Nedene bağlı olarak (pulpitis veya pulpa nekrozu), condensing osteitis hem asemptomatik hem de ağrıyla beraber olabilir. Condensing osteitisli dişin pulpa dokusu elektriksel ve termal uyarılara cevap verebilir. Ayrıca bu dişler palpasyonda ve perküsyonda hassas olabilir veya olmayabilir. Radyografik olarak, dişin kökü etrafında diffüz yoğun radyoopak düzenlenmelerin varlığı patognomiktir. Histolojik olarak düzensiz oluşmuş trabeküler kemik ve iltihap artışı vardır. Eğer endike ise kök kanalı tedavisinin yapılması condensing osteitisin tam olarak çözülmesiyle sonuçlanabilir [66]. Condensing osteitis sıklıkla patolojik bir oluşum olmayan enostozlar (sklerotik kemik) ile karıştırılırlar.

2.3.1.5. Akut Apikal Apse (Semptomatik Apikal Apse)

Etyolojisi: Akut apikal apse (AAA) periradiküler dokularda yıkıma neden olan, nekrotik pulpadaki mikrobiyal veya mikrobiyal olmayan iritanlara yanıt olarak oluşan, pulpa kaynaklı şiddetli bir iltihabi yanıt, lokalize veya diffüz likefaksiyon

lezyonlarıdır. Çoğunlukla akut apikal periodontitisten sonra gerçekleşir. Ancak bu ilerlemeyi klinik olarak takip etmek oldukça zordur. Akut abselerde çoğunlukla diş şişlikle karakterizedir [59, 67].

Belirtileri ve Semptomları: AAA hızlı bir başlangıç ve spontan ağrı ile karakterizedir. Reaksiyonun şiddetine bağlı olarak, AAA' li hastalarda genellikle orta derecede veya şiddetli rahatsızlık ve/veya şişlik vardır. Eğer apse kemikte sınırlı ise genelde şişlik görülmez. Ayrıca, bazen vücut sıcaklığının yükselmesi, kırıklık ve lökositöz gibi enfektif sürecin sistemik görünümüleri de olabilir. Çünkü bu bulgular sadece nekrotik pulpalı, elektriksel ve termal uyaranlara yanıt vermeyen dişlerde gözlenir. Buna rağmen bu dişler genellikle perküsyonda ve palpasyonda ağrılıdır. İrritanlar tarafından hasara uğratılmış sert dokunun yıkım derecesine bağlı olarak, AAA' nın radyografik özellikleri hiç bir fark olmamasından, PDL boşluğundaki kalınlaşma ve bariz radyolüsent lezyonlara kadar değişebilir. Radyografik görüntüsü akut apikal periodontitisle benzerlik göstermektedir [68].

İnfeksiyon kortikal damağa girdiğinde ve yumuşak dokulara yayıldığında selulit adını alır. Bununla birlikte yumuşak dokulara yayılım neticesinde ağrıda azalma görülür [56]. Bazı akut enfeksiyon durumlarda abseler yayılarak baş, boğaz bölgelerine yerleşmekte ve hastanın yaşamını tehdit etmektedir [69].

Histolojik Özellikleri: AAA'nın histolojik incelemesinde, çok sayıda dağılmış PMN lökosit, debris ve hücre aralıklarını içeren likefaksiyon nekrozunun lokalize yıkıcı lezyonu ve pürülan eksudanın birikmesi görülür. Apseyi çevreleyen granülomatöz doku vardır; bu nedenle lezyonu granülom içinde apse olarak tanımlamak en iyisidir. Özellikle, apse, çoğu kez direkt apikal foramen yoluyla ilerlemez; bir apse çoğunlukla diş yoluyla drene olmaz. Altta yatan nedenin ortadan kaldırılması ile basınç hafifler (drenajın mümkün olduğu durumlarda) ve rutin kök kanalı tedavisi çoğu AAA olgusunun çözülmesine neden olur.

2.3.1.6. Kronik Apikal Apse (Asemptomatik Apikal Apse)

Kronik apikal apse (KAA), uzun süren lezyonların varlığının mukoza (sinüs fistülü) ya da deri yüzeyine drene olması ile sonuçlanan apseye sebep olmasıyla karakterize, pulpa kaynaklı iltihabi bir lezyondur. Periapikal bağ dokusunun

irritanlara karşı uzun süreli ve düşük düzeyli iltihabi reaksiyonlara "kronik apikal apse" denir [63].

Etyolojisi: KAA'nin patogenezi AAA' nınkiyle benzerdir. O da pulpa nekrozundan kaynaklanır ve genelde apse oluşturmuş kronik apikal periodontitis ile ilişkilidir. Apse, oral mukozada ve bazen de fasiyal dermişte fistül ağzı oluşturmak için kemikte ve yumuşak dokuda tünel açarak ilerler. Bu lezyonlardaki histolojik bulgular SAP 'teki bulgular ile benzerdir. KAA, periodonsiyum yoluyla sulkus içine de drene olarak, periodontal apseyi ya da cebi taklit edebilir.

Belirtileri ve Semptomları: Fistül yolunun geçici olarak kapanmasının ağrıya neden olduğu durumlar haricinde KAA, drenaj sağlandığı için genelde asemptomatiktir. KAA' nin klinik, radyografik ve histopatolojik özellikleri AAP' inkilerle benzerdir. Farklı olan özellik, iltihaplı bağ dokusu ile çevrili epitel ile parsiyel ya da total olarak sınırlanmış sinüs fistülüdür [70].

Parulis ve fistül ağzından drenaj ile karakterizedir. Kronik apikal apsede histolojik olarak oluşan bölgeler apeks çevresinde cerahat bulunması dışında periapikal granülomlarla karıştırılabilir.

Sakin dönemdeki kronik apikal abse klinikte belirti vermez. Ağrılar akut hale geçtiği zaman başlar. Fistül ağzı koagülüm veya epitelyal gelişimiyle tıkanığında hafif ağrılı semptomlar oluşur. Her devital dişte kronik apikal apse varlığından şüphe etmek gerekir [65].

2.4. KÖK KANAL TEDAVİSİNDEN SONRA PERİAPİKAL LEZYONLARIN İYİLEŞMESİ

Dişlerin periapikal bölgesinin fizyolojik açıdan aktif alan olması ve tamirin (onarımın) ve rejenerasyonun değişim yeteneği yüksektir. Başta mikroorganizmaların neden olduğu dişlerin ileri derecedeki kök kanalının apikal bölümünde meydana gelen iltihap sonucu dentinden, semente hatta periodontal membrana doğru genişlemiş alveolar kemik rezorpsiyonu görülür. Periapikal lezyonlu dişlerde iyileşmenin rejenerasyondan ziyade tamir (onarım) olduğu vurgulanmıştır. Bu iltihabik durum ile ilgili olarak erken evrelerde hakim olunmuş, son derece erken yanıtlar alınarak moleküler ve hücresel seviyelerde iyileşmeler

gözlenmiş çalışmalar vardır. İltihap ve tamir farklı fenomenler olmayıp, moleküler ve hücresele seviyede ayrılması olanaksız tek proçesin (sürecin) parçalarını oluştururlar [31, 71].

2.4.1. İyileşme Derecesi

Doku onarımının derecesi, apikal bölgedeki doku hasarına ve çevresinde gözlemlenen doku yıkımının derecesine bağlıdır. Periapikal bölgedeki dokularda yaralanma hafifse daha küçük bir tamir yeterli olurken yaralanma derecesi ağırsa daha kapsamlı bir tamir gerekmektedir. Ve çeşitli derecelerde yeniden organizasyon ve onarım oluşmaktadır [31, 71].

Defektin büyüklüğü ya da alttaki stromaya gelen yaralanmanın derecesi gibi belirli faktörler orijinal doku yapısının tamamen rejenerasyonunu etkileyebilir. Boyne, bu kritik boyutlardaki defektlerin kemik morfo genetik proteinler gibi indükleyici faktörler ile uyarılmaz ise iyileşmeyeceğini ortaya çıkarmıştır [72].

2.4.2. İyileşme Süreci

Çoğu araştırmacı periapikal lezyonların iyileşme sürecindeki bir dizi oluşumları çekim bölgesindeki onarıma (tamire) benzetmektedir [26, 31, 71, 73]. Özellikle hekim için önem taşıyan iltihabi reaksiyona neden olan mikroorganizmaların ortadan kaldırılmasıyla nekrotik pulpalı dişlerin foramen apikale'ye komşu iltihaplı dokudaki reaksiyon azalmaktayken dokuyu oluşturan hücrelerden fibroblastlar ve endotelyal hücreler artmakta ve böylece dokunun yeniden organizasyonu ve olgunlaşması gözlenmektedir [74]. Çekim bölgesinde enfeksiyon yokluğunda iyileşme nasıl hızla gerçekleşiyorsa; başarılı bir kanal tedavisi sonrası iltihabın giderek azalması da buna benzer bir süreçtir [6, 75, 76]. Aksine iyileşmenin daha yavaş seyretmesi durumunda, kök kanal tedavisi sonucu enfeksiyonun yok edilememesi veya yeterli seviye azaltılamaması sonucu ile karşılaşılabilir [12, 26, 77, 78]. Kök kanal tedavisi sonrası yapılan çeşitli hatalardan kaynaklanan taşkın enstrümantasyon ve taşkın dolgu materyalinin yabancı cisim reaksiyonlarının onarımın gerçekleşeceği apikal bölgedeki tamir (onarım) ve iyileşmenin yavaş olmasına neden olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır [26, 78-80]. Nair ve arkadaşları apikal periodontitisi tanımlarken, intraradiküler

biyofilmle meydana gelen kronik bir hastalık olduğundan bahsetmişlerdir [12]. Savunma mekanizmaları ve dezenfektanlara karşı daha dirençli olan bakteriyel biofilmler inatçı iltihapların en sık görülen nedenidir. Periradiküler iyileşmenin süreci ancak bakterilerden arındırılmış bir ortamda sağlıklı olarak oluşabilmektedir. Birçok araştırmacı yaptığı röntgenografik ve histolojik çalışmaları sonucunda periapikal lezyonların iyileşme sürecinde kronik iltihabın devam ettiğini vurgulamışlardır [81-83].

Enfeksiyondan ilk etkilenen periodontal ligament, iyileşme sürecinde tam aksine normal yapısına son kavuşan dokudur. Sement birikimi, artan vaskülarite ve artan fibroblastik ve osteoblastik aktivite histolojik olarak iyileşen periapikal lezyonu göstermektedir. Bazı lezyonlar önceki ilk yapısının bütünlüğünü birebir kazanamamaktadır. Farklı fibril ve kemik örneklerinde varyasyonlar görülmektedir. Bu durum radyografik olarak genişlemiş lamina dura veya değişmiş kemik yapısı ile karakterizedir [26].

2.4.3. İyileşmeyi Etkileyen Faktörler

Endodontik tedavilerin ardından yaş, genel sağlık durumu, kök ve çevresindeki dokuların mikrobiyal ve iltihabi durumu, tekrarlayan tedavi olguları, periodontal hastalık varlığı, okluzal travma, teknik komplikasyonlar, kanalların biyomekanik preparasyonlarının seviyesi, kök kanal antiseptiklerinin tümü ve kullanılış biçimleri, kök kanal dolgusunun seviyesi ve tıkama etkinliği periapikal doku iyileşmesi üzerine etkili olabilmektedir.

Periapikal lezyonlarda onarımı (tamiri) etkileyen lokal faktörler arasında enfeksiyon, hemoraji ve enstrümantasyon sırasında apeks dışında oluşan fiziksel zedelenme ve periradiküler dokulardaki yabancı cisimlerin basıncı ve yaşlılarda görülen vaskülarizasyon azalmasını sayabiliriz. Zedelenen dokuların tamiri yaşlılıkta da gerçekleşmesine rağmen sürecinin geciktiği görülür.

Tüberküloz ve diyabet gibi hastalıklar kontrol altında değilse iyileşmeyi geciktirir. Fouad ve Burleson insüline bağımlı diyabetes mellitus olan hastalarda yaptığı çalışmada, apikal lezyonlu dişlere yapılan kök kanalı tedavisinden sonra iyileşme oranının diyabetik olmayanlara göre daha az olduğunu bulmuşlardır [84].

Periapikal lezyonların iyileşmesini etkileyen diğer faktörler arasında; lökopeni gibi kalıtsal konak faktörlerini, kan akımının bozulmasını, yetersiz beslenmeyi, kortikosteroidleri, menapoz sonrası görülen kemik matriksinin oluşumundaki bir bozukluk olan osteoporözü ve diğer sistemik hastalıkları sayabiliriz.

Bazı sistemik durumlarda endodontik tedaviyi çekimin yerine tercih etmekteyiz. Bunlar arasında bakteriyemi riski taşıyan sistemik durumları ve radyasyon tedavisi görmüş hastalarda osteoradyonekroz olasılığı bulunan durumları sayabiliriz.

Bazı araştırmalar, sitokinlerin periapikal lezyonların iyileşmesi sürecinde önemli rol oynadığını göstermiştir [85, 86] .

2.5. ENDODONTİK AÇIDAN SONUÇLARI DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

Periapikal lezyonların iyileşip iyileşmediği, endodontik açıdan sonuçların değerlendirilmesinde ve kök kanalı tedavisinin başarı ya da başarısızlığını belirlenmesinde kullanılacak yöntemler arasında cerrahi müdahale ile periapikal dokuların histolojik değerlendirmeleri, klinik muayeneleri ve radyografik değerlendirmeleri sayabiliriz. Ancak histolojik değerlendirme kök kanalı tedavisinin klinik sonuçlarını değerlendirme açısından kullanışlı olmadığından bu yöntem klinik ortamda rutin olarak pek kullanılmaz.

2.5.1. Histolojik Değerlendirme

Klinik ortamda pratik olmayan bu yöntem cerrahi olmadan imkansızdır. Birkaç araştırmacı olumsuz radyografik görünüm ile histolojik bulgular arasındaki ilişki derecesini belirsiz olarak ortaya koyarak çok farklı sonuçlara ulaşmışlardır. Örneğin Brynolf kök kanalı tedavisi görmüş dişlerde, radyografilerde, başarılı görünüme rağmen histolojik incelemelerde periradiküler iltihabın olduğunu göstermiştir [81].

Bunun aksine Green ve arkadaşları kök kanalı tedavisi görmüş dişlerin histolojik olarak iltihapsiz olduğunu göstermiştir [2].

Bu yüzden, klinik muayene ve radyografik değerlendirme kök kanalı tedavisinden sonra iyileşme derecesini belirlemek açısından en pratik yöntemlerdir.

2.5.2. Klinik Değerlendirme

Sonucun klinik olarak izlenmesi, kök kanal tedavisi öncesi anamnezi ile tedavi sonrası sürecin hikayesini, kanal tedavisinin tamamlanmasından sonraki rahatsızlığının olup olmadığını, ağrı ve hastanın diğer subjektif semptomları ayırt edici yaklaşımının incelenmesini, palpasyon ve perküsyona verilen cevap ve diş mobilitesinin değerlendirilmesini, cep derinliğinin çevresel olarak ölçülmesini, fistül yolu bulunan olgularda fistülün iyileşip iyileşmediğinin kontrolünü ve fonksiyonellik ve dayanıklılık açısından uygun koronal restorasyonun kalitesinin değerlendirilmesini içermelidir. Klinik incelemenin yetersiz bir tarafı asemptomatik seyirli olan kronik değişikliklerin değerlendirilememesidir [87].

2.5.3. Radyografik Değerlendirme

Farklı zamanlarda alınan radyografilerin karşılaştırılmasında kesinlik ve tekrarlanabilirlik olmasının sağlanması için minimum sapma açısı ile çekilmesi gereklidir. Paralleleştirici bir aygıtın kullanılarak filmlerin çekilmesi en iyi yol olarak gözükmektedir. Radyografik değerlendirmede, köklerin çevresinde düzenli ve devamlı bir periodontal ligament aralığının mevcut olup olmadığı, apikal periodontitisin varlığı ya da yokluğu, enflamatuvar kök rezorpsiyonu belirtileri, koronal restorasyonun kalitesi ve marjinal ve periradiküler kemiğin durumu incelenir [87, 88].

Sonucu değerlendirmede klinik muayene ile birlikte radyografi esastır. Sonucun değerlendirilmesi radyografik görüntü olmadan mümkün değildir, en fazla dişin sağ kalımı değerlendirilmesi olarak tanımlanabilir.

Buna karşın radyografik tanıda birkaç yetersizlik vardır. Bunlar arasında aşağıdakileri sayabiliriz:

- Radyografik bulgular mevcut doku yıkımının ilerlemesine ve periradiküler kemikten devamlı kemik kaybına bağlıdır.

- Radyografi, patolojik bir olayın ilerlemesi, durması veya gerilemesini içeren dinamik bir sürecin statik bir görüntüsüdür. Bu nedenle, radyografi her zaman geçen süre bağlamında değerlendirilmeli ve bu amaçla mevcut görüntü eskileri ile karşılaştırılmalıdır.

- Koronal restorasyonun kalitesi periapikal bölgenin değerlendirilmesini etkiler: Sağlam koronal restorasyonlu bir diş, defektli veya şüpheli bir restorasyona sahip dişe göre daha çok "sağlıklı" olarak değerlendirilmelidir [87].

Bazı araştırmacılar periapikal lezyonlu dişlerin tedavisini taküben yaptıkları radyografik incelemeden sonra lezyonun sınırı ve genişliğiyle ilgili farklı fikirler ortaya atmışlardır. Örneğin; Gutmann ve arkadaşları, periodontal ligament aralığındaki genişliğin 1 mm'den az olmasını kabul edilebilir olarak sayarken 2 mm'den fazlasını kabul edilebilir olarak saymamışlardır [89]. Örneğin; Strindberg taşkın kanal dolgusunun etrafındaki az miktardaki genişlemeyi, materyalin bağ dokusu ile enkapsülasyonunu gösterebileceğinden dolayı, tolere edilebilir olarak tanımlamıştır [90]. Strindberg'in (1956) radyografik değerlendirmesine göre ise; 1. İyileşmiş ve başarılı: Periodontal ligament boşluğunun kontür ve genişliği normal veya esas olarak taşkın dolgunun çevresinde genişlemiş periodontal ligament kontürleri mevcut, 2. İyileşmekte veya belirsiz: Periradiküler radyolüsensi ebat olarak belirgin şekilde azalmış, bununla beraber ilave takip mevcut değil. 3. İyileşmemiş veya başarısızlık: Periradiküler radyolüsensi değişmemiş veya ebat olarak artmış şekilde değerlendirme yapılmıştır [90].

Radyografik değerlendirmede önemli olan nokta tedaviyi yapan hekim ile tedavi sonrası alınan radyografiyi öncekiyle kıyaslayan hekimin farklı olup olmamasıdır. Çünkü tedaviyi yapan hekim önyargılarından uzaklaşmadığı için objektif kıyaslama yapamayabilir. Bender ve arkadaşları radyografik yorumlamaların kişisel hükümlerden etkilendiğini ve açıda yapılan bir değişimin lezyonun daha büyük ya da daha küçük olmak üzere çok farklı bir şekilde görünmesine neden olduğunu belirtmiştir. Aynı zamanda farklı gözlemciler radyografide gördükleri konusunda uzlaşmaya varamayabilir ve aynı gözlemci farklı bir zamanda aynı radyografide gördüğü durumu daha değişik yorumlayabilir [91].

2.5.4. Son Durumun Değerlendirilmesinde Kullanılan İndeksler

Brynolf'un 1967'deki çalışmasına dayanarak (Tablo 6), Ørstavik ve arkadaşları geliştirdikleri periapikal indeksin (PAI), kök kanalı tedavisinin radyografik olarak yorumlanmasında kullanılmasını önermişlerdir. Bu indeksin pozitif kalibrasyon yeteneği ve klinik ayırımından dolayı iyi bir tanı hassasiyeti, tekrarlanabilirlik ve gözlemciler arası uyum sağlayabilme özellikleri bulunmaktadır. Ayrıca, bu indeks, lezyonun varlığını test ederken basit bir evet ya da hayır kararının yanı sıra semi-kantitatif bir analize de olanak sağlar. Buna karşın Reit ve Gröndahl'ın geliştirdiği beş seviyeli periapikal olasılık indeksi (PRI= periapical probability index) 'nin kullanımı kolaydır ve sadece lezyonun varlığının var ya da yok olma olasılığını belirler [3, 81, 92].

Bazı araştırmacılar tedavi sonuçlarının değerlendirilmesinde periapikal indeksi kullanmışlardır [3, 93-95]

PRI (Periapikal Olasılık İndeksi) şu şekilde derecelendirilir: [92]

1. Kemiğin periapikal yıkımı neredeyse hiç mevcut değildir,
2. Kemiğin periapikal yıkımı muhtemelen mevcut değildir.
3. Emin olmayan, şüpheli.
4. Kemiğin periapikal yıkımı muhtemelen mevcuttur.
5. Kemiğin periapikal yıkımı neredeyse kesin olarak mevcuttur.

Bu indeks PAI' den daha hassas değildir, ancak yüksek derecede gözlemci kalibrasyonuna ihtiyaç duymaz. Buna karşın histopatolojik verilere dayanmaması önemli bir dezavantajdır.

PAI (Periapikal İndeks) şu şekilde derecelendirilir: [3] (Şekil 2.1)

PAI-1 Normal periapikal kemik yapısıyla karakterli normal apikal periodonsiyum.

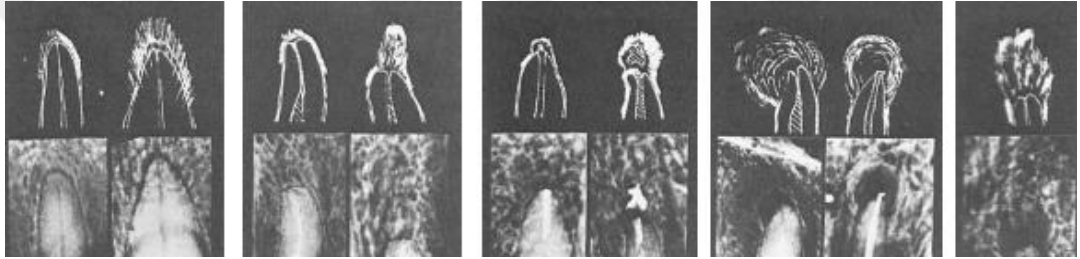
PAI-2 Kemik yapısında küçük değişiklikler vardır, ancak apikal periodontitis tanısı için yeterli radyografik bulgu yoktur ve demineralizasyon yoktur.

PAI-3 Apikal periodontitise özgü, diffüz mineral kaybı ile kemik yapısındaki değişiklikler.

PAI-4 İyi tanımlanmış radyolüsent alanlı apikal periodontitis.

PAI-5 Kemikte belirgin bir yıkım ile görülen şiddetli apikal periodontitis, özellikleri kötüleşmiştir.

Bu indeks Ørstavik ve ark.'nın geliştirdiği radyografik ve histopatolojik bulguların bir kombinasyonudur.

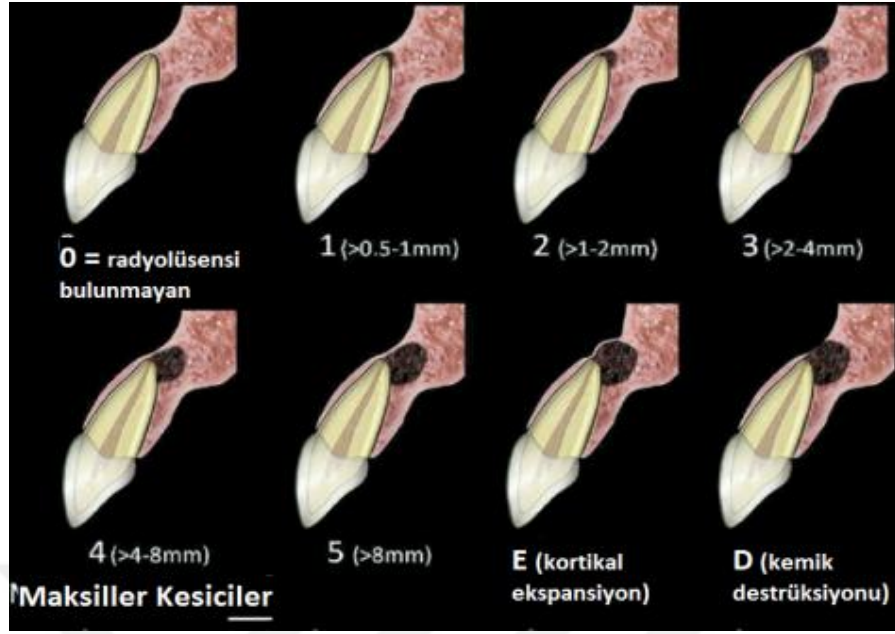


Şekil 2. 1. PAI radyografik ve histopatolojik bulguların bir kombinasyonu [4]

Tablo 6. Periapikal indeks puanlarının Brynolf kategorileri ile ilişkisi [81]

PAI Skorları	Brynolf Temel Grupları
1	M, N
2	I, II
3	II
4	III
5	IV

Estrela ve arkadaşları (2008), apikal periodontitis genişlemesindeki gözlemci müdahalesini en aza indirmek, önceki iki boyutlu radyografik incelemelerden farklı olarak üç boyutlu inceleme sağlayarak yüksek çözünürlüklü görüntülerin yorumuna dayalı yeni bir periapikal indeks geliştirmek amacıyla 596 hastanın 1014 CBCT görüntüsünü (3D Accuitomo Aksial Tomografi: J. Morita Corp. Mfg model MCT-I), Kodak Insight film-E periapikal radyografilerle elde edilen görüntülerle karşılaştırmalı olarak incelemiştir (Şekil 2.2.) [96].



Şekil 2. 2. CBCT-PAI (Konik Işın Bilgisayarlı Tomografi-Periapikal İndeks) Skorları.

Skor 0 Bozulmamış periapikal kemik yapıları

Skor 1 Periapikal radyolüsensinin çapı > 0.5–1 mm

Skor 2 Periapikal radyolüsensinin çapı > 1–2 mm

Skor 3 Periapikal radyolüsensinin çapı > 2–4 mm

Skor 4 Periapikal radyolüsensinin çapı > 4–8 mm

Skor 5 Periapikal radyolüsensinin çapı > 8 mm

Skor (n) # E Periapikal kortikal kemiğin ekspansiyonu

Skor (n) # D Periapikal kortikal kemiğin destrüksiyonu

2.6. BAŞARI VE BAŞARISIZLIĞIN TANIMI

Kök kanal tedavisinin başarılı olması ve estetik beklentilerin sağlanması amacıyla diş hekimleri kök kanallarını temizler, şekillendirilmesi esnasında bakterileri ortadan kaldırır veya büyük ölçüde azaltır, kanalların üç boyutlu biçimde doldurularak yeniden kontamine olmasını engeller ve nihayetinde estetik ve işlevsel anlamda kalıcı restorasyonları uygular.

Başarılı kök kanalı tedavisi, birincil olarak enfekte kök kanalından mikroorganizmaların etkin bir biçimde ortadan kaldırılmasına bağlıdır. Bazı vakalarda, kök kanalı sisteminin karmaşıklığı, şekillendirme ve kanal doldurma yöntemlerinin yetersizliği ve restorasyonlardan meydana gelen sızıntıdan dolayı bakterilerin uzaklaştırılması tamamen mümkün olmayabilir. Uygun prosedürlerle yapılan kök kanal tedavisi dişlerin prognozunu olumlu derecede etkiler. Wong, endodontik tedavinin başarısını etkileyen olası faktörler arasında aşağıdaki çizelgede (Tablo 7) görüldüğü apikal patoloji bulunması, kanal dolgusunun seviyesi, gözlem süresi, kültür alınması, hekim becerisi..vs gibi etkenlerin olduğunu belirtmiştir [97]. Apikal lezyon varlığı kök kanalı tedavisi üzerinde olumsuz bir etki yaratır. Kanal dolgusunun seviyesinin radyografik kök ucundan 2 mm'den daha kısa ya da kök ucundan dışarı taşmış uzun olanlar iyileşmeyi belirsizleştirir. Kök kanal dolgusundan öncesinde ve sonrasında kanal içerisinde bakterilerin tespit edilmesi prognozu zayıflatabilir. Kök kanal dolgu maddesinin boşluklu ya da daha az yoğun olması da başarı oranını düşürür.

Torabinejad başarı ve başarısızlığı önceden belirleyen koşullardan birkaçını, apikal doku hastalıkları, kanalın bakteriyel durumu, kanal dolumun düzeyi ve kalitesi ve kuronal restorasyonun kalitesinin oluşturduğunu belirtmiştir [88].

Strindberg tedavinin sonuçlarını biyolojik ve terapötik faktörlere bağlamış; zamanla, başarı ve başarısızlığı bu faktörlerle ilişkilendirmiştir [90].

Tablo 7. Endodontik tedavi başarısında etkenler. [97]

Etkenler	Başarıda Etkili	Başarıda Etkisiz	Etkenler	Başarıda Etkili	Başarıda Etkisiz
Apikal patoloji bulunması	Evet	Hayır	Kullanılan dolgu çeşidi		Hayır
Kanal dolgusunun seviyesi	Evet	Hayır	Seans sayısı		Hayır
Diş Tipi	Evet	Hayır	Postoperatif onarım	Evet	Hayır
Gözlem süresi	Evet	Hayır	Kanal içi ilaç kullanımı	Evet	Hayır
Çene (maksilla veya mandibula)		Hayır	Preoperatif ağrı		Hayır
Tıkama kalitesi	Evet	Hayır	Postoperatif ağrı		Hayır
Koronal sızıntı	Evet	Hayır	Apikal rezorpsiyon	Evet	Hayır
Gözden kaçan kanallar	Evet	Hayır	Tedavinin uzunluğu		Hayır
Uygun temizleme ve şekillendirme	Evet	Hayır	İşlemsel periapikal inokulasyon	Evet	Hayır
Pulpa canlılığı	Evet	Hayır	Hastanın sağlık durumu		Hayır
Kültür alınması	Evet	Hayır	Yaş		Hayır
Dolgu tekniği		Hayır	Cinsiyet		Hayır
Hekim becerisi	Evet				

Strindberg'in kök kanalı tedavisini "başarılı" olarak sınıflandırma kriterleri:

1. Semptom bulunmaması
2. Kökün çevresinde periodontal ligament alanının konturu, kalınlığı ve yapısının normal olması,
3. Periodontal ligament aralığındaki genişlemenin özellikle taşkın dolgu materyali çevresinde sınırlı olması.

Strindberg'in kök kanalı tedavisini "başarısız" olarak sınıflandırma kriterleri:

1. Kök çevresindeki kemik yoğunluğunun azalmasında bir düşüşün olması, ancak iyileşme olmaması
2. Kök çevresindeki kemik yoğunluğunun azalmasında bir değişiklik olmaması
3. Yeni bir radyolüseni ortaya çıkması veya apikal lezyonun başlangıç boyutunda artış olması

2.6.1. Başarı ve Başarısızlığın Histolojik Değerlendirmesi

Periapikal iyileşmenin histolojik olarak değerlendirilmesinde kriterler üç grup altında toplanabilir:

A. Histolojik olarak kabul edilebilir.

1. İltihabın yokluğu
2. Periodontal fibril rejenerasyonu
3. Foramen apikale bölgesinde yeni sement tabakalarının oluşumu.
4. Sağlıklı osteoblastlarla yeni kemik yapımı
5. Kök rezorbsiyonunun bulunmaması ve önceki rezorbsiyon alanlarının sement birikimi göstermesi

B. Histolojik olarak soruya açık

1. Devam eden hafif iltihap
2. Devamlı rezorbsiyon ve tamir gösteren sement alanları
3. Periodontal fibril organizasyonunun olmaması
4. Osteoklastik aktivite delilleriyle düşük düzeyde tamir

C. Histolojik olarak kabul edilmeyen

1. Şiddetli iltihap
2. Çevre kemikte rezorbsiyon ve kemik tamirinin bulunmaması
3. Tamir görülmeyen aktif sement rezorbsiyonu
4. Nekrotik doku bölgelerinin bulunuşu
5. Granulasyon dokusu varlığı ve olası epitel proliferasyonu [71]

2.6.2. Başarı ve Başarısızlığın Klinik Değerlendirmesi

Başarılı bir kök kanalı tedavisinin en büyük belirteçleri klinik semptomların ve apikal lezyonun olmamasıdır. Tedavisi yapılmakta olan bir dişin belirti ve semptomlarının inatçı bir şekilde devam etmesi hastalığın ve başarısızlığın bir göstergesidir. Apikal periodontitisle ilişkili rahatsızlıklar semptomsuz seyredebilir ve tesadüfen radyografide tespit edilebilir. Bu yüzden semptomların olmaması da her zaman başarı anlamına gelmez.

Kök kanalı tedavisinden önce veya sonra önemli bir belirti göstermeyen periapikal doku hastalıkları mevcut olabilir. Hastalığın varlığı ile göstermiş olduğu semptomlar arasındaki ilişki zayıf olmasına rağmen; olumsuz belirtiler gösterdiği zaman hastalık olasılığı güçlü ve yüksektir. İnatçı belirtiler (örneğin şişlik ya da fistül yolu) ya da semptomlar (örneğin kendiliğinden ağrı, künt devamlı ağrı ya da çiğneme hassasiyeti) genellikle başarısızlığı belirtir.

Bender ve arkadaşları (1966)'nın klinik başarı için koydukları kriterler şu şekilde tanımlanmıştır:

- Ağrı ve şişliğin bulunmaması,

- Fistülün kapanması,
- Fonksiyon kaybının olmayışı,
- Yumuşak doku destrüksiyonunun bulunmayışı [91].

Başarının klinik kriterlerini Torabinejad şu şekilde tanımlamıştır:

- Ağrı ve şişliğin olmaması,
- Fistül yolunun olmaması,
- Sondalama defekleri de dahil olmak üzere yumuşak doku harabiyetinin olmaması [88].

2.6.3. Başarı ve Başarısızlığın Radyografik Değerlendirmesi

Bu konuda radyolojik muayene daha çok önem taşımaktadır. Klinik olarak güven veren, fakat radyografik olarak periapikal bir anormallik gösteren dişler hemen hemen her zaman histolojik olarak periapikal hastalık delilleri göstermektedir. Radyografik bulgulara göre, her tedavinin sonucu başarılı, başarısız ya da şüpheli olarak sınıflandırılabilir.

Radyografik başarı periapikal bir lezyonun olmamasıdır. Bu, ya tedavi esnasında mevcut olan bir lezyonun tedaviden sonra iyileşmesi ya da tedavi sırasında lezyon yoksa tedaviden sonra herhangi bir lezyonun gelişmemesidir. Bu yüzden radyografik başarı tedaviden en az bir yıl sonra incelenen alanda bir lezyonun ortadan kaldırılması ya da oluşmamış olması ile belirlenir. Başarısızlık radyografik açıdan bir hastalığın tedaviden sonra devam etmesi ya da gelişmesidir. Özellikle, bu hastalık, boyutları aynı kalmış veya büyümüş ya da tedaviden sonra gelişmiş bir radyolusent lezyondur. Radyografik bir lezyonu olan ya da olmayan, işlev görmeyen semptomlu dişler başarısız olarak sınıflandırılır (iyileşmemiş).

Şüpheli statüsündeki dişlerde bir belirsizlik bulunmaktadır. Bu sınıflandırmaya semptomsuz ve fonksiyonel dişler dahildir. Bu dişlerdeki radyolusent lezyonların boyutu ne büyür ne de önemli bir oranda küçülür. Şüpheli

statüdeki bir dişin durumu başlangıç radyografik bulgulara bağlı olarak iyileşen ya da iyileşmeyen olarak sınıflandırılabilir.

Matsumoto ve arkadaşlarına (1987), Morse ve arkadaşlarına (1983), Selden'e (1974), Seltzer ve arkadaşlarına (1963) ve Zeldow ve Ingle' a (1963) göre , kök kanal tedavisi yapılmış ve radyografik olarak değerlendirildiğinde radyolüsen boyutlarının başlangıç durumuna göre azaldığı görülse bile başarılı olarak kabul edilmez, "başarısız" olarak sınıflandırılır. Bundan dolayı diğer bir sınıflandırma dahil edilir ki bu da sonucu "belirsiz", "tartışmalı", "iyileşiyor" veya "tamamlanmamış iyileşme" olarak belirtilmiştir [98-102]. Bazı araştırmacılar, örneğin Harty ve arkadaşları (1970) ile Swartz ve arkadaşları (1983) yalnızca başlangıçtaki radyolüsen boyutunun artmadığı durumlarda kök kanal tedavisini başarılı olarak saymışlardır [103, 104]. Başarı ve başarısızlık gibi bu iki modelin aksine Kvist (2001) ve Reit (1986) periapikal sağlığın sürekliliğini, geniş periradiküler lezyon veya müdahale gerektiren geniş periradiküler lezyon varsa "yüksek düzeyde sağlıklı"; lezyon yoksa veya müdahaleye gerektirmeyecek şekildeyse "mükemmel sağlıklı" olarak tanımlamışlardır [105, 106]. Friedman (2002) başarı veya başarısızlık yerine iyileşen veya iyileşmeyen olarak eşleşmiş terimlerini kök kanal tedavisinin durumu için kullanmayı önermiş ve "tedavi sonrası hastalık" kavramını ortaya koymuştur. İyileşmedeki her başarısızlık veya inatçı lezyonun, mutlaka tedavi veya hekim hatasına bağlı olmadığını, aksine birçok vakada primer apikal periodontitisten ayrı olarak gelişebileceğini öne sürmüştür [107].

Klinik semptom vermeyip aynı boyutta kalan veya küçülen endodontik kaynaklı inatçı periradiküler lezyonlu dişler, Friedman tarafından "fonksiyonel" olarak tanımlanmıştır. Bu da hemen müdahaleyi gerektiren değil, ileri takip gerektiren bir durumu gösterir [107].

Brynolf tarafından 1967'de bildirilmiş 5 radyografik görünümle var olan radyografinin karşılaştırılmasıyla elde edilen periapikal indeksi Ørstavik ve arkadaşları kök kanalı tedavisinin sonuçlarının radyografik olarak yorumlanmasında kullanılmasını önermişlerdir. Bu görüntüler sağlıklı periapikal dokudan (skor 1), geniş periapikal lezyona (skor 5) doğru değişik durumları simgelemektedir. İşlem öncesi ve takip röntgenlerinin hepsine referans alınan röntgenlere olan

benzerliklerine göre bu beş skordan biri verilir. Periapikal indeks kullanılarak kök kanalı tedavisinin sonuçları sınıflandırıldığında, lezyonun boyutu azaldıysa "iyileşmekte", lezyon tamamen ortadan kalktıysa "iyileşmiş" ve yeni bir lezyon oluşmuşsa "gelişmekte" olan bir lezyondan söz edilir [3, 81].

Avrupa Endodonti Derneği'nin (ESE) kalite yönergesine göre iyileşme ile ilgili tanımlar aşağıda verilmiştir [108].

ESE Kalite Yönergesi'ne göre olumlu sonuç (tam iyileşme):

- Ağrı, şişlik ve diğer semptomlar yok, fistül yok, fonksiyon kaybı yok.
- Radyolojik olarak kök çevresinde normal periodontal ligament aralığı mevcut (diğer bir deyişle radyografik olarak kemik rejenerasyonu mevcut).

ESE Kalite Yönergesi'ne göre belirsiz sonuç (yetersiz iyileşme):

- Klinik belirti yok
- Lezyon radyografik olarak aynı boyutta kalmış veya boyutu küçülmüş.

ESE Kalite Yönergesi'ne göre olumsuz sonuç (iyileşme yok):

- Dişte enfeksiyon belirtileri vardır.
- Tedaviyi takiben radyolojik olarak gözlenebilen bir lezyon ortaya çıkmış veya daha önceden bulunan lezyonun boyutu artmıştır.
- Lezyon aynı boyutta kalmış veya bu boyut dört yıllık değerlendirme süresinde küçülmüştür.
- Devam eden rezorpsiyon belirtileri mevcuttur.

Avrupa Endodonti Derneği'nin (ESE) kalite yönergesine göre sadece tam iyileşme tedavinin başarısı olarak kabul edilmelidir.

2.6.4. Endodontik Tedavinin Değerlendirilmesi Ne Zaman Yapılmalıdır?

Endodontik tedavi sonucunun değerlendirilmesi postoperatif gözlem, klinik ve radyolojik muayeneleri içerir. Kronik periapikal hastalıkların tanı ve kontrolünde klinik muayenenin yeri sınırlıdır. Bu konuda radyolojik muayene daha çok önem taşımaktadır. Klinik olarak güven veren, fakat radyografik olarak periapikal bir anormallik gösteren dişler hemen hemen her zaman histolojik olarak periapikal hastalık delilleri göstermektedir. Eğer 6 ayda lezyonun varlığının sürmesine karşın boyutlarında küçülme olduysa iyileşebileceği düşünülebilir; ancak bir kontrol randevusu daha gereklidir. Büyük periradiküler lezyonların iyileşmesi küçük olanlara göre daha uzun sürer. Bazan radyografik küçülmeye rağmen periapikal lezyonun tamamen onarımı 2 yıl içinde gerçekleşmeyebilir. Periapikal lezyonda kök dolgusundan iki yıl sonra hala bir küçülme olmayınca başarısızlık düşünülmelidir. İki yıl sonra lezyonun yok olması başarı olarak değerlendirilebilir.

Seltzer (1967) ve arkadaşları başarısızlıkların büyük bölümünün tedaviden sonraki ilk 2 yılda oluştuğunu bildirmişlerdir [109]. Byström ve ark. da %85 vakada 2 yıl sonra iyileşmenin tamamlandığını bildirmişlerdir [110]. Molven ve ark. 265 endodontik tedavili kökü 10-27 yıl arasında takip etmişler, bunlardan 10-17 yıl sonra hala lezyonları olanların %6,4' ünün 20-27 yıl sonra iyileşmiş olduğunu bildirmişlerdir [111].

Tedavi anındaki irritasyonların kötüleşmeye sebep olduğu radyografide periapikal bölgedeki belirsiz rarefaksiyon alanların belirli bir süre sonra kaybolabildiği görülmektedir. Bundan dolayı radyolojik başarısızlık değerlendirilmesi 6 aydan önce yapılmamalıdır.

Avrupa Endodonti Derneği (ESE) yönergesi postoperatif gözlemin en az 4 yıllık süre boyunca yapılmasını önermektedir. İlk değerlendirme ise 1 yıl sonra yapılmalıdır [108].

Birinci yılın sonunda tedavi edilen tüm dişler değerlendirilerek üç kategoriden birine dahil edilirler:

I. Tedavi sonrası hastalık olmayan dişlerde semptom veya radyografik belirti yoksa başarılı olarak

II. Tedavi sonrası hasta olan dişlerde semptom veya değişmeyen veya genişleyen periapikal radyolüsensi varsa başarısız olarak

III. Semptomsuz olup radyolüsensi boyutunda küçülme olan dişleri ise iyileşiyor olarak değerlendirilmelidir, diğer yandan kontrole devam edilmeli ve son karar iki yıl sonunda verilmelidir.

Dört yıllık takip önerisi, Ørstavik'in 1996'da ortograd kök kanal tedavisi tamamlanmış 732 kökü öğrenciler tarafından 1, 2, 3, 4 yıl sonra kontrol ettiği çalışmaya dayanmaktadır [112].

Bazı üniversitelerde yapılan değerlendirme süreleri 1 yıl ile 10 yıl arasında olan kontrollü klinik çalışmalarda aşağıdaki Tablo 8'de gösterildiği gibi başarı oranları % 87 ile % 91 arasında değiştiği görülüyor [90, 104, 113-116].

Tablo 8 Klinik çalışmalarda başarı oranları [61]

Araştırmacılar	İyileşme %	Olgu Sayısı	Değerlendirme Süresi	Tarih
Strindberg	87	529	4 yıl	1956
Grossman ve ark.	86	432	1-5 yıl	1964
Kerekes ve Tronstad	91	501	3-5 yıl	1979
Swartz ve ark.	88	1007	1 yıl	1983
Sjögren ve ark.	91	356	8-10 yıl	1990
Smith ve ark.	84	821	5 yıl	1993

Bununla beraber farklı ülkelerde yapılan epidemiyolojik çalışmalar kök kanal tedavili dişlerde apikal periodontitis prevalansını %35-60 oranlarında göstermektedir [117-122]

Toronto çalışmasında (Perry ve arkadaşları, 2003) tedavi öncesi apikal periodontitisin bulunmasının ve uygulanan tedavi yönteminin başlangıç tedavisinde sonucu belirleyen ana etmenler olduğu ileri sürülmüştür [123]. Buna göre;

a. Faz I ve Faz II olgularda iyileşme oranı % 85 olarak bulunmuştur.

b. Yalnızca radyografik ölçüme göre değerlendirme yapıldığında bu oran % 95 olarak belirlenmiştir.

c. Apikal periodontitis bulunmadığında iyileşme % 94'e ulaşmıştır.

d. Apikal periodontitis bulunduğu iyileşme oranı % 79'dur. Bu olguların % 45'i orijinal ebatlara göre küçülme göstermiştir.

e. Koronal konikleştirme ile ısıtılmış guta-perkanın vertikal kompaksiyonunun uygulandığı olgularda step-back preparasyon ve guta-perkanın lateral kompaksiyonu olgularına göre % 10 daha fazla iyileşme oranı belirlenmiştir.

f. Diş lokalizasyonu, preoperative semptomlar, periodontal durum, flare-up oluşumu ve son onarımlar da dikkate alınmış, fakat istatistiksel olarak önemli farklılıklar belirlenmemiştir.

Sonuç olarak ; radyografik bulgular negatif olsa da, klinik semptomlar, tedavi sonrası yeni veya inatçı bir hastalık varlığını gösteriyorsa, bu durum diş hekimini ileri tedavi seçeneğini aklına getirmesini mümkün kılmalıdır. Analjezik ve antibiyotiklerin reçete edilmesi uygun bir tedavi şekli değildir. Bir kanal dolgusunun radyografik görüntüsü kanal tedavisinin genel kalitesini göstermeyebilir. Özellikle, tedavi kontrol eden hekim tarafından yapılmış bile olsa, kök kanal tedavisinin dezenfeksiyonunun kalitesinin retrospektif veya radyografik olarak değerlendirilmesi mümkün değildir. İnatçı veya yeni ortaya çıkmış apikal periodontitis genelde kanal içinde mikroorganizma eliminasyonunun yetersiz olduğunun veya endodontik sistemin tekrar enfekte olduğunun göstergesidir [87].

2.7. İYİLEŞME SAĞLANAMAMIŞ (BAŞARISIZ) KÖK KANALI TEDAVİSİNİN NEDENLERİ

Başarısız yada iyileşmeyen kök kanalı tedavilerinin ana nedeni bakterilerin varlığıdır [38]. Bunun yanında teşhis ve tedavi planlamasındaki hatalar, koronal sızıntı, pulpa anatomisi hakkında bilgi eksikliği, kök kanalı sisteminin yetersiz şekillendirilmesi ve dezenfeksiyonu, yetersiz restoratif koruma, işlemsel hatalar, dolum kusurları ve hataları ve dikey kök kırıklar başarısız kök kanalı tedavisinin nedenleri arasında sayılırlar. Bu faktörler kök kanalı tedavisinin işlem öncesi, işlem sırasında ve işlem sonrası aşamalarında incelenebilir [124].

2.7.1. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlem Öncesi Faktörler

Yanlış teşhis ve tedavi planlamasındaki hatalar, diş hekiminin kendi yetenekleri üzerinde tedavileri yapmaya kalkışmasıyla zayıf vaka seçimi ve prognozu kötü olan bir dişin tedavi edilmesine kalkışılması başarısız kök kanalı tedavilerinin işlem öncesi nedenleri arasında sayabiliriz. Hastadan alınan anamneze göre belirti ve semptomların geçmişi, varolan belirti ve semptomlar, radyografik değerlendirme ve canlılık testlerinden alınan bilgiler ilişkili olmalıdır. Kesin bir teşhis oluşturmadan uygun olmayan tedavi ya da yanlış diş tedavi etme olasılıkları mevcut olabilir. Radyografik olarak tedavisi yapılacak dişin morfolojik değerlendirilmesinin iyi yapılamaması neticesinde ekstra kanalların örneğin üst büyük azıda meziolingual kanalın ve alt kesicilerde ikinci kanalın belirlenememesi, doğru teşhis yapılsa bile tedavilerin bu dişlerde başarısızlığa neden olacağı unutulmamalıdır. Kuron ya da kök dentinindeki kırıklar da yanlış teşhis edilir ya da erken teşhiste gözden kaçan periodontal defektler ve bu defektlerle ilişkili kemik kayıpları genellikle kırık kurona ulaştıktan ya da çatlak enfekte olduktan uzun süre sonra meydana gelir. Şüphe edilen dişte derin bir sondalama defekti varsa dikey kök kırığının varlığını düşündürebilir [90, 101, 125, 126].

2.7.2. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlemsel Sorunlar

Başarılılıkların çoğu işlem sırasında meydana gelen hatalardan kaynaklanır. Başarısızlık nedenlerini elimine edilip, başarılı kök kanal tedavisinin öngörülebilir olması kök kanalı boşluğunun kimyasal ve mekanik bir biçimde temizlenip şekillendirilmesini takiben kök kanalı sisteminin içinde kalan tam bir kanal dolgusu yapılmasına dayanmaktadır. Bundan dolayı kök kanal tedavisi işlemleri sırasında hem mekanik hem de biyolojik hedefler üzerinde durulmalıdır.

2.7.3. Kök Kanal Tedavisinin Mekanik Hedefler

Giriş kavitesinin ne fazla genişletilmesi ne de az genişletilmesi gerekmektedir. Böylece başarılı bir kök kanal tedavisinin önemli bir parçası olarak hem temizlenmesine hem de kanal dolgusunun yapılmasını kolaylaştıracak şekilde bir giriş kavitesi hazırlanmış olur. Giriş kavitesinin gerekenden az açılması,

kullanılan nikel titanyum döner aletlerinin hareket kabiliyetini azaltır, yetersiz temizlemeyle sonuçlanır, düzensiz şekillendirilmiş kanal formasyonu içinde aletin kanal içerisinde kırılmasına neden olur. Alet kırılmasının sonucu kanal şekillendirme işleminin hangi evrede olduğuna ve tedavi öncesindeki pulpanın vital ya da nekrotik olması durumlarına bağlıdır. Alet çıkarılabilirse ya da yanından geçilebilirse sonuç bu olumsuzluktan etkilenmeyebilir [127, 128].

Ayrıca anterior bölgelerde pulpa boynuzlarının açılmaması, kuronal pulpa boşluğunda artık madde ve pat kalması sonucu dişte renklemeye ve tedavinin başarısızlığına neden olur. Giriş kavitesinin gerekenden fazla genişletilmesi aşırı dentin kaybıyla dişin kırık oluşumu olasılığını artırarak dişin zayıflamasına ve perforasyon riskine neden olur [129-131]. Şekillendirme sırasında kanal eğiminin korunamaması kanalın ya da kök ucunun taşınmasıyla kanal morfolojisinin değişmesine neden olarak kanal sistemi içerisinde potansiyel olarak enfekte artıkların kalmasına neden olur. Apikal üçte birlik bölgede gereğinden fazla şekillendirme yapılması perforasyonla karakterli sızıntı veya mekanik tahriş meydana getirir ve lezyon gelişebilir [132]. Kanal boyundan daha fazla şekillendirilme yapılması doku hasarı, periradiküler kanama ve geçici iltihaba neden olur [133]. Devamlı bir biçimde fazla şekillendirme yapılması ise diş ve kemik dokularında yıkım oluşturabilecek inatçı bir iltihabi yanıt meydana getirir. Kanalların boyundan daha fazla şekillendirilmesi ile kanaldan kök ucu çevresine mikroorganizmaların taşınmasına ve tedavide başarısızlığa sebep olacaktır [26].

Taşkın dolgu yapılması da tedavi başarısızlığına yol açabilir. Bazı vakalarda gütta perka kısmen zararsız bir malzeme olduğu için lezyon gelişmez. Bunun yerine, kanal boyundan fazla şekillendirme ile yetersiz tıkaç oluşumunun birleşmesi sonucunda başarısızlık meydana gelir. Buna ek olarak kanal patları dokular için tahriş edici ya da zehirli (toksik) olabilir [134-136]. Doldurma hataları zayıf kanal şekillendirme ya da uygun olmayan bir doldurma tekniğinin seçilmesinden kaynaklanır. İyi sıkıştırılmamış bir dolum sonucunda (iyi doldurulamamış ya da boşluklar içeren) apikal ya da kuronalde sızıntı meydana gelir [135, 137, 138]. Hem yetersiz hem de taşkın kanal dolgusu özellikle pulpa nekrozunun ve periapikal lezyonun varlığında başarısızlığa neden olur [116].

2.7.4. Kök Kanal Tedavisinin Biyolojik Hedefler

Kök kanal tedavisinin biyolojik hedefleri arasında kök kanallarının temizlenmesinin ardından kanal içerisinde bakteri kalmamasıdır [128]. Şekillendirme yapılması pulpa canlıysa, kontaminasyonu önleyecek; nekrotik pulpada ise dezenfeksiyonu sağlayacaktır. Ancak kanalın tam olarak temizlenmesi gerçekte imkansızdır [139, 140]. Dikkatli şekillendirme ve sodyum hipokloritle yapılan tekrarlı irigasyonlar bakterilerin sayısını en aza indirgeyecektir [141]. Kanal içi medikament, kalsiyum hidroksit, bakterilerin sayısını azaltıp iyileşme hızını arttırarak iltihabı azaltır [142]. Ancak, bu medikamentin kullanımı sonucunda prognozun iyileşip iyileşmediği tartışmalıdır [143].

2.7.5. Başarısız Kök Kanal Tedavisine Neden Olan İşlem Sonrası Faktörler

Kuronal restorasyon dişi korur ve sızdırmazlığı sağlar; başarısız tedaviye neden olan tükürüğün ve bakterilerin apikale ulaşmasını engeller [116, 128, 139-146]. Endodontik tedavisi yapılmış dişlerin üzerindeki zayıf kuron restorasyonlarıyla bakteri ve endotoksinlerin kanaldan sızmasıyla prognozu kötüye gidebilir [146-150]. Kuronalde sızdırmazlığın sağlanamaması en fazla karşılaşılan problemdir. Kök kanalı tedavisi yapılmış bir dişe kuronalden girişin sızdırmaz bir şekilde kapatılması gereklidir. Kanal dolgusundan sonra restorasyon yapılırken izolasyonun yapılarak lastik örtü ile tükürük yalıtımının sağlanması kontaminasyonu önleyecektir. Ancak post yapılması dentinden çok fazla madde uzaklaşacağından kökü zayıflatarak kırılma hassasiyetini arttıracaktır [131].

2.8. CERRAHİ OLMAYAN TEDAVİ TEKRARI (RETREATMENT)

2.8.1. Cerrahi Olmayan Endodontik Başlangıç Tedavisinin İyileşmeme Nedenleri

Terminolojik olarak 'başarı ve başarısızlık' terimlerinin endodonti literatürlerinde mevcut durumu uzun süre takip altında asemptomatik veya semptomatik belirteçler altında tanımlandığı görülmüştür. Son zamanlarda başarısızlık durumunu post-endodontik hastalık yani tedavi sonrası hastalık olarak

tanımlandığını görmekteyiz. Kök kanal tedavisinin asıl amacı periapikal bölgenin iyileşmesi ve apikal periodontitisin engellenmesidir [87]. Ancak kök kanal tedavisinin yetersiz kaldığı durumlarda bu amaçlarına ulaşamaz ve başarısızlık olgularında birçok etyolojik faktörler bulunmaktadır. Bu faktörler arasında kök dışı enfeksiyonlarını, yabancı cisim reaksiyonlarını, gerçek kistleri, primer tedavi sırasında ortaya çıkan pek çok sayıda teknik problemleri sayarken büyük değişikliğe uğrayan endodontik mikrobiyal florayı unutmamak gerekir. En sık karşılaşılan nedenler primer tedavi esnasında kök kanalındaki var olan mikroorganizmaların elimine edilememesi veya tedavi sonrası kök kanal sistemine yeni mikroorganizmalar eklenmesidir [4, 151, 152].

Tüm kök kanallarının belirlenememiş olması veya tedavi edilememiş olması, kök kanal sisteminin uygun temizleme ve şekillendirmesinin yapılmamış olması, uygunsuz tıkama veya kalsifikasyonlar, tedavi esnasında girişimsel kazalardan perforasyonlar, uygun olmayan restorasyonların yapımı sonucu kronal mikrosızıntı neticesinde mikroorganizmalar kanal boşluğunu istila edebilirler [126, 153-156].

2.8.2. Tedavi Seçenekleri

Endodontik tedavi görmüş iyileşmeme durumu gelişmesi halinde tedavi seçenekleri arasında; özel vakalarda planlanmış replantasyon, cerrahi retreatment, dişin çekimi ve cerrahi olmayan retreatment yer alır. Endodontist tarafından düşünülmesi gereken ilk tedavi cerrahi olmayan retreatment olmalıdır. Ancak cerrahi olmayan ve periradiküler cerrahi yaklaşımları mümkün olmadığında hastanın isteği doğrultusunda planlanmış replantasyonun da bir tedavi seçeneği olduğundan bir çok literatürde bahsedilmiştir. Etken yabancı cisim reaksiyonu, gerçek kist veya kök dışı enfeksiyon ise cerrahi müdahalenin gerekli olduğu görülür. Periradiküler küretaj, apikal kök rezeksiyonu, kök amputasyonu, hemiseksiyon da cerrahi seçenekleri arasındadır. Cerrahi olmayan retreatment için iyileşme oranlarını % 74-98, yalnızca apikal cerrahi ile iyileşme oranını % 59, ortograt retreatment ve apikal cerrahi ile iyileşme oranını % 80 olarak bazı literatürlerde bahsetmişlerdir. Bu bazı durumlarda hem cerrahi hem de cerrahi olmayan tedaviye gerek duyulabilir [153-155, 157, 158].

Retreatment seçeneği hekime, başlangıç tedavisi sırasında geride kalmış ve başlangıç tedavisi sonrasında kök kanal sistemine giriş yapmış olabilecek tüm mikroorganizmaları elimine etme şansı verecektir.

2.8.3. Cerrahi Olmayan Retreatment'ın Endikasyonları

Kök kanal tedavisinin yenilenmesine karar vermek için öncelikle klinik ve radyografik verilerin ışığında doğru bir anamnez alınması gerekir. Daha önceden bahsettiğimiz gibi radyografide gözlenen periapikal lezyonun, kök kanal dolgusunu takiben altı ay ve dört yıl arasında beklemek iyileşme aşamasında olup olmadığını anlamamıza yardımcı yaklaşımlardandır [108].

Kök kanal tedavisi görmüş dişlerle ilgili ağrının sıklıkla çiğneme veya ısırma basıncıyla başladığı durumlarda, hassasiyet, sinüs perforasyonu, drenaj gösteren fistül yolu varlığı, mukobukkal kıvrımda şişlik, perküsyona hassasiyet, kaybedilmiş kural restorasyonlar, aktif tekrarlayan çürükler gibi klinik semptomların yanında periapikal ya da lateral lezyon oluşumunun radyografik olarak belirlenmesi, varolan bir lezyonun yeterli zaman geçmesine rağmen iyileşmemesi, kök kanalının tam olarak doldurulmaması gibi endikasyonlar iyileşmemeye ilgilidir ve eğer diş restore edilebilirse, periodontal olarak sağlıklı ve kök kanallarının cerrahi olmayan bir yaklaşımla erişilebilecekse tedavi seçeneği retreatment olmalıdır. Gerekli retreatment ile restoratif girişimleri karşılayabilecek durumdaysa hastanın kişisel değerlerinden ağız hijyeni alışkanlığının olması ve doğal diş dizisinin koruma amacı bilincinde olması önemlidir [154, 156, 159, 160].

2.8.4. Cerrahi Olmayan Retreatment'ın Kontraendikasyonları

Retreatment'ın en önemli hususu dişin restore edilebilirlik derecesidir. Restore edilemeyeceği düşünülüyorsa retreatment o diş için kontrendikedir. Eğer kural / kök oranı uygun değil, kronik periodontal hastalık sonucu aşırı mobilite mevcudiyetinde o diş için retreatment kontrendikedir. Hatta hastanın oral hijyenini sağlayamadığı daimi diş dizisinin koruma amacı bilincinde değilse retreatment yapılmamalıdır [153, 156, 160]. Eğer hekimin yeterli beceri ve eğitimi yoksa hatta uygun ekipmanın bulunmadığı kliniklerde hastanın sağlığını ve tedavisini riske atacak şekilde bir uygulamadan kaçınmak gerekir [154].

Kök kanal kalsifikasyonlarının yanında çıkarılamayan ve iyileşmeyen durumlara neden olan kırık aletlerin varlığında, atlatılamayan basamaklar, perforasyon defektleri, rezorpsiyona bağlı kök defektleri, dikey kök kırıkları gibi cerrahi olmayan retreatment için kontrendike durumlarda en iyi tedavi seçeneği cerrahi yöntemlerdir [153, 154, 156, 160].

2.8.5. Retreatment'in Faydaları ve Riskleri

Hastaya yapılacak her dental tedavi işlemleri öncesinde o tedavinin faydaları ve riskleri hastalara anlatılmalıdır. Retreatment'in faydaları arasında; hastanın doğal diş yapısının korunması ve bu sayede dişin biçim ve fonksiyonunun geri restore edilebilecek olması, dişin çekilmiş olması halinde gerekecek daha kapsamlı ve muhtemelen daha pahalı olacak olan protez ihtiyacını azaltmasını sayabiliriz.

Cerrahi olmayan kök kanal retreatment girişimleri için riskleri arasında ise; dişin kökünde veya kuronunda kırıklar meydana gelmesi, incelmesi, zayıflaması veya kök kanal duvarında perforasyon meydana gelmesi, kanal duvarında basamaklar oluşması, retreatment girişimi sırasında kullanılan aletlerin kırılması ve uyumu iyi olan bir prefabrike kuronun değiştirilmesini gerektirecek bir uyum bozukluğu meydana gelmesi sayılabilir. Bu risklerin meydana gelmesi halinde dişin çekimi gerekebilir [154, 156, 161].

2.8.6. Retreatment İşlemlerinde Restorasyon Sökümü veya Korunması için Kriterler

Retreatment işlemlerinin daha uygun bir giriş sağlamasını ve uygulamayı kolaylaştırabilmesi için kuronal restorasyonların kaldırılması gerekebilir [154, 160]. Kuronal mikrosızıntı varsa ve tekrarlayan çürükler mevcudiyetinde bu çürüklerin kaldırılması gerekmektedir [155]. Eğer amalgam veya kompozitli restorasyonlar varsa tüm hasarlı restorasyonlar sökülmeli ve tüberkül korumasını atlamadan yeni bir restorasyon yapılmalıdır [154, 156, 160]. Tam kuronsa bu kuron sökülmelidir. Kuron içerisinde pulpa odasına ulaşabilmeyi kolaylaştırmak için mevcut olan postun kök kanalından çıkarılması gerekir. Kuron restorasyonun çıkarılması postun çıkarılmasını kolaylaştırır. Estetik bir kuron varsa , kuron sınırlarının bütünlüğünü

koruduğu ve tekrarlayan çürüğün olmadığı durumlarda retreatment için giriş kavitesi kuronun içinden yapılmalıdır [154-156, 160].

Kuronun korunması ile izolasyonu ve rubber-dam (lastik örtü) uygulamasını kolaylaştırdığı, estetik ve okluzyon değişikliğini minimal düzeyde tuttuğu avantajlarına rağmen kavite görüş açısının azaldığı, iatrojenik hata yapma olasılığının arttığı, kanal dolgularını ve kanal içi post uygulamalarını uzaklaştırma zorluğu, kuron altındaki çürüklerin, kırık hatların ve kanalların gözden kaçabileceği gibi dezavantajları bulunmaktadır [26].

2.8.7. Retreatment İşlemlerinde Kanaldaki Engellerin Kaldırılması

Post ve post-core restorasyonlarını, kök kanal kalsifikasyonlarını, kök kanal duvarlarında basamak oluşumunu ve kök kanal aletlerinin kırılmasını cerrahi olmayan retreatment uygulamaları sırasında önemli engeller arasında sayabiliriz. Ve başarılı bir şekilde kök kanal sistemine ulaşmayı sağlamak için bu engellerin kaldırılması dikkatli ve özenli bir şekilde gerekmektedir. Bu engellerin kaldırılması esnasında ortaya çıkabilecek riskleri hekim tecrübesi ile hastayla koopere edilmelidir [153, 154, 156, 162].

2.8.8. Retreatment İşlemlerinde Kalsifikasyonların Kaldırılması

Kök kanal kalsifikasyonlarını giderebilmek için hekimin kalsifiye alanı görüntüleyebilmesi gerekir. Gelişmiş aydınlatma ve büyütme sağlayan operasyon mikroskobu ile bunun sağlanması mümkündür. Öncelikle kalsifiye bölgeye erişimi önleyen tüm engeller kaldırılmalıdır. Kalsifiye bölge görüntülendiğinde sert kanal eğeleri, şelasyon ajanları ve ultrasonik uçların bir kombinasyonu ile kalsifiye bariyer kaldırılmaya çalışılır ve kök kanalının apikali ile kalsifikasyon arasında kalan kısma erişim sağlanmaya çalışılır [6, 163-170].

2.8.9. Retreatment İşlemlerinde Basamakların Kaldırılması

Basamaklar genellikle kök kanal tedavisinin temizleme ve şekillendirme işlemleri sırasında paslanmaz çelik el eğeleri ile oluşturulur. Nikel titanyum el ve döner aletlerinin ise eğimli kanallarda merkezi biçimde kalabilmesi daha az basamak oluşumu sağlamıştır. Paslanmaz çelik eğelerin hafıza özelliği vardır ve eğimli bir

kanalda düzgün hale gelmeye çalışacaklardır ve sonuç olarak sıklıkla eğimli kanal duvarında bir perforasyon veya basamak oluşumu meydana gelecektir.

Basamak söz konusu olan retreatment vakalarında kuronaldeki tüm engeller kaldırılarak crown-down tekniğiyle açılıp basamak görüntülediğinde sert ve kıvrık bir kanal eğesi ile basamak atlandıktan sonra dairesel eğeleme hareketi ile küçük çaplı eğelerden büyük çaplı eğelere kadar işlemler gerçekleştirilir.

Basamağın kaldırılamadığı ve kalsifiye kanal engelleri durumlarında cerrahi tedavi veya çekim seçenekleri seçimi yapılır [6].

2.8.10. Retreatment İşlemlerinde Alet Parçalarının Çıkarılması

Kırık alet parçalarının kök kanal sisteminden başarılı biçimde çıkarılmasını etkileyen faktörler arasında; hekimin becerisi ve deneyimi, aletin büyüklüğü, kırık parçanın uzunluğu ve kök kanalı içindeki konumu yer almaktadır [156, 171, 172].

Öncelikle parçayı görebilmek için bir operasyon mikroskopunun kullanılmasıyla kırık parçanın kuronal kısmına erişim sağlandıktan sonra [156, 171-174] eğer alet küçük boyutlu ise ultrasonik uçlarla veya frezlerle bertaraf edilebilir [160, 175]. Kırık parçanın uzunluğu ne kadar fazlaysa çıkarma ihtimali o kadar fazla olur [160, 171]. Eğer kanal eğimliyse ve kırık parça eğimin kuronalinde konumlanmışsa çıkarma ihtimali o kadar fazla, eğer kırık parça eğimin ne kadar apikalinde konumlanmışsa çıkarma ihtimali o kadar az olur [171, 174].

Örgülü ege tekniği, kırık parça çıkarma kitleri, Gates-Glidden frezleri [173, 174, 176], modifiye frezler [172], modifiye döner eğeler [176], el eğeleri, mikrotüpler, ince telli kementler ve ultrasonik uçların kombinasyonu kullanılarak başarılı erişim sağlanabilir [176-179]. Eğer çıkarılma işleminin prognozu iyi olmayacaksa, küçük parça çıkarılamaz ya da bertaraf edilemezse; tedavi seçeneği, periradiküler cerrahi yaklaşım olabilir [161].

2.8.11. Retreatment İşlemlerinde Gutta Perkanın Çıkarılması

Gutta perkanın çıkarılması; genellikle crown-down yöntemiyle, Gates-Glidden frezleri [175, 180-184], el aletlerinden Headstrom veya el Reamer'ları [175,

182] ve döner aletlerden RaCe (Brasseler USA, Savannah, GA), ProFiles (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK), Liberator (Miltek, York, PA) 300-1300 rpm aralığında [180, 181, 183, 184] (34. Ferreira JJ, Rhodes JS, Ford TR: The efficacy of gutta-percha removal using ProFiles, Int Endod J 34:267, 2001.), sıcaklıkla, ısıtılmış pluggerlar [175, 182, 185], ultrasonik aletlerle [175, 185-187], solventlerle [160, 175, 182-191] veya tüm bunların kombinasyonu ile gerçekleştirilebilir. Sonik veya ultrasonik uçların kullanılmasıyla gutta perka'yı yumuşattığından dolayı asıl çıkarma işlemi eğeler ile yapıldıktan sonra kök kanal duvarlarına tutunmuş olan kanal patlarının çıkarılması için daha uygundur [175, 186, 192].

Kimyasal gutta perka çözücülerden (solventlerden) en hızlı etki gösteren kloroformdur [173, 181, 184]. Kloroformun toksisitesi ve potansiyel karsinojen nedeniyle alternatif solventler kullanılmıştır [175, 186, 188, 189]. Bunlar arasında halotan [186, 191], metilkloroform [175], okaliptol [175], ksilen [175], karbon disülfid, benzen, saflaştırılmış trebentin ve portakal yağıdır [175, 188, 189].

Bir araştırmada; gutta perka'yla dolmuş dişin retreatment'i sırasında kloroform, ksilen ve halothanın arta kalan hacimlerinin apikal foramenden dışarı sızdığı tespit edilmiş [188] ancak apikal foramenden sızan solventlerin her birinin hacmi, müsaade edilebilir toksik dozun altında büyüklüklere sahip oldukları ve hastalara karşı oluşturdukları sağlık riski önemsiz nitelikte olduklarını vurgulamışlardır [6].

Solventler, gutta perkanın çıkarılmasında yardımcı unsurlardır. Materyalin sökümünü tamamlamak için el eğeleri veya döner alet eğeleri kullanılmalıdır. Sonrasında kanalların şekillendirilmesi uygun herhangi bir step - back preparasyon tekniği ile gerçekleştirilebilir [6].

2.8.12. Retreatment İşlemlerinde Taşıyıcı Bazlı Gutta Perka Tıkaçların Çıkarılması

Metal veya plastik merkezli core üzerine gutta perka kaplı kanal dolgularının çıkarılmasında öncelikle ne yüksek sıcaklıkta ne de yüksek rpm hızda çalışılmadan periodontal ligamente zarar vermeden bir solvent veya ısı kaynağıyla yumuşattıktan

sonra taşıyıcıyı yakalayacak şekilde giriş yolu oluşturulmalıdır. Sonra bir veya birden fazla el eğesiyle birlikte taşıyıcıyı yakalayarak çıkarılabilir [193-198].

2.8.13. Retreatment İşlemlerinde Yumuşak ve Sert Patların Çıkarılması

Eğer kök kanala sistemi dolgusu için yumuşak pat kullanılmışsa, crown-down yöntemini bolca sodyum hipoklorit irigasyonla el eğeleri veya döner eğelerle kolaylıkla çıkarılabilir ancak sert pat kullanılmışsa çıkarılması daha zordur. K-file el eğeleri ile birlikte küçük çaplı frezler veya ultrasonik uçları kombine olarak kök perforasyonuna neden olmadan kullanılabilir [160, 175, 199, 200].

Rezorsinol-formalin patının yumuşatılması ve çıkarılmasını kolaylaştırmak için yapılan in vitro araştırmalarda %5.25'lik sodyum hipoklorit'in kullanılabilceği bildirmiştir [201] ancak bir takip çalışması sodyum hipokloritin, bir çekilmiş diş örneği kullanıldığında aynı etkiyi göstermediğini ortaya koymuştur [201, 202].

İçeriğinde tetrakloroetilen, izofenil asetat ve timol bulunan Endosolv-E solventi çinko oksit ojenol içerikli patlar için önerilmiştir. İçeriğinde formamid ve feniletanol bulunan Endosolv-R solventi rezin içerikli patlar için önerilmiştir. Sert patlara bir örnek kalsiyum oksit içerikli Biocalex patının yumuşatılması için EDTA önerilmiştir [26].

2.8.14. Retreatmentta İyileşme Prognuzu

Yapılan çalışmalarda retreatment görmüş dişlerin başlangıç kök kanal tedavisi görmüş dişlerle kıyaslandığında tedavi sonrası görülen akut alevlenmelerin (flare-up) daha fazla oranda meydana geldiği görülmüştür [203-205]. Özellikle apikal foramenden debris ve mikroorganizma taşırılmasını minimuma indirgeyerek yapılan tedavide akut alevlenmeyi önleyecek girişimde bulunulabilir. Bu sebeple crown-down preparasyon tekniği kullanılabilir. Tek seans yerine iki seans tercih edilir [206].

Retreatment yapılan bir dişe kuronal restorasyon yapılarak diş yapısını korumak, kuronal mikrosızıntıyı önlemek amaçlanmıştır. Dişin restore edildiğinden, klinik işaret ve bulguların kaybolduğundan veya tedavi sonrasında tekrarlamadığından ve radyografik olarak iyileşmenin gerçekleştiğinden emin olmak

için takip seanslarını en az 6 ay sonra gerçekleştirilmeli eğer komplikasyonluysa ilk seansı 3 ay sonrasına belirlemek daha doğru olur. Sonrasında da takip seansları 1 yıl sonra tekrarlanarak 6 ay ile 5 yıl arasında olmalıdır [6]. Cerrahi olmayan tedavi tekrarının başarı oranı %40 ile %100 arasında değişmektedir [157, 158]. Apikal periodontitisin var olduğu vakalarda prognoz %66'ya düşer [107, 157, 158].

2.9. KÖK KANAL ENFEKSİYONLARININ MİKROBİYOLOJİSİ

2.9.1. Tarihçesi

Kolonizasyon basit olarak tanımlandığında, biyokimyasal ve fiziksel koşulların üremek için yeterli olduğu zaman içerisinde mikroorganizmaların konağa yerleşip yaşaması anlamına gelmektedir. Mikroorganizmalar insan vücudunun tüm yüzeylerinde kolonize olmuşlardır. İnsan vücudunun 10^{13} ökaryotik hücrelerden oluştuğu, 10^{14} bakterinin de insan vücudunda ihtiva ettiği tahmin edilmektedir [207].

Mikroorganizmaların insan vücudundaki baş, yüz, çene, bağırsak, cilt ve genital bölgelerde simbiyotik olarak konakçıda daimi kolonizasyonla birlikte oluşturduğu flora normal flora olarak tanımlanır. Ancak uygun koşullar sağlandığında normal oral flora üyeleri, fırsatçı patojen olabilirler. Fırsatçı patojenler, pulpa ve periapikal dokular gibi vücudun steril alanlarına ulaştıklarında hastalığa yol açar. Patojenik doku hasarı, mikroorganizmalara karşı konak dokunun cevabını kapsar. Konakçı bu durumda immün cevapla karşılık verir [26].

Pulpa ve periapikal doku hastalıklarının en önemli ve birincil etyolojik ajanların mikroorganizmaların olduğu yapılan birçok çalışmada 1800'lü yıllardan beri vurgulanmıştır [208, 209]. Enfekte kök kanalına ve periapikse girebilen ve periapikal doku hastalıklarına sebebiyet veren mikroorganizmaların büyük çoğunluğu bakterilerdir. Bu bakterilerin büyük bir bölümünü anaerob bakteriler oluşturur. Bu nedenle endodontik mikrobiyolojinin büyük oranı anaerobik bakteriyoloji üzerine kuruludur [210].

Anaerob bakterilerin varlığı ilk olarak 17. yüzyılda Hollandalı amatör mikroskop üreticisi Antonie Van Leeuwenhoek'un (1632-1723) geliştirdiği

mikroskop ile gözlemediği bazı küçük canlıların oksijensiz ortamda dahi hareket edebildiğini ileri sürmesi ile ortaya çıkmıştır [26, 211].

Pastörizasyonun temelini oluşturan Louis Pasteur, yaptığı çalışmalarla anaerob bakteriyolojinin temel taşlarını inşa etmiştir. 1861'de Pasteur bütirik asit fermentasyonunun hareketli, spor oluşturan mikroorganizmalarla ilişkisini ortaya koymuştur ve bu canlıların oksijensiz ortamda basit besiyerlerinde üreyebildiğini görmüştür. Bunun üzerine Pasteur 1863 yılında mikroorganizmaları aerob ve anaeroblar olmak üzere ikiye ayırmıştır [212]. Oral mikrobiyolojinin babası olarak sayılan Willoughby Dayton Miller, Berlin'de Robert Koch'un laboratuvarında çalışan Amerikalı bir diş hekimi olarak, 1894 yılında pulpa hastalığında bakterilerin varlığını tespit eden ilk araştırmacıdır [209]. Kakehashi ve ark. pulpa ve periradiküler hastalıklara bakterilerin neden olduğunu kanıtlayan klasik çalışmayı 1965 yılında yayınlamışlardır. Bu araştırmacılar, germ-free farelerin oral kaviteye açık pulpalarında ve periradiküler dokularında patolojik değişikliklerin meydana gelmediğini, oysa ağız florası ile kontamine olan fare grubunda pulpa nekrozu ve periapikal lezyonların oluştuğunu tespit etmişlerdir. Sonuçta araştırmacılar bir dokuda mikrobiyal flora bulunmasının veya bulunmamasının, dokunun patolojik yıkımında veya iyileşmesinde asıl belirleyici faktör olduğu sonucuna varmışlardır [38]. Möller ve ark. 1981 yılında maymunlar üzerinde yaptıkları çalışmada, devitalize ettikleri pulpalardan sadece bakterilerle enfekte edilenlerde periapikal bölgede lezyon oluştuğunu bildirmişlerdir [39].

Oral kavitede 300'den fazla bakteri türünün kültürü yapılabilirken, kök kanal enfeksiyonlarında sadece sınırlı sayıda bakteri türü izole edilmektedir [213]. Enfekte kök kanalında ortalama 1- 12 farklı tür bakteri mevcuttur ve CFU (Colony forming units) sayısı 10^2 - 10^8 arasındadır [214].

Bu mikroorganizmalardan en sık görülenler: *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Peptostreptococcus*, *Bacteroides*, ve *Lactobacillus* türleridir [213, 215].

2.9.2. Mikroorganizmaların Pulpaya Ulaşma Yolları

Normal koşullar altında, pulpa-dentin kompleksi sterildir. Mine, dentin ve sementi örterek oral mikrobiyotadan izole eder [26, 216]. Mikroorganizmalar kök kanal sistemine çeşitli yollar ile ulaşmaktadır.

2.9.2.1. Koronal Yol:

Mikroorganizmalar pulpa boşluğuna en çok çürük yolu ile ulaşırlar. Bakteriler dentin tübüllerine girer ve burada çoğalırlar. Bakteri türlerinin birçoğunun hücre çapı 0,2-0,7 µm arasında değişirken, dentin tübüllerinin en küçük çapı ortalama 0,9 µm ile en büyük çapı 2,5 µm arasında değişir. Mine ya da sement tabakası yok olmuşsa, mikroplar pulpaya açık tübüllerden ulaşabilirler. Sağlıklı bir pulpa mikrobiyal invazyona karşı dirençlidir. Dentin tübüllerindeki bakteri hareketi, odontoblastlar, mineralize kristaller ve çeşitli makromoleküller tarafından kısıtlanır. Bakteriler ve yan ürünleri pulpa açılımı olmaksızın pulpayı indirekt olarak etkileyebilir [217].

Bazı çalışmalarda açık dentin tübüllerine komşu pulpada inflamatuvar reaksiyon ispat edilmiştir [216, 218, 219]. İnflamatuvar reaksiyonlar pulpa nekrozu ile sonuçlanabildiği halde, büyük bir kısmı iyileşerek tamir olabilir [220]. Vital bir pulpa travma sonucu açıldığında, inflamasyon, nekroz ve bakteri infiltrasyonunun 2 hafta sonra bile pulpanın ancak 2 mm içerisine ilerleyebildiği gösterilmiştir [221]. Bunun aksine nekrotik bir pulpa hızla istila edilir. Odontoblastların ölümünü takiben boş dentin tübülleri, mikropların pulpa boşluğuna girişini kolaylaştırabilir. Mikroorganizmalar, restoratif işlemler, travma ya da anormal diş gelişimi sonucu pulpanın direkt açıldığı durumlarda da pulpaya ulaşabilirler [220].

2.9.2.2. Retrograd Yol:

Bir çok otoriter enfekte kök kanal sisteminden, tübüller, lateral ya da aksesuar kanallar, furkasyon kanalları ve apikal foramen yoluyla çıkan iritanların etraftaki ataşmanı direkt olarak etkilediğini savunmuştur. Ancak periodontal hastalığın doğrudan pulpal hastalığa neden olup olmadığı ile ilgili tartışmalı görüşler de mevcuttur [222-224].

Periodontal tedavi sırasında sement dokusunun kaldırılması, dentin tübüllerini ağız florasına açık hale getirmesine neden olur. Kök düzeltmesini takiben açık dentin tübüllerine bakteri penetrasyonunun olduğunu termal hassasiyetle birlikte pulpa iltihabını gösteren çalışmalar mevcuttur [225].

Bazı araştırmacılar ileri düzey periodontit hastalarının kök kanallarındaki bakteri ile periodontal ceplerindeki bakterileri karşılaştırma yaptıkları çalışmalarda hem periodontal alanda hem de pulpada bakteri mevcudiyeti durumunda, periodontal cep ya da sulkusun, kök kanal enfeksiyonunda yer alan bakterinin kaynağı olduğuna inanmaktadır [226, 227].

2.9.2.3. Anakorezis:

Bakterilerin pulpaya diğer bir geçiş yolu olan anakorezis, mikropların, kan ya da lenf yolu ile pulpitli bir diş gibi inflamasyonlu alana ulaşmasıdır. Brucella abortus, streptokok ve stafilokok gibi bakterilerin köpeklere intravenöz olarak enjekte edilerek, bu bakterilerin hastalıklı periapikal bölgeden ve iltihaplı pulpa dokusundan izole edildiğini ileri süren deneysel araştırma sonuçlarına karşın, başka bir çalışmada sistemik olarak enjekte edildiğinde bakterileri, kedilerin doldurulmamış kök kanallarındaki sıvıdan izole edilemediği belirtilmiştir [228, 229].

Anakorezis hayvan çalışmalarında gösterilmiş olsa da önemli hastalıklarla ilişkili olduğu düşünülmemektedir. Ancak travmaya uğramış dişler bu yolla enfekte olabilir [230, 231].

2.9.3. Kök Kanalındaki Mikrobiyal Ekosistem

İnsan diş kök kanalı içindeki mikroorganizmaların üremeleri ve kolonize oluşturmalarını etkileyen çeşitli ekolojik faktörler bulunmaktadır. Diş kök kanal enfeksiyonlarındaki mikroflora popülasyonu sabit değildir, zamanla değişkenlik gösterir.

Mikrobiyal floranın kompozisyonunu;

- 1) Anaerobik ortam,
- 2) Mikroorganizmalar arasındaki etkileşim ve

3) Besin maddelerinin mevcudiyeti tayin eder.

1) Anaerobik Ortam: Kök kanal sisteminin dinamiği ile ilgili yapılan çalışmalar sonucu, endodontik çevrenin, anaerop mikrofloranın belirli oranlarda gelişimine olanak sağlayan, seçici bir habitat olduğu gösterilmiştir [214].

Anaerop bakterilerin üremelerini etkileyen başlıca üç önemli faktör vardır:

- i) Ortamın oksijen konsantrasyonu,
- ii) Ortamdaki süperoksit radikal konsantrasyonu ve peroksitler,
- iii) Ortamın oksido-redüksiyon potansiyelidir.

i) Oksijen konsantrasyonu: Anaerop bakteriler metabolizmaları ve üremeleri için gerekli enerjiyi fermantasyon reaksiyonlarından sağlarlar. Anaeroplara, moleküler oksijeni kullanamadıkları gibi, oksijen bu bakteriler üzerinde tam olarak bilinmeyen nedenlerle doğrudan toksik etki oluşturmaktadır. Kök kanalı gibi kapalı bir ortamda oksijen konsantrasyonu apikal doğrultuda yavaş yavaş azalır. Zamanla, enfekte pulpa nekrozu oral çevreye açılmamış dişte ne kadar uzun süre var olursa o kadar fazla oksijen tüketilir, böylece anaeroplara hayatta kalmak ve çoğalmak için daha iyi koşullar sağlanmış olur. Bunun sonucu olarak, zorunlu anaeroplara ve fakültatif organizmaların üremesi desteklenmiş olur [232].

ii) Süperoksit radikalleri ve peroksitler: Oksijen kullanan bakterilerin üreyebilmeleri için oksijen gereklidir. Bu bakteriler kendilerini toksik süperoksit radikallerinden ve peroksitlerden koruyan enzimlere sahiptirler. Bunlardan süperoksit dismutaz, toksik süperoksit radikallerinin, toksisitesi daha düşük olan hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalize ederken, katalaz enzimi de hidrojen peroksitten su ve oksijen oluşumunu sağlar. Zorunlu anaerop bakteriler ise kendilerini toksik oksijen radikallerinden koruyan süperoksit dismutaz ve katalaz enzimlerine sahip değildirler. Mikroaerofilik bakteriler oksijen bulunan ortamlarda üreyebilmelerine rağmen, en iyi karbondioksitli ve düşük oksijenli ortamlarda ürerler. Fakültatif anaeroplara, oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilir, hem katalaz hem de süperoksit dismutaz enzimlerine sahiptirler [233].

iii) Oksido-redüksiyon potansiyeli (Eh): Anaeroplara üremesinde önemli rol oynayan diğer bir faktör de Eh'dır. Bir ortamın Eh'ı, elektron verme eğiliminin ölçümü olup, ortamda indirgenen maddelerin bulunması Eh'ının düşmesine yol açar. Anaeroplara ancak düşük ya da negatif Eh bulunan ortamlarda üreyebilirler [234].

2) Mikroorganizmalar Arası Etkileşim: Enfekte kök kanallarından alınan mikrobiyolojik örnekler incelendiğinde bazı bakteri türlerinin genellikle bir arada buldukları gözlenmektedir [235]. Mikroorganizmalar arası etkileşimin kök kanalı ekolojisinde önemi büyüktür ve endodontik ortama uyumlu polimikrobiyal floranın oluşumunu sağlamaktadır [236]. Endodontik floranın ekolojisini etkileyen mikroorganizmalar arası etkileşimler, pozitif (sinerjik) veya negatif (antagonist) yönde olabilir.

Sundqvist 1992 yılındaki çalışmasında, kök kanal enfeksiyonlarında en sık bulunan türlerden biri olan *Fusobacterium nucleatum* ile *Peptostreptococcus anaerobius*, *Campylobacter rectus* ve *Porphyromonas endodontalis* arasında pozitif ilişki tespit etmiştir. Sundqvist 1992 yılındaki başka bir çalışmasında da *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *P.anaerobius*'un *Eubacteriler* ile arasında pozitif ilişki bulmuştur [232].

Çogu streptokok türünün, *Capnocytophaga achracea* ve *Veillonella parvula*'nın ise diğer bakteriler ile ya antagonist ilişkide oldukları ya da hiçbir bağlantılarının olmadığı tespit edilmiştir. Ayrıca, *Actinomyces israelii*'nin *Propionibacterium propionicum* dışındaki hiçbir bakteri türü ile bağlantısı olmadığı görülmüştür. *P. propionicum* ile *Actinomyces* türleri arasında sinerjik ilişki bulunmuştur [235].

Porphyromonas türlerinin *F.nucleatum*'la birlikte yaptığı aktivasyon desteğinde, Feuille ve ark. farede lezyon model yardımıyla *F.nucleatum*'un *Porphyromonas gingivalis*'le birlikte yumuşak doku yıkımında sinerjik etki gösterdiğini ve bunun sonucunda dişin nekroz olduğunu bildirmişlerdir [237].

Dahlen ve ark.'nın yaptıkları çalışmada, enfekte maymun dişlerinin çürük kuronlarında sekiz bakteri çeşidi izole edildiği bildirilmiştir. Bunlar

mikroorganizmaların farklı çeşitlerinin birleşmesine bağlı olarak farklı iltihabi cevapları meydana getirmektedir. *P. anaerobius*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium necrophorum*'un karışımı bakteriler arasında en etkili olan karışımdır ve şiddetli lezyonlara neden olmaktadır. Oysa bu mikroorganizmalar diğer kombinasyonlarda veya tek başlarına yaşayamamaktadır ve daha az inflamasyon oluşturmaktadır. Bu faktörler endodontik enfeksiyondaki sinerjinin etkisine açıklık getirmektedir [213, 238].

3) Besin Mevcudiyeti: Besin türü ve mevcudiyeti mikrobiyal gelişme için önemli bir faktördür. Parçalanmış pulpa dokusu ve doku sıvıları kök kanalındaki besin maddelerinin önemli kaynaklarını oluştururlar [232, 235].

Kök kanalındaki çevresel koşullar, aminoasit ve peptidleri fermente edebilen anaerop bakterilerin üremesine izin verirken, öncelikle karbonhidratların fermentasyonu ile enerji sağlayan bakteriler için uygun beslenme koşulları bulunmadığından bu türler sınırlı kalabilir. Bu durum, ağız kavitesine açık kök kanallarının koronal kısmında streptokoklar gibi fakültatif anaeroplara, apikal kısmında da zorunlu anaeroplara baskın olmasının sebebinin açıklanmaktadır [239].

Ter Steeg ve van der Hoeven kök kanal florasının dinamiği ile ilgili önemli ipuçlarını ortaya koydukları çalışmalarında, subgingival plak organizmalarının serum içindeki üreme sıralarını incelemişler, üremelerin üç faza ayrılabilceğini bildirmişlerdir.

Birinci fazda, serumdaki düşük karbonhidrat içeriği hızlı üreyen sakkarolitik bakteriler tarafından tüketilmiş ve bu da laktik asit ile formik asit üretilmesine yol açmıştır.

İkinci fazda, proteinler hidrolize edilmiş, bir miktar amino asit fermentasyonu olmuş ve serum glikoproteinlerinden ayrılmış olan karbonhidratların kalan miktarı kullanılmıştır. *P. intermedia*, *Veillonella parvula*, *F. nucleatum* ve *Eubacterium* türleri, ikinci faz sırasında baskın olarak üreyen mikroorganizmalardır.

Üçüncü fazda, yoğun protein ayrışması meydana gelmiştir. Bu fazın baskın mikroorganizmaları *P. micros*, *F. nucleatum* ve *Eubacterium* olmuştur [240].

Diğer bir çalışmada, yine subgingival plak organizmalarının kültürünün serum içinde üremesi sonucu *P. micros*'un baskın tür olduğu gösterilmiştir. *P. micros*'un ekolojik çevresi, onun serum proteinlerini ayrıştırarak, peptid ve amino asit oluşumunu sağlayan peptitaz aktivitesi ile ilgili olabilir. Bu amino asitler, *P. micros* tarafından kullanılabilirdiği gibi, serumda bulunan proteolitik aktivitesi olmayan ya da çok az olan diğer bakteriler tarafından da kullanılabilir [241].

Besinsel olarak mikroorganizmaların bazı türlerinin metabolik yıkım ürünleri, diğer türlerin besin zincirinin bir kısmını oluşturabilmektedir [213].

Siyah pigmentli anaerobik rodler (*Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri) üremek için vitamin K ve hemine ihtiyaç duyarlar. Vitamin K, diğer bakteriler tarafından üretilir [242].

Hemin, hemoglobinin parçalanması sonucu ortaya çıkar, ancak bazı bakteriler de hemin üretebilirler. Örneğin *C. rectus*'un *Porphyromonas* türlerinin üremesini, hemin üreterek stimüle ettiğini gösteren bir çalışma bulunmaktadır [243].

2.10. ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA BAKTERİYEL PATOJENİTE

Kök kanalını enfekte eden her oral mikroorganizmanın periapikal dokuları da enfekte etme olasılığı bulunmaktadır. Bu sonuca dayanarak tüm oral mikroflora üyeleri kök kanalı ve periapikal dokuların enfeksiyonunda birer patojen olarak görülebilir [213].

Bununla birlikte, kök kanal patojenlerinin hastalık yapabilmesi için bazı şartlar gerekmektedir [244]:

1. Mikroorganizmalar periradiküler hastalığı başlatıp sürdürmek için yeterli sayıda bulunmalıdır.
2. Mikroorganizmalar kök kanal enfeksiyonu oluşturabilmesi için virülans faktörlere sahip olmalıdır.
3. Kök kanal sistemine yaygın olarak yerleşmiş mikroorganizmalar virülans faktörleriyle periapikal dokulara geçip patojen hale gelebilmelidir.

4. Kök kanal ortamı, mikroorganizmaların yaşamasına ve çoğalmasına izin vermeli ve sinyal salgılayarak virülans genleri uyarabilmelidir.

5. Kök kanal patojenleri, konak dokuda savunmayı başlatarak doku hasarına yol açabilmelidir.

Fabricius yaptığı maymun deneyinde enfekte kök kanal dokusundan izole edilen orijinal bakteri veya bakteri gruplarını (*P. oralis* ve 11 diğer tür) çeşitli kombinasyonlarda veya tek tek diğer maymunların kök kanallarının içine inoküle etmiştir. Her bir bakteri türü tek tek inoküle edildiği zaman sadece hafif bir apikal periodontit gelişirken, kombinasyonlar halinde verildiğinde çok şiddetli periapikal reaksiyonlar meydana gelmiştir [245]. Bu çalışma kök kanalında patojenite gücü için bakterilerin aralarında oluşturdukları sinerjinin ne kadar önemli olduğunu ortaya koymaktadır.

Kök kanalında kolonize olabilen herhangi bir mikroflora az ya da çok şiddetle bir hastalığa yol açabilir. Bu olayda tek bir patojen rol almaz. Deneysel araştırmalar anaeroplardan hem akut hem de kronik enfeksiyonlardaki önemini göstermekle birlikte, araştırmalar ayrıca, anaerobik enfeksiyonun yerleşmesi için fakültatif ve Gram (+) mikroorganizmaların önemini de ispat etmişlerdir [238, 239, 246-248].

Ekolojik ve çevresel faktörler, kök kanal enfeksiyonunda mikrobiyal floranın kompozisyonu belirlemektedir. Sonuç olarak patojenite, daha çok mikrobiyal grup ya da kombinasyonlarla ilişkilidir ve tek bakteri türünün özgünlüğünün düşük olmasını izah eder [249]. Yani periapikal hastalık kök kanalındaki farklı kompleks mikroorganizmaların kombine aktivasyonu ile meydana gelir.

2.10.1. Mikrobiyal Virülans Faktörler

Kök kanalında var olan mikroorganizmalar tarafından üretilen birçok virülans faktörlerinin birleşimi endodontik mikrobiyal floranın patojenite derecesini belirler. Mikrobiyal virülans faktörler (Tablo 9), yapısal bileşenler ve mikroorganizmalar tarafından oluşturulan ürünleri kapsar [250].

Doku hasarı, bakteri enzimleri ve metabolik son ürünler tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak yapılır ve konak hücreleri ve/veya bağ dokusundaki hücreler

arası matriks hasarı şeklinde oluşabilir. Ayrıca peptidoglikan, lipoteikoik asit, fimbria, kirpik, dış membran proteinleri ve vezikülleri, DNA, kapsül ve lipopolisakkaritler gibi bakterilerin yapısal komponentleri periradiküler dokulara yayılarak konak immun yanıtını uyarır ve şiddetli doku yıkımına neden olurlar [56].

2.10.1.1. Lipopolisakkarit (LPS) (Endotoksin):

Endotoksinler, lipopolisakkarit yapıda moleküller olup Gram (-) bakterilerin hücre duvarında yer alırlar [251].

LPS, bakterinin ölümünden sonra çoğalma ve üreme aşamasında ortama yayılmaktadır. LPS'in patolojik etkisi endotelial hücreler ve makrofajlar arasındaki etkileşimler sonucu oluşmaktadır. LPS'ler endotelial hücrelere, adezyon moleküllerinin, interlökinlerin (IL) ve tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α) gibi birkaç moleküler mediatörün salgılanması için sinyal göndermektedir. TNF- α , LPS'in zarar veren etkilerini oluşturmada birincil sorumlu mediatördür. LPS, periapikal lezyonlu dişlerin dentin duvarlarından ve kök kanallarından elde edilen örneklerinde bulunmuştur [236].

Dahlen ve Bergenholtz'un yaptıkları çalışmada LPS ve endotoksinler enfekte kök kanallarında gözlemlenmiş ve var olan Gram (-) bakterilerin sayısı ile ilişkili bulunmuştur [252].

2.10.1.2. Peptidoglikan tabaka:

Peptidoglikan birçok özdeş alt birimden oluşan kompleks polimer bir yapıdır. Gram (+) bakterilerde peptidoglikan tabaka 40- 100 katmandan oluşmuş olup, hücre duvarının ağırlıkça %50'sinden fazlasını oluşturmaktadır. Gram (-) bakterilerde ise yalnızca bir veya iki katman olup hücre duvarının ağırlıkça %5-10'unu oluşturur [60].

Peptidoglikan, apikal periodontit lezyonlarının patogenezinde rol oynayabilecek birçok biyolojik etkiyi başlatabilir [253].

Tablo 9. Bakterilerin virulans faktörleri

	Örnek endodontik patojenler
Lipopolisakkarit	<i>T. forsythia, P. endodontalis, P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia, C. rectus</i>
Peptidoglikan	<i>S. anginosus grubu</i>
Lipoteioik asit	<i>E. faecalis, S. anginosus grubu</i>
Dış membran proteinleri ve vezikülleri	<i>F. nucleatum, P. endodontalis, P. gingivalis</i>
Lipoproteinleri	<i>T. denticola, P. gingivalis</i>
Fimbriya	<i>P. gingivalis, P. intermedia / nigrescens</i>
Kapsül	<i>P. endodontalis, P. gingivalis, F. nucleatum, P. micra</i>
Kirpik	<i>T. denticola</i>
DNA	
Salgılanan ürünler	
Enzimler;	
Proteaz	<i>T. denticola, P. endodontalis, P. gingivalis</i>
Hiyolüronidaz	<i>P. gingivalis, P. micra, E. faecalis</i>
Kondroitin sülfataz	<i>P. gingivalis</i>
Fosfataz	<i>T. forsythia, P. endodontalis, P. gingivalis</i>
DNaz	<i>P. gingivalis</i>
Fosfolipaz	<i>P. gingivalis, P. intermedia / nigrescens, C. albicans</i>
Eksotoksinler: lökotoksin	<i>C. rectus, F. necrophorum</i>
Isı-şok proteinleri	<i>T. denticola, T. forsythia, P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia / nigrescens, C. rectus, E. faecalis, C. albicans</i>
Metabolik son ürünler	
Volatil sülfür bileşikleri	<i>T. denticola, P. endodontalis, P. gingivalis, P. micra</i>
Kısa zincir yağ asitleri	<i>T. denticola, T. forsythia, P. endodontalis, P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia / nigrescens</i>
Poliaminler	<i>P. gingivalis</i>
İndol	<i>P. endodontalis, P. gingivalis, F. nucleatum, P. intermedia / nigrescens</i>
Amonyum	<i>P. gingivalis, F. nucleatum</i>

2.10.1.3. Lipoteioik asit:

Lipoteioik asit (LTA) gibi anyonik polimerler, Gram (+) bakteri hücre duvarının kuru ağırlığının %50'sini oluşturan major bileşenlerdir. Dolaylı olarak doku hasarı başlatabilen etkileri bulunmaktadır. Makrofaj ve kompleman sistemini aktive etmek gibi biyolojik etkileri LPS ile benzerlik gösterdiği için LPS'in Gr (+) bakteri karşılığı olarak değerlendirilebilir [60].

2.10.1.4. Dış zar proteinleri:

Gram (-) bakterilerin dış zarının ağırlıkça yaklaşık %50'si proteinler içermektedir. Bakterilerin konak hücreye tutunmasında rol oynarlar.

2.10.1.5. Ekstraselüler veziküller:

Gram (-) bakteriler ekstraselüler veziküller meydana getirirler. Ekstraselüler veziküllerin zarları, bakteri hücre zarına benzer, aynı özellikte yüzey antijenine sahip olduğu için, antikorların bakteriye direkt bağlanmasına engel olur. Böylece konakçının enfeksiyona karşı hümmoral cevabını azaltır. Bu veziküllerde enzimler ya da toksik ajanlar bulunabilir. Ekstraselüler veziküllerin konakçı dokuda hemagglünasyon, hemoliz, bakteriyel adezyon ve proteolitik aktivasyonda rol oynadığı düşünülmektedir [254].

2.10.1.6. Lipoproteinler:

Lipoproteinler genellikle Gram (-) bakterilerin hücre duvarında bulunur ve dış zarı peptidoglikan tabakaya bağlar. Makrofajlar yoluyla IL-1, IL-6, IL-12 ve TNF- α salınmasını uyardıkları gösterilmiştir [255].

2.10.1.7. Fimbria (pili):

Birçok Gram (-) bakteri fimbria olarak adlandırılan uzantılar içerir. Fimbrialar bakterilerin konak doku ya da diğer mikroorganizmalara tutunmasında rol alırlar [254].

2.10.1.8. Kapsül:

Hem Gram (+) hem de Gram (-) bakterilerde bulunan kapsül, bakteri yüzeyinin topografisini değiştirerek bakteriyi fagositozdan korur.

2.10.1.9. Flagel:

Bakteriyel flajeller, bakterinin hareketini sağlayan, sitoplazmik zardan dışarı doğru uzanan çıkıntılardır. Bakterilerin fagositozdan kaçmasında rol oynarlar.

2.10.1.10. Bakteriyel DNA:

Bakteri DNA'sı, metilsizlenmiş CG (sitozin, guanin) dinükleotidli (CpG) DNA dizisi mevcudiyeti bakımından memeli DNA'sından farklıdır. Yapısal özelliklerinden dolayı immün sistem hücreleri bakteri DNA'sını tehlike olarak algılayabilir. Bunun sonucunda çeşitli sitokinler ortaya çıkarırlar [256].

2.10.1.11. Enzimler:

Kök kanalında görülen mikroorganizmalar kollejenaz, hyaluronidaz, fibrinolizinler ve proteazlar gibi çeşitli enzimler üretirler. Bu enzimler direkt olarak toksik değildir ama konak dokusundaki organizmaların yayılmasına yardım etmektedir. Mikroorganizmalar, kan pıhtısı ve diğer konak savunmasıyla ilişkili çeşitli plazma proteinlerini yıkan enzimler üretmektedirler [257].

2.10.1.12. Eksotoksinler:

Eksotoksinler, endotoksinlerin aksine yaşayan mikroorganizmalar tarafından salgılanan antijenik, nonpiyojenik, termolabil polipeptidlerdir ve bunlar toksoidlere dönüşebilirler. Lökotoksinler, marjinal periodontitin bazı tiplerinin patogenezile ilişkili en iyi bilinen eksotoksinlerdir. Lökosit hücre membranlarında küçük delikler oluşturup hücrenin lizisine neden olmaktadır [258]. Lökotoksin, *F.necrophorum* [259] ve *Actinobacillus actinomycetemcomitans* [260] çeşitleri tarafından üretilir. Bununla birlikte *Fusobacterium* türlerinden, *F. nucleatum* en sık rastlanan endodontik patojendir ve bu mikroorganizma herhangi bir eksotoksin üretmez. *A. actinomycetemcomitans* yüksek miktarda kapnofilik veya karbondioksit seven bir organizmadır ama kök kanal ortamında yaşayamamaktadır. Bu yüzden, eksotoksinler endodontik floranın patojenitesinde önemli bir role sahip değildirler.

2.10.1.13. Bakteriyel peptid (N-Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine (fMLP):

fMLP, güçlü bir kemoatraktan ve polimorfonükleer lökosit (PMNL) ve makrofajlar için kuvvetli bir aktivatör olarak dikkate alınan bakteriyel bir peptiddir [60].

2.10.1.14. Isı şok proteinleri:

Asıl görevleri mikroorganizmaların çeşitli koşullar altında hayatlarını sürdürmelerine olanak sağlamak olan ısı şok proteinleri, yüksek derecede korunmuş proteinlerdendir. Bakterilerin konak hücreye tutunmasında rol oynarlar. Apoptozisi kolaylaştırdığı ve bu etkinin muhtemelen konağın antibakteriyel cevabını inhibe ettiği rapor edilmiştir [261].

2.10.1.15. Metabolik son ürünler:

Bakterilerin metabolizması sonucu ortaya çıkan çeşitli son ürünlerin konağa toksik etkileri olabilir. Uçucu sülfür bileşikleri, kısa zincirli yağ asitleri, poliaminler, indol ve amonyak gibi çeşitli metabolik son ürünler virülans faktörleri arasında göz önünde bulundurulabilir. Uçucu sülfür bileşikleri, sülfidril içeren amino asitlerin desülfürasyonu sonucu ortaya çıkar. Örneğin hidrojen sülfür, sistenin; metil merkaptan ise metioninin desülfürasyonu ile oluşur. Kök kanal patojeni olmaya aday bakteriler de dahil olmak üzere pek çok oral bakteri türünün uçucu sülfür bileşikleri oluşturabildikleri gösterilmiştir [241, 262].

Siquera ve Roças 2007 yılında bu bileşiklerin nekrotik kök kanallarında birikerek periradiküler dokulara zarar verecek seviyelere ulaşabilmesi mümkün olduğunu bahsetmişlerdir [60].

Kök kanal bakterileri tarafından salınan kısa zincirli yağ asitleri, uçucu (propiyonik, butirik, isobütirik, valerik, isovalerik, asetik ve formik asit) ve uçucu olmayan (laktik ve süksinik asit) asitleri içerir [263]. Kısa zincirli yağ asitleri nötrofil kemotaksisi, degranülasyon ve fagositozu etkiler [254].

Poliaminler, amino asitlerin dekarboksilasyonu sonucu mikroorganizmalar tarafından üretilir. Putresin, spermidin ve kadavrin poliaminlere örnek olarak verilebilir. Poliaminler hücre canlılığının devamında, hücre proliferasyonunda inflamasyon sürecinin düzenlenmesinde rol alan bileşiklerdir [264, 265]. Bakterilerin metabolik son ürünü olan indol ve amonyak da konak hücrelerine toksik olabilmektedir [266, 267].

Enfekte kök kanalındaki bakteriyel birlikteliğin içeriği, bakterilerin konsantrasyonları kadar son ürünlerin çeşitliliğini de belirler. Bir yandan bazı bileşikler, bazı mikroorganizma türleri tarafından tüketilir ve indirgenebilirken, diğer yandan ortaya çıkan metabolitler periradiküler dokularda birikerek toksik seviyelere ulaşabilir. Kısa zincirli yağ asitleri, poliaminler ve özellikle de uçucu sülfür bileşikleri gibi birçok son ürünün anaerobik kök kanal enfeksiyonlarının tipik kokusundan sorumlu oldukları bildirilmiştir [60].

2.10.2. Biofilm

Costerton ve arkadaşlarının 1977 yılında ‘bakterilerin, polisakkarit fiberlerin birbirine geçmesiyle veya şeker moleküllerinin dallanmasıyla bakteri yüzeyinden uzanarak tek bir hücrenin veya hücre kolonilerinin adezyonun iletimini sağlayan glikokaliks yapısının çevreninle yapışmaları görülmüştür’ diyerek biyofilm tanımını öne sürmüşlerdir [268].

Donlan ve Costerton 2002 yılında en güncel olarak " mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan, mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir" diyerek biofilmi tanımlamışlardır [269].

Caldwell ve arkadaşlarına göre mikrobik biyofilm topluluğunun autopoeisis, homeostasis, sinerji ve communalıty diye dört temel kriteri sağlamış oluyorlar. Yani kendi kendilerine organize olabilme, kendi hücre dışı olaylar karşısında kendi metaolizmasını koruma eğiliminde ve dirençte olabilme, birlikte olduklarındaki etkileri tek başlarına olduklarından daha etkili olabilme, çevresel değişikliklere karşı tek başlarına değil birlikte karşılık verebilme özelliklerine sahiptir [270].

Biofilm hem yapısal ve dinamik olarak kompleks bir biyolojik sistem hem de virulan faktör olarak tanımlanır. İnsanlarda gelişen bakteriyel enfeksiyonların yaklaşık %65-80'inin biofilm enfeksiyonu sorumlu tutulur. Bakteriler kule ya da mantar şeklinde koloniler halinde bulunur. Dental biofilm tabakası 300'den fazla hücre katmanına sahiptir [271].

Yüzey biofilm tabakası polisakkarit yapı sürekli mikroorganizmalar tarafından sentezlenerek farklı tipteki polimer kümelerden oluşarak ekstraselüler polimerik matriksi meydana getirir. Bu matriks biofilmin %85-90'dan daha fazlasını oluştururken mikroorganizmalar %10'undan daha azını oluşturur. Biyofilmin üç boyutlu yapısının iskeletini ekstraselüler polimerik matriksi oluşturur ve biyofilmin yüzeylere adezyonu ve kohezyonundan sorumludur [272].

Bu ekstraselüler polimerik matrisler hücreleri yüzeye bağlayarak adezin gibi davranmaları dışında hücreleri birbirlerine de bağlayarak antimikrobialların biyofilmler içerisinde mikrokolonilere difüzyonunu önlemekte ve geciktirmekte, ve konağın savunma mekanizmalarından biyofilm organizmalarını korumaktadır. Biofilm yapı içindeki bakterileri öldürmek için planktonik (tutunmamış) türlere etkili antibiyotik konsantrasyonun 100-1000 katı daha fazlası gerekebilir. Biofilm matrisi içindeki enzimler antimikrobiyal ajanları nötralize edici etki göstermektedir. Antibiyotiklerin bazıları biofilm içerisine girebilseler de hücre yapısına etki edemedikleri için etkisiz kalabilmektedirler [273].

Biyofilm; bakterilerin çevresel tehditlerden koruyan, besinlerin yakalanmasına ve içerisindeki aynı veya farklı türden hücrelerin metabolik birlikteliğine imkân sağlayan, organize iç bölümlendirme özelliği göstererek büyüme gereksinimi olan bakteri türlerinin farklı bölmelerde yaşayabilmesine imkân sağlayan, bakteriyel hücrelerin yeni özellikler alabilmek için haberleşebilmesine ve yatay gen transferi yapabilmesine olanak sağlayan bir yapı içerisinde [274].

2.10.3. Quorum Sensing

Quorum sensing sistemi bakteri topluluğunun kollektif bir grup olarak birlikte hareket etmelerine ve çok hücreli birim olarak davranmalarına izin vermektedir. Hem gram negatif hem de gram pozitif türler için iletişim kurabilme ve davranışını değiştirebilme yeteneği kazandırır [275].

Bakteriler otoindüktör denilen, yayılabilen sinyal moleküllerinin üretimini, salınımını ve saptanmasını sağlayan bu sistem aracılığıyla iletişim kurarlar. Bu moleküller bazal seviyede üretilerek büyüme sırasında birikirler. İki tip baskın otoindükleyici protein N-acyl-L-homoserine lactone ve posttranslasyonally modified peptid gram pozitif ve gram negatif bakteriler tarafından kullanılır [276].

Küçük moleküllü quorum sensing otoindükleyici *Pseudomonas* quinolone sinyal ve AI-2'dir [277]. Kritik konsantrasyona ulaşıldığında otoindüktörler hedef genlerin birkaçını aktive edebilir veya baskılayabilirler. Otoindüktörlerle gen ekspresyon kontrolü hücre yoğunluğuna yani yeterli çoğunluğa bağlı olduğundan bu olay quorum sensing olarak adlandırılır. Quorum sensing birçok organizmada

virulans gen ekspresyonu ile kontrol edilmektedir. Quorum sensing sistemi virulan faktörü, DNA yükseltme yeteneğini, durağan faza geçişi ve biofilm formasyonunu düzenler [271, 278].

2.10.4. Endodontik Biyofilm

Sağlıklı bir insanın oral florasında 300'den fazla mikroorganizma türünün kolonize olduğu bilinmektedir. Çeşitli yollarla diş sert dokusunun bütünlüğü bozulduğunda oral mikrobiyotadan bir kısmı pulpa odasını enfekte edebilir. Bununla birlikte, endodontik floranın öne çıkan özelliği az sayıda türün periapikal olarak enfekte olmuş dişlerin kök kanallarından sürekli olarak izole edilmesidir [53, 279].

Birçok vakada, endodontik tedavinin başarısız olması, iyi tedavi edilmiş dişlerde bile, kök kanal sisteminin apikal kısmındaki inatçı mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır. İstmus, dallanmalar, deltalar, düzensizlikler ve dentintübülleri gibi bölgelerde bulunan bakteriler, bazı durumlarda endodontik tedavi prosedürlerinden etkilenmeyebilirler. Tedavi sonrasında dallanmalarda ve deltalarda bulunan bakterilerin besin kaynağı kesilmezken, dentinal tübüllerde ve istmuslarda bulunan bakterilerin besine ulaşma yolları kapatılmıştır. Bu bölgelerde kanal dolgusu ile üzeri kapatılan bakteri ya ölür ya da periradiküler dokulara geçişi engellenir. Fakat bazı bakteri türleri doku kalıntıları ve ölü hücrelerden beslenerek görel olarak daha uzun süreler yaşayabilirler [4].

Endodontik enfeksiyonlar anatomik olarak buldukları yere göre intraradiküler veya ekstraradiküler olarak sınıflandırılabilirler. İntraradiküler enfeksiyona kök kanal sisteminde kolonize olan mikroorganizmalar sebep olmaktadır ve kök kanal sistemine mikroorganizmaların girme zamanlarına göre üç alt kategoriye ayrılabilirler. 1- Primer enfeksiyonlar, nekrotik pulpa dokusunu kolonize eden ve ilk olarak işgal eden mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. 2- Sekonder enfeksiyonlar, primer enfeksiyonlarda görülmeyen fakat kök kanalına profesyonel müdahaleden sonra girmiş olan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır. 3- İnmatçı enfeksiyonlar, primer ve sekonder enfeksiyonların üyesi bulunduğu mikroorganizmalar tarafından sebep olunan ve bir şekilde intrakanal antimikrobiyal prosedürlere direniş göstermiş ve tedavi edilen

kanallarda besin yoksunluğuna dayanabilmiş enfeksiyonlardır. Ekstraradiküler enfeksiyon enfekte olmuş periradiküler dokuları mikropların işgal etmesiyle karakterize edilen ve intraradiküler enfeksiyonların devamı olan enfeksiyonlardır. Ekstraradiküler enfeksiyonlar intraradiküler enfeksiyonlara bağımlı ya da bağımsız olabilir [26].

Leonardo ve arkadaşları 2002 yılında yaptığı çalışmada; pulpa nekrozu bulunan, periapikal lezyonları radyografik olarak görülen veya görülemeyen ve canlı pulpası bulunan dişlerin kök apekslerinin eksternal yüzeylerinde bakteriyel biyofilmin varlığının değerlendirildiği çalışmada sağlıklı dişlerin ve pulpa nekrozu olan radyografik olarak periapikal lezyon görülmeyen dişlerin apikal eksternal kök yüzeylerinde mikroorganizma bulunamamıştır. Pulpa nekrozu ve kronik periapikal lezyonu olan dişlerde ise sementte rezorbsiyon ve apikal foramen çevresinde çok miktarda mikroorganizmaya rastlamışlardır [280].

Noiri ve arkadaşlarının elektron mikroskop çalışmalarında; cerrahi olarak çekilen dişlerin; yüzeyi, kök uçları ve ameliyat sırasında veya endodontik olarak yeniden yapılan tedavi sırasında çıkarılan gutta perka uçlarında periapikal lezyonlarda biyofilmin oluşumunun varlığı incelenmiştir ve incelenen 11 örneğin 9'unda ekstraradiküler biyofilme rastlanmıştır [281].

Sunde ve arkadaşlarının dirençli periapikal endodontik lezyonların florasının toplanması ve belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada; 36 periapikal lezyondan 35'inde mikrobiyal büyüme gözlenmiştir ve 33 örnekte polimikrobiyal türe rastlanırken 2 örnekte tek bakteriyel türe rastlanmıştır [282].

Noguchi ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptığı çalışmada, dirençli periapikal periodontitisi bulunan insan dişlerinin ekstraradiküler biyofilmleri, biyofilm oluşturan bakterileri ayırt etmek için ve belirlenen bakterilerin imminohistokimyasal yerleşiminin araştırıldığı çalışmada; 20 ekstraradiküler biyofilm örneğinin 14'ünden 1207 klon analiz edilmiş ve 113 bakteri cinsi ve türü belirlenmiştir [52].

Wang ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptığı çalışmada, kök ucu cerrahisi yapılmış, kök kanal dolgusu tamamlanmış, apikal periodontitisi bulunan 23 dişten apikal kök örnekleri olarak; 5 örneği SEM aracılığı ile, 5 örneği ise Brown ve Brenn

modifiye gram boyama aracılığı ile biyofilm varlığını araştırmak için kullanmışlar. Tedavi edilmiş dişlerin diş kök yüzeylerinde görülen ekstrarakler biyofilmin, bol miktarda şekilsiz ekstrasellüler materyalin ve birçok bakteriyel türün varlığını görmüşlerdir [283].

2.10.5. Bakterilerin gram boyama yöntemine göre sınıflandırılması

Hücre duvar yapılarına göre bakteriler Gram + ve Gram - olmak üzere iki gruba ayrılır. Bakterileri ayırt etmede gram boyama kullanılır. Gram pozitif bakterilerin duvarlarında kalın bir peptidoglikan tabakası vardır ve boya parçacıklarını tutar. Gram pozitiflerde bu boyalar hücre çeperinden zor ayrılan bileşikler yaparak fuksin veya safranin uygulandığında mor renklerini kaybetmezler. Gram negatif bakterilerin hücre duvarı ise sadece ince bir peptidoglikan katmanından oluşur. Gram boyama tekniğinde gram negatif bakteriler mor renklerini kaybederek kırmızı-pembe renge boyanırlar [284].

Ağız ortamında, çok çeşitli mikroorganizmaların bulunduğu bilinmektedir. Bakteriler pulpa nekrotik hale geldikten sonra artık bakteriler apikal periodontitis ve apekse doğru ilerlemektedir. Bu nedenle endodontide mikroorganizmaların önemli bir yeri vardır. Mikroorganizmaların ortadan kaldırılması endodonik tedavilerin gidişi ve prognozu açısından birinci derecede önem taşımaktadır [285].

Odontojenik enfeksiyondaki bakteriler normalde bireyin vücudunda yaşayan canlılardır. Ağız florasını oluşturan plakta, mukoza yüzeylerinde, gingival sulkusta bulunan bakterilerdir. Bu bakteriler, aerobik gram pozitif koklar ve anaerobik gram negatif çubuklardır.

Kök kanal enfeksiyonlarının dinamiği üzerine yapılan çalışmalar şunu göstermiştir; aneorobik mikroorganizmaların ve bakteri hücrelerinin nisbi oranlarda zamanla arttığı fakültatif anaerobik bakterilerin 3 ay ve daha uzun süreli enfekte olan kanallarda aşırı derecede arttığıdır. Enfeksiyon esnasındaki mikrobiyal türler ve populasyon geçişleri arasında gelişen ilişkiler, kök kanalındaki özel çevresel ve seçici baskılar kadar bu etkileşimlerin sonucu olarak oluştuğu belirtilmektedir [284].

Gram negatif bakterilerin çoğu patojendir. Bu hastalık yapma yetisi Gram negatif hücre duvarlarında bazı özelliklerinden ve lipopolisakkarit içeriğinden kaynaklanmaktadır [232].

Hücre duvar yapılarındaki farklılık sebebiyle antijenik yapılar konakçının savunma mekanizmasına karşı verilen cevap ve hastaların antibiyotiğe karşı hassasiyeti değişmesine sebep olmaktadır [286].

Apikal periodontitiste bakteriler kök kanalında simbiyotik bir ilişki içindedirler. İmmunoglobulin ve diğer proteinleri proteolitik parçalanması sadece konak savunma sistemini etki etmez aynı zamanda diğer bakterilere de besin olarak peptid ve amino asitler sağlar [232].

2.10.6. Temel Mikrobiyolojide Anaerop Bakterilerin Oksijen İhtiyacına Göre Sınıflandırılması

Normal koşullar altında oda atmosferin yaklaşık % 20'si oksijendir ve bazı bakterilerin mevcut orandaki oksijenin varlığında üremedikleri, bununla beraber ortamda oksijen bulunmadığında üreyebildikleri bilinir. Genel bir basitleştirme ile bir bakteri topluluğunun bu tekdüze davranışları bile onları diğerlerinden ayırmaya ve farklı sınıflandırmaya yeterlidir.

Zorunlu aerop bakteriler, ürettikleri ortamda bol oksijen bulunmasını isterler. *Bacillus*, *Bordetella*, *Brucella*, *Franciella*, *Legionella*, *Micrococcus*, *Nocardia* ve *Pseudomonas* genusunun üyeleri bu gruba örnek oluşturur. Enfekte kök kanalında bu bakteriler bulunmaz [61, 210].

Anaerop bakteriler yaşama ve üremeleri için oksijene ihtiyaç duymayan bakterilerdir. Anaerop bakteriler moleküler oksijen ile olan ilişkilerine göre 'zorunlu anaerop', 'mikroaerotolerant anaerop', 'aerotolerant anaerop' ve 'fakültatif anaerop' olarak sınıflandırılırlar [210].

2.10.6.1. Zorunlu anaeroplara:

Katı besiyerinde %0,5'den fazla oksijen varlığında üreyemeyen, salt oksijensiz ortamda üreyebilen bakterilerdir (Örn; *Clostridium novyi* tip B,

Porphyromonas, *Fusobacterium* ya da *Peptostreptococcus* türleri). Zorunlu anaeroplarda birkaç dakikalık hava temasında ölürlür. Normal florada bulunmalarına rağmen klinik örneklerden nadiren izole edilirler. Ancak bu grup içinde %2-8 (~ %3) oksijen varlığında üreyebilen ve ılımlı anaeroplarda olarak adlandırılan (Örn; *Bacteroides fragilis* grubu) bakteriler bulunur. Besiyeri yüzeyinde havadaki oksijeni birkaç saat tolere edebilir, üremek için anaerop atmosfere ihtiyaç duyarlar.

Endodontik patojenlerin en çok bilinenleri bu gruba girer: *Acidaminococcus*, *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Mitsoukella*, *Peptococcus*, *PeptoStreptococcus*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Propionibacterium*, *Spiroketler*, *Veillonella*, *Wolinella*, *Selenomonas* zorunlu anaerop bakteri aileleridir ve hepsi endodontik patojendir [61, 210].

Bazı anaerop bakteriler (örneğin, *Clostridium haemolyticum*) oda atmosferine (% 20 oksijene) yalnızca 1-2 dakika dayanabilirler. Başka anaeroplarda (mesela *Bacteroides fragilis*, *Propionibacterium acne*) oda atmosferine 30, bazen 60-100 dakika dayanabilir [61, 210].

2.10.6.2. Mikroaerofilik bakteriler:

% 4-6 oksijeni tolere edebilirler. Bu düzeyin üzerindeki oksijen bu bakteriler için anabolik baskı oluşturur. Enfekte kök kanalında bulunan *Camphylobacter* ve *Lactobacillus* genusunun pek çok üyesi mikroaerofilik bakterilere birer örnek oluşturur. Bunlar ilerleyen pasajlarında aerotoleran anaerop olabilirler [61, 210].

2.10.6.3. Mikroaerotolerant anaeroplarda:

Anaerop ve mikroaerofil (%5 O₂) ortamda üreyebilen, CO₂'li ortam (%15 CO₂) ve atmosferik ortamda (~ %21 O₂) üreyemeyen bakterilerdir (Örn; *Clostridium tertium* gibi).

Aerotoleran anaerop mikroorganizmalar, % 2-8 oksijen toleransı gösterebilir. Aslında bu isim, fakültatifler ile zorunlu anaeroplarda arasında kalan spektrumu tümüyle içerisine alır. Çünkü mikroaerofilik bakteriler ve hatta fakültatif anaerop bakteriler bile aslında birer aerotoleran mikroorganizmaya dönüşebilir. Fakat tolere

edebildikleri oksijen yoğunluklarındaki farklar nedeniyle farklı sınıflanırlar. Aerotoleran ve mikroaerofilik bakterilerin arasındaki sınır belirgin değildir.

2.10.6.4. Fakültatif anaerop bakteriler:

Hem oksijenli ve hem de oksijensiz koşullarda üreyebilirler. Bu grup bakterilere örnek olarak: *Staphylococcus* ve *Streptococcus* genuslarının neredeyse bütün üyeleri, Gram negatif barsak bakterilerinin tamamına yakın bölümü, *Actinobacillus*, *Corynebacterium* genusları, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteuslar* verilebilir. Enfekte kök kanalındaki fakültatif anaerop bakteriler: *Eikenella*, *Enterobacter*, *Streptococcus* üyeleridir [61, 210].

2.10.6.5. Kapnofiller:

En iyi karbondioksit konsantrasyonu yüksek ortamda üreyen anaerop ve aerop bakterilerdir (Örn; *Bacteroides* ve *Fusobacterium* türleri, *Neisseria* ve *Haemophilus* türleri).

2.10.7. Anaeroplara Kaynağı:

Bilimsel verilere dayanarak gezenimizde yaşamın anaerop bakterilerle başladığı ve yüzlerce milyon yıl anaerop kaldığı düşünülmektedir. Bugün anaeroplara özel ekolojik bölgelerde bulunmaktadır. Bu bölgeler, toprak, taze ve tuzlu su çökeltileri ve insanlar dahil hayvan vücutlarıdır. İnsan ve hayvan floralarının önemli bir parçasını oluşturan anaeroplara 'endojen anaeroplara' denir. Vücut dışından kaynaklanan anaeroplara ise 'eksojen anaeroplara' denir [210].

2.10.8. Anaeroplara Normal Floradaki Dağılımı

Anaerop bakteriler vücudun pek çok bölgesinde (kalın barsak, ağız boşluğu, vajina, deri) normal flora elemanları olarak bulunması ile beraber bu bölgedeki bulunma sıklıkları ve cinsleri farklılık göstermektedir (Tablo 10 ve 11).

2.10.8.1. Deri:

Deri anaerop florası *Propionibacterium*, *Peptostreptococcus* ve diğer anaerop gram pozitif koklar ve bazen *Eubacterium* cinsi bakterilerden oluşmaktadır [287, 288].

2.10.8.2. Üst solunum sistemi:

Burun ve ağızdan alınan örneklerdeki anaerop bakteri sayısı aerop bakterilerin sayısına eşit veya daha fazla sayıdadır. Tükürükte bulunan anaerop bakterilerin % 90'ı anaeroptur. Bu sebeple tüm ağız lezyonlarında, aspirat pnömonisi olgularının çoğunda ve kulak burun boğaz infeksiyonlarında anaeroplara yer alır. En çok *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, anaerop gram pozitif koklar, *Propionibacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* ve *Actinomyces* türleri bulunur. Bu özel anaeroplara solunum sisteminden kaynaklanan herhangi bir enfeksiyöz sürece katılabilirler [288].

2.10.8.3. Vajina:

Servikal ve vajinal sekresyonlardaki bakterilerin yaklaşık %50'si anaeroptur. Anaerop gram pozitif koklar, *Prevotella bivia*, *Prevotella disiens*, *Mobilincus*, bazı anaerop laktobasiller ve *Actinomyces* türleri en sık rastlananlardır. *Actinomyces* ve *Eubacterium nodatum* intrauterin araç ve aktinomikotik infeksiyonla ilişkilidir. Anüse yakın diğer anaeroplara ise; *Clostridium*, *Eubacterium*, *B. fragilis* grubu, *Porphyromonas* türleridir. Gram negatif çomaklardan ise *P. bivia* ve *P. disiens* en sık rastlanan türlerdir. Pigmentli gram negatif anaerop çomaklardan ise *B. fragilis* grubu, *Prevotella* ve *Bacteriodes* türlerine rastlanabilir. Ancak vajina ve servikal sürüntü örneklerinden anaerop bakteriler izole edildiğinde ne mikrobiyologlar ne de klinisyenler enfeksiyona neden olan anaerop bakterileri endojen flora kontaminasyonundan ayırt edemezler. Bu yüzden genitoüriner sistem sürüntü örnekleri anaerop bakteriyoloji için uygun örnekler değildir .

Tablo 10. Mukoza yüzeylerindeki endojen floranın anaerop oranları

Anatomik bölge Örnek yeri	gr. ya da ml.'deki total bakterisi	Anaerop:Aerop oranı
Üst solunum yolları		
Burun	$10^3 - 10^4$	3-5 : 1
Tükürük	$10^8 - 10^9$	10 : 1
Diş yüzeyi	$10^{10} - 10^{11}$	10 : 1
Dişeti oluşu	$10^{11} - 10^{12}$	$10^3 : 1$
Gastrointestinal sistem		
Mide	$0 - 10^5$	1 : 1
İnce barsak	$10^4 - 10^7$	1 : 1
Kalın barsak	$10^{11} - 10^{12}$	$10^3 : 1$
Kadın genital sistemi	$10^7 - 10^9$	3-10 : 1

2.10.8.4. Barsak:

Barsak florasını oluşturan anaerop bakterileri en çok *B. fragilis* grubu, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*, *PeptoStreptococcus* ve diğer anaerop gram pozitif koklar, *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleridir. *B. fragilis* grubu içinde en sık rastlanan tür *B. thetaiotaomicron*'dur .

Tablo 11. Endojen florada yer alan anaerop bakteriler

Anaeroplara	Deri	ÜSY ^{xx}	Ağız	Barsak	Vajina
Gram (+) çomak (sporlu)					
<i>Clostridium</i>	-	-	±	++	±
Gram (+) çomak					
<i>Actinomyces</i>	-	+	+	±	-
<i>Bifidobacterium</i>	-	-	±	++	±
<i>Eubacterium</i>	±	±	+	++	±
<i>Lactobacillus</i> ^x	-	-	±	+	++
<i>Propionibacterium</i>	++	+	±	±	±
Gram (-) çomak					
<i>Bacteroides</i>	-	-	-	++	+
<i>Prevotella</i>					
<i>Porphyromonas</i>	-	+	++	-	+
<i>Fusobacterium</i>	-	+	++	+	±
Koklar					
Gram (+)	+	+	++	++	+
Gram (-)	-	+	++	+	+

-: yok ya da çok nadir var, ±: düzensiz var, x: anaerop, mikroaerofil ve fakültatif

+: genellikle var, ++: çok miktarda var, xx: üst solunum yolu: burun boşluğu, nasofarinks, orofarinks, tonsiller

2.11. ENDODONTİK FLORA (MİKROBİYOTA ÇEŞİTLİLİĞİ)

Bir insan vücudunda ortalama 10^{13} tane hücre bulunurken bunun 10 katı fazla sayıda 10^{14} tane bakteri bulunur. Bunlar deri, göz, ağız, kulak yolu, üreme organları, göbek çukuru gibi yerlere gruplar ve cinsler halinde yerleşirler. Belli bir vücut bölgesinde tarif edilen organ, doku veya yüzeyde yaşayan mikroorganizma topluluğuna flora ismi verilir. Ağız florası, çürük florası, enfekte kök kanalı florası, göz florası, dışkı florası gibi florayı tanımlarken bulunduğu yeri belirtilmelidir. Bazı dokuların florası yoktur. Yani sterildir. Örneğin kan florası olmaz, çünkü kan daima sterildir. Beyin omurilik sıvısının florası olmaz, daima sterildir. Diş pulpasının da florası yoktur. Kapalı, canlı ve problemsiz pulpa sterildir.

Organ ve dokuların daha lokal bir bölgesinde yaşayan mikroorganizmaları anlatırken mikroflora terimi kullanılır. Örneğin dil mikroflorası, yanak mikroflorası, interdental mikroflora gibi. Ağızdaki bütün mikrofloralar ağız florasından gelmek zorundadır ve ağız florasındaki bakterilerin çeşitli kombinasyonlarından oluşur. Enfekte kök kanal florası ağız florasının herhangi bir kombinasyonundan ibarettir. Ağız florasının mikroorganizmaları Tablo 12'de gösterilmiştir. Florada bulunan bakterilerin hepsi hastalık nedeni değildir. İçlerinden bir tanesi hastalığa neden olur. Bu mikroorganizmaya patojen (hastalık yapıcı) adı verilir. Bazen patojen bakteri birden fazla sayıda olabilir. Genellikle floradaki en baskın bakteri en patojen olanıdır [61, 210, 289].

Tablo 12. Ağız florasının mikroorganizmaları

1. <i>Streptokoklar, Laktobasiller, Eikenella, Actinobacillus</i>
2. Anaeroplara, <i>Porphromonas, Prevotella, Mitsuokella, Leptothrichia, ve diğer bütün Bacteroides üyeleri, Fusobacterium, Capnocytophaga, Peptostreptococcus, Selenomonas, Abiotrophia, Megasphaera, Gamella, Granulicatella, Atopobium, Rothia, Catonella, Kingella, Dialister, Cardiobacterium, Eubacterium, Veillonella, Wolinella, Bifidobacterium, Propionobacterium, Actinomyces, Camphylobacter ve Helicobacter, Vibriyo ve Spiroketler</i>
3. Daha ender bulunan koagülaz negatif stafilkoklar, Gram negatif barsak çomakları, Mycoplasma ve <i>Candida albicans</i>

Nobel Tıp Ödülü'nü 1958'de kazanan Amerikalı moleküler biyolog Joshua Lederberg mikrobiyota terimini ilk kez kullanarak; milyarlarca mantar, bakteri ve

tek hücrelilerden oluşan, vücudumuzda yaşayan mikroorganizmalar sisteminin topluluk adı olarak belirtmiştir.

Açıkçası mikrobiyota terimini mikroorganizmalar için en iyi kolektif terim olarak kullanmak doğru olacaktır [290].

Kültür ve moleküler biyoloji teknikleri kullanılarak, endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal doğası, primer enfeksiyonlardaki zorunlu anaerobik bakterilerin dikkat çeken üstünlüğüyle açığa çıkarılmıştır. Güncel kanıtlarla, ağız boşluğundan örnekleri bulunan *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Spirochaetes*, *Fusobacteria*, *Synergistes* (daha önce filum *Deferribacter*'lere atanan filotipler), *Sulphur River 1* (SR1) (OP11 bölümünden köken alan), *TM7*, *Chloroflexi*, *Deinococcus*, *Acidobacteria* ve *Cyanobacteria*'dan oluşan 13 filumun (şube) 9' unda endodontik bakterilerin yer aldığı (Tablo 13) gösterilmektedir. Endodontik mikrobiyotanın yaklaşık %40-55'i şimdiye kadar ekilmiş ve tamamen tanımlanmış bakterilerden oluşmaktadır, daha ekilmemiş türlerin yüksek prevalansı dikkati çekmektedir [291-296].

Tablo 13. Endodontik enfeksiyonlarda bulunan bakteri filumları ve yaygın temsilcileri.

Filum	Tür/Filotip
<i>Firmicutes</i>	<i>Dialister</i> türleri, <i>Filifactor alocis</i> , <i>Parvimonas micra</i> , <i>Pseudoramibacter alactolyticus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Eubacterium</i> türleri, <i>Mogibacterium</i> türleri, <i>Streptococcus</i> türleri, <i>Lachnospiraceae</i> türleri, <i>Veillonella parvula</i> , <i>Lactobacillus</i> türleri, <i>Catonella morbi</i> , <i>Gemella morbillorum</i> , <i>Selenomonas</i> türleri, <i>Peptostreptococcus</i> türleri
<i>Bacteroidetes</i>	<i>Tannerella forsythia</i> , <i>Porphyromonas endodontalis</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i> , <i>Prevotella</i> türleri, <i>Klon X083</i>
<i>Actinobacteria</i>	<i>Actinomyces</i> türleri, <i>Atopium</i> türleri, <i>Corynebacterium matruchotii</i> , <i>Olsenella ulii</i> , <i>Propionibacterium propionicum</i> , <i>Propionibacterium acnes</i> , <i>Slackia exigua</i>
<i>Proteobacteria</i>	<i>Eikenella corrodens</i> , <i>Campylobacter rectus</i> , <i>Campylobacter gracilis</i>
<i>Fusobacteria</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Spirochaetes</i>	<i>Treponema denticola</i> , <i>Treponema parvum</i> , <i>Treponema socranskii</i> , <i>Treponema maltophilum</i>
<i>Synergistes</i>	<i>KlonBA121</i> (<i>Pyramidobacter piscolens</i>), <i>Klon W090</i>
<i>TM7</i>	<i>Klon I025</i>
<i>Sulphur River 1 (SR1)</i>	<i>Klon X112</i>

4 filum temsilcileri - *Spirochaetes*, *Synergistes*, *TM7* ve *SRI* - neredeyse yalnızca moleküler biyoloji yöntemleri ile endodontik enfeksiyonlarda bulunmuştur.

Endodontik mikrobiyoloji araştırmasında, son 10 yılda yapılan moleküler çalışmaların enfekte olmuş kanallarda 317 farklı bakteri taksonu ortaya koyduğu, kültür ile yapılan çalışmalarda ise son 30 yıldaki çalışmalarda (Tablo 14) 258 taksonun ortaya konulduğu dikkat çekmektedir [296].

Tablo 14. Farklı endodontik enfeksiyon tiplerinde bakteri türlerinin / filotip (takson) zenginliğinin genel bulguları.

Filum	Takson	Henüz ekilememiş filotipler	Moleküler Çalışmalarla saptanan taksonlar	Kültür Çalışmalarla saptanan taksonlar
<i>Firmicutes</i>	220	81	146	124
<i>Bacteroidetes</i>	73	28	47	48
<i>Actinobacteria</i>	69	21	43	42
<i>Proteobacteria</i>	65	17	44	34
<i>Fusobacteria</i>	15	6	11	9
<i>Spirochaetes</i>	14	4	14	0
<i>Synergistes</i>	10	10	10	1
<i>TM7</i>	1	1	1	0
<i>SRI</i>	1	1	1	0

2.11.1. Primer İntraradiküler Enfeksiyonlar

Primer intraradiküler enfeksiyon, başlangıçta nekrotik pulpa dokusunu istila eden ve kolonize eden mikroorganizmalardan kaynaklanır. Anaerobik bakteriler belirgin biçimde baskındır ve kanal başına 10 ila 30 türden oluşan karma bir konsorsiyum ile karakterizedir [297-299].

Toplam bakteri sayıları, enfekte olmuş kanal başına 10^3 ila 10^8 hücre arasında değişir [300-302]. Endodontik mikrobiyotanın bakteriyel profilleri kişiden kişiye değişir [8, 303], yani her birey tür zenginliği ve bolluğu bakımından benzersiz bir endodontik mikrobiyota barındırır.

Moleküler yöntemler 271 taksonu tanımlarken, 216 takson kültür ile izole edilmiştir. En yüksek tür zenginliği *Firmicutes* için gözlemlendi, bunu *Bacteroidetes* ve *Actinobacteria* takip etti (Tablo 15).

Primer enfeksiyonlarda Gram negatif ve Gram pozitif bakterilerin çeşitli grupları tanımlanmıştır.

Önemli bir periodontal patojen, *Tannerella forsythia* (eskiden *Bacteroides forsythus*), kök kanallarında kültür tarafından hiç tespit edilmemiş titiz bir Gram-negatif zorunlu anaerob, ilk defa türlere özgü PCR ile yapılan bir çalışmada primer endodontik enfeksiyonlarda meydana geldiği bildirildi [304].

Tablo 15. Primer endodontik enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği

Filum	Takson	Henüz ekilememiş filotipler	Moleküler Çalışmalarla saptanan taksonlar	Kültür Çalışmalarla saptanan taksonlar
<i>Firmicutes</i>	184	69	131	98
<i>Bacteroidetes</i>	69	24	42	48
<i>Actinobacteria</i>	54	11	31	39
<i>Proteobacteria</i>	44	11	32	21
<i>Fusobacteria</i>	14	5	9	9
<i>Spirochaetes</i>	14	4	14	0
<i>Synergistes</i>	10	10	10	1
<i>TM7</i>	1	1	1	0
<i>SRI</i>	1	1	1	0

Dialister türleri, endodontik enfeksiyonlarda ancak moleküler biyoloji tekniklerinin ortaya çıkmasından sonra tutarlı bir şekilde tespit edilen başka bir bakteri örneğini temsil eden asakaritik zorunlu anaerobik Gram-negatif kokobakildir. *D.pneumosintes* ve yakın zamanda açıklanan *D.invisus*, asemptomatik ve semptomatik primer enfeksiyonlarla ilişkili mikrobiyotada sıklıkla yer almaktadır.

Fusobacterium nucleatum, endodontik enfeksiyonlarda en sık rastlanan Gram negatif türlerinden biri olan anaerobik iğ şeklindeki bir çubuktur. *F. nucleatum*, primer olarak enfekte olmuş kök kanallarından ve endodontik apselerden sıklıkla izole edilmiştir veya saptanmıştır.

Spiroketler, endodontik enfeksiyonlardan alınan numunelerde mikroskopi tarafından sıkça gözlemlenen oldukça hareketli spiral şekilli bakterilerdir. Bununla birlikte, hiçbir zaman türler düzeyinde tanımlanmamıştır. *Spiroketlerin* tanımlanmasında moleküler teşhis yöntemlerinin uygulanması, bu spiral bakterilerin endodontik enfeksiyonlarda meydana gelmesinin, kültür tekniklerinin teknik engelleriyle göz ardı edildiğini göstermiştir.

Şu anda yetiştirilebilir ve adlandırılmış oral *Treponema* türlerinin tümü primer endodontik enfeksiyonların moleküler çalışmaları ile açıklanmıştır. Primer enfeksiyonlarda en baskın tür *T. denticola* ve *T. socranskii*'dir [303, 305-307].

Anaerobik Gram negatif bakterilerin primer enfeksiyonlarda en yaygın mikroorganizmalar olduğu görülmesine rağmen, birkaç Gram pozitif çubuk da endodontik mikrobiyal konsorsiyumun sık üyeleri idi.

Bunlardan *Pseudoramibacter alactolyticus* [232, 308, 309], *Filifactor alocis* [310, 311] endodontik enfeksiyonlardan alınan numunelerden sık sık izole edilmiştir veya tespit edilmiştir.

Endodontik tedavinin apikal aktinomikoza neden olarak başarısızlığı ile ilişkili olan *Actinomyces* türleri [232, 244], *Propionibacterium propionicum* primer enfeksiyonlardan alınan numunelerde de yaygın olarak saptanmıştır [312].

Olsenella türleri, endodontik enfeksiyonlarda ancak moleküler biyoloji yöntemlerinin uygulanmasından sonra tespit edilen başka bir bakteri örneğini temsil eden, hareketli olmayan Gram-pozitif zorunlu anaerobik çubuklardan oluşur [297, 313].

Olsenella clade arasında *O. uli*, endodontik enfeksiyonlarda en yaygın olarak bulunan tür olmuştur [306, 314].

Gram-pozitif kok, özellikle peptostreptokok ve streptokok, primer endodontik enfeksiyonlarda sıklıkla bulunur.

Parvimonas (eski adıyla *PeptoStreptococcus* veya *Micromonas*) micra primer olarak enfekte olmuş kanalların yaklaşık üçte birinde izole edilmiştir [232, 309, 315-318].

Streptococcus anginosus grubunun üyelerinin en yaygın streptokok olduğu bildirilmiştir, ancak *S. oralis*, *S. mitis* ve *S. sanguinis* de sıklıkla değerlendirilebilir ve saptanabilir [232, 244].

C. rectus ve *C. gracilis* dahil *Campylobacter* türleri, primer endodontik enfeksiyonlarda, ancak düşük-orta dereceli prevalanslarda saptanan Gram-negatif anaerobik çubuklardır [215, 232, 319].

Primer enfeksiyonlarda düşük-orta frekanslarda tespit edilen diğer bakteriler şunlardır: *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mukozası*, *Centipeda periodontii*, *Granulicatella adiacens*, *Gemella morbillorum*, *Capnocytophaga* türleri ve anaerobik laktobasil [296].

Dikkate alınmamış, henüz ekilmemiş bakteri oluşumunun en sık rastlandığı durumdur - endodontik mikrobiyotun yaklaşık % 40-55' i henüz ekilmemiş filotiplerden oluşur [8, 297, 300].

Primer enfeksiyonları araştıran bir moleküler araştırma, taksonların % 55 ve% 40'ının kronik apikal periodontitis ve akut apikal apseler ile ilişkili olarak tespit edilenlerin sırasıyla ekilmemiş fiotipler olduğunu ortaya koydu. Bu enfeksiyonlardaki bolluklarına gelince, henüz yetişmemiş filotipler, sırasıyla, kronik apikal periodontitis ve apselerdeki örneklerden dizilen klonların % 38 ve% 30'una karşılık geldi [8].

Yukarıda bahsedildiği gibi, endodontik temsilcileri olan tüm filalar için ekilmemiş filotipler bildirilmiştir. Bu filotiplerin birçoğu ilişkilendirme verilerine dayanarak aday endodontik patojenler olabilir. Örneğin, oral *Synergistes*, aslen *Flexistipes* veya *Deferribacteres* grubuna atanmış BA121, E3_33, BH017 ve W090 klonlarını [294, 320], asemptomatik ve semptomatik endodontik enfeksiyonlardan alınan numunelerde yaygın olarak saptanmıştır [321-324].

Synergist bakterilerinin büyük çoğunluğu ekilmemiş kalmaktadır ve endodontik enfeksiyonlardaki varlığının kültür çalışmaları tarafından göz ardı edilmesinin temel nedeni bu olabilir.

Benzer şekilde, TM7 ve SR1 aday filosundan I025 ve X112 klonları, şimdiye kadar ekilebilir temsilcisi olmayan, birincil enfeksiyonlarda da tespit edilmiştir [322, 325, 326].

Birkaç cinsle ilgili ekilmemiş filotipler, çoğunlukla *Dialister*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Solobacterium*, *Olsenella*, *Selenomonas*, *Eubacterium*, *Megasphaera*, *Veillonella* ve ayrıca *Lachnospiraceae* familyasına ait filotipler ile açıklanmıştır [8, 297, 327-329].

2.11.2. İnatçı / İkincil İntraradiküler Enfeksiyonlar

İnatçı enfeksiyon, primer veya sekonder enfeksiyonun üyeleri olan ve bir şekilde intrakanal antimikrobiyal prosedürlere ve tedavi edilen kanallardaki besin yoksunluğunun sürdüğü sürelerle dirençli olan mikroorganizmalardan kaynaklanır [244].

İnatçı veya sekonder intraradiküler enfeksiyonlar, tedaviden sonra apikal periodontitisin kalıcılığı veya görünümü ile karakterize endodontik tedavi başarısızlığı dahil olmak üzere çeşitli klinik problemlerin ana nedenleridir [296].

Kök kanal doldurma aşamasında bulunan mikro organizmaları ve tedavi sonucunu tehlikeye sokabilecek mikroorganizmaları ve tartışmasız olarak başarısızlığa neden olan apikal periodontitisli kök kanal tedavisi görmüş dişlerdeki mikro organizmaları tespit etmeye çalışmışlardır.

Kültür ve moleküler çalışmalardan elde edilen entegre verilerin analizi, doldurma sırasında ve ayrıca yeniden işleme sırasında alınan numunelerde 51 bakteri ve 2 mantar taksonunun tespit edildiğini ortaya koydu.

Aşağıdaki taksonlar çeşitli çalışmalarla tespit edilmiştir: *Propionibacterium acnes*, *P. propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *P. intermedia*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *E. faecalis*, *G. morbillorum*, *P. micra*, *P. alacily*, *S. anginosus grubu*, *S. mitis*, *F. nucleatum* ve *C. Albicans* [296].

2.11.3. Kök – Kanal Tedavili Dişlerde Mikrobiyota (Retreatment Örnekleri)

Kök kanal örnekleri aylar veya yıllar öncesinden tedavi gören dişlerden alınabilir ve hastalığın ortaya çıkması veya kalıcılığı nedeniyle endodontik olarak

yeniden tedavi gerektirir. Bu vakalardaki mikrobiyota da birincil enfeksiyonlara göre azalmış bir çeşitlilik gösterir.

Görünüşe göre iyi işlenmiş kanallar, 1 ila 5 tür içerir; buna karşın, yeterli işlem görmemiş kanallardaki türlerin sayısı, tedavi edilmemiş kanallardakine benzer şekilde 30'a ulaşabilir [152, 330-332].

Tablo 16. İnatçı Apikal Periodontitis Sonucu Kök Kanalı Tedavisi Yapılmış Dişlerde Bulunan Mikroorganizmalar

Sınıflandırma	Görülme Sıklığı (%)	Sınıflandırma	Görülme Sıklığı (%)
<i>Enterococcus faecalis</i>	77	<i>Treponema denticola</i>	14
<i>Pseudoramibacter alactolyticus</i>	55	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	10
<i>Propionibacterium propionicum</i>	50	<i>Prevotella intermedia</i>	10
<i>Filifactor alocis</i>	48	<i>Candida albicans</i>	9
<i>Dialister pneumosintes</i>	46	<i>Campylobacter gracilis</i>	5
<i>Streptococcus spp.</i>	23	<i>Actinomyces radicidentis</i>	5
<i>Tannerella forsythia</i>	23	<i>Porphyromonas endodontalis</i>	5
<i>Dialister invisus</i>	14	<i>Micromonas micros</i>	5
<i>Campylobacter rectus</i>	14	<i>Synergistes oral klon BA121</i>	5
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	14	<i>Olsenella uli</i>	5

Siquera JF,Jr., Roças IN: Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 97:85, 2004;
Siquera JF,Jr., Roças IN: J Clin Microbiol 43:3314, 2005.
Her sınıflandırmadaki örneklerin yüzdeleridir.

Kültür ve moleküler yöntemlerden elde edilen bütünleşik veri kümeleri, apikal periodontitis lezyonlarından çıkan dişlerin kök kanalı tedavisi sırasında alınan numunelerde 158 bakteri ve 3 mantar taksonu ortaya çıkarmıştır.

Moleküler yöntemler 109 takson tespit ederken, kültür çalışmaları 72 taksonu izole etmiştir. Retreatment örneklerinde tespit edilen bakteriyel türler / filotipler, 7 phyla ve 58 cinsine aittir. Aile veya filum seviyesine dokuz takson atanmıştır. En yüksek tür zenginliği *Firmicutes* için tekrar gözlemlendi, ardından *Actinobacteria* ve *Proteobacteria* gelmektedir (Tablo 17).

Kültüre bağlı ve kültüre bağlı olmayan çalışmalar, *E. faecalis*'in kök kanalıyla tedavi edilen dişlerde en sık görülen tür olduğunu ve prevalans değerlerinin olguların % 80' lere (Tablo 16) ulaştığını göstermiştir [151, 152, 330, 332-336].

Kök kanalıyla tedavi edilen dişlerin, birincil enfeksiyon vakalarından daha *E.faecalis* barındırması olasılığı 9 kat daha fazladır [334]. Henüz ekilmemiş filotipler tespit edilen taksonların% 55'ine karşılık geldi.

Birden fazla vakada sadece 11 takson bulundu: Bacteroidetes oral klonu X083, kültürlenmemiş bir *Saprosiraceae* klonu, *Prevotella oris*, *P. baroniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus mutans*, *Synergistes* klonu BA121, *Dialister* klonu 9N-1, *E. faecalis*, *Flavobacteriaceae* genomspecies C1 ve *Peptostreptococcus* klonu FG014.

Mantarlar yalnızca nadiren primer enfeksiyonlarda bulunur, ancak *Candida* türleri vakaların% 18'ine kadar kök kanalıyla tedavi edilen dişlerde tespit edilmiştir [337-339]. *C. albicans*, yeniden tedavi vakalarında en yaygın olarak saptanan mantar türüdür.

Tablo 17. Tedavi başarısızlığına bağlı inatçı / ikincil enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği [296].

Filum	Takson	Henüz ekilememiş filotipler	Moleküler Çalışmalarla saptanan taksonlar	Kültür Çalışmalarla saptanan taksonlar
<i>Firmicutes</i>	76	21	50	40
<i>Actinobacteria</i>	28	11	21	10
<i>Proteobacteria</i>	26	5	17	11
<i>Bacteroidetes</i>	22	6	16	9
<i>Fusobacteria</i>	4	2	3	2
<i>Spirochaetes</i>	1	0	1	0
<i>Synergistes</i>	1	1	1	0

2.11.4. Ekstraradiküler Enfeksiyonlar

Apikal periodontitis, intraradiküler enfeksiyonlara yanıt olarak oluşur ve çoğu durumda mikroorganizmaların periradiküler dokulaya geçişini engellemeyi başarır. Bununla beraber, bazı spesifik durumlarda mikroorganizmalar bu savunma bariyerini aşip ekstraradiküler enfeksiyon meydana getirirler. Ekstraradiküler enfeksiyonun en yaygın şekli akut apikal apsedir [6].

Akut apikal apsedden farklı, genelde açıkça görülen semptomların olmamasıyla karakterize başka bir ekstraradiküler apse şekli de vardır. Bu durum,

apikal eksternal kök yüzeyine biyofilm yapısında yapışması ya da enflamatuar lezyonlu vücut içinde kohezif aktinomikotik kolonilerin oluşması sayesinde, periradiküler dokulardaki mikroorganizmaların etrafını kuşatır. Özenle yapılmış kök kanalı tedavisine rağmen, ekstraradiküler mikroorganizmalar inatçı apikal periodontitis lezyonlarının nedenlerinden biri olarak bilinirler [10].

Intraradiküler enfeksiyondan bağımsız ekstraradiküler lezyonlarda apikal aktinomikoz adı verilen ve *Actinomyces* türleri ve *P.propionicum* tarafından sebep olduğu bir durum söz konusudur. Bu bağımsızlıktan dolayı, apikal aktinomikozis başarılı bir şekilde sadece periradiküler cerrahi ile tedavi edilebilir.

Kültür ve moleküler yöntemler, tedavi edilmiş kanallarla ilişkili apikal periodontitis lezyonlarından alınan numunelerde 92 bakteri takson ve bir mantar türü ortaya çıkarmıştır. Bu enfeksiyonları araştırmak için şu ana kadar güvenilir ve geniş bir moleküler çalışma yapılmamıştır. Örneğin, çıkarılan dişlerden alınan numunelerin sonuçları, lezyonun kontaminasyon riskleri nedeniyle burada düşünülmedi. Bu nedenle, tedavi edilmiş dişlerle ilişkili ekstraradiküler enfeksiyonlardaki bakterileri araştırmak için moleküler yöntemler sadece ekilebilir taksonları değerlendirdi.

Bu moleküler yöntemler tek başına 44 takson tespit ederken, 71 kültür türü kültüründe izole edilmiştir. Ekstraradiküler enfeksiyonlarda tespit edilen bakteriyel taksonlar 6 phyla ve 38 cinse aittir. *Firmicutes*, en fazla temsilciye sahip filumdu, bunu *Bacteroidetes* ve *Proteobacteria* izliyordu (Tablo 18).

Birçok çalışma tarafından bildirilen türler şunlardır: *Actinomyces* türleri (*A.israelii*, *A.naeshlundii*, *A.odontolyticus*, *A.viscosus*), *P.acnes*, *P.propionicum*, *P.gingivalis*, *P.intermedia*, *Prevotella oralis*, *P.micra*, ve *F.nucleatum*.

Tablo 18. Ekstraradiküler enfeksiyonlarda bakteri türleri / filotip (takson) zenginliği

Filum	Takson	Moleküler Çalışmalarla saptanan taksonlar	Kültür Çalışmalarla saptanan taksonlar
Firmicutes	47	16	41
Bacteroidetes	18	10	12
Proteobacteria	12	6	8
Actinobacteria	10	7	8
Fusobacteria	3	3	2
Spirochaetes	2	2	0

2.12. ANAEROP BAKTERİLERİN TANI VE İDENTİFİKASYONU

2.12.1. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Geleneksel Yöntemler

2.12.1.1 Tanıda kullanılan basit ve ucuz testler

1) **Aerotolerans testi:** Bu amaçla anaerop kanlı agarda üreyen her farklı koloniden, anaerop kanlı agara ve çukulata agar besiyerine pasajlar yapılır. Anaerop kanlı besiyerleri anaerop ortamda, çukulata besiyerleri ise %5-10 CO₂'li ortamda 48 saat inkübe edilir. Bu sürenin sonunda anaerop kanlı besiyerlerinde üreyen bakteriler anaerop olarak kabul edilir. Tanımlama amacı ile her bakterinin saf kültürlerinin elde edilmesi önemlidir.

2) **Gram boyama:** Anaerop bakteriler gram yöntemi ile boyanabilir ve morfolojik özelliklerine göre kabaca sınıflandırılabilirler. Buna göre bakterilerin gram negatif veya pozitif, kok-çomak şeklinde oldukları, spor oluşturup oluşturmadıkları saptanabilir.

3) **Antimikrobiyal diskler ile anaeroplara identifikasyonu:** Saf kültürden kanlı agara ekim yapıldıktan sonra ekim alanına aralıklarla kolistin 10 µg., vankomisin 5 µg., kanamisin 1 mg. diskleri konarak anaerop koşullarda 48 saat inkübe edilir. Antibiyotiklere duyarlılıklarına göre tanımlamaya gidilir (Tablo 19.).

4) **SPS diski:** 'Sodium polyanethol sulfonate' diski, anaerop gram pozitif kokun kanlı besiyerindeki inokulumu üzerine yerleştirilerek anaerop ortamda inkübe edilir. *Peptostreptococcus anaerobius* SPS'ye duyarlı olup diğer peptostreptokoklardan ayrılır (Tablo 19.).

5) **Nitrat diski:** Bakterilerin nitratı redükte etme özelliği belirlenir.

6) **Safra diski:** Yüksek konsantrasyonda safra varlığında üreyebilme özelliğine bakılır. %20 oranında safra besiyerine ilave edilebilir. *B. fragilis* grubu bakterileri izole etmede kullanılır.

7) **Katalaz testi:** Anaerop gram negatif basillerden bazı önemli türler katalaz enzimi oluşturmaktadır. Bunlar arasında *B. fragilis* ve bu gruptan birkaç tür

yer alır. Bu nedenle katalaz testinin anaerop gram negatif basillerin tanımlanmasında da önemli yeri vardır. %15'lik hidrojen peroksit kullanılır.

Tablo 19. Antimikrobiyal disklerle anaerop bakterilerin ön tanısı

	Kanamisin 1000 µg	Vankomisin 5 µg	Kolistin 10 µg	SPS diski 1000 µg
Gram-negatif	V	R ¹	V	
Gram-pozitif	V	S ²	R	
<i>Bacteroides fragilis grup</i>	R	R	R	
<i>B.ureolyticus grup</i>	S	R	S	
<i>Fusobacterium sp.</i>	S	R	S	
<i>Porphyromonas sp.</i>	R	S	R	
<i>Prevotella sp.</i>	R	R	V	
<i>Veillonella sp.</i>	S	R	S	
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	R	S	R	S
Diğer gram-pozitif koklar	S	S	R	R

¹ *Porphyromonas sp.* vankomisin duyarlıdır. ² Nadir *Lactobacillus* ve *Clostridium* türleri vankomisine dirençli olabilirler. R: Dirençli (zon çapı <10 mm) , S: Duyarlı (zon çapı ≥10 mm), V: Değişken SPS diski için zon çapı; R: Dirençli (zon çapı <12 mm) , S: Duyarlı (zon çapı ≥12 mm)

8) Spot indol testi: İndol triptofan'ın triptofanaz enzimi olan bakteriler tarafından yıkım ürünü olduğu için test edilecek bakterilerin, içerisinde triptofan bulunan kanlı agar, yumurta sarılı agar gibi besiyerlerinde üremiş olması gerekir. Testin uygulanacağı bakterinin üretildiği besiyerinde nitrat diskinin bulunmasının yalancı negatif sonuca neden olabileceği unutulmamalıdır. Test edilecek bakterinin saf kültür halinde elde üremiş olması da önemlidir. Eğer plakta indol pozitif başka bir bakteri ürediyse yalancı pozitif sonuca neden olur. Bir diğer önemli nokta ise spot indol testinde kullanılacak olan ayıraç maddenin aeroplardan farklı oluşudur. Bu amaçla 'p-dimethylaminocinnamaldehyde (DMACA)' kullanılır. Filtre kağıdı p-dimethylaminocinnamaldehyde ile ıslatıldıktan sonra saf kültürden sürülür, yeşil-mavi, mor renk oluşumu testin pozitif olduğunu gösterir.

9) Lesitinaz ve lipaz reaksiyonu: Yumurta sarılı besiyeri kullanılır. *Fusobacterium*, pigmentli *Prevotella* ve *Porphyromonas* türlerinin tanımlanmasında yardımcıdır. Besiyeri üzerinde inci veya sedef parlaklığının oluşması testin pozitif olduğunu gösterir.

10) Üreaz testi: Diskler veya üreli besiyerleri kullanılır, anaerop koşullarda 1 saat inkübe edilir. Pembe renk oluşumu pozitif reaksiyonu gösterir. *B. ureolyticus*, *C. sordellii*, *A. tetradius* üreaz enzimine sahiptirler.

11) Oksidaz testi: Sitokrom oksidaz oluşumunu tespit etmek için 'kovacs' oksidaz ayıracı kullanılır. *B. ureolyticus*, *Campylobacter cocisus* ve *Veillonella curva* türlerinin çoğunda oksidaz testi pozitifdir.

12) Safraya direnç: Safraya direncin saptanmasında '*Bacteroides* safra eskülin' agardaki üremelerin değerlendirilmesi yol göstericidir. Özellikle anaerop gram negatif basillerin tanımlanmasında, primer kültürlerin bu besiyerine ekilmesi önemlidir. '*Bacteroides* safra eskülin' agarda üreyen 1 mm ve daha büyük koloniler safraya dirençli türlere aittir. Kolonilerin siyah renkte oluşu, eskülin hidrolizini göstereceğinden bu şekilde *B. fragilis* grubu bakteriler de diğerlerinden ayırt edilmiş olur. Safraya dirençli anaeroplardan *Bilophila wasdworthia* bu besiyerinde etrafı şeffaf, ortası siyah (balık gözü) koloniler oluştururlar [340, 341].

Yukarıda söz edilen bu testlerin değerlendirilmesinde esas, bazı akış şemalarına göre testlerin yönlendirilerek uygulanmasıdır. Ancak anaeroplarda ileri biyokimyasal testlerin konvansiyonal olarak yapılması son derece zahmetli ve zaman alıcıdır. Bu nedenle birçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarında, geleneksel yöntemlerle cins veya tür düzeyinde muhtemel tanımlaması yapılan bakterilerin kesin tanımlanması için ticari tanımlama sistemleri kullanılmaktadır. Geleneksel yöntemler ve ticari tanımlama sistemlerinin yanı sıra, uygun donanımı olan laboratuvarlar tarafından moleküler yöntemler kullanılmaya başlamıştır. Gaz-likit kromotografisinin kullanımı ise referans laboratuvarları ile sınırlıdır.

2.12.2. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Mikrosistemler

Günümüzde, anaeroplarn identifikasyonu için birçok mikrosistem kullanılabilir. Bu sistemler mikrobiyokimyasal sistemler ve hızlı enzimatik sistemler olmak üzere iki ana başlıkta incelenebilir.

2.12.1.2 Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Mikrobiyokimyasal Sistemler:

Mikrobiyokimyasal sistemler anaerop bakterilerin identifikasyonu için kullanılan substratların yıkımına ve mikroorganizmaların üremesi esnasında oluşturdukları son metabolik ürüne dayanmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen ve yaygın olarak kullanılan iki mikrobiyokimyasal sistem mevcuttur: API 20A (bioMérieux, Inc.) ve Minitek (BD Biosciences) [287, 341]

1) API 20A: API 20A sistemi (bioMérieux Vitek, St. Louis, Mo), substrat olarak 15 karbonhidrat ve indikatör olarak bromkrezol moru kullanan bir mikrotüp biyokimyasal sistem olup, 24-48 saatlik inkübasyon sonunda sonuç verir ve bilgisayara aktarılmış bir veritabanı bulunmaktadır. Kullanılan indikatörün pH 6.8'de mor renginden sarıya dönüşmesi pozitif test reaksiyonu anlamına gelmektedir. API 20A en çok, *B. fragilis* grubu üyeleri ve klostridyumların çoğu gibi sakkarolitik olan ve hızlı üreyen organizmaların identifikasyonu için uygundur.

2) Minitek: Minitek sistem (BD Biosciences), kullanılan karbonhidratlarda geniş seçenek sunmaktadır. Kullanılan 'phenol red' indikatörünün pH 5.2'de sarı renge dönüşmesi test pozitifliğini göstermektedir.

Anaeroplardan tanısı için kullanılan mikrobiyokimyasal sistemler sakkarolitik organizmaların tanımlanması için uygun iken, nazlı, yavaş üreyen (Örn; *Porphyromonas* spp., *Prevotella* spp.) ve asakkarolitik anaeroplardan (*Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus* spp.) tanımlanmasında düşük performans göstermektedir. Renk reaksiyonları her zaman çok kesin değildir. Bazı anaeroplardan kullanılan indikatörü indirgemeden dolayı kahverengi tonların oluşması veya hiç renk oluşmaması, test sonuçlarının değerlendirilmesini güçleştirir. İndol reaksiyonu sıklıkla yalancı negatiflik vermektedir. Kullanılan her iki sistem anaeroplardan tanımlanması için ek testlere ihtiyaç duymaktadır (Örn; safrada üreme, katalaz, hareket testi gibi).

2.12.3. Anaerop Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Hızlı Enzimatik Sistemler:

Kromojenik ve florojenik substratların kullanımı ile, önceden üretilmiş (yapısal) enzimlerin tespitine dayanan hızlı (2-4 saat) identifikasyon sistemleri veya ikisinin kombinasyonu olan sistemler arasında, “RapID ANAII” sistemi (Remel), “Rapid ID 32A”, “ANI Card” ve “API ZYM” sistemleri (BioMérieux), “MicroScan” sistemi (Dade Behring MicroScan, Inc., Sacramento, Calif.) ve “BBL Crystal Anaerobe Identification” sistemi (Becton Dickinson Diagnostic Systems, Franklin Lakes, N.J.) yer alır. Bu sistemlerin performansı, orta ile iyi arasında değişmektedir; izolatların %53-100’ü tür düzeyinde tanımlanabilmektedir “Crystal Anaerob (ANR) Identification” sisteminin, *B. fragilis* grubunun %91’i ile, test edilen tüm *Prevotella* ve *Porphyromonas* suşlarını tür düzeyinde tanımlayabildiği; *B. fragilis* grubu dışındaki *Bacteroides spp.*’nin ise %53’ünü doğru olarak identifiye edebildiği bildirilmiştir. “Rapid ID 32A” sisteminin *B. fragilis* grubu için doğruluğu %78.4-90.6 arasında bulunmuştur, katalaz aktivitesi için ek uygulama, doğruluk oranını %94.6’ya çıkartmaktadır. “Rapid ID 32A” sistemi, fusobakterilerin % 95.5’ini doğru olarak tanımlamaktadır; ancak *F. nucleatum* ile *F. necrophorum* ayrımının zayıf olduğu belirtilmiştir. “Rapid ID 32A” sistemi de benzer şekilde *Prevotella* ve *Porphyromonas* suşlarını cins düzeyinde doğru olarak belirlemektedir, ancak türler arasındaki ayrım daha az güvenilirdir. “RapID ANA II” sistemi, gram-negatif çomakların %62’sini doğru olarak identifiye etmektedir. Hızlı enzimatik sistemler; identifikasyon süresinin kısa olması, yavaş üreyen anaerop bakterileri tanımlayabilmesi ve yapılan identifikasyonun sakkarolitik tepkimelere dayalı olmaması gibi avantajlara sahiptir. Ancak oral kavite florasındaki bazı anaerop bakterileri identifiye edememesi, bazı reaksiyonların net olmamasından kaynaklanan sonuçları yorumlama zorluğu, identifikasyon başarısının veritabanının genişliğine bağlı olması ve veritabanının son taksonomik değişiklikleri içermemesi gibi deavantajları vardır [287].

2.12.4. Anaerob Bakterilerin İdentifikasyonda Kullanılan Moleküler Yöntemler

Anaerob bakteriler fakültatif anaerob bakterilere göre daha yavaş ürerler ve tanımlanmaları uzun süre gerektirmektedir. Yapılan çalışmalar, anaerob bakterilerin kinlik örneklerden izolasyon oranının % 50-75 arasında değiştiğini ve izole edilen anaerob bakterilerin % 27'sinin identifikasyonunun yapılamadığını göstermiştir [342].

Anaerob bakteriyolojideki bu olumsuzluklardan dolayı konvansiyonel yöntemler yerini moleküler yöntemlere bırakmaya başlamıştır. Mikroorganizmaların identifikasyonunda fenotipik ve genotipik yöntemler karşılaştırıldığında[343];

- Fenotipik yöntemler;

- Her bakteri için uygulanamamaktadır.
- İş yükü fazladır.
- Zaman almaktadır.
- Hatalı tiplendirme yapılabilmektedir.
- Genellikle epidemik suşları endemiklerden ayırmada yetersizdirler.
- Çoğunlukla üreme koşulları, üreme fazı ve mutasyona bağlı olarak değişken sonuçlar vermektedir.
- Patojen mikroorganizma ile normal flora elemanı arasındaki ayırım yapılamamaktadır.

- Genotipik yöntemler ;

- İleri teknoloji gerektirmektedir.
- Kurulma maliyeti yüksektir.
- Yöntemlerin standardizasyonunda problemler vardır.
- Oluşan profillerin yorumlanmasında sıkıntılar yaşanabilmektedir.

Anaerob bakterilerin tanısında kullanılan moleküler yöntemler üç ana başlıkta toplanabilir [288].

1. Mikroorganizmayı saptamaya yönelik moleküler yöntemler

2. Mikroorganizmayı tiplendirmeye yönelik moleküler yöntemler
3. Mikroorganizmaya özgü ürünleri saptamaya yönelik moleküler yöntemler

2.12.4.1. Mikroorganizmayı saptamaya yönelik moleküler yöntemler

Anaerobik mikroorganizmaları saptamaya yönelik olarak genomik veya oligonükleotid problemlerin kullanıldığı hibridizasyon ve PCR-tabanlı yöntemler şeklinde iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Genomik veya oligonükleotid problemlerin kullanıldığı hibridizasyon yöntemlerinde, saptama eşik değeri 10^2 - 10^3 bakteri olduğundan duyarlılık oldukça düşüktür. Bu nedenle PCR tabanlı yöntemler tercih edilmektedir.

1) Geniş kapsamlı PCR (Broad-range PCR): Mikroorganizmaların tiplendirilmesinde alternatif olarak, tek bir tipten ziyade daha geniş bir mikroorganizma grubunun varlığı tespit edilmek istenebilir. Böyle bir testin primerleri bu gruptaki tüm mikroorganizmaları tespit ederken, grupta olmayan mikroorganizmaları mümkün olduğunca hariç tutacak şekilde tasarlanır. Bakterilerde türden türe değişiklik göstermesine rağmen, tüm bakterilerde ortak olarak çok iyi korunmuş 16S rRNA gen bölgeleri mevcuttur. Broad-range PCR primerleri bu bölgeleri hedef alacak şekilde dizayn edilirler. Broad-range PCR kullanımının nedeni ve en büyük avantajı bir grubun üyelerinden herhangi birini tek bir reaksiyonla tespit edebilmesidir. Broad-range PCR ile iyi tanımlanmamış, nadir olarak izole edilen ve fenotipik olarak tipik olmayan suşlar iyi tanımlanır. Yeni patojenlerin bulunması ve tanımlanması yapılabilir. PCR ile elde edilen ürüne dizi analizi yapılarak gen bankasındaki 16S rRNA gen dizileri ile karşılaştırılır. İncelenen bakteri bu şekilde tür düzeyinde saptanabilmektedir. Yöntemin dezavantajlarından bir tanesi, birbiri ile yakın ilişkili türlerin 16S rRNA dizilerindeki yüksek benzerlik bilinmeyen bir izolatin tür düzeyinde identifikasyonunu sınırlayabilir. Ayrıca yöntemin identifikasyon gücü veritabanındaki mevcut dizi bilgileri ile sınırlıdır. Broad-range PCR'in en önemli sınırlamalarından biri de kontaminasyon riskidir. Kontaminant bakterilerin/DNA'nın varlığı sonuçların değerlendirilmesinde sıkıntılar yaratmaktadır. Bu durum yanlış pozitif sonuçlara neden olabilmektedir. Bu nedenle Broad-range PCR yapılan laboratuarlarda sıkı kontaminasyon önlemleri alınmalıdır.

ve çalışmalarda yöntemin steril vücut sıvıları ile sınırlandırılması gerekmektedir [288, 342].

2) PCR'a dayalı hibridizasyon: Türe özgü gen bölgelerinin PCR amplifikasyonu sonrasında, ürünlerle prob hibridizasyonu yapılarak mikroorganizmanın tespiti, tanımlanması ve semikantitasyonu sağlanır. Bu yöntemle hazırlanmış periodontitis etkenlerini saptamaya yönelik ticari kitleler bulunmaktadır (Micro – IDent / Micro - IDent Plus hibridizasyon kiti / Hain Lifescience, Almanya) Bu sistemler kullanılarak yapılan identifikasyon çalışmalarında, periodontitis etkenlerinden *Eubacterium nodatum*, *Tannerella forsythia* ve *Porphyromonas gingivalis*'in mükemmel tanımlandığı (%92-97), *Capnocytophaga* sp., *Eikenella corrodens*, *Actinobacillus actinimycetemcomitans* ve *Prevotella intermedia*'nın iyi tanımlandığı (%89-91), *Fusobacterium nucleatum*, *Parvimonas micra* ve *Campylobacter rectus*'un zayıf tanımlandığı (%78-89) gösterilmiştir [288, 344].

3) Klasik PCR: 16S rDNA veya mikroorganizmanın türüne özgü farklı bir gen bölgesini (fimbria, flagellin vb.) saptamaya yönelik olarak uygulanan klasik PCR amplifikasyonu sonucunda bakterinin tanımlanması sağlanmaktadır (13). Bu amaçla kullanılan PCR yöntemleri klasik PCR, multiplex PCR, nested PCR ve gerçek zamanlı (real time-RT) PCR olarak sıralanabilir.

4) Multiplex PCR: Multiplex PCR aynı tüpe farklı hedefler için, özgül olan iki veya daha fazla primerin konulduğu ve aynı anda çok sayıda hedef dizinin çoğaltıldığı bir amplifikasyon reaksiyonudur. Multiplex PCR'ın amacı hedef DNA, zaman ve maliyetten kazanç sağlamaktır. Tek tüp içerisinde aynı reaksiyonda birden çok patojenin tespiti sağlanabilmektedir. Yapılan çeşitli çalışmalarda periodontitis, bakteriyel vaginoz etkeni olabilecek, gram pozitif anaerobik kokların tanımlanmasına yönelik multiplex PCR yöntemleri bildirilmiştir [342, 345, 346].

Ancak yaygın kullanım alanına rağmen, kullanılan primer sayısının artmasına bağlı olarak duyarlılık ve özgüllüğü düşük olabilmektedir.

5) Nested PCR: Nested PCR, PCR tekniğinin hassasiyetini artırmak için geliştirilen en popüler yöntemlerden biridir. İstenilen DNA dizisinin bulunup çoğaltılmasında hassasiyeti 104 kat artırdığı tahmin edilmektedir. Bu reaksiyon

mekanizmasında birbirini takip eden iki polimeraz zincir reaksiyonu bulunmaktadır. İlk amplifikasyonda hedef DNA'nın dış bölgesine özgün iki dış primer kullanılır ve uzun bölge çoğaltılır. İkinci amplifikasyon basamağında, ilk amplifikasyondan gelen bölgenin iç bölgesine bağlanan iki iç primer kullanılarak küçük bölgenin çoğaltılması sağlanmaktadır. İkinci PCR işleminden sonra ortada istenilmeyen DNA dizisi kalmamaktadır.

Her iki primer de PCR reaksiyonu başlangıcında vardır ancak nested primerlerinin Tm (primer bağlanma sıcaklığı) değeri başlangıç primerlerine göre daha düşüktür. Başlangıç PCR programında yüksek sıcaklık uygulandığında, başlangıç dizisinin amplifikasyonuna izin verilirken, nested primerleri diziyeye bağlanamaz. Daha sonra ikinci PCR programında daha düşük sıcaklıkta, nested primerleri bağlanarak hedef dizilerin çoğaltılmasını sağlamaktadır. PCR reaksiyonları sonrası yapılan agaroz jel elektroforezi ile hem başlangıçtaki PCR ürünleri hem de daha küçük olan nested PCR ürünleri görülebilmektedir. Yöntemin en önemli dezavantajı, birincil amplifikasyon tüpünden ikincisine örnekler aktarılırken çok az da olsa çevreye örnek saçılması ve daha sonraki çalışmalarda hava yolu ile kontaminasyona neden olmasıdır. Bu nedenle iki tüp yerine tek tüpte, iki farklı reaksiyon ısısı kullanılması önerilmektedir.

6) Gerçek Zamanlı PCR (RT-PCR): Gerçek zamanlı PCR'ı geleneksel PCR yönteminden farklı kılan ampikon tespit yöntemidir. Bu yöntem geleneksel ampikon test yönteminden daha hızlıdır. Real-time PCR, jel kullanımına gerek kalmadan amplifikasyonun başlangıcından itibaren izlenebilmesi, kantitasyon ve spesifik ürün varlığının sorgulanabilmesi gibi birçok avantajı laboratuvarlara taşımıştır. Ampikon analizi için reaksiyon tüpünün açılması gerekmediğinden ampikon kontaminasyonu riski oldukça azdır. Duyarlılığı yüksektir. Pek çok örneğin aynı anda çalışılma kapasitesi vardır. PCR'ın kinetiği hakkında anında bilgi sağlar.

2.12.4.2. Mikroorganizmayı tiplendirmeye yönelik moleküler yöntemler

Hastane epidemiyolojisi, tıbbi mikrobiyoloji ve çevre mikrobiyolojisi açısından, anaerob bakterilerin tiplendirilmesini hedef alan çalışmalar için kullanılan

yöntemlerdir. Bu yöntemler içerisinde PFGE, rDNA, PCR-dayalı tiplendirme ve genomik PCR-dayalı tiplendirmeyi sayabiliriz. rDNA PCR'a dayalı tiplendirme için en yaygın kullanılan yöntemler; ARDRA, T-RFLP, DGGE ve ITS PCR'dır [288, 342, 343].

1) Amplifiye rDNA restriksiyon analizi (ARDRA): ARDRA birçok mantar ve bakteri izolatının yanı sıra anaerobik mikroorganizmaların da tanımlanmasında başarıyla kullanılmaktadır. Bakteriye özgü rDNA dizileri PCR ile çoğaltılır ve sık kesim yapan restriksiyon enzimleri ile kesilir. Elde edilen bant profilleri farklılık tayininde ve cins hatta tür düzeyinde tanımlama için kullanılır.

2) Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP): T-RFLP, ARDRA yönteminin bir türevidir. İşaretli primerler kullanılarak kapiler elektroforezde ürünlerin boyutu saptanır ve elde edilen profil veritabanı ile karşılaştırılarak mikroorganizma tanımlanır.

3) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE): DGGE, RFLP ile belirlenemeyen dizi polimorfizmlerinin belirlenmesini sağlar. 16S rRNA genlerindeki aşırı değişken bölgeler çoğaltılarak DGGE analizine alınır. Polimikrobik enfeksiyonların ve barsak mikroflorasının ekolojik analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

4) 16S-23S rRNA intergenic spacer region (ITS) PCR (Ribotiplendirme): Bakterilerde rRNA operonu, 16S, 23S ve 5S rRNA bölgelerini ve aralarında kalan ITS'leri içermektedir. 16S rDNA bölgesinin 3' ucu ile 23S rDNA bölgesinin 5' ucu arasındaki korunmuş bölüm çoğaltılarak elde edilen bant profilleri tiplendirme ve tanımlama amacıyla kullanılır.

Genomik DNA PCR'a dayalı tiplendirme yaklaşımları, salgın analizi, nazokomiyal patojenlerin çapraz bulaşı, enfeksiyon kaynağının tespiti ve virulan bakteri suşlarının tanımlanması için kullanılan epidemiyolojik yöntemleri kapsar. Genomik DNA PCR'a dayalı tiplendirme yöntemleri AP-PCR veya RAPD ve rep-PCR'ı kapsamaktadır.

5) RAPD (random amplified polymorphic DNA) veya AP-PCR (arbitrarily primed PCR): Bakterilerin tiplendirilmesi, herhangi bir salgın esnasında kaynağın saptanması, bulaş yollarının belirlenmesi ve etkin korunma önlemlerinin alınması açısından büyük yararlar sağlamaktadır. Biyokimyasal yöntemlerle çoğunlukla tür düzeyinde tanımlanan suşların birbirleriyle olan klonal ilişkileri tam olarak anlaşılammaktadır. Epidemiyolojik çalışmalar için gerekli olan alt tür düzeyinde tiplendirmede biyotipleme, faj tiplemesi, serotipleme ve antibiyotipleme gibi fenotipik yöntemler ön bilgiler vermekte, çoğunlukla kesin ayırım için moleküler yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. RAPD (random amplified polymorphic DNA) ve AP-PCR (arbitrarily primed PCR) genotiplendirmede kullanılan PCR bazlı metotlardır. Bu yöntemle, kısa, universal diziler içeren primerler ve düşük bağlanma sıcaklıkları kullanılarak PCR amplifikasyonu yapılır ve elde edilen ürünler jel elektroforezi ile ayrıştırılarak her bir bakteri kökenine özgü profil elde edilir. *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces spp.*, *Porphromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides forsythus*, *Clostridium difficile*, *Lactobacillus spp.* ile ilgili bu yöntemin kullanıldığı çalışmalar yayınlanmıştır.

6) Tekrarlanan dizilere yönelik PCR (Repetitive sequence-based, rep-PCR): Rep-PCR analizi birçok bakteri türünde bulunan ve genoma dağılmış olan korunmuş özgün bölgelerin PCR amplifikasyonu ile elde edilen profillerin karşılaştırılması ile gerçekleştirilir. *Porphromonas gingivalis*, *Bacteroides fragilis*, *Bifidobacterium spp.* ve *Actinomyces spp.* bu yöntemle tiplendirilmiştir.

2.12.4.3. Mikroorganizmaya özgü ürünleri saptamaya yönelik moleküler yöntemler

Bakteriye ait toksin ve enzim genlerinin saptanması için kullanılan yaklaşımların yanı sıra, antibiyotik direnciyle ilişkili genlerin ve aktarılabılır elemanların araştırılması için geliştirilen PCR yöntemleri mevcuttur. Bu konuda, *C. difficile* ilişkili *tcdA*, *tcdB* ile binary toksin genlerini ve *Bacteroides fragilis*, *bft* (fragilysin) genini araştıran çalışmalar yapılmıştır [347, 348].

Bacteroides cinsi, patojen anaerobik bakteriler içinde, farklı antibiyotik sınıflarına karşı direnç göstermeleriyle öne çıkmaktadır. Bu cinsin üyeleri

karbapenemlere ve nitroimidazollere direnç geliştirebilmektedir. Bu direnci ortaya koymaya yönelik olarak metallo-beta laktamaz üretiminden sorumlu *cfiA* (*ccrA*) ve nitrimidazol-reduktazları kodlayan *nim* genlerinin varlığını saptamayı hedefleyen PCR çalışmaları mevcuttur. Yapılan moleküler analizlerde antibiyotik direnç genleri ile birlikte belirli aktarılabılır genetik elemanların (arayagiren diziler-insertion sequece, IS) ilişkisi ortaya konulmuştur.

2.12.5. Moleküler Yöntemlerde Son Gelişmeler

Teknolojideki gelişmelere paralel olarak yeni tanı yöntemleri laboratuvarların kullanımına sunulmaktadır. Bunlar arasında aynı anda 40'a yakın anaerobik mikroorganizmanın tanımlanmasına yönelik olarak geliştirilen oligonükleotid array, 16S rDNA dizileme ile karşılaştırılabilir sonuçların elde edildiği matriks-aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) göze çarpmaktadır.

2.12.5.1. Oligonükleotid Array:

“Array”; içinde çeşitli özellikleri temsil eden problemlerin, sabit küçük bir yüzey üzerine geometrik olarak sıralanması esasına dayalı bir yöntem olup, oligonükleotid microarray'lerinde problemler sekansı bilinen ya da tahmin edilen mRNA'lara uygun olacak şekilde dizayn edilir. Çok sayıda oligonükleotid problemin yoğun bir şekilde bulunduğu DNA mikroarray'ler ile farklı DNA dizilerinin tek bir hibridizasyon basamağında incelenmesine olanak sağlayan gen 'çip' teknolojileri geliştirilmiştir. Yöntem PCR ile elde edilen floresanla işaretli ampliconların çok sayıda oligonükleotid prob içeren alanda kendisine uyan proba hibridize olması esasına dayanmaktadır. Bağlı ampliconların yaydığı floresan sinyaller daha sonra optik tarayıcı ile saptanarak bilgisayar ortamında değerlendirilmektedir. Bu tip dizaynların bazılarının ticari olarak erişmek mümkündür. Bu microarray'ler gen ifadesinin kesin değeri ile ilgili tahminler verir; o nedenle, iki durumun karşılaştırılmasında iki ayrı microarray kullanmak gerekir. Array'deki her bir geni temsil etmek üzere genellikle 25-70 nükleotid uzunluğunda oligonükleotidler kullanılır. Daha küçük boyutlarda prob bağlama etkinliği daha düşük olmaktadır. Bununla birlikte, küçük oligonükleotidlerin özgüllüğü daha fazladır. 70 nükleotidden daha uzun olanlarda ise

sinyalde çok küçük bir artış olmaktadır. Oligonükleotidler her seferinde yeniden sentezlendiği için cDNA'larda olduğu gibi başka sekanslardan kontaminasyon söz konusu değildir [288, 349].

2.12.5.2. Matriks-aracılı lazer desorpsiyon/iyonizasyon-kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS):

1980'lerin sonunda Alman ve Japon bir grup tarafından bulunmuş bir teknolojidir. MALDI-TOF proteinleri peptid kütle parmak izi ile tanımlar. Örnekler kütle spektrometreye pasif bir proba sunulur. Matriks enerji absorbe eden bileşik lazer enerjisi termal enerjiye çevirir ve desorpsiyon/iyonizasyon işlemini kolaylaştırır. Analitik varyasyonların fazla olması klinik geçerliliğindeki başarısını düşürebilmektedir [350, 351].

2.13. MALDI-TOF MS (MATRIX ASSISTED LASER DESORPTION IONIZATION TIME OF FLIGHT MASS SPECTROMETRY)

2.13.1. Tarihçesi

İlk defa 1906 yılında elektronların varlığını kanıtlayarak Nobel ödülünü kazanan J.J. Thomson 1913 yılında Neon'un Ne20 ve Ne22 olmak üzere iki izotopunun olduğunu göstererek kütle spektrometresinde ilk adımı atmıştır [352].

Daha sonra Arthur J. Dempster'in 1936 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve Francis William Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri üzerindeki çalışmaları ile kütle spektrometresinde gelişmeler kaydedilmiştir [353, 354]. Kütle spektrometresinin ticari amaçla kullanımı 1940'lı yıllarda başlamış, petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur.

William Stephens uçuş zamanı kütle spektrometresi (time-of-flight mass spectrometer= TOF MS) konseptini 1946 yılında sunmuştur.

Philip Morris' teki J.C. Holmes ve F.A. Morell isimli kimyager araştırmacılar 1959 yılında ilk defa gaz kromatografi - kütle spektrometresi (GC-MS) kombinasyonunu oluşturmuşlardır [355].

Cihazın biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda peptid ve nükleotidlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir.

İngiliz Kütle Spektrometresi Derneği, ilk özel kütle spektrometresi topluluğu olarak 1964 yılında kuruldu. İlk toplantısını 1965 yılında Londra'da gerçekleştirdi.

İlk defa 1966 yılında Tanaka ve arkadaşlarının GC-MS ile izovalerik asidemiği tanımlamalarıyla birlikte cihaz metabolik hastalıkların tanısında kullanılmaya başlamıştır.

Tandem kütle spektrometresi (TMS) 1980'li yıllarda geliştirilmiş ve birçok alanda kullanıma sunulmuştur.

Franz Hillenkamp, Michael Karas ve meslektaşları, 1985 yılında matris destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) terimini tanımlamışlardır [356].

ESI ile kapiler elektroforezis kütle spektrometresi 1987'de, ilk ticari elektrosprey kütle spektrometresi (Şekil 2.3) 1989'da tanıtıldı. ESI kullanılarak 1989'da oligonükleotid sekansındaki çalışmalar hız kazanmıştır.

Kimya alanında İsviçreli bilim adamı Kurt Wüthrich çözültideki biyolojik makromoleküllerin üç boyutlu yapısını belirlemek için nükleer manyetik rezonans spektroskopisini geliştirdiği için Nobel Ödülünün yarısını 2002 yılında almaya hak kazanırken; biyolojik makromoleküllerin kütle spektrometrik analizleri için soft desorpsiyon iyonizasyon yöntemleri geliştirdikleri için Amerikalı bilim adamı John Bennett Fenn ve Japon bilim adamı Koichi Tanaka ödülün diğer yarısını almaya hak kazanmışlardır.

En son gelişmeler, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında rutin bakteri ve mantar teşhisi için MALDITOF MS'nin ticarileştirilmesi ve yasal olarak onaylanması olmuştur.

ABD Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) maya ve bakterilerin tanımlanması için son yıllarda 2 sistemi VITEK® MS (bioMe'rieux Inc.) ve MALDI Biotyper CA Sistemi (Bruker Daltonics Inc.) açıklamıştır.



Şekil 2. 3. İlk ticari elektrosprey kütle spektrometresi.

Her biri bir kütle spektrometresi, yazılımı ve veri tabanı içermesine rağmen, tanımlanması için açıklanan mikroorganizmaların listesi de dahil olmak üzere her 3 bileşen de her sistem için benzersizdir. Bruker'in kütle spektrometresi bir masaüstü araçtır, oysa bioMe'rieux's daha geniş bir zemin modelidir. Sayısal puanlar farklı ölçeklerde rapor edilir ve doğrudan karşılaştırılmaz. Bruker'in sistemi, birçok laboratuvarında yayınlar ve değerlendirmeler açısından en çok incelenen sistemdir.

Gelişmeler 2005 yılında başladı; 2008 yılında Mellmann ve ark. kendi kütle spektrumları veritabanını oluşturarak, fermente edilmeyen gram negatif bakteriyel izolatları kesin olarak tanımlayabildiklerini gösteren bir çalışma yayınladı [357].

Bir yıl sonra Seng ve ark. laboratuvarlarında rutin olarak izole edilmiş 1660 bakterinin tanımlanması için Bruker'in ticari kütle spektral veri tabanının prospektif bir değerlendirmesini yayınlarak 6 dakika / izolatta sırasıyla cins ve tür seviyelerine sırasıyla% 95 ve% 84 doğru identifikasyon yapıldığını bildirmişlerdir [358].

Son 5 yılda, yükseltilmiş analiz yazılımı ve gittikçe daha kapsayıcı ve daha iyi küratörlü kütle spektral kütüphaneleri oluşturulmuştur.

FDA onaylı organizma listesi şu anda gram negatif bakterilerle sınırlı olmasına rağmen, RUO kütüphaneleri (örneğin, RUO MALDI Biotyper Reference Library v3.3.1.2, Security Relevant Library v1.0) mevcuttur.

1998 yılında, AnagnosTec, Shimadzu'nun AXIMA Assurance kütle spektrometresi (Shimadzu) ile birlikte kullanılan, SARAMIS adlı bir mikrobiyal kütle spektrum veri tabanının geliştirilmesine başlamıştır.

Amerikan Kütle Spektrometresi Derneği (ASMS), Amerika Birleşik Devletleri merkezli, kütle spektrometrisi bilimsel alanını destekleyen profesyonel bir dernektir. 2018 itibariyle, esas olarak ABD'den olmak üzere dünyanın dört bir yanından yaklaşık 8.500 üyesi vardı. Dernek, tipik olarak Mayıs ayının sonlarında veya Haziran ayının başlarında ve diğer güncel konferans ve atölye çalışmaları için yılda bir kez büyük bir toplantı düzenler. Dernek, Amerikan Kütle Spektrometrisi Derneği Dergisi'ni yayınlamasına devam etmektedir.

2010 yılında, bioMe'rieux AnagnosTec'i satın aldı ve sistemin adını VITEK MS RUO olarak değiştirdi.

bioMe'rieux, VITEK MS olarak adlandırılan yeni bir veritabanı, işletim yazılımı ve analiz algoritması geliştirdi. Son olarak, bioMe'rieux, daha kapsamlı VITEK MS RUO yazılımı ve veritabanıyla birlikte FDA-onaylı veritabanının kullanımını içeren VITEK MS Plus sistemini geliştirdi.

MALDI-TOF MS, klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında kullanım için hızlı bir şekilde yinelemeli mikrobiyal tanımlama için performansını geliştirmeye devam etmektedir.

Veritabanları giderek daha fazla tamamlanmasına rağmen, değişen isimlendirmeler ve yeni türlerin / cinslerin devam eden tanımlamaları nedeniyle, öngörülebilir geleceğe kaliteli mikrobiyal tanımlama sağlamak için düzenli ve devam eden veri tabanı güncellemeleri zorunlu olacaktır.

Akademik laboratuvarlar, ticari olarak temin edilebilen sistemlerin performansını artırmak için veri tabanı oluşturma işini yürütmüştür. Örneğin, Mayo Clinic Custom MALDI-TOF MS Kütüphanesi, halihazırda ticari olarak temin

edilebilen veritabanları tarafından yeterli şekilde ele alınmayan organizmaları temsil eden 1599 kütle spektral girişi içerir.

Günümüzde Bruker Biotyper (Bruker Daltonics, Bremen, Almanya), Saramis (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa), VITEK MS (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Fransa) ve Andromas (Andromas, Paris, Fransa) olmak üzere ticari olarak dört farklı sistem bulunmaktadır [359].

2.13.2. Kütle Spektrometresi (Mass Spectrometry=MS)

Kütle spektroskopisi, yüklü moleküllerin manyetik ya da elektriksel bir alanda kütle/yük (m/z) oranına göre ayırt edilerek kalitatif ve kantitatif analizinin yapıldığı bir sistemdir. Tarihsel olarak, tekniğin orijini yaklaşık 100 yıl öncesine dayanmaktadır ve temel olarak elementlerin atomik ağırlıklarının ölçülmesinde ve ayrıca belirli izotoplarda kullanılmıştır [360].

Biyolojik bilimler alanında kütle spektrometrisinin ilk uygulaması, biyolojik sistemler yoluyla ağır izotopların izlenmesi içindi. Teknik daha sonar oligonükleotitlerin ve peptitlerin sekanslanmasını ve ayrıca nükleotitlerin yapısının analizini sağladı [361].

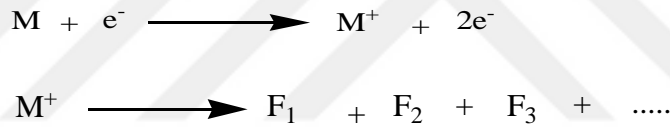
Sistem, ilk olarak endüstriyel analizlerde, özellikle petrol ve kimya endüstrisinde kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde, birçok farklı araştırma alanında çok çeşitli disiplin ve ortamlar için kütle spektrometresi uygulamaları kullanılmaktadır. Analitik olarak, protein yapısının belirlenmesi, işlevi, katlanması ve etkileşimlerinin belirlenmesi, bir proteinin peptit fragmanlarının külesinden tanımlanması, translasyon sonrası değişikliklerin tespiti, proteinlerin miktar tayini, izleme, enzim reaksiyonları veya kimyasal modifikasyonlar ve protein sindirimi ve oligonükleotitlerin sekanslanması gibi akademik araştırma nedenleriyle kullanılabilir. Daha spesifik olarak, uygulamaları, ilaçlar veya metabolitler için yapıların belirlenmesi, metabolitlerin taranması, adli analizler veya hastalık biyobelirteçlerinin tespiti gibi klinik ve farmasötik testlerin yanında mikroorganizmaların tanımlanması için de kullanılmıştır [362, 363].

Kütle spektrometrisi uzun yıllardır özellikle kimya alanında kullanılmakla birlikte mikrobiyoloji alanında kullanımı 1970'lerden itibaren başlamaktadır. Anhalt ve Fenselau'nun 1975'te yaptıkları analizlerde bakterilerin tür ve cins bazında kendilerine has bir kütle spektralarının olduğu ortaya konmuştur [364].

2.13.3. Kütle Spektroskopisinin Temel Prensipleri

Kütle spektrometreleri, yüklü partiküllerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partiküllerden m/z oranlarına göre ayrılmaları prensibine dayanır [365, 366].

Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil değildir. Bu yüzden diğer moleküllerle ve bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler [363].



M: molekül

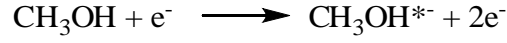
M⁺: moleküler iyon

F: fragment

Oluşan her bir iyon spesifik bir moleküler kütle ve yüke sahiptir. Bu bileşenler m/z değerlerinin yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrum verir. Her bir iyonun yoğunluğu, dedektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrum ile karşılaştırılarak tanımlanır. Kütle spektrometrelerinde + veya - iyonlar incelenebilmelerine karşın genellikle + iyonlar incelenir. Katı, sıvı ve gaz örnekler incelenebilir [363, 365, 366].

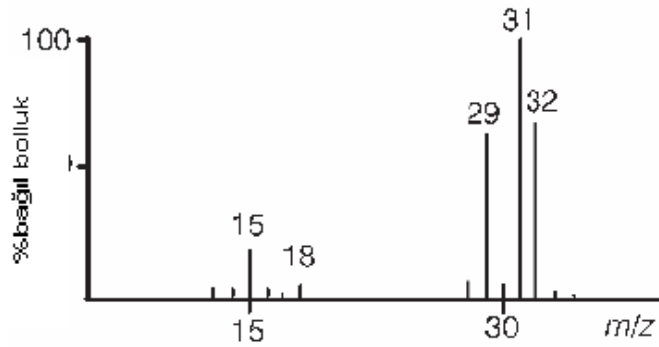
Şekil 2.4' de, metanolün kütle spektrumu görülmektedir. Metanolün, mol kütlesi 32'dir. Bu spektrumu elde etmek için metanol buharı bir elektron akışı ile

bombardıman edilmiş ve sonuçta moleküller birer elektron kaybederek aşağıdaki denklemde de görüldüğü gibi moleküler iyon oluşturmuştur.



Yüksek enerjili elektronlar ile analit molekülleri arasındaki çarpışmalar moleküle, genel olarak elektron verecek kadar yüksek enerji verir. Uyarılmış molekülün durulması, genellikle parçalanma şeklinde olur ve daha düşük kütleli iyonlar ortaya çıkar.

Şekil 2.4' de verilen spektrumdaki çizgiler, kütle/yük oranına karşı gelen iyonun bağıl şiddetini göstermektedir. Her spektrumda en büyük olan pik temel pik olarak adlandırılır ve bu temel pikin şiddeti keyfi olarak %100 olarak kabul edilir. Diğer piklerin tümünün şiddeti, temel pikin belirli bir % oranı olarak ifade edilir. Modern kütle spektrometreleri, temel kabul edilecek piki seçecek ve diğer pikleri bu temel pike göre belirleyecek şekilde programlandırılır [367].



Şekil 2. 4. Metanol Molekülünün Kütle Spektrumu

2.13.4. Kütle Spektrometresi ve Bileşenleri

Elektromagnetik ışımının belli bir alanında, örneğin farklı dalga boylarında verdiği etkileşimlerle ilgilenen alana *Spektroskopi* denir.

Kütle spektrometresi, manyetik veya elektriksel alanda hareket eden iyonik yapıları kütle/yük oranlarına göre ayıran spektroskopik bir cihazdır. Modern kütle spektroskopisi, yüksek kütle dağılımı ve doğru analize imkan tanır.

Kütle spektrometresi cihazı temelde 5 kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.5). Bu kısımlar sırasıyla; [368]

1. Numune giriş sistemi,

2. İyon kaynağı; İyonlaştırıcı MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization; Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon-İyonizasyonu) ESI (Electro-Spray Ionization; Elektro-Sprey İyonizasyonu, İyon Sprey, Nano Sprey, Sonik Sprey)

3. Kütle analizörü; TOF (Time Of Flight; Uçuş Zamanlı Analizör) Quadrapole (Kuadrapol; Dörtlü Kutup) Ion Trap (İyon Tuzağı)

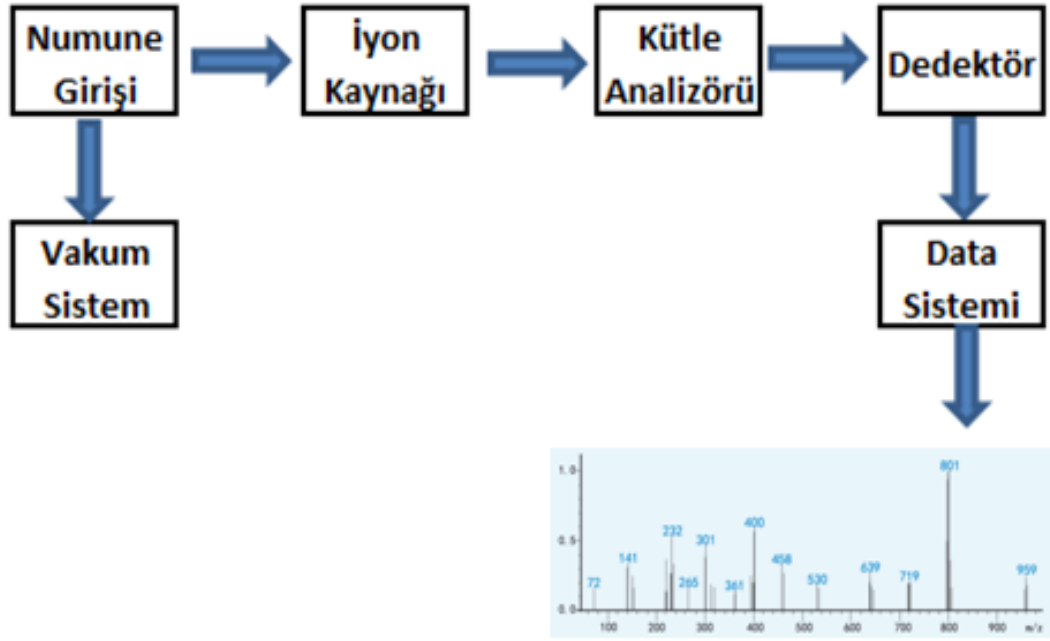
4. Dedektör

5. Sinyal işleyici olan veriyi (spektrum) işleyen kısımlardır.



Şekil 2. 5. Manyetik sektörlü kütle spektrometresinin kısımları.

Elektromanyetik ışımının bir fonksiyonu olarak ölçülen sinyallerin yani absorbanların toplamına *spektrum* denir. Dalga boyunun (frekansın ya da enerjinin) bir fonksiyonu olan cevap alanı yani sinyaller toplamı bir spektrum oluşturur. Kütle spektrumuna, iyon kaynağı tarafından üretilen farklı m/z oranlarındaki iyon bolluğuna bağlı olarak oluşturulan “kimyasal parmakizi” de denir.



Şekil 2. 6. Kütle spektrometresinin bölümleri (şematik olarak)

MS cihazının çalışma prensibi kısaca (1) örneklerden iyonların elde edilmesi, (2) farklı kütlelerdeki iyonların birbirinden ayrılması, (3) kütle spektrumu şeklinde verilerin biriktirilmesi olarak Şekil 2.6,'da gösterildiği gibi özetlenir.

1) Numune girişi:

Numunenin sisteme girişi gaz-likid kromatografi, likid kromatografi veya katı probe tarafından sağlanmaktadır.

2) İyonlaştırma kaynağı:

Numune sisteme girdikten sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırma olayıdır. İyon kaynağı incelenecek maddenin türüne ve çalışmada istenilen bilgilere göre değişmektedir. İyonlaştırma işlemi çeşitli kaynaklarla sağlanabilir. Bu kaynaklar arasında; elektronlar, fotonlar, elektriksel ark (kıvılcım), ısı, kimyasal reaksiyonlar, nükleer reaksiyonlar mevcuttur [365, 369].

İyon kaynakları başlıca gaz faz iyon kaynakları ve desorpsiyon iyon kaynakları olmak üzere iki grup altında toplanır (Tablo 20) [369].

Tablo 20. İyon kaynakları

İyon kaynağının tipi	İyon kaynağının ismi	İyonlaştırıcı ajan
Gaz faz	Elektron impakt (EI)	Yüksek enerjili elektronlar
	Kimyasal iyonlaştırma (CI)	Reaktif gaz iyonları
	Alan iyonlaştırma (FI)	Yüksek potansiyelli elektrot
Desorpsiyon	Alan desorpsiyon (FD)	Yüksek potansiyelli elektrot
	Plasma desorpsiyon (PD)	^{252}Cf 'nin fisyon ürünleri
	Hızlı Atom Bombardımanı (FAB)	Enerjik atom demeti
	İkincil İyon Kütle Spektrometri (SIMS)	Enerjik iyon demeti
	Termosprey iyonlaştırma (TS)	Yüksek sıcaklık
	Elektrosprey iyonlaştırma (ESI)	Yüksek elektrik alanı
	Matriks destekli desorpsiyon iyonizasyon (MALDI)	Laser kaynağı

Gaz faz iyon kaynaklarında numune önce buharlaştırılır ve daha sonra iyonize edilir. Desorpsiyon kaynaklarında ise numune likid veya katı halden direkt gaz iyonlara dönüştürülür. Gaz faz kaynaklar ısıya dayanıklı numunelere özellikle kaynama noktası $500\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'nin altındakilere uygulanmasına rağmen desorpsiyon kaynakları ise ısıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşiklere kolaylıkla uygulanabilir. Bu da desorpsiyon kaynaklarını gaz faz kaynaklara göre daha avantajlı kılar [369].

Gaz faz iyon kaynaklarından Elektron impakt EI [370] ve Kimyasal iyonlaştırma CI [371, 372] teknikleri en sık kullanılanlarıdır

Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; Hızlı Atom Bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılırken [373], Elektrosprey iyonlaştırma (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır [374]. MALDI özellikle peptitlerin analizinde kullanılan yeni bir iyonizasyon yöntemidir [375].

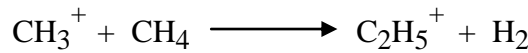
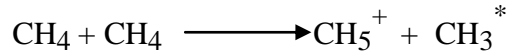
2.13.5. Gaz Faz İyon Kaynağı Tipleri

2.13.5.1. Elektron İmpakt Kaynağı (EI)

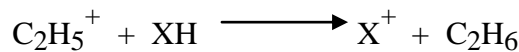
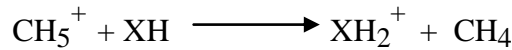
Bu teknikte, numune yeterince buharlaşabilecek sıcaklığa getirilir ve elektronlarla bombardıman edilerek iyonlaştırılır. Duyarlılıkları yüksek ve kullanışlı olmasıyla birlikte yüksek iyon akımı üreterek aşırı parçalanma ve çok sayıda pik görülmesi maddenin şüpheli kısımlarının tanınmasında yardımcı olması bir üstünlük gibi görülse de bu aşırı parçalanma analitin molekül pikini ortadan kaldıracığından mol kütlelerinin ölçülmesini imkansız hale getirebilir. Elektron impakt kaynakları, molekül kütlesi 10^3 daltondan küçük moleküllere uygulanabilir [369].

2.13.5.2. Kimyasal İyonlaştırma (CI)

Kimyasal iyonlaştırmada, moleküllerin iyonlaştırılması yüksek enerjili elektronlarla değil, iyonlarla yapılır. Bu şekilde kullanılan iyonlara genellikle ayıraç iyonlar denir. Böyle iyonlar, moleküllerle çarpışmaları sonucu, moleküle ya bir proton aktarırlar, ya bir hidrür (H) veya molekülden bir elektron koparırlar. Ayıraç iyonlar şu şekilde elde edilir. Kütle spektrometresine yüksek basınçta (1-10 torr) metan gazı gönderilir. Metan iyonlaşır CH_4^+ ve CH_3^+ iyonlarını verir. Bu iyon molekülleri ortamda bulunan metan molekülleriyle çarpışarak;



reaksiyonlarını verirler. CH_5^+ ve C_2H_5^+ molekül iyonları metan molekülleriyle tekrar çarpışamazlar. Fakat ortama alınan ve konsantrasyonu metan konsantrasyonunun binde biri olan XH molekülleriyle çarpışırlar. Çarpışma;



şeklinde olur. XH_2^+ ve X^+ iyonları parçalanmaya uğrar ve kütle spektrumu verir. Bu teknikte moleküler iyon piki görülmez, ancak M^+ ve M^- pikleri görülür. Buradan da maddenin molekül kütlesi hesaplanır [372].

2.13.5.3. Alan İyonlaştırma (FI)

Alan iyonlaştırma tekniğinde, iyonlaştırma bölgesi modifiye edilmiş bir kütle spektrometresi kullanılır. Numune bölgesinden gelen ve numuneyi iyon hızlandırıcı kısma taşıyan borunun ucuna anot görevi yapan üzeri pürüzlü bir tel eklenir. Anot telle katot arasına 7-8 bin voltluk bir potansiyel yüklenir. Numune bölgesinden gelen moleküller anotla çarpışmaları sonucu bir elektron bırakarak pozitif yüklü hale gelirler. Pozitif yüklü parçacıklar iyon tabancasında hızlandırılarak spektrometreye gönderilirler. Bu şekilde meydana gelen iyonlarda potansiyel enerji fazlalığı olmadığından, iyonlar daha küçük kısımlara fazla parçalanamazlar. Bunun sonucu elektron impakt tekniğine göre daha az sayıda pik verirler [369].

2.13.6. Desorpsiyon İyon Kaynağı Tipleri

2.13.6.1. Alan Desorpsiyonu (FD)

Eğer numune çok az uçucu veya ısıya dayanıksızsa elektriksel alan iyonizasyonundaki gibi ancak madde direkt anota uygulanır. Madde molekülleri anot (+) tarafından iyonlar haline dönüştürülür ve ortamdan uzaklaştırılır. Bu yöntemle maddenin M^+ ve daha fazla olmak üzere M^{+1} iyonları elde edilir [369].

2.13.6.2. Plazma Desorpsiyon (PD)

Plazma desorpsiyonu (PD) McFarlane ve Torgesson tarafından geliştirilmiştir. Bu iyonizasyon tekniğinde, örnek küçük bir alüminyum folyo üzerine yerleştirilir. Örnek, çeşitli mega-elektronvolt enerji yüklü parçaları olan ^{252}Cf 'nin fisyon parçalarına kaynak içinde maruz bırakılır [376]. Bombardımandan sonra şok dalgaları nötrallerin ve iyonların saniyede birkaç bin kez parçalanmasına neden olur. Bu teknik 10 000 Da' dan büyük iyonların gözlemlenmesini sağlar. Ancak günümüzde kullanımı sınırlıdır ve yerini MALDI' ye bırakmıştır.

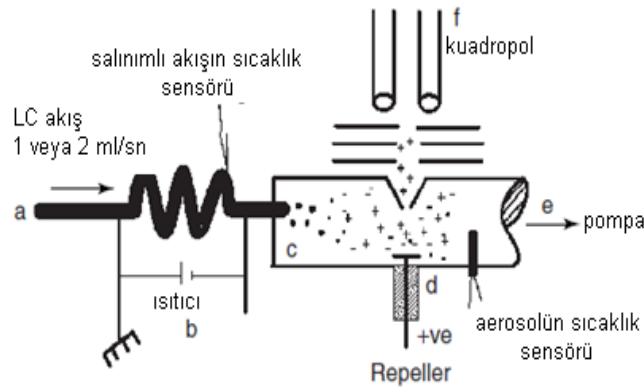
2.13.6.3. Hızlı Atom Bombardımanı (FAB)

Moleküller, Ar ve Xe gibi yüksek enerjili (6-10 keV) karbon atomların bombardımana tutulur. Fakat bu bombardımana tutulan moleküller, genellikle bir çözücü içinde çözündüklerinden bu atom bombardımana çok etkilenmezler.

Bombardıman sırasında, moleküller elektron kaybederler. FAB, çok yüksek molekül kütleli molekülleri, molekül iyonu oluşturmada çok etkili bir yöntemdir. DNA gibi bir molekülün tanınması, protein tanınması gibi çok yüksek molekül kütleli çalışmalarda etkilidir [377].

2.13.6.4. Termosprey İyonlaştırma (TSP)

Termosprey (TSP)' in prensipleri, Blakney ve Vesta tarafından 1983 yılında belirlenmiştir ve Şekil 2.7 de gösterilmiştir.

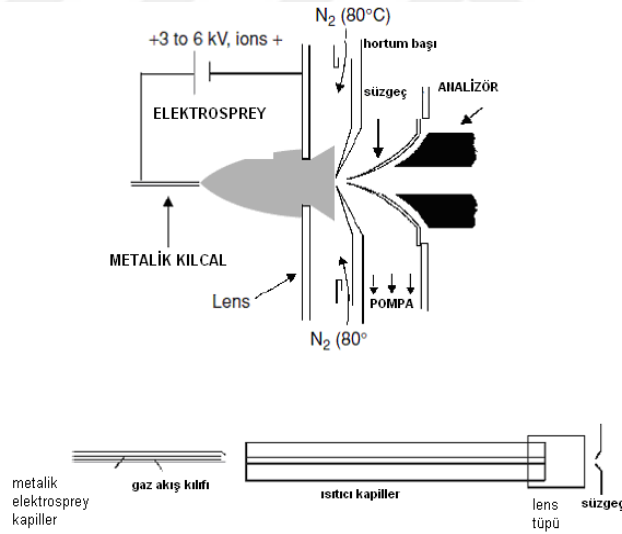


Şekil 2. 7. Termosprey kaynağının şeması

Bu metotta tuz içeren ve çelik kapiller içine pompalanan örnek hızlı bir şekilde yüksek sıcaklığa getirilir. Çözelti süpersonik ışın halinde vakum odasına geçer. Solvent ve örnek molekülleri, iyonlar içeren iyi-sıvılaştırılmış spreyci oluşturur. Repeller tarafından analizöre doğru hızlandırılır ve iyonlar çözüldükten uzaklaştırılır. Bir veya birkaç çözülmüş çözücü molekülü veya çözülmüş molekül taşıyan ayrıştırılmış damlacık vardır. Bu nedenle iyonlaştırmadan önce buharlaştırmak gerekli değildir. İyonlar doğrudan sıvı fazdan buhar faza geçer. İyon ekstraksiyonu geliştirmek için kapillerin çıkışında damlacıklar şarj edilebilir. Damlacıklar süpersonik ışının önünde bulunan açıklık sayesinde, çıkış yerine doğru sürekli olarak pompalanır. Damlacıkların vakum altında donmasını önlemek için enjeksiyon sıvısı ısıtılmış olmalıdır. Bu ısıtma vakum altında geri beslemeli bir termokupl olan ışın ölçerden faydalanılır [367].

2.13.6.5. Elektrosprey İyonlaştırma (ESI)

Bu yöntem ilk defa 1984 yılında proteinler, polipeptidler ve oligonükleotidler gibi biyomoleküllerin analizi için kullanılmıştır. Daha sonra sadece polimer ve biyopolimerlerin değil aynı zamanda küçük polar moleküllerin analizi için de kullanılmaya başlanmıştır. Birçok organik bileşik ve ilaç molekülleri için moleküler iyon pikini belirlemede oldukça uygun bir yöntemdir. Elektrosprey iyonlaştırma, atmosfer basıncında ve oda sıcaklığında gerçekleşmektedir. Bu yöntemin avantajı büyük ve ısı ile kolayca parçalanabilen maddelerin mol kütlelerinin belirlenebilmesidir. Fenn ve arkadaşları proteinlerden çeşitli yüklerdeki iyonları oluşturarak ES'yi başarıyla uygulamışlardır. Bu metotta kütleleri en az 2000 olan türlerin kütlesi alet tarafından belirlenebilir. ESI'nın gerçekten yüksek hassasiyet sağladığı ve HPLC, μ HPLC veya kapiller elektroforez ile kolaylıkla birleştirilebildiği görülmüştür. ESI'nın prensipleri ve biyolojik uygulamaları kapsamlı olarak gözden geçirilmiştir.



Şekil 2. 8. Elektrosprey kaynağının şeması

ESI güçlü bir elektrik alanı uygulayarak, atmosferik basınç altında, içinden zayıf bir akım ile sıvı geçen kılcal bir boru aracılığıyla üretilmiştir (genellikle $1-10 \mu\text{l min}^{-1}$). Kapiler ve taşıyıcı elektrot arasına 3-6 kV potansiyel fark uygulayarak bir elektriksel alan sağlanır. Üretilen elektriksel alan 10^6 Vm^{-1} ' dir. Bu alan, kapillerin sonunda yer alan sıvı yüzeyde bir yük toplanması oluşturur. Gaz, düşük akış oranında enjekte edildiği için alanda sınırlı olarak dağılır. Gazın düşük akış oranında enjekte edilmesi spreyn boşlukta sınırlı dağılmasını sağlar. Bu damlacıklar bölmenin

ardından, ısıtılmış inert gaz, genellikle azot veya ısıtılmış kılcal aracılığıyla solvent molekülleri üzerinden geçerler.

Püskürtmenin belli bir başlangıç geriliminde başlaması, herhangi bir kaynak için, solventin yüzey gerilimine bağlıdır. Bir kaynakta, su için 4kV (yüzey gerilimi 0.073Nm^{-2}), metanol için tahminen 2,2 kV (0.023Nm^{-2}), asetonitril için 2.5 kV (0.030Nm^{-2}) ve dimetilsülfoksit için 3kV (0.043Nm^{-2}) yüzey gerilimi vardır [367].

2.13.6.6. Matriks ile Destekli Lazer Desorpsiyon İyonlaştırması (MALDI)

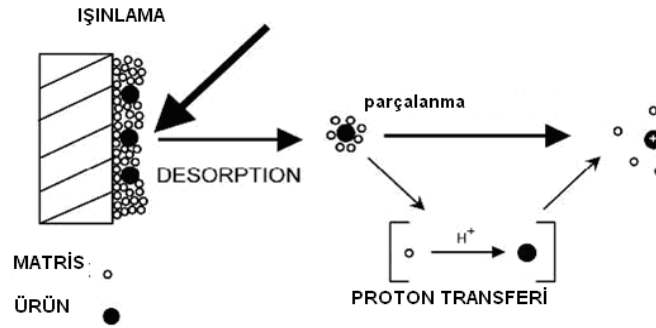
MALDI, yeni bir iyonlaştırma yöntemidir. Bu yöntem, mol kütlesi, birkaç binden birkaç yüz bin daltona kadar olan biyopolimerlerin mol kütlelerini doğru tayin etmede ümit verici görünmektedir. Yöntemin esasları Karas ve Hillenkamp tarafından belirlenmiştir.

MALDI iki aşamada meydana gelir. İlk adımda matris adı verilen küçük organik moleküller analiz için bileşik içinde çözülür. Bu moleküller uygulanan lazer dalga boyunda güçlü bir absorpsiyon gücüne sahip olmalıdırlar. Bu karışım analizden önce kurutulur ve çözeltinin hazırlık aşamasında kullanılan sıvı solvent uzaklaştırılır. Sonuçta analitin dope edildiği bir katı matriks kristal kalır [378].

Analit moleküllerinin birbirinden tamamen ayrılması için matris boyunca yerleştirilirler. İkinci adım kütle spektrometresi kaynağındaki vakumlu şartlar altında oluşur. Bu adım kısa bir süreçte yoğun lazer vuruşlarıyla bu katı çözeltideki kütle bölümlerinin ablasyonunu içerir. MALDI sürecinin kesin mekanizması tamamen aydınlatılamamıştır. Ancak, lazer ile ışınlama matris moleküllerinin yoğun olarak uyarılması nedeniyle büyük miktarda enerji birikimine ve böylece fazla ısınmaya sebep olur. Hızlı ısınma matris kristallerinin sınırlı süblimleşmesine, bir kısım kristal yüzeyinin ablasyonuna ve gaz evresinde matrislerin genişlemesine sebep olur. İyonizasyon reaksiyonları herhangi bir zamanda vakum koşulları altında meydana gelebilir. Ancak MALDI'de üretilen iyonların kaynağı tam olarak anlaşılamamıştır. MALDI için önerilen kimyasal ve fiziksel iyonlaşma yolları arasında gaz fazda foto iyonizasyonu, proton transferi, iyon-molekül reaksiyonları ve daha önceden oluşmuş iyonların desorpsiyonu vs. vardır. Gaz fazındaki iyonlar elektrostatik alan tarafından

analizöre doğru hızlandırılır. Şekil. MALDI'nin desorpsiyon-iyonizasyon sürecini göstermektedir.

MALDI, diğer iyonizasyon tekniklerine göre daha hassastır. Nitekim matris moleküllerinin sayısı analit sınırlarını aşmakta, böylece analiz molekülleri birbirinden ayrılmakta ve buna bağlı olarak örnek kümelerinin oluşumu önlenerek moleküler iyonların görünüşü inhibe edilmektedir. Enerji yükünün büyük bir kısmının absorbe edilmesi ve lazerden analite enerji transferinin artması nedeniyle lazer sinyallerinde oluşan benzer hataları, matriks minimize etmektedir. Böylece duyarlılık da son derece artar. MALDI diğer iyonizasyon tekniklerine göre daha evrenseldir. Analitin absorpsiyon frekansını ayarlamak için belirli bir dalga boyu gerekli değildir. Çünkü burada lazer vuruşlarını matriks absorbe eder. Ayrıca, MALDI molekül kütlesi 100 000 Da' dan daha büyük moleküllere sahip analitlerin desorpsiyon ve iyonizasyonunu da sağlar. Çünkü absorpsiyon özellikleri ve bileşik büyüklüğü analizden bağımsızdır. Örneğin, moleküler kütlesi 300 000 Da' a kadar olan proteinlerin analizi yapılabilir.



Şekil 2. 9. MALDI'nin temel prensibinin görünümü

MALDI, sentetik polimer ve biyopolimerlerin tespitinde güçlü bir analitik tekniktir [367]. Tipik MALDI, özellikle pozitif iyonların protonlaşması ile tek yüklü moleküler türlerin spektrumlarını içerir. Daha kolay proton verebilen bileşikler, genellikle negatif iyon şeklinde algılanır. Bazı çok yüklü iyonlar ve çok küçük parçalar da görülebilir. Bileşikler kolaylıkla protonlanamaz, katyon oluşabilmesi için örneğe genellikle alkali, bakır veya gümüş katyonları ilave edilmesi gerekebilir. MALDI spektrumlarında basit ve kompleks karışımlar kolaylıkla analiz edilebilir.

MALDI'nin değişik bir kullanım alanı da biyolojik materyallerin görüntülenmesidir. Aslında, Lazer Desorpsiyonu (LD) ve Sekonder İyon Kütle Spektrometresi (SIMS) gibi, MALDI de biyomoleküllerin hedef dokuda dağılım haritasının belirlenmesinde kullanılmaktadır.

MALDI, diğer iyonizasyon teknikleri gibi sürekli iyon demeti oluşturmanın aksine aralıklı olarak iyon demetleri oluşturan darbeleri bir iyonizasyon tekniğidir. MALDI kaynağının vuruş yapısı, uçuş zamanlı (TOF) analizör için uygundur. Ayrıca TOF analizörünün geniş kütle aralığındaki iyonları analiz etme yeteneği vardır, böylece MALDI ile de yüksek kütleli iyonlar analiz edilebilir. Bu da, MALDI spektrumlarının genelde MALDI-TOF spektrometreleri ile elde edilmesini açıklar. Bununla birlikte TOF analizörler ile MALDI kaynaklarının kullanımını sınırlayan bazı temel nedenler vardır. MALDI kaynakları, iyon tuzaklı veya Fourier dönüşümlü kütle spektrometreleri gibi diğer kütle analizörleri ile de birleştirilebilir. Bu aletler çok daha kolay ve güçlü MS/MS analizleri yapılmasına olanak verir. Ayrıca fourier dönüşümlü kütle spektrometreleri yüksek çözünürlüğe sahiptir.

Farklı lazerler arasında en yaygın olarak UV lazerler kullanılır; çünkü çalışma kolaylığı vardır ve ucuzdur. N2 lazerler ($\lambda=337$ nm) standart olarak kullanılmaktadır.

Ancak Nd: YA ($\lambda = 266$ veya 355 nm) lazerlerde kullanılır. MALDI'de IR lazerlere benzeyen Er:YAG lazerleri ($\lambda=2.94$ μm) veya CO2 lazerleri ($\lambda=10.6$ μm) kullanılabilir. MALDI 'de kullanılan lazer dalga boyları ve darbe genişlikleri tablo 21' de listelenmiştir.

Tablo 21. MALDI'de yaygın olarak kullanılan bazı lazerler

Lazer	Dalga boyu	Enerji(eV)	Darbe genişliği
Azot	337nm	3.68	<1 ns veya birkaç ns
Nd:YAG μ3	355nm	3.49	5ns
Nd:YAG μ4	266nm	4.66	5ns
Er:YAG	2.94nm	0.42	85ns
CO₂	10.6nm	0.12	100ns + 1 μs tail

Yaygın olarak kullanılan UV-MALDI matrisleri tablo 22' de sahip oldukları bileşiklerin sınıfına göre listelenmiştir. Infrared (IR) lazerlerde kullanılan matrisler, üre, karboksilik asit, alkol ve su gibi, doğal çözeltiler olduğu gibi, aynı zamanda aromatik UV-MALDI matrisler de vardır. Ayrıca IR dalga boyunda moleküler

bileşiklerin güçlü absorpsiyon yaptığı daha pek çok IR-MALDI matrisler de bulunmasına rağmen IR-MALDI' de iyon oluşumu ve matris absorpsiyonu arasındaki korelasyon iyi değildir [367].

Tablo 22. Yaygın olarak kullanılan bazı UV-MALDI matrisler

Analit	Matriks	Kısaltma
Peptidler/Proteinler	α-Siyano-4-hidroksisinnamik asit	CHCA
	2,5-Dihidroksibenzoik asit	DHB
	3,5-Dimetoksi-4-hidroksisinnamik asit	SA
Oligonükleotidler	Trihidroksiasetofenon	THAP
	3-Hidroksipikolinik asit	HPA
Karbonhidratlar	2,5-Dihidroksibenzoik asit	DHB
	A-Siyano-4-hidroksisinnamik asit	CHCA
	Trihidroksiasetofenon	THAP
Sentetik polimerler	Ditranol	DIT
	2,5-Dihidroksibenzoik asit	DHB
Organik moleküller	2,5-Dihidroksibenzoik asit	DHB
İnorganik moleküller	Trans-2-(3-(4-tert-bütilfenil)-2-metil-2-propeniliden)	DCTB
	malononitril	
Lipidler	Ditranol	DIT

Literatürde bir dizi farklı örnek hazırlama metotları belirtilmiştir. En sık kullanılanlar bahsedilmiştir.

2.13.6.7. Protein Tanımlama İşlemlerinde MALDI İçin Örnek Hazırlanmasında Farklı Yaklaşımlar

i. Cleanup prior to spotting: Ters faz materyallerin ister kolon formatında isterse bir pipet ucunun içinde gevşek şekilde paket edilerek kullanılmasının yararlı bir yaklaşım olduğu kanıtlanmıştır. Bu yaklaşım örneklerin tuzlardan arındırılmasında ve MALDI-TOF analizinden önce polimerlerden ayrılmasında yararlı olmuştur. Fakat reverse faz materyalin ve paketlenmenin özelliklerinin dikkatli bir biçimde ölçülmesine ihtiyaç vardır. Örneğin pipet uçlarından Ziptips; en uç kısmında bir tampon ekstraksiyon materyali vardır. Bu tampon bir polimerik destek içinde reverse faz materyalin gömülmesiyle elde edilir. Sıvının uç içinde kolayca akmasını sağlamak için gömüldükleri polimer içerisinde reverse faz taneleri iyice yayılır. Bu durum düşük geri basınca neden olur. Uçların orta ve yüksek seviyedeki peptid karışımlarının temizlenmesinde yararlı olduğu kanıtlanmıştır. Ancak reverse tanelerinin yayılımları ekstraksiyon verimliliğinin

difüzyonunu sınırlar. Yani peptidlerin paketlenmiş materyale ulaşması için yayılmak zorunda olduğu mesafeyle karşılatınca bu doğrusal akış çok yüksektir. Bunun sonucunda ekstraksiyon verimliliği düşük konsantrasyondaki peptid karışımları için önemli miktarda düşer. Yani bu yöntemle düşük miktardaki peptid karışımlarını (100 fmol'den az) analiz etmek oldukça zordur.

ii. Spotting yaklaşımları: Küçük miktarlardaki peptidlerin analizi için yıllar boyunca farklı örnek hazırlama yöntemleri geliştirildi. En popülerleri “Dried Droplet” metodu oldu. Bu yöntemde peptid karışımının suyu çekilir ve α -cyano-4-hydroxycinnamic asitle doyurulmuş asitli su içinde asılı bırakılır. Bu organik karışımdan 1 mikrolitre MALDI plağının içine konular ve kurumaya bırakılır. Bu yöntem örnek hazırlanması için hızlı bir yoldur ancak en duyarlı yol değildir. İkinci bir yaklaşım da “Two-layer” yöntemi olarak adlandırıldı. İlk önce α -cyano-4-hydroxycinnamic asit solüsyonu MALDI plağının üzerine konular ve bir mikrokristal tabakası oluşturması için kurumaya bırakılır. Daha sonra matriks ve analit solüsyonu ilk tabakanın üzerine konular ve kurumaya bırakılır. Bu yöntem oldukça sıkıcı olmasına rağmen analizde daha temiz bir spektra verir. Ayrıca bu metot otomatikleştirilebilir.

iii. Cleanup post spotting: İster “Dried droplet” ister “two-layer” metodu olsun her iki yöntemde de bir cleanup yöntemi MALDI plağı üzerine direkt olarak uygulanabilir. Bu yöntem bir spotting yönteminin hemen ardından uygulanır. Bir su damlası MALDI plağının üzerindeki her bir spota eklenir ve su damlası uçurulur ve spotlar MALDI-TOF kütle spektrometresine yerleştirilmeden önce kurumaya bırakılır. Bu basamak tuzlar ve kurutulmuş kristaldeki hidrofilik moleküllerin eldesini sağlar. Bu sinyal gürültü oranında bir yükselmeye neden olur. Yıkamanın zamanlaması hidrofilik peptidlerin gereksiz kaybının önlenmesinde önemlidir.

iv. On plate concentration: Daha önce de değinildiği gibi kütle spektrometreler yoğunluğa bağımlı aletlerdir. MALDI daha komplekstir. Çünkü iyonizasyon süreci ve matrikslerin katılımı tam olarak anlaşılammaktadır. MALDI yüzeyindeki analit konsantrasyon artışı gözlemlenen sinyali artırabilir ancak bu durum örnek yeteri kadar temiz olduğunda iyi çalışır. Örnek miktarı kısıtlı olduğunda

yoğunluğu artırmanın tek yolu spotun büyüklüğünü azaltmaktır. MALDI plakları küçük ve hidrofilik spotting bölümleriyle hazırlanır fakat plağın diğer kısmı hidrofobiktir. Bir damla peptid solusyonu spot üzerine konulduğunda hidrofobik çevre ve yüzey gerilimi damlanın yüzeyle temasını kısıtlayacak bir şekil almasına zorlar. Damla kururken küçük hidrofilik page üzerinde yoğunlaşır. Sonuç; MALDI plağı üzerinde küçük bir alanda yüksek bir konsantrasyondur. Kendi içinde bu yöntem önemli bir gelişme sağlayacak yeterlilikte değildir. Çünkü kontaminantlar özellikle tuzlar benzer şekilde konsantre olurlar. Tuzları uzaklaştırmak için “Drop of water” gibi bir cleanup yönteminin beraberinde uygulanması gerekir [379].

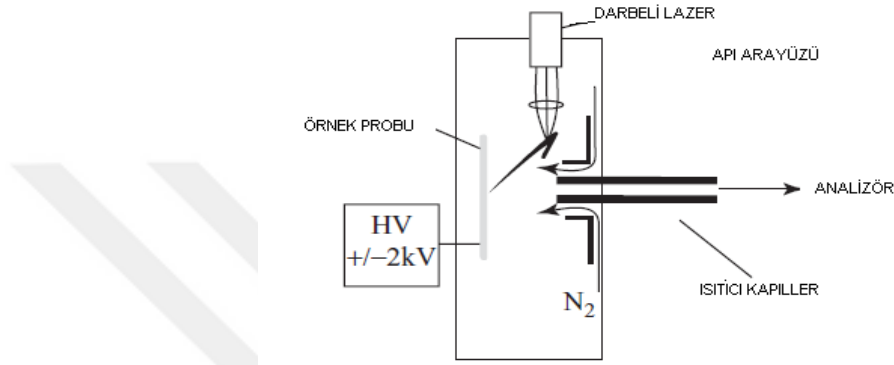
MALDI'nın doğruluğunun örnek hazırlama metotlarının doğruluğu ile orantılı olması, düşük tekrarlanabilirliği gibi bazı dezavantajları vardır. Her bir lazer vuruşu örnek kısmındaki birikimin birkaç tabakasını yok eder. Bu yüzden, katman homojenitesinin iyileştirilmesi ile sinyalde daha iyi tekrarlanabilirlik sağlanır. Bu, kantitatif sonuçların elde edilmesinde çok önemlidir.

2000 yılında, atmosferik basınçlı MALDI kaynağının kullanılması MALDI alanında gelişmelere yol açmıştır. Bu yöntem atmosfer basıncı (AP) ve MALDI' yi birleştirebilmiştir. Aslında, bu kaynak normal atmosferik basınç altında analit dop edilmiş matriks mikrokristalinden lazer vuruşlarıyla bu kristallerin ışıması nedeniyle analit iyonlarını oluşturur.

Şekil 2.10' da bir AP-MALDI kaynağı görülmektedir. Geleneksel MALDI kaynağına benzer bir şekilde çalışır. Aynı örnek hazırlama teknikleri ve konvansiyonel MALDI vakumunda kullanılan aynı matriksler, AP-MALDI de başarıyla kullanılabilir. Temel fark iyonların hangi basınç şartları altında oluşturulduğudur. Konvansiyonel MALDI bir vakum iyonizasyon kaynağıdır ve analit iyonları kütle spektrometresinin vakum kısmında bulunur. Bundan dolayı AP-MALDI bir atmosferik iyon kaynağıdır. İyonizasyon, aletin vakum kısmının dışında, atmosferik basınç altında oluşur.

İyonlar kütle analizörünün vakumu içerisine atmosferik basınçlı ara yüz (API) kullanılarak aktarılır. İyonların taşınmasına yardım etmek için, atmosferik basınç iyonizasyon bölgelerinden yüksek vakumda hareket eder, yüksek bir voltaja (tipik

olarak 2-3kV) hedef tabaka çevresindeki yüzeye uygulanır ve kuru azot buharı aynı bölgeye uygulanır. Toplam örnek tüketiminin, AP-MALDI' de, MALDI vakumuna göre daha fazla olması nedeniyle, iyonların kütle spektrometresi içine transferi gereksizdir. Ancak iyon kaynağının hassasiyeti azalmamıştır, çünkü MALDI için gereken örnek tüketimi analiz için gerekenden çok daha azdır. Nitekim örneğin büyük bir kısmı analiz sırasında kullanılmaz.



Şekil 2. 10. AP-MALDI şeması

AP-MALDI'nin iyon üretme mekanizması geleneksel MALDI'ye benzer. AP-MALDI kaynağı, geleneksel MALDI kaynağı gibi tek yüklü moleküler türler üretir. Ancak daha dar bir kütle yelpazesi oluşur. İyonların iç enerjisinin, hızlı ve verimli termalizasyonu geleneksel MALDI vakumu ile karşılaştırıldığında AP-MALDI iyonizasyon teknikleri daha yumuşaktır, hatta IR-MALDI tekniklerine göre de daha yumuşaktır. İyonlar genellikle hiçbir parçalanma göstermeden bu yöntemle üretilir. Matriksle analit arasında istenmeyen kümeleşmeler oluşabilir. Bu durum kaynaktan iyonlara enerji transferinin artırılmasıyla ortadan kaldırılabilir. Örneğin lazer enerjisinin veya bazı API parametrelerin artması, analit-matriks ayrışma sürecini artırır.

AP-MALDI, MALDI kaynaklarının bazı dezavantajlarını yok eder. AP-MALDI bir vakum bölgesi gerektirmez. Ayrıca elektrosprey iyonizasyon gibi atmosferik basınç kaynakları ile değiştirilebilir. Aletin performansı (kalibrasyon, çözünürlük ve kütle doğruluğu) kütle analizöründen gelen iyon desorbsiyonunun

ayrımını etkiler, ancak kaynak koşullarından (örnek matris, örnek hazırlama metodu) etkilenmez. Bu durum, deneysel esneklik sağlar. Örneğin uzun sinyalli lazerler kullanarak çözünürlüğü bozmadan duyarlılığı artırmak mümkündür. AP-MALDI kaynakları, geleneksel MALDI kaynakları gibi biyolojik materyallerin görüntülenmesinde de kullanılabilir. Uçucu madde taşıyan solventler gibi hassas vakum gerektiren örneklerin atmosfer basıncı altında incelenmesini sağlar. Bu metot ile biyolojik dokuların doğal yüzeyleri üç boyutlu olarak görüntülenebilir.

2.13.7. Kütle Analizörü

Kütle analizörleri MS sistemlerinin en önemli kısımlarından birisidir. Farklı kütle/yük oranlarındaki iyonları ayırabilmek için pek çok cihaz kullanılabilir. İdeal olarak kütle analizörleri küçük kütle farklarını ayırabilecek duyarlılıkta olmalıdır. Buna ek olarak analizörler kolayca ölçülebilir iyon akımları elde etmek için yeterli sayıda iyon geçişi sağlayabilmelidir. Kütle analizörlerinin optik eşdeğerleri olan mono kromatörlerde de hem duyarlılık hem de yüksek geçirgenlik istenir. Bir kütle spektrometrenin kalitesi kütleleri ayırma yeteneği, yani onun ayırma gücü ile ifade edilir ve bu R ile tanımlanır.

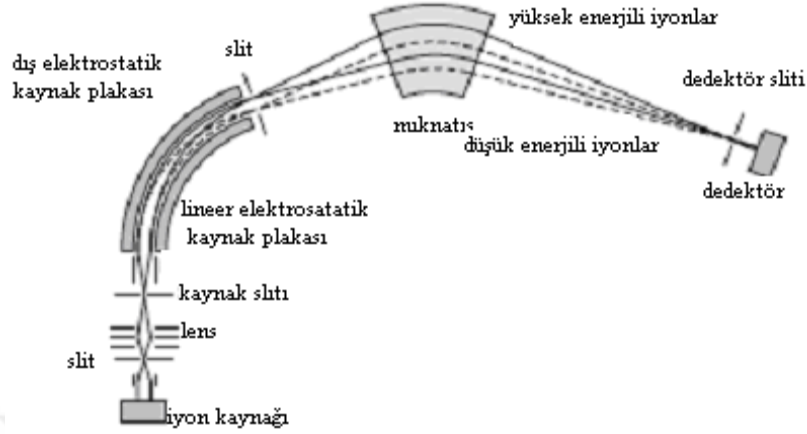
$$R=m/\Delta m$$

Burada Δm iki komşu pik arasındaki kütle farkıdır, m ise birinci pikin kütlesidir (bazen iki pikin ortalama kütlesi olarak da alınır). Eğer pikler arasındaki boşluğun yüksekliği, onların yüksekliğinin belli bir yüzdesinden (genellikle bu %10'dur) fazla değilse, iki pik ayrılmış kabul edilir. Buna göre 4000 ayırma gücüne sahip bir spektrometrede 4000,0 ve 4000,1 veya (40,00 ile 40,01) m/z değerlerinde olan pikler birbirinden ayrılabilir.

2.13.7.1. Manyetik Sektör Analizörleri

Manyetik sektör analizörlerinde kalıcı mıknatıslar veya elektromıknatıslar kullanılır. Bu mıknatıslar iyon kaynağından gelen farklı m/z oranına sahip iyonlara 180, 90 veya 60 derecelik açılarla dairesel hareket yaptırırlar. Bu sayede iyonlar manyetik alanda farklı m/z oranlarına göre sapma gösterirler. Aynı yükteki iyonlardan hafif olanlar, ağır olanlara göre daha büyük açı ile saparlar ve dedektörde

kaydedilirler. Manyetik ayırıcılarda tarama süresi 1sn'den daha az olacak kadar hızlıdır [380].

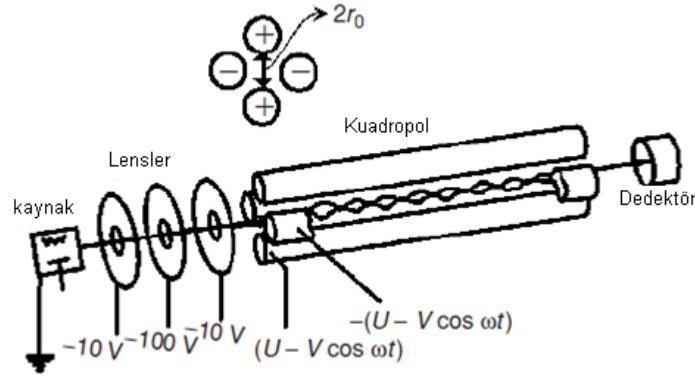


Şekil 2. 11. Manyetik sektörlü kütle analizörü şeması

2.13.7.2. Kuadropol Kütle Spektrometreleri

Kuadropol analizörler seramik bir tutucu ile birbirine bağlanmış dört adet paralel metalik çubuktan oluşmuştur ve bunlar spesifik radyo frekans alanı sağlamaktadırlar. Silindir şeklindeki bu çubuklar yaklaşık 10-20 cm uzunluğunda ve 1 cm çapındadırlar. Rodların üzerinde zıt yüklenmiş potansiyel bulunmaktadır ve zıt yüklü çubuklar elektriksel olarak birbirine bağlantılıdır. Voltaj uygulandığında bu çubuk setlerinin arasında bir potansiyel farkı oluşmaktadır. Bu potansiyel farkı özel bir titreşim alanı oluşturur ve bu titreşim iyonların detektöre yönlendirilmesini sağlar [363].

Kuadropol kütle spektrometreleri, manyetik sektörlü tiplere göre daha ucuz ve sağlamdır. Genellikle manyetik sektörlü cihazlardan daha küçük ve masa üstü cihazlardır. Bu cihazların kısa tarama süreleri ayrı bir avantajdır (tarama süresi < 100ms) bu yüzden, özellikle kromatografik piklerin anında taranması için çok faydalıdır. Kuadropol kütle spektrometreleri bugün en yaygın kullanılan kütle spektrometreleridir [369].



Şekil 2. 12. Kuadropol kütle spektrometreleri

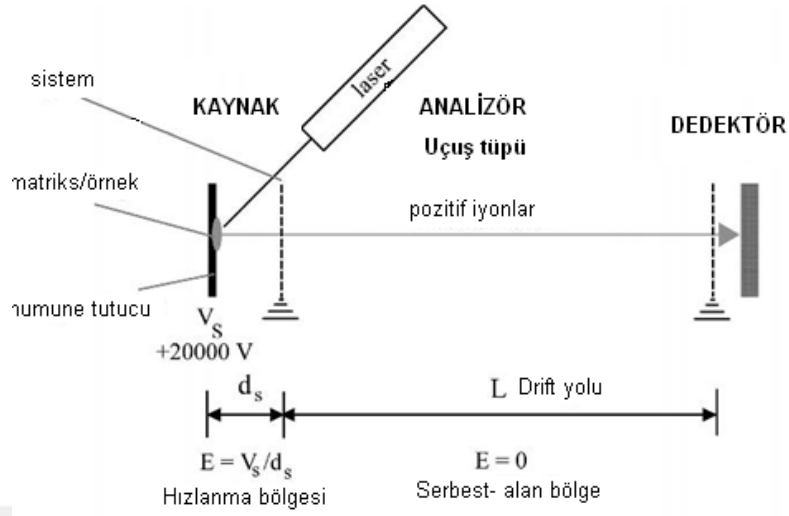
Şekil 2.12’de, kaynak, odaklayan lensler, silindirik kuadropol çubuklar ve dedektörden oluşan bir kuadropol cihazı görülmektedir. İdeal olarak çubuklar hiperbolik olmalıdır [367].

2.13.7.3. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörleri (Time Of Flight, TOF)

Bu yöntemde, iyonların ayrılması için değişik kütleli iyonların aynı gerilimle hızlandırıldıkları zaman aynı sürede değişik hızlar kazanmaları özelliğinden yararlanır. Uçuş-zamanlı (TOF) cihazlarda pozitif iyonlar kısa süreli pulslarla, örneğin elektron, ikincil iyon veya lazer bombardımanlarıyla üretilir. Bu şekilde üretilmiş iyonlar alansız bir toplama tüpüne $10^3 - 10^4$ V’luk elektrik alan pulslarıyla hızlandırılarak gönderilirler. Ayırma, tüpün sonunda bulunan dedektöre iyonların ilerlemesi sırasında meydana gelir. Bütün iyonlar, aynı kinetik enerjide olduklarından, hızları kütleleri ile ters orantılı olarak değişir (Eşitlik 2-1), bu yüzden hafif partiküller dedektöre daha önce ulaşırlar. Tipik olarak bir iyonun uçuş süresi 1-30 μ s arasında değişir.

$$KE = z e V = \frac{1}{2} m V^2 \quad (\text{Eşitlik 2-1}) \quad KE = \text{Kinetik enerji, } z = \text{yük, } m = \text{iyonun kütlesi}$$

Uçuş zamanlı cihazlar, diğer tipteki kütle spektrometrelerine göre, basitlik, sağlamlık, iyon kaynağının kolayca değiştirilebilmesi ve sınırsız kütle aralığı gibi bazı bakımlardan üstündür. Bununla birlikte, sınırlı ayırma gücü ve duyarlılığı gibi dezavantajları vardır. Birkaç cihaz üreticisi, son zamanlarda uçuş zamanlı cihaz üretmektedir. Ancak uçuş zamanlı cihazlar manyetik sektör ve kuadropol kütle spektrometrelerine göre daha az kullanılmaktadır [369].

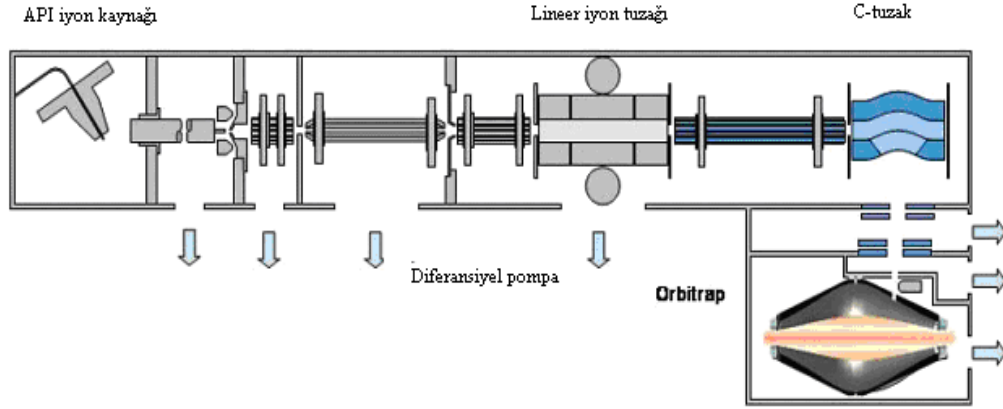


Şekil 2. 13. TOF analizörlü kütle spektrometresi

Şekil 2.13’ de, MALDI tarafından üretilen pozitif iyonların analizini yapan TOF analizörünün şeması görülmektedir. Sonra, lazer darbesi sırasında oluşan, iyonlara uygulanan doğal bir elektrik alan vardır. Sürekli hızlandırılan ve serbest bölgede sürüklenen iyonlar vardır. Bu iyonlar, m/z oranlarına göre serbest bölgede hareket ederler. İyonlar böylece zamanında dağıtılır.

2.13.7.4. İyon Tuzaklı Analizörler

İyon tuzakları, iyon kaynağı ve kütle analizör fonksiyonlarını bir arada taşımaktadırlar. Bir halka elektrot ve iki uç elektrottan oluşan üçlü bir yapısı vardır (Şekil 2.14). İyon kapanlarının özelliği iyon kaynağı oyuğunda oluşan iyonların yakalanması ve saklanmasıdır. Bu da merkezdeki halkasal elektroda radyo frekans voltajı uygulanması ile gerçekleşir. Yakalanmış iyonlar daha sonra kütle seçimli olarak m/z oranlarına göre tespit edilecekleri elektron “multiplier” üzerine gönderilirler. Bu yöntem diğer kütle analizörlerine göre daha hassastır [363]. Tablo 23’te farklı kütle analizörlerinin ana özellikleri görülmektedir.



Şekil 2. 14. İyon tuzaklı kütle analizörünün şeması

Tablo 23. Kütle analizörlerinin karşılaştırılması [367].

	Kuadropol	İyon tuzaklı	TOF	Manyetik sektörlü
Kütle limiti	4000 Th	6000 Th	>1000 000 Th	20 000 Th
Çözünme	2000	4000	5000	100 000
Keskinlik	100 ppm	100ppm	200ppm	< 10 ppm
İyon sampling	Sürekli	Darbeli	Darbeli	Sürekli
Basınç	10^{-5} Torr	10^{-3} Torr	10^{-6} Torr	10^{-6} Torr

Dedektörler

Kütle ayırma kısmından, m/z oranlarına göre demetler halinde ayrılan iyon tanecikler dedektöre gelir. Böyle bir dedektör iyon halindeki taneciklerin enerjilerini elektrik enerjisine çevirir. Elektrik enerjisi haline çevrilen enerji cihazda bulunan bilgisayarın hafızasına kaydedilir, ekranda veya kağıtta görülür hale getirilir.

Böyle bir dedektör birçok dinot ihtiva eder. Art arda gelen dinotlar yükselen potansiyeller altında tutulur. Bu UV ve görünür olan spektrofotometrelerinde kullanılan dinotlu dedektörlere benzer. Katot ve dinotların yüzeyleri Cu/Be 'dan yapılmıştır. Bu yüzeylere enerjetik iyonlar veya elektronlar çarptıkları zaman daha çok elektron fırlatırlar. Sistemde bulunan 20. dinottan fırlayan elektronların sayısı 10^7 ye ulaşır (bir elektrona on milyon elektron).

Kütle spektrometresinde kullanılan bir başka dedektör gümüş bromürlü levhadır. Jelatin içinde emülsiyon halinde dağılmış bulunan gümüş bromür enerjili iyonlara karşı hassastır. Böyle bir dedektör genel olarak spark kaynaklı cihazlarda

kullanılır. Çünkü m/z oranları çok farklı olan, aynı zamanda dedektöre gelen iyonlar için daha uygundur.

Kütle spektrometrisinde kullanılan bir başka dedektör, sintilasyon tipi dedektördür. Böyle bir dedektörde, üzerine kristalin fosforesans bir madde sürülmüş ince bir alüminyum levha bulunur. Bu levha fotomultipliye tübün giriş penceresine yerleştirilir. İyonlar fosforesan maddeye çarpınca, etrafa ışınlar saçılır. Bunlar da fotomultipliye dedektör tarafından algılanır.

Bir başka dedektör de Faraday kollektörü dedektördür. Bu kollektör analizörden gelen iyonlara eğik durumda yerleştirilmiştir. Kollektör elektroda çarpan iyonlar mahfaza kabına yansıtılırlar. Kolektör elektrot ve mahfaza kabı büyük bir direnç üzerinden toprak potansiyeline bağlanır. Mahfaza kabına çarpan pozitif yüklü iyonlar, topraktan dirence, dirençten mahfaza yüzeyine gelen elektronlar tarafından nötralleştirilirler. Böylece direnç üzerinden bir potansiyel düşmesi meydana gelir. Potansiyel düşmesi de yüksek empedanslı bir amplifikatör tarafından yükseltilir. Bu dedektörün cevabı, iyonun kinetik enerjisinden, kimyasal yapısından ve külesinden bağımsızdır. Faraday kolektörü, elektrik ve mekanik olarak basit tasarımlı, ucuz bir dedektördür. Başlıca dezavantajı yüksek empedanslı bir amplifikatöre ihtiyaç göstermesi, böyle bir amplifikatörün de spektrum alma zamanının uzun olmasıdır [360].

Kütle spektrumu küçükten büyüğe veya büyükten küçüğe doğru taranarak kaydedilir. Bu iş için kullanılan kaydediciler UV, IR ve NMR' dakilerden farklıdır. Burada duyarlılık dereceleri gittikçe artan bir seri ayna galvanometreleri kullanılır. İyonlar detektör üzerine düştükleri vakit galvanometreler sapma gösterir. Bundan sonra bir ultraviyole ışını, bir motor tarafından döndürülen ultraviyole ışınlarına hassas bir kağıt üzerine, bir seri pikler oluşturacak şekilde iletilir. Kütle spektroskopisinde sonuç, ya diğer spektroskopik yöntemlerdeki gibi grafik şeklinde (mass spektrumu) ya da alete bağlı bir bilgisayar yardımı ile parçaların bağlı bolluklarını veren bir liste halinde gösterilir [369].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Sağlık Bilimleri Üniversitesinin Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulunun 26.06.2018 tarihli Proje/ Karar No 18/187 olan Araştırma Projesi Değerlendirme Raporuyla (Ek.1) araştırmanın etik açıdan uygun bulunması, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyon Toplantısında verilen 11.12.2018 tarihli Karar No 18 olan toplantı tutanağı (Ek.2) ile 12 ay süreli Bilimsel Araştırma Projesi (BAP) Komisyonu Üyelerince desteklenmesine karar verilmesi, Ankara İl Sağlık Müdürlüğü Sağlık Hizmetleri Başkanlığı Sağlığın Geliştirilmesi Birimi Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Sağlık Uygulama Araştırma Merkezi Tıpta Uzmanlık Eğitim Kurulu (TUEK) 'da izin talebi için alınan 20.12.2018 tarihli 90169164.799.E.2651 sayılı kararın (Ek.3) oybirliği ile uygun görülmesiyle periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin MALDI-TOF MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) aracılığıyla tanımlanmasını amaçladığımız bu çalışma yapılmıştır.

Aralık 2018 ve Nisan 2019 tarihleri arasında, Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı Başkanlığı bünyesindeki kliniğe müracaat eden hastalar arasında yapılan anamnez, tıbbi hikaye ve dental öyküleri alma işlemleri sonrası PAI (Periapikal İndeks)'e göre sınıflandırdığımız 30'ar lı gruplar halinde Retreatment tedavisi gerektiren hastalardan oluşan Grup I, Akut Apikal Apseli hastalardan oluşan Grup II, Kronik Apikal Apseli hastalardan oluşan Grup III, Akut Apikal Periodontitli hastalardan oluşan Grup IV ve Kronik Apikal Periodontitli hastalardan oluşan Grup V şeklinde toplam 150 hastadan alınan örnekler işleme alındı. Bu örneklerin Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığı, Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji kliniği laboratuvarlarında kültürleri yapılmış ve üreyen bakteriler MALDI-TOF MS (Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi) cihazı ile tanımlama işlemine alınmıştır.

Bu çalışma Endodonti Anabilim Dalına ait yapılan işlemler ve Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalına ait yapılan işlemler olmak üzere iki safhada düzenlenmiş olup materyal, gereç ve yöntemler aşağıda anlatıldığı gibi yapılmıştır.

3.1. ENDODONTİ ANABİLİM DALI KLİNİĞİ'NDEKİ ÇALIŞMA METODUNUN AYRINTILARI

3.1.1. Hastadan Demografik Anamnez Bilgileri ile Tedavi Onam Formlarının Alınması

Hastadan alınan anamnez formlarındaki bilgiler, hastanın şikayeti, klinik ve radyografik bulguları ile birlikte yorumlanarak, hastaların şikayetçi olduğu dişlerinin periapikal filmlerini PAI'e göre sınıflandırıp, hangi periapikal doku hastalığı teşhisi konulduğu göz önüne alınarak Retreatment tedavisi gerektiren hastalardan oluşan Grup I, Akut Apikal Apseli hastalardan oluşan Grup II, Kronik Apikal Apseli hastalardan oluşan Grup III, Akut Apikal Periodontitli hastalardan oluşan Grup IV ve Kronik Apikal Periodontitli hastalardan oluşan Grup V şeklinde gruplar oluşturulmuştur. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'nün 1995 tarihindeki açıklamasını, Amerikan Endodontistler Birliği (AAE)'nin 3 Ekim 2008'de Chicago Illinois'de pulpa ve periapikal hastalık durumlarının sınıflandırılmasında kullanılan terminolojiyi standartlaştırma toplantısını ve Ørstavik' in 1986' da tanımladığı PAI sınıflandırmasını yorumlayarak oluşturduğumuz anamnez formu ile birlikte kayıtlarımızı tuttuk. Araştırmada kayıtlarımızı tuttuğumuz hasta anamnez formu ve takip formu, hastadan alınan bilgilendirilmiş gönüllü olur formu, tedavi onam formları Ekler 4,5,6'da gösterilmiştir. Endodonti kliniğine başvuran hastalardan çalışmaya alınma kriterlerine göre oluşturulan gruplardan akut apikal apse tanısı koyulan bir hastanın ekstraoral görüntüsü ve radyografik filmi Şekil 3.1.'de gösterilmiştir. Her hastadan alınan radyografik filmleri PAI sınıflandırmasına göre derecelendirildi. Şekil 3.2.'de PAI sınıflandırması yapılan periapikal lezyonlu diş radyografilerine örnek filmler gösterilmiştir.

3.1.2. Hastaların Araştırmaya Dahil Edilme Kriterleri

Hastalar demografik anamnez bilgileri ile tedavi onam formları alındıktan sonra aşağıda bahsettiğim çalışmaya alınma kriterlerine göre araştırmaya dahil edilmiş veya edilmemişlerdir.

3.1.2.1. Çalışmaya alınma kriterleri

- 18 yaş üzeri olanlar.
- Materyal alınacağı günden en az 4 gün öncesi süreçte hiçbir antimikrobiyal ilaç kullanmamış olanlar.
- Daha önceden sürdürdüğü ağız bakımını, materyal almak için belirlenen tarihe kadar aynen devam ettirenler.
- Enfekte kök kanalında son 1 hafta içerisinde hiç bir hekim girişimi yapılmamış olanlar.

3.1.2.2. Çalışmaya alınmama kriterleri

- 18 yaş altı olanlar.
- Materyal alınacağı günden önceki 4 günlük süreçte antimikrobiyal ilaç kullanmış olanlar.
- Enfekte kök kanalında son 1 hafta içerisinde bir hekim tarafından girişim yapılmış olanlar.
- Sistemik problemi olan ve profilaksi uygulaması gerekebilecek hastalar.



Şekil 3. 1. Periapikal radyografisiyle birlikte akut apikal apseli bir vaka



Şekil 3. 2. PAI sınıflandırması yapılan periapikal lezyonlu diş radyografi örnekleri

3.1.3.Kriterlere Uygun Olan Hastaların Endodonti Kliniği Çalışma Safhası

Çalışmaya dahil edilen hastalardan alınacak örnekler için Endodonti Anabilim Başkanlığı Kliniğinde yapılan işlemler şu şekildedir:

1. Hasta ağız 2 dakika boyunca su ile çalkalandı.

2.Kavite açılmadan önce steril bir pamuk pelet %10 povidon-iodine solüsyonuna batırılarak steril bir presel ile diş üzerine bırakılıp 2 dakika bu şekilde beklendi (Şekil 3.3).



Şekil 3. 3. povidon-iodine %10' luk ve etil alkol %70' lik

3. Hasta ağızı tekrar 2 dakika boyunca su ile çalkalanıp rubber dam ve tükürük emici takıldı. (Şekil 3.4)

4. %70 lik etil alkol içeren steril bir pamuk pelet dişin yüzeyine sarıldı.(Şekil 3.5)



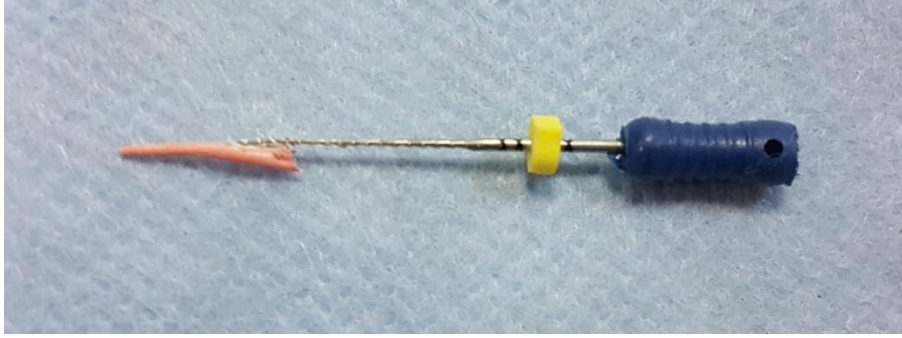
Şekil 3. 4. Hastaya rubber dam uygulaması ile işleme başlama



Şekil 3. 5. Steril bir pamuk pelet ile %70 lik etil alkol sürülen dişin giriş kavitesi açımı

5. Steril bir frez ile kavite açıldı, açıksa genişletildi ve kanal ağız(lar)ı bulundu. Retreatment vakalarında klasik yöntemle H-tipi kanal eğeleri kullanılarak eksik doldurulmuş kök-kanalından gutta-perkaların çıkarılma işlemi yapıldı. (Şekil 3.6)

6. Steril ve uygun çaptaki bir kanal eğesi ile apekse kadar ilerlendi ve hafifçe kazınarak çekildi.



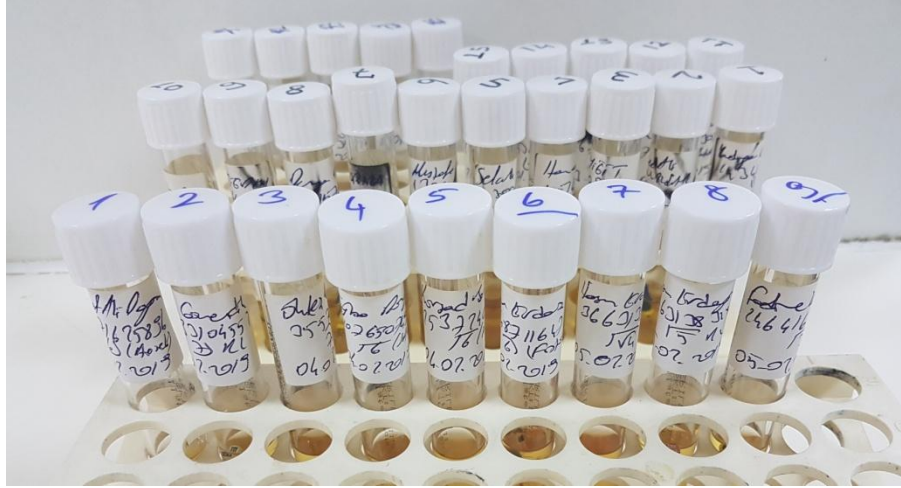
Şekil 3. 6. H tip kanal eğesinde sökülmüş gutta perka

7. Sterilize kağıt koni kanal içerisinde mümkün olan en derin bölgeye ilerletildi. Hasta ağrı duyduğunda 1 mm kadar dışarı çekilmiştir. Hafifçe oynatılarak kanal duvarlarına sürtünmesi sağlanmıştır. Bu şekilde 5-10 saniye beklendi. Sonra dışarı çekildi.

8. Kağıt koni sıvı tiyoglikolat besiyerine (Şekil 3.7.) yerleştirildikten sonra vakit kaybetmeden Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Mikrobiyoloji Kliniği laboratuvarına gönderildi. (Şekil 3.8.)



Şekil 3. 7. Üreme gözlenmeyen ve gözlenen sıvı tiyoglikolat besiyerleri



Şekil 3. 8. Sıvı tiyoglikolat besiyelerinin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarında toplanması

3.1.3.1. Zenginleştirilmiş tiyoglikolat besiyeri

Endodonti kliniğinden alınan örneklerin Tıbbi Mikrobiyoloji laboratuvarına gönderilmesi için yerleştirildiği hazır sıvı tiyoglikolat besiyerinin içeriği şu şekildedir (Tablo 24):

Tablo 24. Zenginleştirilmiş tiyoglikolat besiyeri içeriği

Triptikaz	15,0 gr	Agar	0,75 gr
Resazurin	0,001 gr	L-Sistin	0,5 gr
Dekstroz	5,5 gr	Maya özeti	5 gr
Sodyum Klorid	2,5 gr	Sodyum Tiyoglikolat	0,5 gr
1 Litre Saf Su için Yaklaşık Formül* pH: 7,1±0,2			

29,8 gram içerik, 1 mL hemin solusyonu, 1mL vitamin K1 ve 1gr sodyum bikarbonat 1 litre distile suda çözülür ve final pH'ı 7.1 olarak ayarlanır. Eriyene kadar ısıtılır (1 dakika). 121 °C'de 15 dakika otoklavlanarak steril edilir. 18 mL'lik steril cam tüplere dağıtılarak, karanlık bir ortamda, oda ısısında muhafaza edilir.

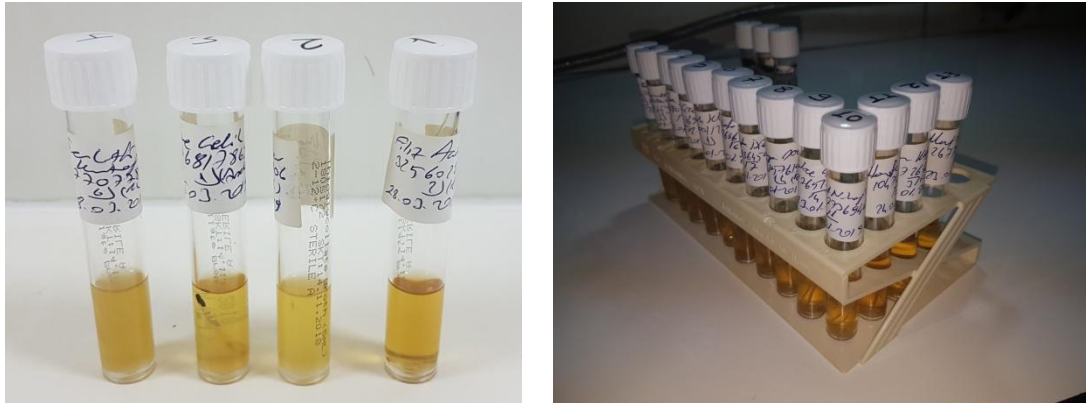
Bu besiyeri, anaerobik atmosferde inkübasyon olmadan mutlakaeroblar dahil olmak üzere çok çeşitli organizmanın iyi bir şekilde büyümesini destekleyebilir. Sodyum tiyoglikolatın bir özelliği, oksidasyon-redüksiyon potansiyelini düşürmenin yanı sıra, mercurial bileşiklerin antibakteriyel aktivitesini nötrleştirme yeteneğinin olmasıdır. Bu özellikler Sıvı Tiyoglikolat Medium'un

biyolojik ve diğer materyallerde kontaminasyon varlığını belirlemek için özellikle faydalıdır. Glikoz, pepton ve maya özütü, bakteri üremesi için gerekli büyüme faktörlerini sağlar. Sodyum tiyoglikolat ve L-sistin, bazı mikroorganizmalara karşı öldürücü olan peroksitlerin birikmesini önleyen indirgeyici ajandır. Resazurin, okside olduğunda pembe ve azaltıldığında renksiz olan bir oksidasyon-redüksiyon göstergesidir.

Anaerop inceleme için alınan örneklerin, uygun transport besiyerleri içinde laboratuvara gönderilmesi, transport besiyeri yoksa hasta başında zenginleştirilmiş tioglikolat broth gibi sıvı anaerop besiyerlerine inokulasyonları önerilir. Oda ısısı, örneklerin transportu için en uygun ısıdır. Çünkü oksijen düşük ısılarda örneğe daha iyi diffüze olur [287, 381].

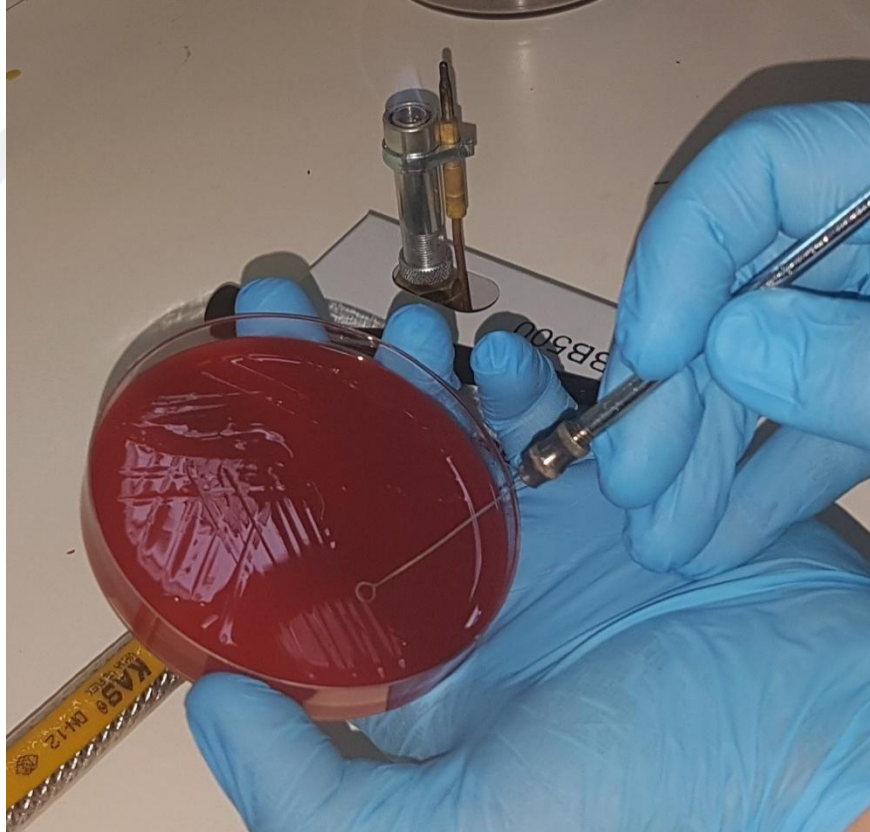
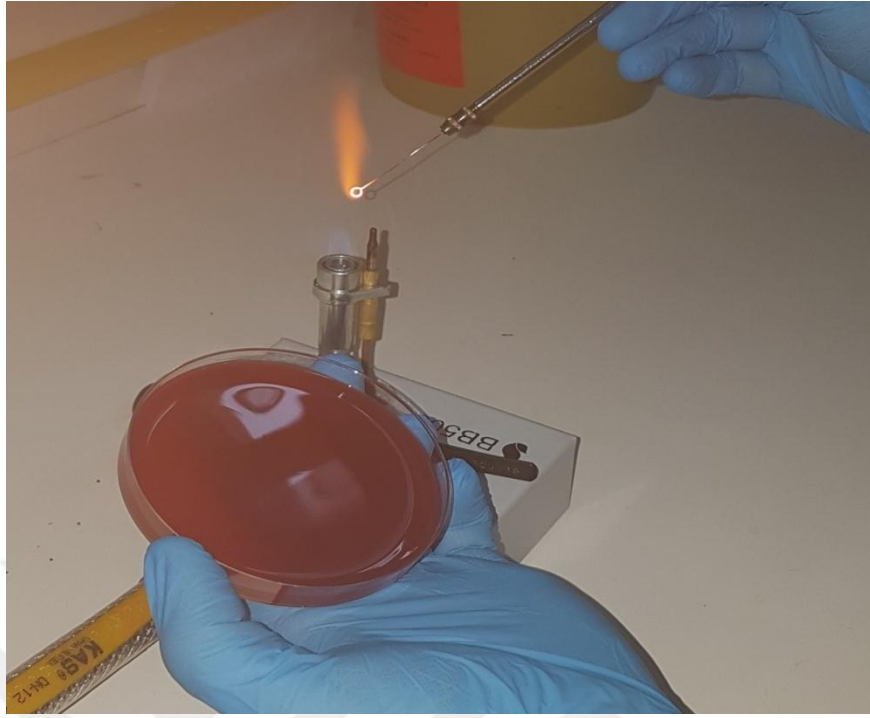
3.2. ENDODONTİ KLİNİĞİNDEN ALINAN ÖRNEKLERİN TIBBİ MİKROBİYOLOJİ LABORATUARINDA ÇALIŞILMA SAFHASI

1. Hastalardan kağıt koni yöntemi ile alınıp tiyoglikolat (vitamin K1 ve hemin içeren) sıvı besiyerine inoküle edilen örnekler 24 saat 37°C'de inkübe edildikten sonra aerop ve anaerop kültür işlemine alındı. (Şekil 3.9.)



Şekil 3. 9. Hastalardan kağıt koni yöntemiyle alınan örneklerin tiyoglikolat (vitamin K₁ ve hemin içeren) sıvı besiyerinin laboratuarda toplanması.

2.Klinik örnekler hem aerop hem de anaerop kültür işlemleri için brucella kanlı agara (vitamin K1 ve hemin içeren) ekildiler. (Şekil 3.10.)



Şekil 3. 10. Brucella kanlı agara ekim yapılırken.

3. Aerop kültürler 37°C'de karbondioksitli ettüvde 24-48 saat inkübe edildi. Anaerop kültürler ise 37°C'de anaerobik atmosferde (%80-85 N₂, %5 H₂, %5-10 CO₂) 5-7 gün inkübe edildi.

4. İnkübasyon süresi sonunda her bir kültürde üreyen farklı morfolojideki bakteri kolonilerinin subkültürleri yapıldı.

3.2.1. Anaerobik İnkübasyon ve Denetlenmesi

Anaerop inkübasyon amacıyla anaerop poşetler, 2,5 lt'lik anaerop kavanozlar (jar) ve anaerop standart inkübasyon konteynır sistemler kullanılır. (BD GasPakTM EZ). Bunların içine ekim yapılan besiyerleri yerleştirilir. 2,5 lt'lik jarda anaerop ortam oluşturabilecek özellikte olan paketler (AnaeroPackTM-Anaero Mitsubishi Gas Chemical, Japan) jarın içine bırakılarak jar hızlıca kapatılır (Şekil 3.11). Anaerop kavanozlar(jar) için bu paketlerden 2 tane kullanılır. Anaerop ortamın oluşup oluşmadığını kontrol etmek amacıyla metilen mavisi emdirilmiş kâğıt stripler (Aerotest, Merck, Germany) dışardan gözlenebilecek şekilde jarın içine yerleştirilir. Bu stribin renginin maviden beyaza dönüşmesi durumunda anaerop ortamın oluştuğu düşünülür. Eğer stripte renk değişikliği 1-2 saat içinde oluşmamışsa yukarıda sayılan işlemler tekrarlanır. Çalışmada 37°C'de 48 saat inkübasyon yapıldı.



Şekil 3. 11. Anaerop kavanoz (jar)

3.2.2. Koyun Kanı (5%), Hemin ve Vitamin K1 ihtiva eden Brucella Agar

Anaeroplara izolasyonunda kullanılan nonselektif besiyeridir. % 5 koyun kanı, hemin ve vitamin K1 içeren Brucella Agar, titiz, zorunlu anaerobik organizmaların izolasyonu ve kültürü için kullanılır. % 5 koyun kanı, hemin ve vitamin K1 içeren Brucella Agar, çok çeşitli zorunlu anaerobik mikroorganizmaların izolasyonu ve kültürü için zenginleştirilmiş, seçici olmayan bir ortamdır. Seçici olmayan ortam, düşük miktarlarda bulunan organizmaları izole etmek numunede mevcut olan organizma sayılarının ve tiplerinin bir göstergesini sağlamak için kullanılır. Brucella Agar, pepton, dekstroz ve maya özü içeriği nedeniyle titiz mikroorganizmaların büyümesini destekler. Koyun kanı bileşenleri, hemin ve K1 vitamini bazı zorunlu anaerobların gerektirdiği büyüme faktörlerini sağlar (Tablo 25).

Tablo 25. 5% koyun kanı, hemin and vitamin K1 ihtiva eden Brucella Agarın içeriği.

Pankreas Kazein Özeti	10.0 gr	Sodyum bisülfid	0.1 gr
Hayvan Dokusunun Peptik Özeti	10.0 gr	Agar	15.0 gr
Dekstroz	1.0 gr	Hemin	0.005 gr
Maya özü	2.0 gr	Vitamin K₁	0.01 gr
Sodyum klorid	5.0 gr	Defibrine Koyun Kanı	% 5

3.2.3. α -Siyano- 4- Hidroksisinnamik Asit

IVD Matrix HCCA ('IVD HCCA'; HCCA = α -Siyano- 4- hidroksisinnamik asit olarak adlandırılır) peptitler ve proteinlerin MALDI-TOF-MS ölçümü için MALDI matris solüsyonunun kolay ve uygun biçimde hazırlanmasını mümkün kılar. Her tüp, ilgili solvent hacmini basit biçimde ekleyerek istenen konsantrasyonun hızlı biçimde hazırlanmasına imkan veren 2,5 ($\pm 0,3$) mg matris içerir.

3.2.4. Etanol-Formik Asit Ekstraksiyonu

Gerekli kimyasallar şunlardır: HCCA Matriks çözeltisi, Deiyonize su, Etanol (EtOH), Asetonitril (ACN), Formik Asit (FA) (%70'lik)(bir kereliğine 10 mL kadar hazırlayıp, stok olarak kullanılabilir.

1) Ependorf tüpün içine 300 mikrolitre deiyonize su alınır, gözle görülebilecek şekilde koloni (5-10 mg) deiyonize suya aktarılır. Pipetle karıştırılıp vortekslenir.

2) 900 mikrolitre EtOH eklenir ve karıştırılır.

3) 2 dk. maksimum hızda sentrifüj yapılır, dipte kalan peletlere zarar vermeyecek şekilde üst faz atılır, yeniden sentrifüj basamağı tekrarlanır, kalan EtOH'ü pipet yardımıyla atılır, EtOH'ün uçması için 2-3 dk. peletler oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. (EtOH'ün tamamen uzaklaştırılması önemlidir.)

4) Peletlerin miktarına göre 1-80 mikrolitre arasında FA eklenir. Eğer hiç pelet görünmüyorsa 5-10 mikrolitre arasında FA uygundur. (Çok fazla pelet olması FA ve ACN kullanımını arttıracığı için pelet miktarını 30-40 mikrolitre FA eklenecek şekilde ayarlamak en uygun miktar olacaktır.)

5) FA eklendikten sonra pipetleme veya vorteks ile karıştırılır.

6) Koyulmuş olan FA ile aynı miktarda ACN eklenir.

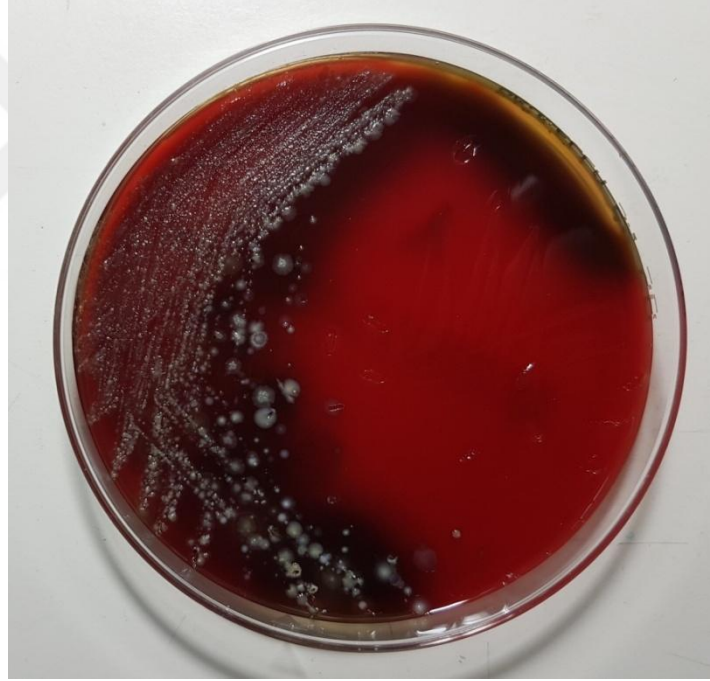
7) 2 dakika maksimum hızda sentrifüj yapılır.

8) Üst fazdan 1 mikrolitre alınır ve target'e (hedef plak'a) aktarılır. Kuruması beklenir. 1 mikrolitre matriks eklenir. Tekrar kuruması beklenir. Hedef plak'a (Target) cihaza yerleştirilir.

3.3. MİKROORGANİZMALARIN MALDI-TOF MS SİSTEMİ İLE TANIMLANMASI

Subkültürü yapılan bakteri kolonilerinin MALDI-TOF MS (Matriks assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry) (Bruker) sistemi ile tanımlanması yapılarak hasta örneklerinden izole edilen fakültatif anaerop ve mutlak anaerop bakterilerin tanımlanması sağlandı.

Çalışmaya aldığımız ve MALDI- TOF ile tanımladığımız tüm anaerop bakteriler Brucella agara pasajlandı (Şekil 3.12), 48 saatlik saflaştırma pasajlarından sonra koloni morfolojisi açısından MALDI - TOF ile identifikasyonu şüpheli olan koloniler ya da MALDI - TOF ile cut-off değeri altında olanlar tekrar MALDI-TOF sistemi ile tanımlandı. (Tablo 26.)

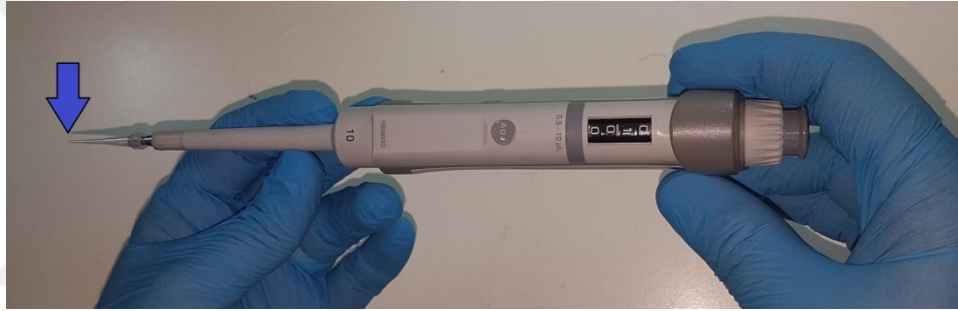


Şekil 3. 12. Brucella kanlı agarda üreyen bakteri kolonileri

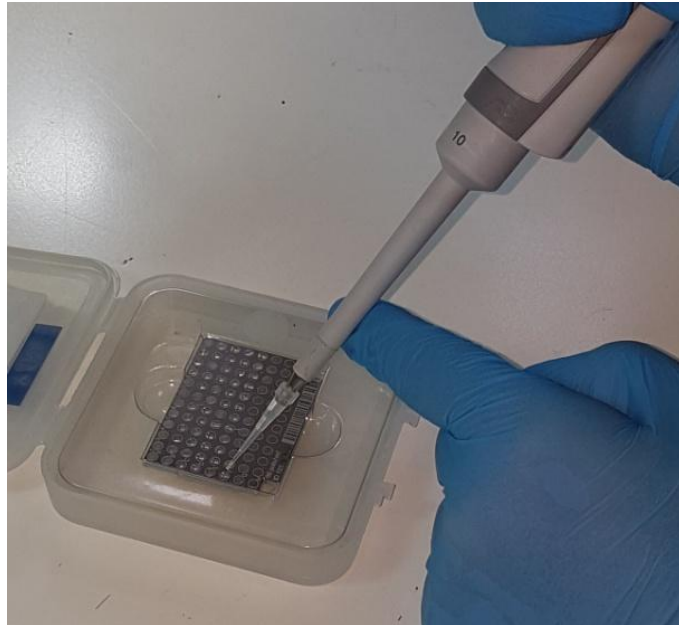
Taze kültürlerden 1-5 koloni alınarak Maldı plağındaki (96 örneklilik paslanmaz çelik tekrar kullanılabilir örnek uygulama plakası) noktasal bölgelere konuldu, örneklerin üzerine 1µL formik asit çözeltisi eklendi ve kurumaları için oda sıcaklığında bekletildi daha sonra örneklerin üzerine 1µL matriks çözeltisi (Bruker Daltonics GmbH HCCA Matriks=siyano 4 hidroksisinnaminik asit) eklendi ve yine oda sıcaklığında kurutuldu. (Şekil 3.13-15)



Şekil 3. 15. Bruker Daltonics GmbH HCCA Matriks= α -Siyano-4-hidroksisinnaminik asit



Şekil 3. 13. Otomatik pipette hazırlanmış 1 μ L matriks çözeltisi



Şekil 3. 14. MSP 96 Target üzerine matriks eklenmesi ve kurumasının beklenmesi

Matriks, örnek moleküllerinin iyonlaşması için gerekli enerjinin lazer ışığından örnek moleküllerine iletilmesini sağlayan bir aracı olarak düşünülebilir. MSP 96 Target, matriks eklenip kuruduktan sonra MALDI-TOF MS sisteminin haznesine yerleştirildi (Şekil 3.16). Çalışmamızda MALDI-TOF-MS sistemi olarak Bruker Daltonics Microflex LT sistemi kullanıldı ve ölçümler üretici firmanın önerdiği ayarlarla yapıldı (Şekil 3.17). 2-20 kDa kütle aralığında, pozitif lineer modda, 337 nm Nitrojen lazeri ile iyonlar oluşturuldu. Elde edilen spektrumlar MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics Microflex LT, Bremen, Germany) sistemi ve MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) kullanılarak analiz edildi (Şekil 3.17).



Şekil 3. 16. MSP 96 Targetin MALDI-TOF MS sistemi haznesine yerleştirilmesi



Şekil 3. 17. MALDI-TOF-MS (Bruker Daltonics Microflex LT) sistemi ve MALDI Biotyper 3.1 yazılımı (Bruker Daltonics, Bremen, Germany)

Çalışmaya dahil edilen her hastadan alınan örneklerin anaerob ve aerob kültürleri yapıldıktan sonra subkültürlerinin etanol-formik asit ekstraksiyon ile Microflex LT sistemi (Bruker Daltonics Inc.) MALDI-TOF MS cihazında tanımlamaları yapıldı. MALDI-TOF MS ile bakteri tanımlamaları yapılırken her çalışmada standart referans suşu “*Bacteroides fragilis* ATCC 25285” kullanıldı.

Bizim analizimizde kullandığımız tanımlama kriterleri, üretici firmanın önerdiği şekilde aşağıdaki tablo 26’ da özetlenmiştir:

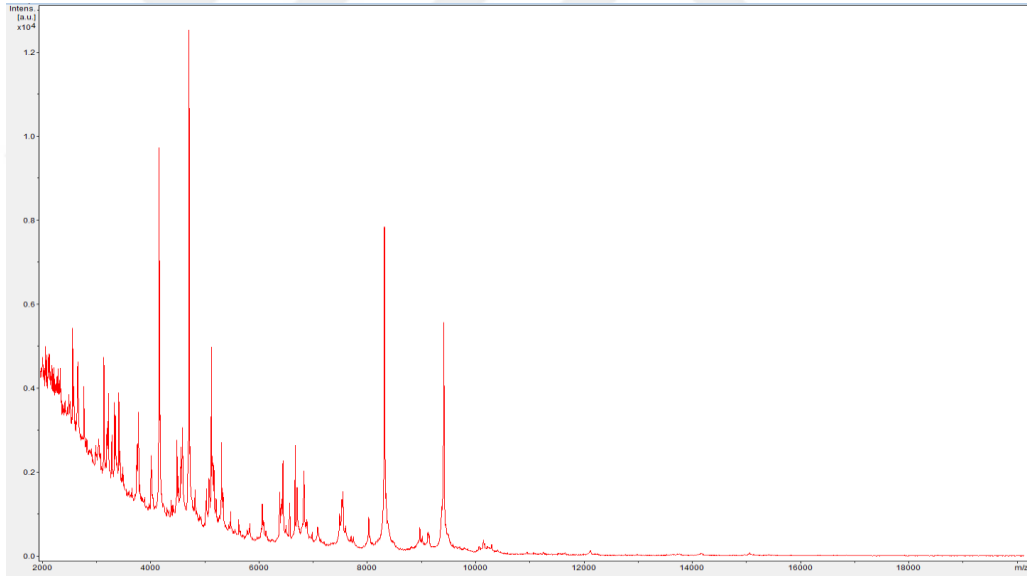
Tablo 26. MALDI-TOF skor değerlerinin anlamı

Skor Aralığı	Açıklama	Sembol	Renk
2.300-3.000	Yüksek olasılıklı tür tanımlaması	(+++)	Yeşil
2.000-2.299	Muhtemel tür, güvenilir cins tanımlaması	(++)	Yeşil
1.700-1.999	Muhtemel cins tanımlaması	(+)	Sarı
1.000-1.699	Güvenilir olmayan tanımlama	(-)	Kırmızı

Skor ≥ 2.000 ise tür düzeyinde güvenli tanımlama (A düzeyi ya da yeşil renk ile temsil ediliyor)

Skor 1.700-1.999 ise cins düzeyinde güvenli tanımlama (B düzeyi ya da sarı renk ile temsil ediliyor)

Skor < 1.700 ise güvensiz sonuç (C düzeyi ya da kırmızı renk ile temsil ediliyor) olarak



Şekil 3. 18. Cihazın analiz ettiği örneklerden tanımlanmış *Enterococcus faecalis*'e ait kütle spektrometresi

4. BULGULAR

Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı Başkanlığı Endodonti kliniğine başvuran çalışmaya gönüllü olarak dahil edilen hastalardan alınan örnekler MALDI-TOF MS ile çalışılarak elde edilen mikroorganizma tanımlanması yapılmıştır. Bu çalışmamızda 150 vakadan 467 izolatu Biotyper system v.3.1. software ile formik asit ekstraksiyonu kullanılarak anaerobik tanımlama işlemleri yapılmıştır. Anaerobik bakterilerin ≤ 1.700 cut-off skorunun altında olan % 5,78 'lik kısmını çalışmaya dahil etmedik. Cut-off skoru ≥ 1.700 olan anaerobik bakterilerin %94,22 cins ve % 65,10 tür seviyelerinde doğru bir şekilde tanımlandı. MALDI-TOF MS Biotyper system v.3.1 ve flexAnalysis kendine özgü programlar ile tanımlamaları yapılan anaerob bakteriler arasında tür düzeyinde güvenli tanımlama yapan ≥ 2.000 skor değeri yüksek olan bakterileri sınıflandırmaya dahil ettiğimiz örneklerden *E.faecalis*'in üç farklı izolatta 3 farklı spektrumlarını Şekil 4.1-4. 'de gösterilmiştir. Birkaç araştırma grubunun, bilimsel topluluk için serbestçe kullanılabilen bazı açık kaynaklı yazılımlardan olan MALDIquant R paket programından yararlanarak spektrumları gözden geçirdik. Örneğin cins düzeyinde güvenli tanımlama yapılan skorları 1.700-1.999 olan bakterilerden *E.faecalis*'in hem Biotyper system v.3.1 flexAnalysis programında gösterilen spektrum hem de R programı MALDIquant 'da gösterilen spektrumları Şekil 4.6-8 'de gösterilmiştir. Çalışmaya dahil etmediğimiz ≤ 1.700 cut-off skorunun altında olanlardan örnek olarak Şekil 4.5 'de gösterilmiştir. R programı ile spektrumunun yoğunluk aralığında değişiklikler yapılabildiği gibi base-line düzeltilebilir (Şekil 4.9-11). Çalışmamızda MALDI-TOF MS ile tanımlanan toplamda 77 tür hem anaerobik hem de aerobik ortamda kültüre edilebilen anaerob bakterilerden oluşan 6 farklı filum altında (*Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Fusobacteri*, *Citrobacter*) ve 3 farklı tür *Candida* 'ları *Ascomycota* filumu altında periapikal doku hastalıklarına göre tablolar oluşturuldu. (Tablo 28-37).

Grup 1'de *Firmicutes* 'lerden *E.faecalis*, *V.parvula*; *Fusobacteria* 'lardan *F.nucleatum*; *Actinobacteria* 'lardan *R.dentocariosa*; *Proteobacteria* 'lardan *N.lactamica*; *Ascomycota* 'lardan *C.glabrata* ;

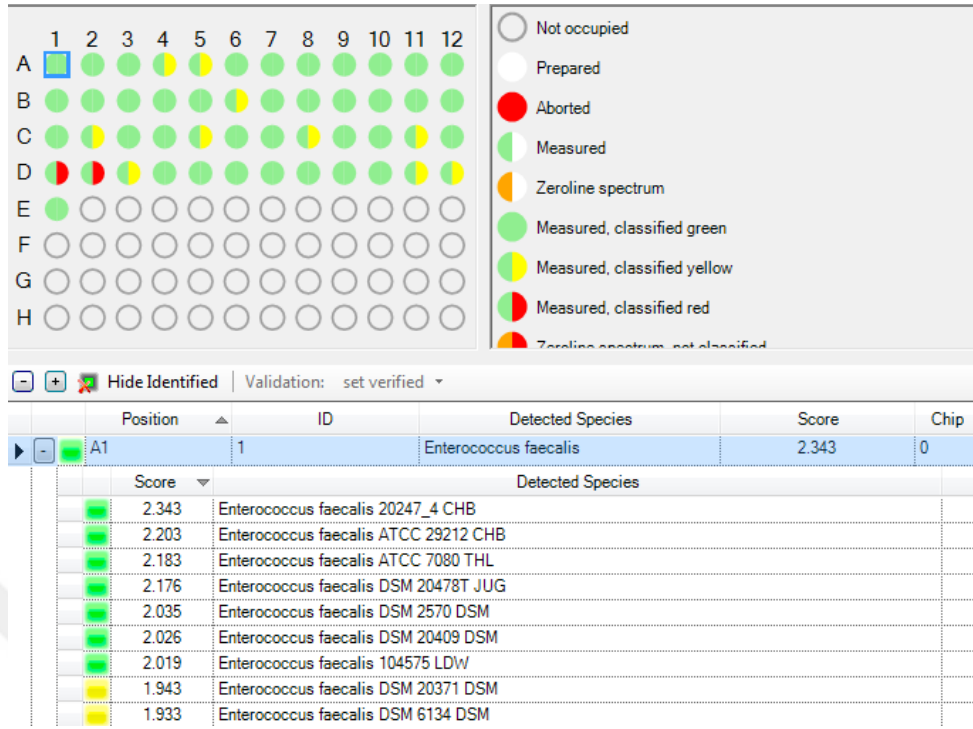
Grup 2’de *Firmicutes*’lerden *E.brachy*, *E.yurii*, *V.atypica*, *V.parvula*, *P.micra*; *Bacteroidetes*’lerden *P.baroniae*, *P.denticola*, *P.nigrescens*; *Actinobacteria*’lardan *A.oris*, *Proteobacteria*’lardan *E.cloacae*, *Ascomycota*’lardan *C.albicans* ve *C.dublinsiensis*;

Grup 3’ te *Firmicutes*’lerden *E.faecalis*, *V.parvula*, *Gemella morbillorum*; *Bacteroidetes*’lerden *P.heparinolytica*, *Actinobacteria*’lardan *Olsenella uli*; *Proteobacteria*’lardan *P.mirabilis*; *Citrobacteria*’lardan *C.freundii*; *Fusobacteria*’lardan *F.nucleatum*; *Ascomycota*’lardan *C.albicans*;

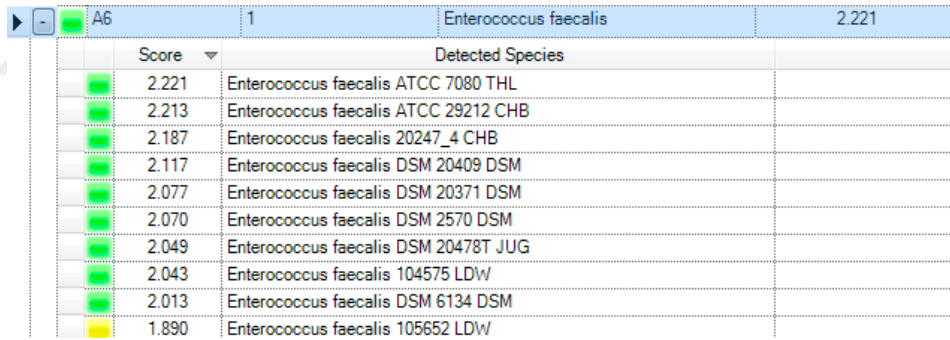
Grup 4’te *Firmicutes*’lerden *E.durans*, *E.faecalis*, *E.faecium*, *P.micra*, *V.parvula*; *Bacteroidetes*’lerden *P.denticola*; *Actinobacteria*’lardan *A.odontolyticus*, *A.oris*, *B. dentium*, *O.profusa*, *O.uli*; *Proteobacteria*’lardan *Kingella denitrificans*, *N.macacae*, *N.subflava*; *Citrobacteria*’lardan *C.freundii*; *Fusobacteria*’lardan *F.nucleatum*; *Ascomycota*’lardan *C.albicans*;

Grup 5’ te *Firmicutes*’lerden *Gemella sanguinis*, *V.parvula*; *Bacteroidetes*’lerden *P.nigrescens*; *Actinobacteria*’lardan *P.denticolens*, *R.denticariosa*, *R.mucilaginoso*; *Proteobacteria*’lardan *N.flavescens* mikroorganizmalar da oral florada sık tespit edilen *Streptococcus* spp. türleri ve *Staphylococcus* spp. türleriyle birlikte tespit edilmiştir. (Tablo 28-37).

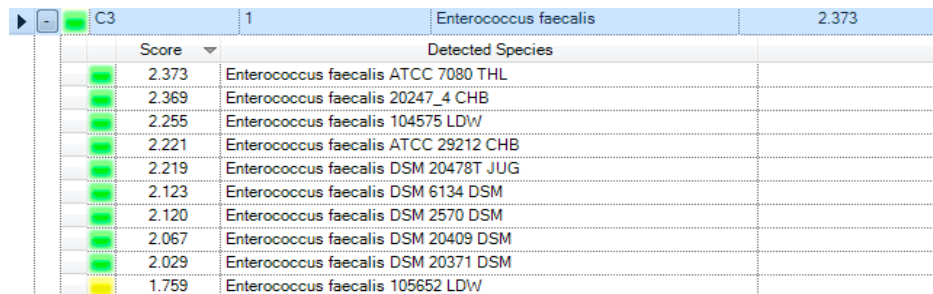
Bahsettiğimiz grupları, periapikal doku hastalıklarını, periapikal indekslerini, hastaların yaşını, cinsiyetlerini Tıbbi Mikrobiyoloji’den gelen sonuçlardaki tanımlanmış mikroorganizma türleriyle bir veri oluşturduk. Bu verilerin istatistiksel analizleri için R Version 3.5.3 R Foundation for Statistical Computing , Vienna, Austria paket programını kullandık.



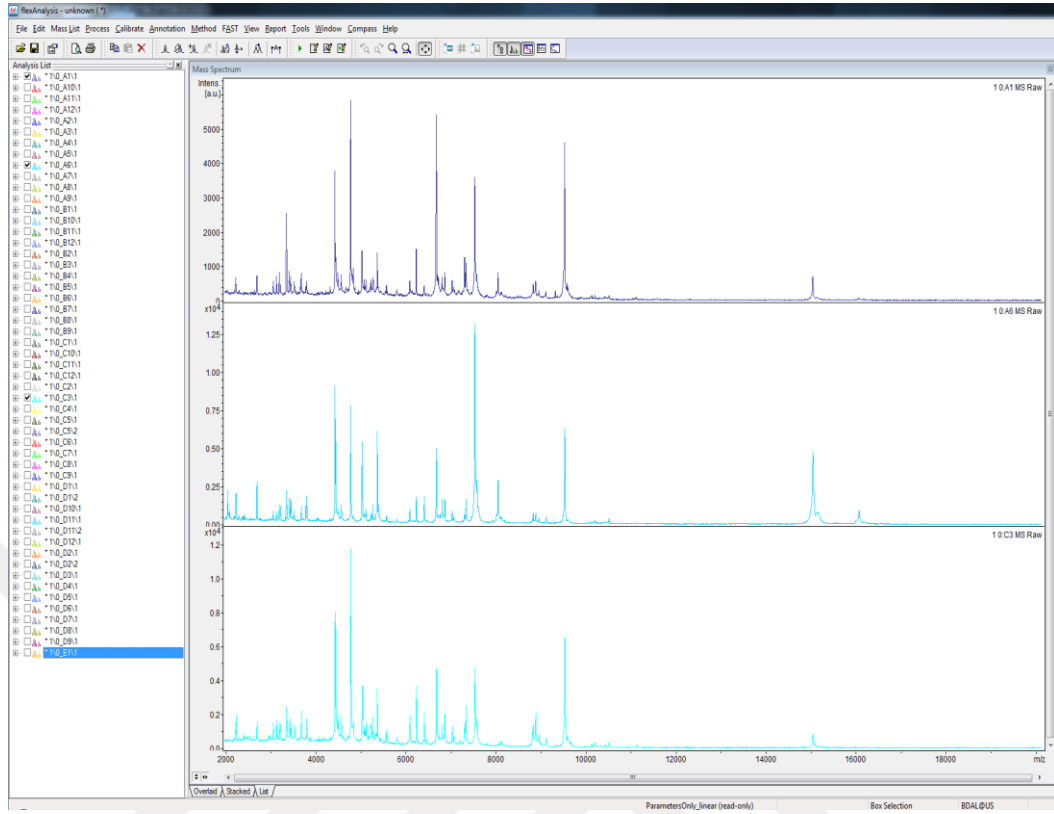
Şekil 4. 1. Retreatment vakalarından birindeki *E.faecalis*'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi.



Şekil 4. 2. Retreatment vakalarından başkabirindeki *E.faecalis*'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi.



Şekil 4. 3. Retreatment vakalarından farklı birindeki *E.faecalis*'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen tür düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi.



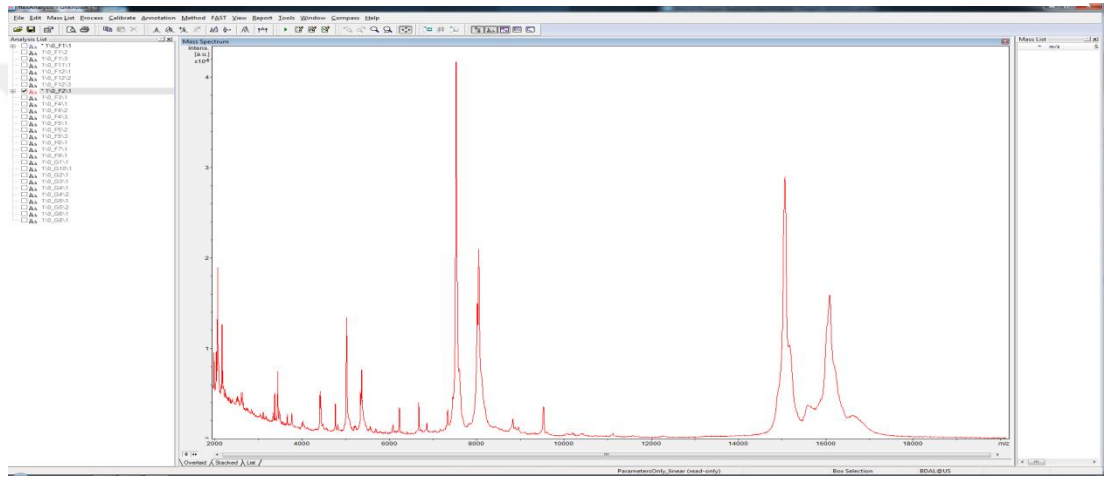
Şekil 4. 4. Retreatment vakalarından üç farklı *E.faecalis*'in MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de flexAnalysis program ile elde edilen kütle spektrometreleri.

Score	Detected Species
1.290	Myroides odoratimimus LMG 4029T HAM
1.242	Enterococcus faecium 20218_1 CHB
1.229	Aromatoleum pretroileum ToN1 MPB
1.225	Aeromonas caviae CECT 838T DSM
1.222	Clostridium beijerinckii 1011_DSM 552 BOG
1.209	Enterococcus faecium VRE_PX_16086218 MLD
1.190	Lactobacillus fructivorans DSM 20203T DSM
1.187	Neisseria meningitidis MB_8295_05 THL
1.184	Sphingomonas paucimobilis B341 UFL
1.182	Neisseria meningitidis MB_8295_05 THL

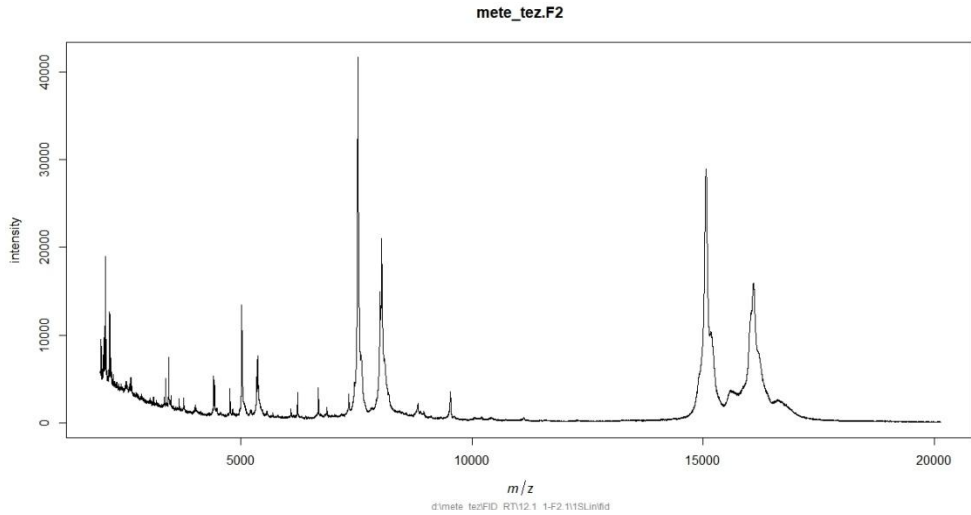
Şekil 4. 5. Çalışmaya dahil etmediğimiz ≤ 1.700 cut-off skorunun altında olanlardan

Score	Detected Species
1.984	Enterococcus faecalis 20247_4 CHB
1.949	Enterococcus faecalis ATCC 7080 THL
1.929	Enterococcus faecalis ATCC 29212 CHB
1.658	Enterococcus faecalis 104575 LDW
1.633	Enterococcus faecalis DSM 20478T JUG
1.600	Enterococcus faecalis DSM 6134 DSM
1.511	Enterococcus faecalis DSM 2570 DSM
1.460	Enterococcus faecalis DSM 20409 DSM
1.430	Enterococcus faecalis DSM 20371 DSM
1.295	Enterococcus faecalis 105523 LDW

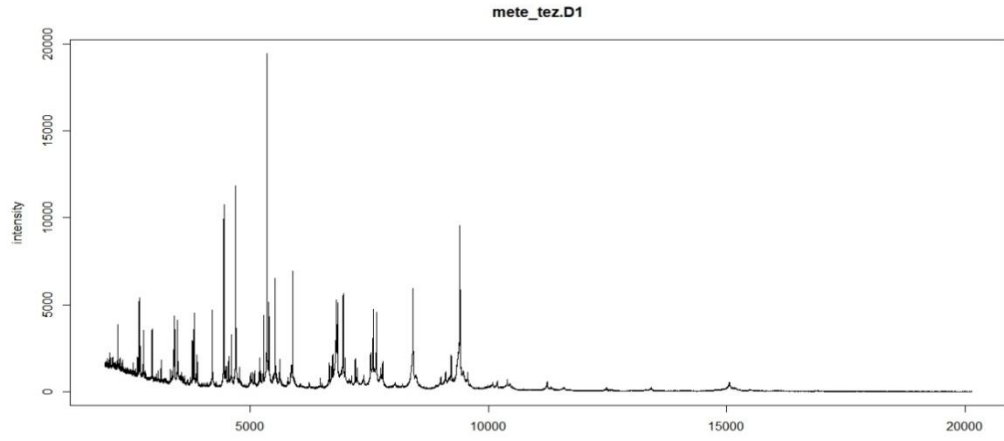
Şekil 4. 6. MALDI-TOF MS Biotyper system v.3 'de tespit edilen edilen 1.700-1.999 olan bakterilerden *E.faecalis*'in cins düzeyinde güvenli tanımlama göstergesi.



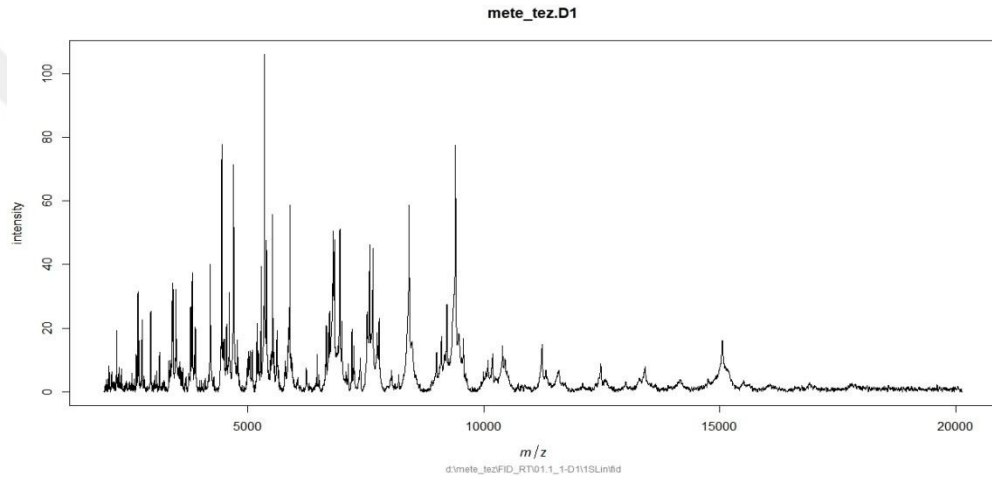
Şekil 4.7. *E.faecalis*'in Biotyper system v.3.1 flexAnalysis programında gösterilen spektrumu.



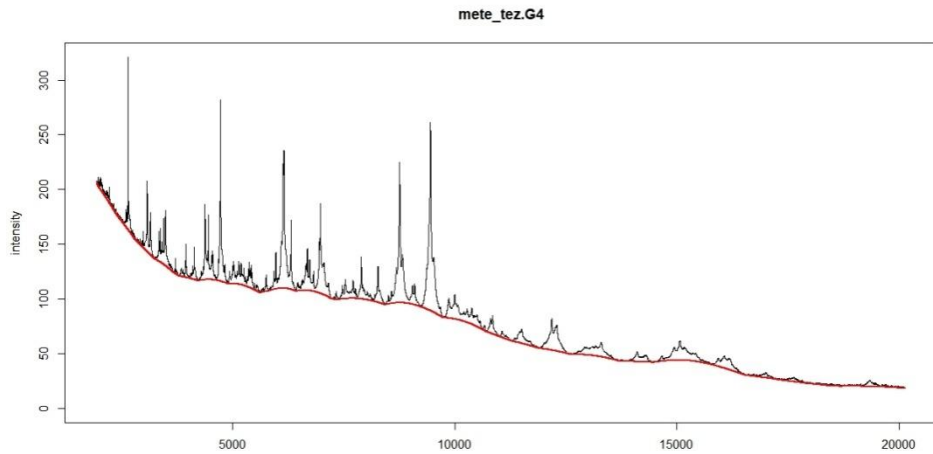
Şekil 4. 8. *E.faecalis*'in R programı MALDIquant 'da gösterilen spektrumu.



Şekil 4. 9.R programı ile spektrumunun yoğunluk aralığında değişiklik yapıldıktan önce



Şekil 4. 10. R programı ile spektrumunun yoğunluk aralığında değişiklik yapılmadan sonra



Şekil 4. 11. R programı ile herhangi bir spektrumunun base-line tespiti

Tablo 27. Retreatment vakalarından alınan örneklere uygulanan anaerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Firmicutes		
Fakültatif Anaerop Gr (+) Kok	Fakültatif Anaerop Gr (+) Kok	Zorunlu Anaerop Gr (-) Kok
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
Fakültatif Anaerop Gr (+) Basil	<i>Streptococcus anginosus</i>	
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>	
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Streptococcus mitis</i>	
<i>Lactobacillus kefir</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>S.parasanguinis</i>	
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	
Actinobacteria	Fusobacteria	Proteobacteria
Zorunlu Anaerop Gr (+) Basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) Basil	Fakültatif Anaerop Gr (-) Kokobasil
<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>H.parainfluenzae</i>
<i>P.acidipropionici</i>		

Tablo 28 Retreatment vakalarından alınan örneklere uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Firmicutes		
Fakültatif Anaerop Gr (+) Kok	Fakültatif Anaerop Gr (+) Basil	
<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>		
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
<i>Streptococcus cristatus</i>		
<i>Streptococcus hominis</i>		
<i>Streptococcus mitis</i>		
<i>Streptococcus oralis</i>		
<i>Streptococcus salivarius</i>		
<i>Streptococcus sanguinis</i>		
<i>Streptococcus vestibularis</i>		
Actinobacteria	Ascomycota	Proteobacteria
Fakültatif Anaerop Gr (+) Kok	Aerop Mantar	Fakültatif Anaerop Gr (+) Diplokok
<i>Rothia aeria</i>	<i>Candida glabrata</i>	<i>Neisseria lactamica</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>		

Tablo 29. Semptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere uygulanan anaerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Firmicutes		
Zorunlu Anaerop Gr (+) kokobasil	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok	Zorunlu Anaerop Gr (-) kok
<i>Eubacterium brachy</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Veillonella atypica</i>
<i>Eubacterium yurii</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
	<i>Streptococcus anginosus</i>	
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	<i>Streptococcus cristatus</i>	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Streptococcus parasanguinus</i>	
	<i>Streptococcus pneumoniae /mitis</i>	
Zorunlu Anaerop Gr (+) kok	<i>Streptococcus salivarius</i>	
<i>Parvimonas micra</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	
Actinobacteria	Proteobacteria	Bacteroidetes
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	Fakültatif Anaerop Gr (-) basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) basil
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Prevotella baroniae</i>
Zorunlu Anaerop Gr (+) basil	<i>Escherichia coli</i>	<i>Prevotella denticola</i>
<i>Cutibacterium acnes</i>		<i>Prevotella nigrescens</i>

Tablo 30. Semptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Actinobacteria	Firmicutes	Proteobacteria
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok	Aerop Gr (-) basil
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	
Ascomycota	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Fakültatif Anaerop Gr (-) basil
Aerop Mantar	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Streptococcus gordonii</i>	
<i>Candida dubliniensis</i>	<i>Streptococcus oralis</i>	Fakültatif Anaerop Gr (-) diplokok
	<i>Streptococcus pneumoniae /mitis</i>	<i>Neisseria macacae</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Neisseria subflava</i>
	Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	

Tablo 31. Asemptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere uygulanan anerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Firmicutes		
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok	Zorunlu Anaerop Gr (-) kok
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Veillonella parvula</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Gemella morbillorum</i>	
<i>Lactobacillus gasseri</i>	<i>Staphylococcus hominis</i>	
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Streptococcus anginosus</i>	
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Streptococcus cristatus</i>	
	<i>Streptococcus constellatus</i>	
	<i>Streptococcus vestibularis</i>	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	
	<i>Streptococcus mitis</i>	
	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	
Actinobacteria	Proteobacteria	Bacteroidetes
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	Fakültatif Anaerop Gr (-) basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) basil
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
Zorunlu Anaerop Gr (+) basil		<i>Prevotella buccae</i>
<i>Cutibacterium acnes</i>		<i>Prevotella heparinolytica</i>
<i>Olsenella uli</i>		
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>		
Citrobacter	Fusobacteria	Ascomycota
Fakültatif Anaerop Gr (-) basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) Basil	Aerop Mantar
<i>Citrobacter freundii</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Candida albicans</i>

Tablo 32. Asemptomatik Apikal Apse tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere uygulanan aerop kültür işlemlerinden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Proteobacteria	Firmicutes
Fakültatif Anaerop Gr (-) diplokok	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok
<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Streptococcus gordonii</i>
Aerop Gr (-) basil	<i>Streptococcus oralis</i>
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>
Actinobacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Fakültatif Anaerop Gr (+) kok	<i>Streptococcus parasanguinis</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>	<i>Streptococcus sanguinis</i>
	<i>Streptococcus vestibularis</i>
Ascomycota	Fakültatif Anaerop Gr (+) basil
Aerop Mantar	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Candida albicans</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>

Tablo 33. Semptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere anaerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Actinobacteria	Bacteroidetes	Firmicutes
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) basil	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	<i>Prevotella buccae</i>	<i>Enterococcus durans</i>
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Prevotella denticola</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Prevotella oralis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
Zorunlu Anaerop Gr (+) basil	<i>Prevotella oris</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Bifidobacterium dentium</i>		<i>Staphylococcus epidermidis</i>
<i>Cutibacterium acnes</i>		<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Olsenella profusa</i>		<i>Streptococcus parasanguinus</i>
<i>Olsenella uli</i>		<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>Propionibacterium acidifaciens</i>		<i>Streptococcus vestibularis</i>
<i>Propionibacterium freudenreichii</i>		
<i>Slackia exigua</i>		Fakültatif Anaerop Gr (+) basil
		<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Proteobacteria	Fusobacteria	<i>Lactobacillus oris</i>
Fakültatif Anaerop Gr (-) basil	Zorunlu Anaerop Gr (-) basil	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Kingella denitrificans</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Fakültatif Anaerop Gr (-) kokobasil		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	Citrobacter	<i>Lactobacillus vaginalis</i>
Fakültatif Anaerop Gr (-) diplokok	Fakültatif Anaerop Gr (-) basil	
<i>Neisseria macacae</i>	<i>Citrobacter freundii</i>	Zorunlu Anaerop Gr (+) kok
		<i>Parvimonas micra</i>
		Zorunlu Anaerop Gr (-) kok
		<i>Veillonella atypica</i>
		<i>Veillonella parvula</i>

Tablo 34. Semptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere aerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Ascomycota	Firmicutes
Aerop Mantar	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok
<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
	<i>Enterococcus faecium</i>
	<i>Gemella morbillorum</i>
	<i>Staphylococcus capitis</i>
Proteobacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Fakültatif Anaerop Gr (-) diplokok	<i>Staphylococcus hominis</i>
<i>Neisseria subflava</i>	<i>Streptococcus mitis</i>
	<i>Streptococcus salivarius</i>
Actinobacteria	Fakültatif Anaerop Gr (+) basil
Fakültatif Anaerop Gr (+) basil	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Actinomyces oris</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>

Tablo 35. Aseptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere anaerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Bacteroidetes	Firmicutes	
Zorunlu Anaerop Gr (-) basil	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok	Fakültatif Anaerop Gr (+) basil
<i>Prevotella nigrescens</i>	<i>Gemella sanguinis</i>	<i>Lactobacillus brevis</i>
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Lactobacillus casei</i>
Fusobacteria	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>
Zorunlu Anaerop Gr (-) basil	<i>Streptococcus anginosus</i>	<i>Lactobacillus fermentum</i>
<i>Fusobacterium periodonticum</i>	<i>Streptococcus mutans</i>	<i>Lactobacillus oris</i>
	<i>Streptococcus parasanguinus</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
Actinobacteria	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Zorunlu Anaerop Gr (+) basil	<i>Streptococcus sanguinis</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<i>Lactobacillus salivarius</i>
<i>Parascardovia denticolens</i>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
		Zorunlu Anaerop Gr (-) kok
		<i>Veillonella dispar</i>
		<i>Veillonella parvula</i>

Tablo 36. Aseptomatik Apikal Periodontit tanısı koyulan vakalardan alınan örneklere aerop kültür işleminden sonra MALDI-TOF MS cihazıyla tanımlanabilen mikroorganizmaların listesi.

Actinobacteria	Proteobacteria	Firmicutes
Zorunlu Anaerop Gr (+) basil	Fakültatif Anaerop Gr (-) diplokok	Fakültatif Anaerop Gr (+) kok
<i>Cutibacterium acnes</i>	<i>Neisseria flavescens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	<i>Neisseria mucosa</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
Fakültatif Anaerop Gr (+) kok		<i>Streptococcus anginosus</i>
<i>Rothia dentocariosa</i>		<i>Streptococcus mutans</i>
<i>Rothia mucilaginosa</i>		<i>Streptococcus oralis</i>
		<i>Streptococcus parasanguinus</i>
		<i>Streptococcus salivarius</i>
		Fakültatif Anaerop Gr (+) basil
		<i>Lactobacillus fermentum</i>
		<i>Lactobacillus paracasei</i>
		<i>Lactobacillus salivarius</i>

4.1. İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

Kümeleme analizi yöntemi olarak hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Veriler kesikli ve sürekli değişkenler içerdiği için farklı kategorik ve sayısal değerler arasındaki mesafeyi hesaplamak için Gower Distance mesafe ölçüm yönteminden yararlanılmıştır. Kümeleme analizi için Lance – Williams algoritması ile kümeler arası mesafe için Ward yöntemi kullanılmıştır. Tüm grupların hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramları Şekil 4.12-16 gösterilmiştir. Tüm gruplar için oluşturulan kümelerin doğruluk analizleri (validation = validasyon) ise validasyon ölçümlerinden Silhoutte, Dunn, Connectivity, FOM, ADM, AD, APN yapılabilir. Silhoutte validasyon ölçümünde dörtlü kümeleme yöntemlerinin doğruluk analizi uyumludur. Validasyon analizleri Şekil 4.17-21 de gösterilmiştir.

Çalışmada Grup1 Retreatment, Grup 2 Semptomatik Apikal Apse, Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse, Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontit ve Grup 5 Asemptomatik Apikal Periodontit olarak gruplandığımız periapikal doku hastalıklarını, periapikal indeksleri, hastaların yaşı, cinsiyetleri ve 80 türden oluşan çok değişkenli veri içerdiğinden dolayı yapılan kümeleme analizinde birbirine en çok benzeyenlerin aynı kümede yer aldıkları görülmüştür.

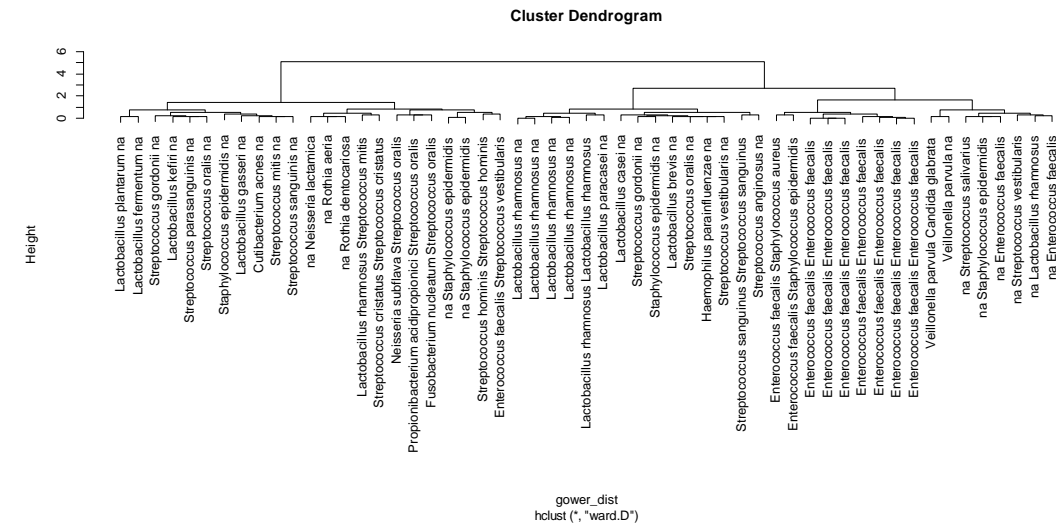
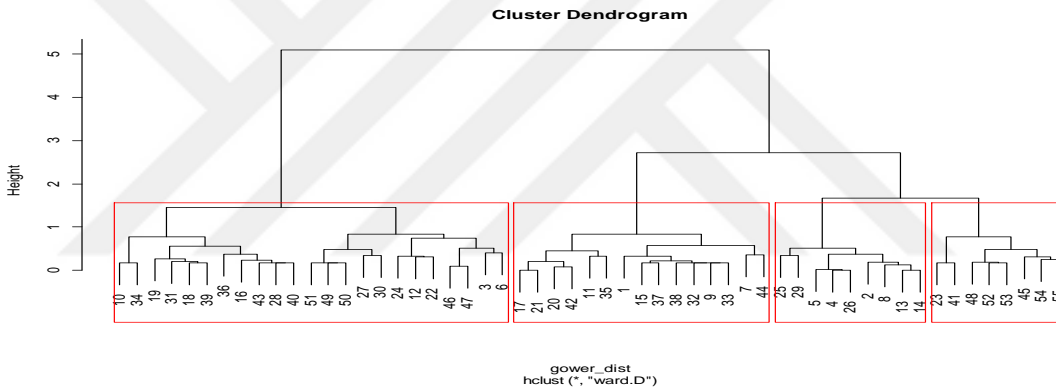
Çok değişkenli istatistik yöntemlerinden biri olan ve çok sayıda ve karmaşık yapıda veri içeren bir alandaki verileri gruplandırmak ve oluşan grupları karşılaştırmak amacıyla kullanılan kümeleme analizi, kullanımının kolay ve sonuçlarının anlaşılır olması nedeniyle sıkça başvurulan bir yöntemdir. Veri madenciliğinin bir alt türü olan bu yöntemde veriler uzaklık ve benzerliklerine göre kümelere ayrılarak, kümeler arasındaki farklılıklar ve nedenleri üzerinde durulur. Birbirine en çok benzeyen birimler aynı kümelerde toplanırlar. Bu tür kümeler kendi içlerinde homojen diğer kümelerle heterojen durumdadırlar.

4.1.1. Grup 1 Retreatment Vakalarında Hiyerarşik Kümeleme

Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:

Grup 1 Retreatment vakalarında sınıflandırılan periapikal doku hastalıkları, periapikal indeks, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik ve uzaklıklarına göre oluşan dörtlü kümelemelere göre en çok benzerliği olan *Enterococcus faecalis*'in 21 ve 23 yaşındaki PAI 4 olan kadın vakalardaki ilişki tespit edildi; en çok benzeşmeyen türler *Veillonella parvula* ile *Candida glabrata* 'nın 24 yaşındaki PAI 5 olan kadın vaka ve *Propionibacterium acidipropionici* ile *Streptococcus oralis*'in 61 yaşındaki PAI 3 olan erkek vaka arasındaki ilişki tespit edildi.

```
R Console
>
> #' Print most similar microbiota
> rt[which(gower_mat == min(gower_mat[gower_mat != min(gower_mat)]), arr.ind = TRUE)[1, ], ]
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
26 RT K 21 4 Enterococcus faecalis Enterococcus faecalis
4 RT K 23 4 Enterococcus faecalis Enterococcus faecalis
> #' Print most dissimilar microbiota
> rt[which(gower_mat == max(gower_mat[gower_mat != max(gower_mat)]), arr.ind = TRUE)[1, ], ]
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
23 RT K 24 5 Veillonella parvula Candida glabrata
12 RT E 61 3 Propionibacterium acidipropionici Streptococcus oralis
```



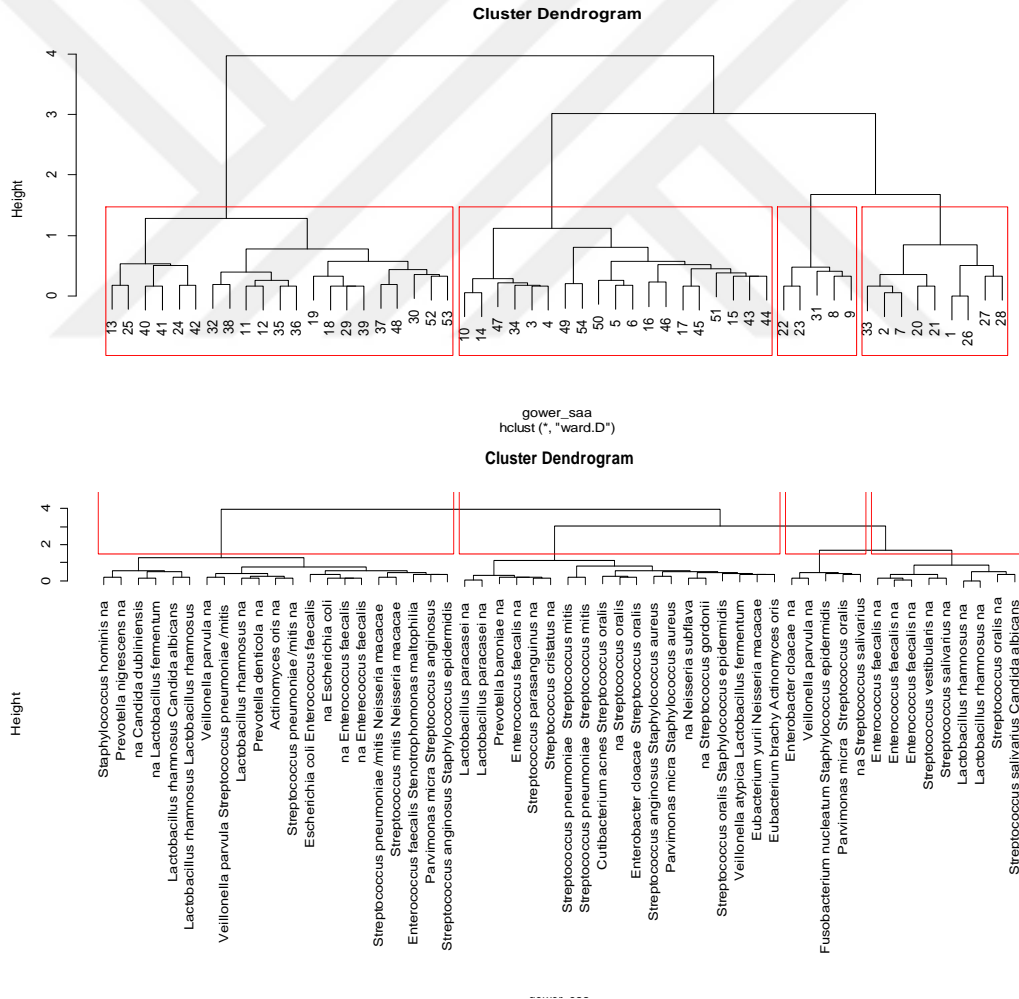
Şekil 4. 12. Grup 1 retreatment vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.

4.1.2. Grup 2 Semptomatik Apikal Apse Vakalarında Hiyerarşik

Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:

Grup 2 Semptomatik Apikal Apse vakalarında sınıflandırılan periapikal doku hastalıkları, periapikal indeks, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik ve uzaklıklarına göre dörtlü kümelemelere göre en çok benzerliği olan *Lactobacillus rhamnosus*'un 20 ve 18 yaşlarındaki PAI 3 erkek vakalarda tespit edildi; en çok benzeşmeyen türler *Streptococcus vestibularis* 'in 69 yaşında PAI 3 erkek vaka ile *Escherichia coli*'in 19 yaşında PAI 5 kadın vaka arasındaki ilişki tespit edildi.

```
> #' Print most similar microbiota
> saa[which(gower_mat_saa == min(gower_mat_saa[gower_mat_saa != min(gower_mat_saa)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
26 SAA E 20 3 Lactobacillus rhamnosus na
1 SAA E 18 3 Lactobacillus rhamnosus na
> #' Print most dissimilar microbiota
> saa[which(gower_mat_saa == max(gower_mat_saa[gower_mat_saa != max(gower_mat_saa)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
20 SAA E 68 3 Streptococcus vestibularis na
18 SAA K 19 5 na Escherichia coli
```



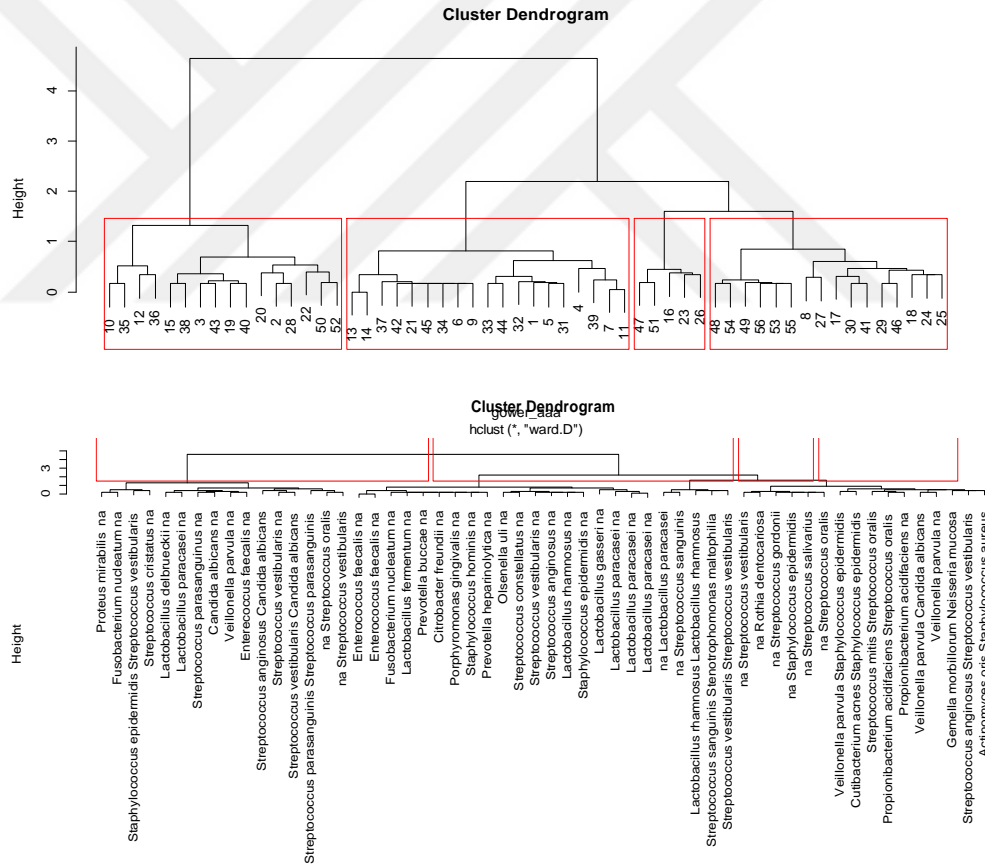
Şekil 4. 13. Grup 2 semptomatik apikal apseli vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.

4.1.3. Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse Vakalarında Hiyerarşik

Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:

Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse vakalarında sınıflandırılan periapikal doku hastalıkları, periapikal indeks, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik ve uzaklıklarına göre dörtlü kümelemelere göre en çok benzerliği olan *Lactobacillus paracasei*'in 26 ve 40 yaşlarındaki PAI 5 erkek vakalarda tespit edildi; en çok benzeşmeyen türler *Gemella morbillorum* ile *Neisseria mucosa*'nın 18 yaşında PAI 5 erkek vaka ile *Staphylococcus epidermidis* ile *Streptococcus vestibularis*'in 63 yaşında PAI 3 kadın vaka arasındaki ilişki tespit edildi.

```
> #' Print most similar microbiota
> aaa[which(gower_mat_aaa == min(gower_mat_aaa[gower_mat_aaa != min(gower_mat_aaa)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
11 AAA E 26 5 Lactobacillus paracasei na
7 AAA E 40 5 Lactobacillus paracasei na
> #' Print most dissimilar microbiota
> aaa[which(gower_mat_aaa == max(gower_mat_aaa[gower_mat_aaa != max(gower_mat_aaa)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
18 AAA E 18 5 Gemella morbillorum Neisseria mucosa
12 AAA K 63 3 Staphylococcus epidermidis Streptococcus vestibularis
>
```



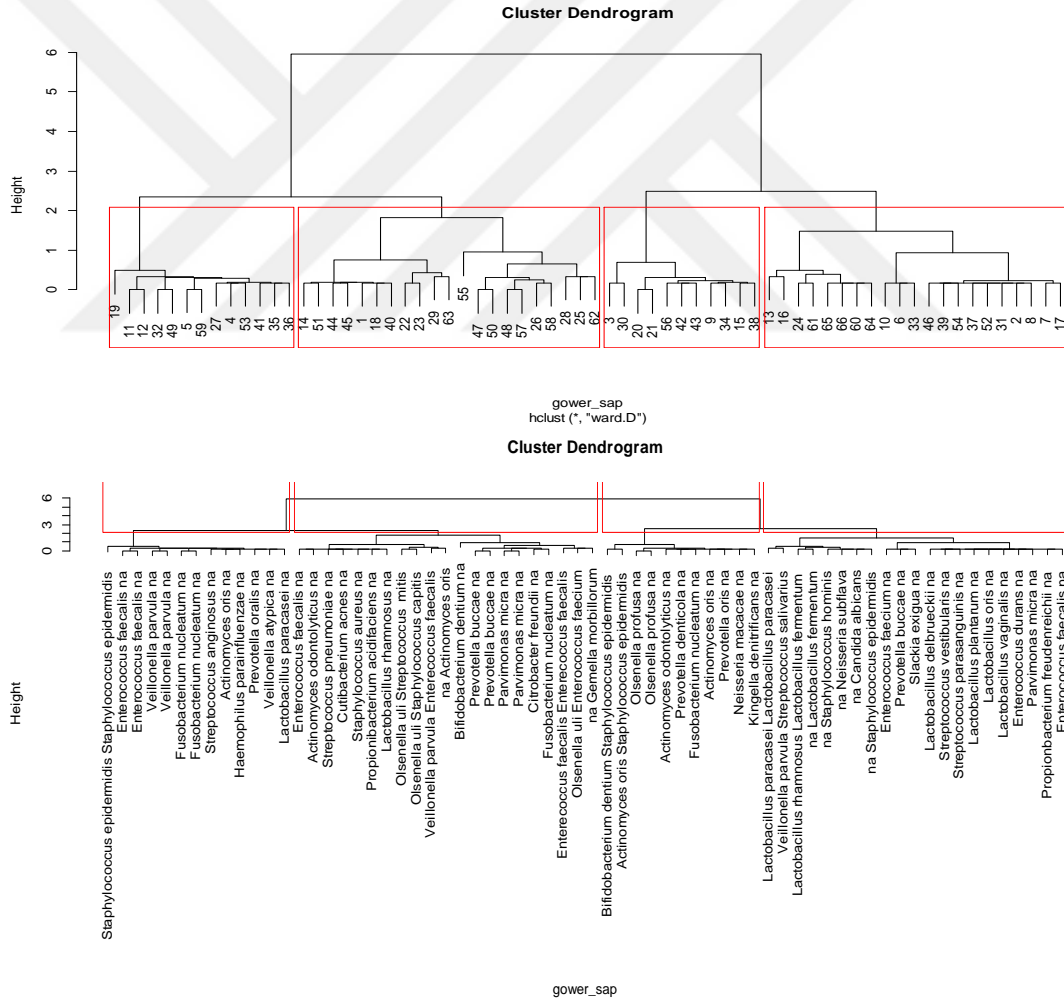
Şekil 4. 14. Grup 3 asemptomatik apikal apseli vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dörtlü kümelemeleri ve dendrogramı.

4.1.4. Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontit Vakalarında Hiyerarşik

Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:

Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontitis vakalarında sınıflandırılan periapikal doku hastalıkları, periapikal indeks, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik ve uzaklıklarına göre dördü kümelemelere göre en çok benzerliği olan *Enterococcus faecalis*'in 48 ve 50 yaşlarındaki PAI 3 erkek vakalarda tespit edildi; en çok benzeşmeyen türler *Gemella morbillorum* ile *Neisseria mucosa*'nın 18 yaşında PAI 5 erkek vaka ile *Bifidobacterium dentium*'ün 41 yaşında PAI 3 kadın vaka ile *Lactobacillus paracasei*'in 20 yaşında PAI 3 erkek vaka arasındaki ilişki tespit edildi.

```
> #' Print most similar microbiota
> sap[which(gower_mat_sap == min(gower_mat_sap[gower_mat_sap != min(gower_mat_sap)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
12 SAP K 48 3 Enterococcus faecalis na
11 SAP K 50 3 Enterococcus faecalis na
> #' Print most dissimilar microbiota
> sap[which(gower_mat_sap == max(gower_mat_sap[gower_mat_sap != max(gower_mat_sap)]), arr.ind = T$
Tani Cinsiyet Yas PAI Anaerop Aerop
55 SAP K 413 Bifidobacterium dentium na
13 SAP E 20 3 Lactobacillus paracasei Lactobacillus paracasei
```

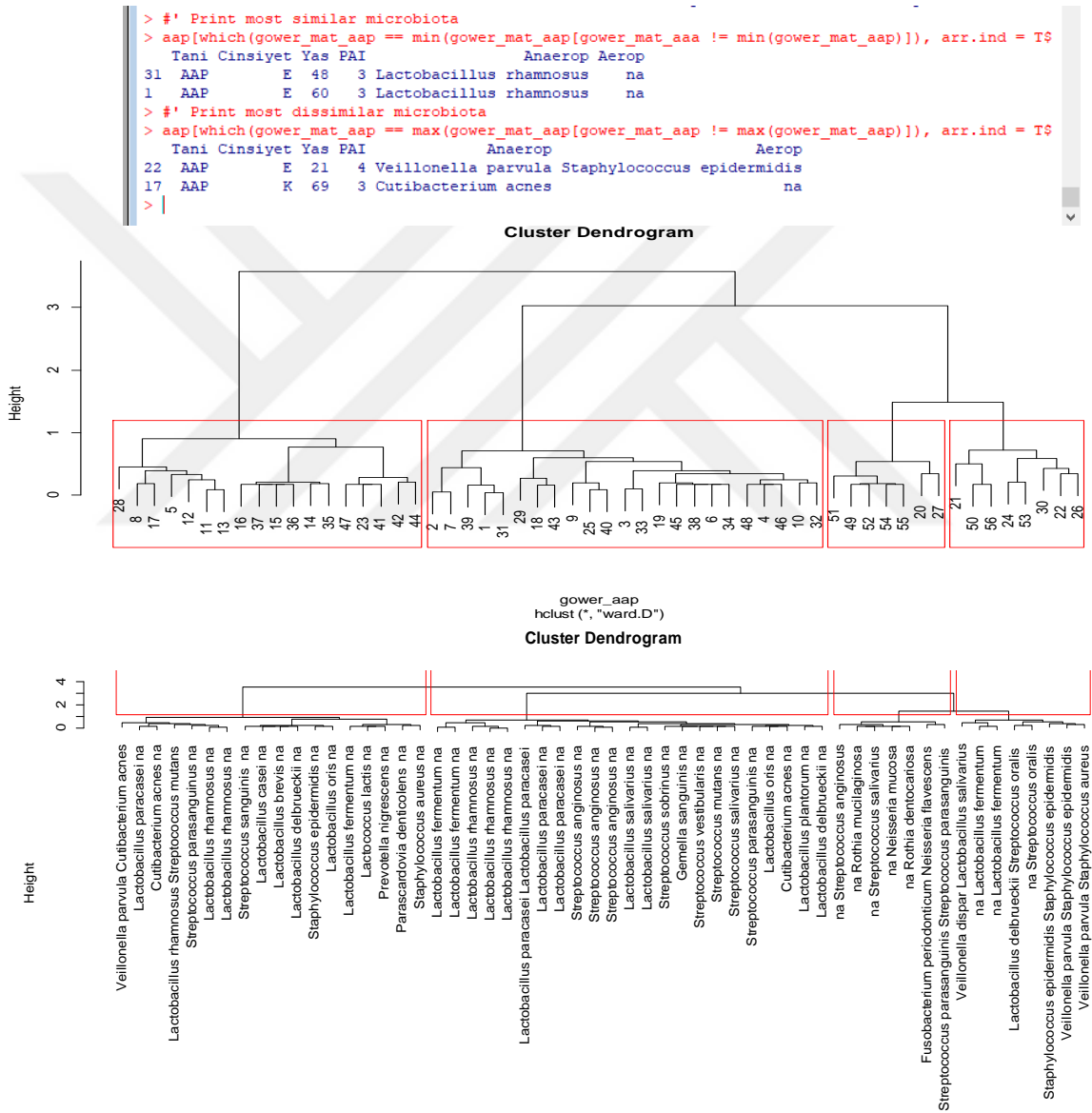


Şekil 4. 15. Grup 4 semptomatik apikal periodontitis vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dördü kümelemeleri ve dendrogramı.

4.1.5. Grup 5 Asemptomatik Apikal Periodontit Vakalarında Hiyerarşik

Kümeleme Yöntemine Göre Mikroorganizma Türlerinin Sınıflandırılması:

Grup 5 Asemptomatik Apikal Periodontitis vakalarında sınıflandırılan periapikal doku hastalıkları, periapikal indeks, yaş ve cinsiyet açısından benzerlik ve uzaklıklarına göre dördü kümelemelere göre en çok benzerliği olan *Lactobacillus rhamnosus*'un 48 ve 60 yaşlarındaki PAI 3 erkek vakalarda tespit edildi; en çok benzeşmeyen türler *Veillonella parvula* ve *Staphylococcus epidermidis*' in 21 yaşında PAI 4 erkek vaka ile *Cutibacterium acne*'nin 69 yaşında PAI 3 kadın vaka arasındaki ilişki tespit edildi.



Şekil 4. 16. Grup 5 asemptomatik apikal periodontitis vakalarının hiyerarşik kümeleme yönteminde benzerlik ve benzeşmeyenlere göre oluşan dördü kümelemeleri ve dendrogramı.

4.2. VALİDASYON SONUÇLARI

4.2.1. Grup 1 Retreatment Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları

Grup 1 retreatment vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçlarında APN validasyon ölçümünün optimal skoru 0.0000 hiyerarşik ikili, üçlü, dördü kümelemelere; ADM validasyon ölçümünün optimal skoru 0.0000 hiyerarşik ikili, üçlü, dördü kümelemelere, Silhouette validasyon ölçümünün optimal skoru 0.3721 hiyerarşik dördü kümelemeye göre doğruluğu tespit edildi. (Şekil 4.17.)

```
> summary(valid_test_rt)

Clustering Methods:
  hierarchical

Cluster sizes:
  2 3 4 15

Validation Measures:

                2         3         4         15
hierarchical APN      0.0000  0.0000  0.0000  0.0085
              AD      1.1497  0.9686  0.8758  0.4748
              ADM      0.0000  0.0000  0.0000  0.0157
              FOM      0.1185  0.1026  0.0944  0.0666
              Connectivity 0.0000  4.9690  9.5056  50.1004
              Dunn      0.6358  0.4882  0.4414  0.6519
              Silhouette 0.3579  0.3567  0.3721  0.2953

Optimal Scores:

      Score Method   Clusters
APN      0.0000 hierarchical 2
AD       0.4748 hierarchical 15
ADM      0.0000 hierarchical 2
FOM      0.0666 hierarchical 15
Connectivity 0.0000 hierarchical 2
Dunn     0.6519 hierarchical 15
Silhouette 0.3721 hierarchical 4
```

Şekil 4. 17. Grup 1 retreatment vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları

4.2.2. Grup 2 Semptomatik Apikal Apse Vakaların Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları

Grup 2 semptomatik apikal apse vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçlarında Silhouette validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.4059 hiyerarşik dördlü kümelemeye göre doğruluğu tespit edildi. (Şekil 4.18.)

```
> summary(valid_test_saa)

Clustering Methods:
hierarchical

Cluster sizes:
2 3 4 15

Validation Measures:

                2      3      4      15
hierarchical APN    0.0000 0.0062 0.0020 0.0120
              AD    1.0842 0.9298 0.8188 0.3868
              ADM    0.0000 0.0175 0.0030 0.0177
              FOM    0.1136 0.0997 0.0877 0.0536
              Connectivity 1.0694 4.4937 8.4857 52.1925
              Dunn    0.6370 0.4254 0.5573 0.6182
              Silhouette 0.3646 0.3776 0.4059 0.3799

Optimal Scores:

      Score Method  Clusters
APN    0.0000 hierarchical 2
AD     0.3868 hierarchical 15
ADM    0.0000 hierarchical 2
FOM    0.0536 hierarchical 15
Connectivity 1.0694 hierarchical 2
Dunn   0.6370 hierarchical 2
Silhouette 0.4059 hierarchical 4
```

Şekil 4. 18. Grup 2 semptomatik apikal apseli vakaların kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları

4.2.3. Grup 3 Asemptomatik Apikal Apse Vakalarının Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları

Grup 3 asemptomatik apikal apse vakalarının kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçlarında Dunn validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.7265 ile Silhouette validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.4059 hiyerarşik dördü kümelemeye göre doğruluğu tespit edildi. (Şekil 4.19.)

```
> summary(valid_test_aaa)

Clustering Methods:
hierarchical

Cluster sizes:
2 3 4 15

Validation Measures:

                2      3      4      15
hierarchical APN    0.0000 0.0000 0.0000 0.0013
              AD    1.1241 0.9498 0.8655 0.3513
              ADM    0.0000 0.0000 0.0000 0.0024
              FOM    0.1186 0.1015 0.0931 0.0472
              Connectivity 3.7595 6.8623 10.8016 54.7310
              Dunn    0.4755 0.4755 0.7265 0.6020
              Silhouette 0.3954 0.4026 0.4146 0.3674

Optimal Scores:

      Score Method Clusters
APN    0.0000 hierarchical 2
AD     0.3513 hierarchical 15
ADM    0.0000 hierarchical 2
FOM    0.0472 hierarchical 15
Connectivity 3.7595 hierarchical 2
Dunn   0.7265 hierarchical 4
Silhouette 0.4146 hierarchical 4
```

Şekil 4. 19. Grup 3 asemptomatik apikal apseli vakalarının kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları

4.2.4. Grup 4 Semptomatik Apikal Periodontitis Vakalarının Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları

Grup 4 semptomatik apikal periodontitis vakalarının kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçlarında APN ve ADM validasyon ölçümünün optimal skoru 0.0000 hiyerarşik ikili, Dunn validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.8185 ile Silhouette validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.5965 hiyerarşik onbeşli kümelemeye göre doğruluğu tespit edildi. (Şekil 4.20.)

```
> summary(valid_test_sap)

Clustering Methods:
  hierarchical

Cluster sizes:
  2 3 4 15

Validation Measures:

                2         3         4         15
hierarchical APN      0.0000  0.0000  0.0004  0.0006
              AD      1.5236  1.1456  1.0076  0.2728
              ADM      0.0000  0.0000  0.0008  0.0007
              FOM      0.1446  0.1126  0.1011  0.0314
Connectivity      2.9290  2.9290  9.1012  47.3139
Dunn              0.6748  0.6731  0.6328  0.8185
Silhouette        0.4190  0.3613  0.3700  0.5965

Optimal Scores:

      Score Method Clusters
APN    0.0000 hierarchical 2
AD     0.2728 hierarchical 15
ADM    0.0000 hierarchical 2
FOM    0.0314 hierarchical 15
Connectivity 2.9290 hierarchical 2
Dunn   0.8185 hierarchical 15
Silhouette 0.5965 hierarchical 15
```

Şekil 4. 20. Grup 4 semptomatik apikal periodontitis vakalarının kümeleme analiz validasyon analiz sonuçları

4.2.5. Grup 5 Aseptomatik Apikal Periodontitis Vakalarının Kümeleme Yönteminin Validasyon Analiz Sonuçları

Grup 5 aseptomatik apikal periodontitis vakalarının kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçlarında APN ve ADM validasyon ölçümünün optimal skoru 0.0000 hiyerarşik ikili, üçlü, dörtlü kümelemeye, Dunn validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.6378 hiyerarşik ikili kümelemeye ve Silhouette validasyon ölçümüne göre optimal skoru 0.4660 hiyerarşik dörtlü kümelemeye göre doğruluğu tespit edildi. (Şekil 4.21.)

```
R Console
> summary(valid_test_aap)

Clustering Methods:
hierarchical

Cluster sizes:
2 3 4 15

Validation Measures:

                2      3      4      15
hierarchical APN    0.0000 0.0000 0.0000 0.0094
              AD    0.9970 0.8719 0.6811 0.3564
              ADM    0.0000 0.0000 0.0000 0.0120
              FOM    0.1045 0.0933 0.0721 0.0496
              Connectivity 0.3472 4.8250 5.4429 56.3361
              Dunn    0.6378 0.5293 0.6208 0.5280
              Silhouette 0.4052 0.3931 0.4660 0.3312

Optimal Scores:

      Score Method Clusters
APN    0.0000 hierarchical 2
AD     0.3564 hierarchical 15
ADM    0.0000 hierarchical 2
FOM    0.0496 hierarchical 15
Connectivity 0.3472 hierarchical 2
Dunn   0.6378 hierarchical 2
Silhouette 0.4660 hierarchical 4
```

Şekil 4. 21. Grup 5 aseptomatik apikal periodontitis vakalarının kümeleme yönteminin validasyon analiz sonuçları

5. TARTIŞMA

Endodontide ağırlı alevlenmeler, periapikal yıkım ve inatçı enfeksiyonlar ile ilişkili spesifik bakteriler ve bu bakterilerin tanımlanması son derece önemli ve güncel konulardır. Kök kanal patojenlerinin tespit edilmesinde mikroskopi, kültür yöntemleri, immünolojik ve moleküler yöntemler kullanılmaktadır. Bakteriye morfoloji ile ilgili mikroskopik bulgular yanıltıcı olabilir, çünkü birçok tür pleomorfik olabilir ve sonuç araştırmacıların subjektif yorumundan etkilenebilir. Çok sayıda bakteri türünün üretilmesinin imkansızlığı ve birçok kültürü yapılabilir türün belirlenmesindeki zorluklar, kültürasyon temelli yaklaşımların en önemli dezavantajlarını temsil etmektedir. Şu an için belirli bir türün üretilmemesi o türün saptanamayacağı anlamına gelmez. Sayısız mutlak (strict) anaerobik bakteriler yüzyıllar öncesinde kültüre edilemiyordu, ancak kültürasyon tekniklerindeki gelişmeler büyük ölçüde bu problemi çözmeye yardımcı olmaktadır [382]. İmmünolojik yöntemler, sadece hedef türleri tespit edebilmeleri, düşük duyarlılığa sahip olmaları (yaklaşık 10^4 hücre), özgüllüklerinin değişken olması ve kullanılan antikor türlerine bağlı olmaları ve ölü mikroorganizmaları da saptayabilmeleri gibi nedenlerle önemli sınırlamalara sahiptirler [383]. Serbest mikrobiyal DNA'nın yaşayan mikroorganizmalar tarafından kolonileştirilmiş bir ortamda bozulmadan kalabilmesi pek olası değildir. Bazı canlı türlerinin yanı sıra hücre ölümünde salınan DNA'lar ortamdaki serbest DNA'yı bozabilir [384]. Bunun sonucunda PCR amplifikasyonu sonrasında yanlış negatif sonuç ortaya çıkar. Bu nedenle, endodontik enfeksiyonlarda ölü hücrelerden DNA saptama olasılığı olsa da, bu olasılık makul derecede düşüktür. RNA'lar daha kararsız olduğundan ve DNA ile karşılaştırıldığında daha kısa bir yarı ömre sahip olduklarından, hücre ölümünden sonra hızlı bir şekilde bozulabilirler [385]. Bu durumlardan dolayı kantitatif sonuçlar yanıltıcı olabilir, çünkü canlı ve ölü bakteriler ayırt edilemez. Anaerobik bakterilerin tanımlanmasında hem doğru, hem hızlı, hem de ekonomik olan MALDI-TOF MS cihazı, 16S rRNA gen sekansı ve gaz-sıvı kromatografinin yerine tercih edilen yöntem haline gelmiştir [386].

MALDI-TOF MS tabanlı bakteri (identifikasyonu) tanımlaması, anaerobik mikrobiyolojide yeni bir dönem başlatmıştır. Anaerobik bakterilerin periodontitte

sıklıkla baskın olduğu iyi bilinmektedir. Anaerobik bakterilerin geleneksel yöntemlerle izolasyonu ve tanımlanması çoğu zaman zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemler yüksek hassasiyet ve özgüllük ile karakterizedir, ancak genellikle pahalıdırlar. Aksine MALDI-TOF MS analizi için sarf malzemeleri ve kimyasalların maliyeti çok düşüktür. Ayrıca, spektrumları otomatik olarak gerçekleştirilme süresi pratik ve kısadır. Pekçok klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında anaerobik bakterileri hızlı tanımlamak için kullanılan araçlar mevcut değildi ancak şimdi rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarları tezgahlarında MALDI-TOF MS cihazının gittikçe artmakta olduğunu görüyoruz.

Endodontik hastalıklara neden olan patojenlerin tanımlanma gerekliliği kanal tedavilerinin başarı oranını yükseltmede önem arz eder. Bu mikroorganizmaların tespiti için moleküler biyolojide kısa sürede yanıt veren çeşitli yöntemlerin olduğu belirtilmiştir [17] . Periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin tanımlanmasının MALDI-TOF MS aracılığıyla yapıldığı bu çalışma rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarında bu çalışmayı gerçekleştirilmiştir.

Hsu ve arkadaşlarının 2014 yılında 101 anaerobik bakterinin tanımlanmasını Biotyper(v3.0 software) 'da değerlendirmiş ve kullanılan target üzerindeki formik asit uygulamasını göstermiştir. Cut-off değeri olarak ≥ 1.700 skoru kullanılmasının direkt target plaka üzerindeki testi ve üreticinin önerdiği cut-off skorlamayı kıyaslayarak doğru tanımlama oranını bildirmişlerdir [387] . Bu çalışmamızda 150 vakadan 467 izolata Biotyper system v.3.1. software ve formik asit ekstraksiyonu kullanılarak anaerobik tanımlama işlemleri yapılmıştır. Anaerobik bakterilerin ≤ 1.700 cut-off skoruna sahip % 5,78 'lik kısmı çalışmaya dahil edilmemiştir. Cut-off skoru ≥ 1.700 olan anaerobik bakterilerin %94,22' si cins ve % 65,10' u tür seviyelerinde doğru bir şekilde tanımlanmıştır. Anaerobik bakterilerin ≤ 1.700 cut-off skoruna sahip % 5,78 'lik kısmı çalışmaya dahil edilmediği ve kontrol suşu kullanıldığı için 16S rRNA gen sekans yöntemiyle doğrulama işlemi gerekli görülmemiştir. MALDI-TOF MS ile anaerobik bakterilere tanımlama yapılırken her çalışmada standart referans suşu "Bacteroides fragilis ATCC 25285" kullanılmıştır. Yukarıda bahsedilen cut-off değerleri doğrultusunda cins ve tür seviyesinde

tanımladığımız bakterilerin doğru tanımlandığı kabul edilmiş ve değerlendirmeler yapılmıştır.

16S rRNA sekansları organizmanın tanımlanmasında altın standart olarak kullanıldığında MALDI-TOF MS'in rutin biyokimyasal tanımlama yöntemlerinden daha doğru olduğunu ve MALDI-TOF'ın 16S rRNA gen dizilimi için bir alternatif olabileceğini Bizzini ve arkadaşları 2011'de yaptıkları çalışmada bildirmişlerdir [388]. Özel yazılımların ve veritabanlarının önemli bir dezavantajı, yüksek maliyetlerinden dolayı özel araştırmacılara sınırlı erişilebilirliğidir [17]. Buna rağmen, birkaç araştırma grubu, bilimsel topluluk için serbestçe kullanılabilen bazı açık kaynaklı yazılımlar ve veritabanları geliştirmişlerdir. Bunlardan birkaçı, BIOSPEAN [389], MALDIquant [390], SpectraBank [391], pkDACLASS [392], mMASS [393] dir.

Anaerop bakteriler için de MALDI-TOF MS tabanlı tanımlama veritabanlarının güncelliğine bağlıdır. Günümüzde ENRIA (the European Network for the Rapid Identification of Anaerobes) adlı proje ile halen geliştirilmeye devam etmektedir [394].

Tronstad ve arkadaşları (1986) periapikal lezyonlu dişi bulunan 6 hastada endodontik cerrahi ile dişlerin kök ucu yüzeyinden elde edilen yumuşak dokulardan aerop ve anaeroplardan kültürler yapmışlar ve sonuçta, *Bacteroides gingivalis* ve *Bacteroides endodontalis* ile *Propionibacterium acnes* bakterilerini teşhis etmiştir [395]. Niazi ve arkadaşları (2010) PCR ile yaptıkları bir çalışmada 20 inatçı endodontik lezyondan izole edilen *Propionibacterium acnes* ve *Staphylococcus epidermidis*' in fırsatçı patojenler olduğunu bildirmişlerdir [396]. Yapılan bu çalışmamızda *Propionibacterium acnes* bakterisinin adı yapılan taksonomik değişiklik nedeniyle *Cutibacterium acnes* olarak düzeltilmiştir. Zorunlu anaerop ve fakültatif anaerop bakterilerle yapılan çalışmalarda, bakteri tanımlamasının doğruluğu ve güvenilirliği, veri tabanlarının güncel taksonomik değişikliklerle uyumlu hale getirilmesine bağlıdır. Ayrıca bu çalışmada *Cutibacterium acnes* ile beraber *Staphylococcus epidermidis* her grupta tanımlanmasına rağmen *Cutibacterium acnes* Aseptomatik Apikal Periodontit vakalarından oluşan Grup 5'te, *Staphylococcus epidermidis* ise Retreatment vakalarından oluşan Grup 1'de

tanımlanmıştır. Endodontik mikrobiyotada yapılan önceki çalışmalarda *Propionibacterium acnes* ve *Staphylococcus epidermidis* de dahil olmak üzere çeşitli *Staphylococcus* türleri değerlendirilmiş, ancak bu organizmalar genellikle cilt bileşimleri oldukları için kontaminant olarak kabul edilmişlerdir. Enfekte kök kanalında üreyen bakteri yukarıda anlatılan kök kanalı patojenlerinden birisi veya onlarla akrabalığı olan bir bakteri değilse kültürün doğrulama amacı ile tekrarlanması gerekebilir. Örneğin laboratuvar, bir *Neisseria*, *Candida*, *Difteroid*, basil ve Gram negatif basilleri veya stafilokoku patojen mikroorganizma olarak bildirmişse materyal alma işleminde bir kontaminasyon olmuştur. Veya laboratuvar hatalı anaerobik çalışma yapıyor da olabilir [397] .

Yeh ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS ile 12 peri-implantit cep örneğinden *Rothia aeria*, *Rothia dentocariosa* ve *Rothia mucilaginosa* türlerini tespit etmişlerdir [398] . Swierzbinsk ve arkadaşları (2015) yaptıkları çalışmada immün sistemi baskılanmış hastalarda endokarditsiz bir *R. aeria* bakteriyemi vakası bildirmişler ve bu bakterileri tür düzeyinde MALDI-TOF MS ile tanımlamışlardır [399] . Yapılan bu çalışmada da *Rothia aeria* ve *Rothia dentocariosa* türleri Retreatment vakalarından oluşan Grup 1’de tanımlanırken *Rothia dentocariosa* ve *Rothia mucilaginosa* türleri Asemptomatik Apikal Periodontitli vakalardan oluşan Grup 5’te tanımlanmıştır. *Rothia aeria*, immün sistemi baskılanmış özellikle oral-diş patolojisi olan hastalarda hastalığa neden olduğu bilinen bir dental kolonizördür, *Rothia* türleri ağız boşluğu ve dental plakların kolonizörleri olarak bilinen pleomorfik gram-pozitif çubuklardır. İnsanlarda hastalığa neden olduğu bilinen 3 tür vardır, *R. dentocariosa*, *R. mucilaginosa* ve *R. aeria*. *R. dentocariosa* kaynaklı enfeksiyonlar en sık bildirilenlerdir ve endokardit ile güçlü bir ilişkisi vardır.

Wang ve arkadaşları (2012) yaptıkları çalışmada 16S rRNA tekniğiyle, apikal periodontit ile ilişkili kök kanalı doldurulmuş 58 diştten alınan örneklerde *Enterococcus faecalis* tespit etmişlerdir. Kök kanalındaki prevalansının (%38) tükürükteki prevalansına (%19) göre daha fazla olduğunu belirtmişlerdir [400] . Pinheiro ve arkadaşlarının (2003) yaptıkları çalışmada periapikal lezyonlu 60 kök kanal dolgululu dişlerden alınan örneklerden biyokimyasal tekniklerle tespit ettikleri

mikroorganizmalarla bu çalışmadaki Retreatment vakalarından oluşan Grup 1’de MALDI-TOF MS ile tespit edilen mikroorganizmalar arasında, bazı değişiklikler olmasına rağmen bir paralellik dikkati çekmiştir [330] Örneğin *Enterococcus faecalis*, *Veillonella spp.* , *Fusobacterium nucleatum*, *Cutibacterium (Propioni) acnes*, *Candida spp.* , *Streptococcus spp.* tanımlanmasına ek olarak bu çalışmada Retreatment vakalarından oluşan Grup 1’de aerobik kültürlerden *Candida glabrata*, *Rothia aeria*, *Rothia dentocariosa*, *Neisseria lactamica* tanımlanmıştır. *Prevotella spp.* türleri en fazla sırasıyla Grup 4, Grup 2, Grup 3 ve Grup 5’te tanımlanırken Grup 1’de hiç tanımlanmamıştır. *Candida spp.* türlerinden *Candida glabrata* Retreatment vakalarından oluşan Grup 1’de, *Candida albicans* Grup 3’ te en fazla tanımlarken asemptomatik apikal periodontit vakalardan oluşan Grup 5’te hiçbir *Candida spp.* türü tanımlanmamıştır. Yeh ve arkadaşları (2019) da periimplantit cepten MALDI-TOF MS ile *Candida albicans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Streptococcus spp.* türlerini tanımlamışlardır [398] . Maldonado ve arkadaşlarının (2018) *Candida* maya türlerini hem konvansiyonel hem de MALDI-TOF MS ile tanımladıkları çalışmaları mevcuttur [401] . Bu çalışmada *Enterococcus faecalis* en fazla Grup 1’de tanımlanmış olup bu durum tedavi sonrası oral hastalıklarda *E.faecalis* ‘in ana patojen durumunu gösteren çalışmalarla da uyumludur [11] . *E.faecalis* birçok çalışmada, tedavi sonrası hastalıklara neden olan en sık mikroorganizmalardan biri olarak bildirilmiştir. Ağız boşluğunda en dirençli türdür ve kök kanal tedavisinin başarısız olmasının olası nedenidir [4] . Waltimo ve arkadaşları *Candida spp.* türlerinin endodontik irrigant ve medikament olarak yaygın şekilde kullanılan antiseptik ve dezenfektanlara karşı dirençli olduklarını bildirmişler. Bu mikroorganizmaların saf kültürlerde kök kanal enfeksiyonlarından izole edilmiş olması bunların apikal periodontitte patojenik olduklarını gösterir [402] .

Yeh ve arkadaşları (2019) yaptıkları çalışmada MALDI-TOF MS ile 12 peri-implantit cep örneğinden *Slackia exigua*, *Eubacterium yurii* tespit etmişlerdir. Downes ve arkadaşları (2001) yaptıkları çalışmada 105 odontojenik enfeksiyonlu dental implantta *Slackia exigua* ve *Eubacterium* cinsi bakterileri hem fenotipik hem de genotipik analizler ile tespit etmişlerdir [398] [403] . MALDI-TOF MS’in bakteriyel veri tabanı, 1000 ‘den fazla tür içerir ve veri tabanı sürekli büyümektedir. MALDI-TOF MS kullanmanın avantajlarından biri, açığa çıkarılmamış oral

enfeksiyonlara yabancı olan yeni mikrobiyal soyların araştırılabilmesidir. Örneğin yapılan bu çalışmamızda da *Slackia exigua* Semptomatik Apikal Periodontit vakalardan oluşan Grup 4'te tek bir vakada tespit edilmiştir. *Slackia exigua*, periodontit ve periapikal enfeksiyonlarda zayıf üreyen bir patojendir ve kültüre edilmesi zordur. Lee ve arkadaşları (2016) periapikal apseli bir hastada bakteriyemiye sebep olduğu düşünülen *Slackia exigua*' yı biyokimyasal testlerle tespit edemediklerini, ancak 16S rRNA gen dizilimi ile tespit ettiklerini bildirilmiştir [404] . Yapılan çalışmamızda çok yavaş büyüyen, titiz ve genellikle biyokimyasal testlerde reaktif olmayan, gram-pozitif, spor yapmayan anaerobik basil grubunu içeren, izolasyonu ve tanımlanması zor olan *Eubacterium yurii* ile birlikte *Eubacterium brachy*' i Semptomatik Apikal Apseli vakalardan oluşan Grup 2'de tespit edilmiştir.

MALDI-TOF MS kendisinin sahip olduğu güçlü sınıflandırma algoritma kombinasyonu ile geleneksel yöntemlerle sıklıkla zor ve zaman alan oral *Actinomyces* 'in 14 farklı türünü ayırt etmek ve tanımlamak için yararlı bir araç olmayı başarmıştır [405] . Bu çalışmada semptomatik apikal periodontit vakalarından oluşan Grup 4'te *Actinomyces odontoliticus* tanımlanmasına rağmen, Grup 2,3,4'te ise *Actinomyces oris* ise tanımlanmıştır.

Stingu ve arkadaşları agresif periodontitli 33 hastanın subgingival biyofilmlerinden izole edilen 75 bakteriyi ve 9 referans suşu MALDI-TOF MS kullanarak test etmişlerdir. Tanımlamalar, 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin detaylı dizi analizi ile karşılaştırılmıştır. Aynı türün neredeyse bütün spektrumlarının çok az istisna dışında bir araya toplanmış olduğunu tespit etmişlerdir. Bu arada MALDI-TOF MS'nin, fenotipik olarak ayırt edilemez iki tür olan *Prevotella intermedia* ve *Prevotella nigrescens*'i ayırt etme özelliği bulunmuştur [22] . Yapılan bu çalışmada asemptomatik apikal periodontit vakalarından oluşan Grup 5'te *Prevotella nigrescens* ENR_0055 ENR' a skor değeri 2,040 olarak güvenilir tür düzeyinde tanımlamıştır. Ancak aynı türü 1,687 skorla *Prevotella nigrescens* DSM133386T DSM suşunu cins düzeyinde güvenilir tanımlarken , tür düzeyinde güvenilir olarak tanımlamamıştır. Stingu ve arkadaşları tarafından tanımlanan *Prevotella nigrescens* DSM 13386 suşudur. Daha sonraki yapılacak çalışmalar

MALDI-TOF MS ile suşlar arasındaki ayırt etme özelliğinden yararlanılarak verileri artırma yönünde olabilir. 16S ribozomal RNA (rRNA) geninin detaylı dizi analiziyle karşılaştırılarak desteklenmelidir.

Klinik tanımlama yöntemleri arasında 16S genine dayalı uyum oranının cins düzeyinde % 96 ve tür düzeyinde % 87,5 olduğu gösterilmiştir [406] . Bu çalışmamızdan elde edilen sonuçlar, MALDI-TOF MS'in cins düzeyinde % 94,22, tür düzeyinde %65,10 oranlarında tanımlama yapabildiğini göstermiştir. Bu çalışmada, 6 filum ve 1 mantarı temsil eden, 77 tür bakteri ve 3 tür *Candida* bulunmuştur. Bu bulgu, Yeh ve ark.'nın peri-implantit ceplerindeki oral bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlandığı araştırmayla bazı durumlarda paralellik göstermemektedir [398] . Bu çalışmada tespit edilen bakterilerin dağılımı, periapikal doku hastalıkları grupları arasında farklı olmuştur. MALDI-TOF MS aracılığıyla periapikal doku hastalıkları ile ilgili bakteri profil varyasyonları hakkında kesin bir açıklama yapabilmek için büyük bir örneklem ölçeği gerekli görünmektedir.

Bu çalışma kültür bağımlı bir çalışma olduğundan, kültüre edilemeyen bakterilere yer verilememiştir. Bu durum oral floradaki bakterilerin tanımlanmasında MALDI-TOF MS yönteminin kısıtlıkları arasında yer almaktadır. Oral mikrobiyotanın yaklaşık %50'si hala kültüre edilemez ve bu nedenle özellikle polimikrobiyal enfeksiyonlarda modern tanı yöntemleri gereklidir. Bazı araştırmacılar hem kültür koşullarının hem de kültür süresinin MALDI-TOF MS ile mikrobiyal tanımlamayı etkilemediğini savunmasına rağmen, farklı taşıma ortamlarının kullanılması veya inkübasyon süresinin uzatılması gibi farklı metodolojik yöntemlerin tanımlamayı etkileyebileceği düşünülebilir [405, 407, 408] .

MALDI-TOF MS ile bakteri tanımlamasının kalitesi ve güvenilirliği, veri tabanında bulunan referans spektrumlarının kalitesine ve miktarına bağlıdır. Teknolojinin bazı sınırlamalarına rağmen, yeni izolatların tanımlanması ancak spektral veritabanında spesifik bir türün peptit kütle parmak izlerini (PMF) içermesi durumunda mümkün olabilmektedir. Bugüne kadar, *Treponema forsythus*, *Treponema denticola* ve *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gibi periodontit patojenleri olarak bilinen bazı bakteri türleri henüz veritabanına dahil edilmemiştir; MALDI-TOF MS ile tanımlanamamıştır. Veri tabanı geliştirme ve zenginleştirme,

MALDI-TOF MS'nin temel unsurlarıdır ve yöntemin daha sık ve doğru kullanılması için gücünü arttırması gerekecektir [405, 409, 410] .

Siyah pigmentli anaerobik bakterilerin, semptomatik endodontik enfeksiyonlarla sıklıkla ilişkili olduğu ileri sürülmüştür [5, 411] ancak son moleküler veriler böyle bir ilişki gösterememiştir [313, 412] . Sakamoto ve arkadaşları 2006 yılında kültür bağımlı ya da bağımsız moleküler yaklaşımlarla yaptıkları çalışmada en yaygın bakteriler olarak *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella türleri*, *Veillonella türlerini* tanımlamışlardır. Kültür bağımlı MALDI-TOF MS ile yapılan bu çalışmada da siyah pigmentli bakterilerden özellikle *Prevotella spp.* retreatment vakalarından oluşan Grup 1 hariç , diğer semptomatik ve asemptomatik enfeksiyon gruplarında görülmüştür. *P. baronie*, *P. denticola*, *P.nigrescens* Grup2 'de; *P. buccae*, *P.heparinolytica* Grup 3'te; *P.buccae* ve *P.denticola* Grup 4'te; *P. nigrescens* Grup 5'te tanımlanmıştır. *Porphyromonas gingivalis* ise sadece asemptomatik apikal apseli vakalardan oluşan Grup 3'te tanımlanmıştır. *Veillonella parvula* tüm gruplarda tanımlanırken, *Veillonella atypical* semptomatik olan (Grup 2 ve Grup 4) gruplarda, *Veillonella dispar* ise sadece asemptomatik apikal periodontit vakalarından oluşan Grup 5'te tanımlanmıştır. *Fusobacterium nucleatum* asemptomatik apikal periodontitli vakalardan oluşan Grup 5 hariç tüm gruplarda tanımlanmıştır. Bu türlerin hem asemptomatik hem de semptomatik endodontik enfeksiyonlara katılımının açıklığa kavuşturulamayan kısmı için bu çalışma bir başlangıç basamağı oluşturarak gelecekte moleküler yöntemlerle yapılacak çalışmalarla desteklenmelidir.

Viridans grubu streptokoklar (VGS)'in enfektif endokardit etkeni olduğu, doğru tanımlanmasında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında zorluklar yaşandığı bilinmektedir. Klinik mikrobiyoloji laboratuvarları genellikle bu bakterilerin tanımlanmasında konvansiyonel yöntemler ile birlikte yarı otomatize veya otomatize sistemler ve moleküler yöntemleri kullanmaktadır. VGS diş hekimliğinde özellikle endodonti, cerrahi, periodontoloji alanında yapılacak işlemler açısından son derece önem arz etmektedir. Oral *streptokoklar* büyük oranda *viridans grubu streptokok* (VGS) üyesidirler ve bu bakteriler oral mikrobiyotanın baskın üyelerindedir [413]. *Viridans grup streptokoklar* 16S rRNA dizi analizi çalışmalarından elde edilen verilere göre beş grupta (*anginosus*, *mitis*, *sanguinis*, *mutans*, *salivarius*) toplanırlar.

Mikrobiyota elemanı VGS'ler düşük virülans özelliklerine karşın enfektif endokardit (EE), sepsis, bakteriyemi gibi ciddi enfeksiyonların etkeni olarak da karşımıza çıkabilmektedirler [414]. Yapılması planlanan tedavinin başlanabilmesi için enfektif endokarditli hastaya profilaksi planlanması gerekmektedir. Antibiyotik tedavilerinin planlanabilmesi için de örneklerin tür düzeyinde tanımlanması önemlidir. Yapılan bu çalışmada MALDI-TOF MS ile beş gruba ait VGS üyeleri hem tür hem cins düzeyinde tanımlanmıştır. *S. anginosus*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius* ve *S. vestibularis* oluşturduğumuz grupların hepsinde tanımlanırken; *S. constellatus* sadece asemptomatik apikal apseli vakalardan oluşan Grup 3'te; *S. mutans* ve *S. sobrinus* asemptomatik apikal periodontitli vakalardan oluşan Grup 5'te tanımlanmıştır. Bir diğer önemli VGS mitis grubundan olan *S.pneumoniae* türüdür. Bu çalışmada sadece semptomatik olan gruplarda Grup 2 ile Grup 4'te *S. pneumoniae* tanımlanmıştır. Son zamanlarda VGS tanısında MALDI-TOF MS sistemlerinin kullanıldığı çalışmalar yayınlanmaktadır. Süzük Yıldız ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada VGS tanımlanmasında MALDI-TOF MS ve 16S rRNA yöntemlerini karşılaştırmışlar, VGS tanısının karmaşık bir süreç olması nedeniyle, bu izolatların tanısında klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında yöntemlerin tek başına kullanımının yeterli olmayacağını, konvansiyonel yöntemlerin yanında moleküler yöntemlere de yer verilmesi gerektiğini bildirmişlerdir [415].

Bir örnek kütle spektrumu ile referans kütle spektrumu arasındaki benzerliğinin nitelikli tanımlama olanağı vermek için birçok araştırmacı farklı yaklaşımlar izlemişlerdir. Hsieh ve arkadaşları (2008) analiz edilen suşların taksonomik bağlılığına göre spektrumu sınıflandırmak için altı türe ait bir grup bakteri spektrumunu hiyerarşik bir kümeleme analizine tabi tutmuşlardır. Hettick ve arkadaşları (2006) dört mikobakteri türüne ait suşları ayırt etmek için doğrusal bir ayırt edici analiz ve rastgele bir forest yaklaşımı kullanmışlardır. Tao ve arkadaşları (2004) bir suşun kütle spektrumundaki her tepe noktasının çoklu kütle spektrumlarında tespit sıklığına göre ağırlıklandırıldığı bir protein kütle haritalama prosedürü önermişlerdir. Tüm bu yaklaşımlar, rutin tanıda kullanım için henüz kabul görmemiştir [416-419].

MALDI Biotyper (Bruker Daltonics) referans spektrumları olarak Main Spectra'yı, yani tek bir soydan elde edilen çoklu spektrumlardan hesaplanan konsensüs spektrumlarını kullanır. Tanımlama sonucu (mikrobiyal türler), referans kütle spektrumları ile eşleşen ve örneklerin kütle spektrumlarındaki sinyalleri sayarak ve bunun tersi olarak kütle spektrumlarının eşleşen sinyallerinin sinyal yoğunluğu ile ilişkilendirilen sinyallerin sayılmasıyla hesaplanan bir skorla bağlantılıdır. Bu tür bir prosedürden elde edilen üç puan çarpılır ve normalde 1000 değerine normalize edilir ve sonuçta log transforme edilir [420]. Genel olarak, log-puan 2.0, bir bakteri türünün güvenilir bir şekilde tanımlanması olarak kabul edilir. Bununla birlikte, bazı çalışmalarda, güvenilir türlerin tanımlanması için log-skor eşiği 1,7 [421] veya 1,9 [358] olarak alınmıştır. Dendrogramlarını da bu spektrumlar cihaz üzerinde otomatize edilmiş program paketlerle oluşturmuşlardır.

Yapılan bu çalışmamızda dendrogramları oluşturmak için hastalardan alınan örneklerle beraber periapikal doku hastalıklarını, periapikal indekslerini, hastaların yaşını, cinsiyetlerini içeren bir veri madenciliği yaratarak, hangi vakada hangi mikroorganizma türünün tanımlandığına bakılarak çok değişkenli veri içermesi nedeniyle kümeleme analizi yöntemi olarak hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Kümeleme analizi sonucu benzerliği olan türler içinde *Enterococcus faecalis*'in retreatment vakalarından oluşan Grup 1'de ve semptomatik apikal periodontitli vakalarından oluşan Grup 4'te tanımlanmış olması yapılan bazı çalışmalarda *Enterococcus faecalis*'in patojenik önemini desteklemekte, endodontik enfeksiyonların klinik bulguları semptomları ile ilişkili olduğunu doğrulamaktadır. Bu bakterinin bazı araştırmacılar tarafından da kalıcı dişlerde başarısız kök kanal tedavisiyle ilişkili olduğu bildirilmiştir. Siqueira ve Roças (2004), Brezilyalı hastaların kök dolgulu örneklerinin %77'sinde *E.faecalis* tespit ederken; Roças ve arkadaşları (2004), Güney Koreli hastalardan alınan örneklerde bu oranı % 64 olarak bulmuşlardır [332, 333]. Bu kümeleme analizi sonucu diğer en çok benzerliği olan tür olarak *Lactobacillus rhamnosus* 'un Grup 2 ve Grup 5 'te; *Lactobacillus paracasei*'nin Grup 3'te tanımlanmış olması laktobasillerin nekrotik pulpayı enfekte ettiklerini düşündürmektedir. Cancio ve arkadaşları (2017) yaptıkları çalışmada, ağız boşluğunda özellikle çürük lezyonlu hastalarda sık görülen *Lactobacillus spp.* türlerinin olduğunu bildirmişlerdir. Callaway ve arkadaşları ise

(2013) MALDI-TOF MS ile yaptıkları çalışmada, yumuşak dentin çıkarıldıktan sonra sert dentindeki *Laktobasil* türleri arasındaki çeşitliliğin önemli ölçüde azaldığını ve sadece *L. rhamnosus* ve *L. paracasei* türlerinin kaldığını belirtmişlerdir. Derin çürük lezyonlarında mevcut olan *Laktobasillerin* aynı zamanda nekrotik pulpayı da enfekte edebildiklerini bildirmişlerdir [422, 423] .

MALDI-TOF MS, oral mikrobiyolojinin daha spesifik, kolay, hızlı ve ekonomik bir şekilde geliştirilmesinde potansiyel bir yöntem olabilir. Bu çalışmanın MALDI-TOF MS ve periapikal doku hastalıklarını içeren gelecekteki çalışma tasarımları için faydalı veriler sağlayacağı düşünülmektedir. MALDI-TOF MS veri tabanı genişledikçe ve kapsamlı verilere ulaşıldıkça bakteri profilleri ve hastalık ilerlemesi arasındaki ilişki yavaş yavaş açığa çıkacaktır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada PAI indeksine göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarında mikrobiyotaların incelenmesi için rutin klinik mikrobiyoloji laboratuvarlarında bulunan MALDI-TOF MS kullanılmıştır. Bu çalışma neticesinde aşağıdaki sonuçlar elde edilmiş, önerilerde bulunulmuştur.

MALDI-TOF MS cihazında mikroorganizma türlerinin tanımlanması kültüre edilebilenlerle sınırlı olduğu için bu durumu bu yöntemin handikaplarından sayabiliriz. Bundan dolayı bu çalışmanın diğer moleküler yöntemlerle de desteklenmesi daha değerli sonuçlara ulaşılmasını sağlayacaktır. Oral mikrobiyoloji alanında bu konuda gelecekte direkt örnekten çalışılması için yöntem, teknik ve cihazların geliştirilmesi gerekecektir.

Kültüre edilemeyenler için ek destek veren moleküler yöntemler birçok çalışmada kullanılmakla birlikte hastalık patogenezi açısından ölü mikroorganizmaların tespit edilmesini ne kadarının doğru patojen olduğu şüphelidir. Yaptığımız çalışmada her ne kadar sınırlı tanımlama yaptıysak da tanımlanan mikroorganizmaların canlılığı konusunda şüphemiz yoktur.

Kültüre edilebilir mikroorganizmaların MALDI-TOF MS ile analizinin, periapikal doku hastalıklarının mikrobiyota çeşitliliğinin değerlendirilmesi ve bu farklı tip endodontik enfeksiyonlar arasındaki topluluk yapısının karşılaştırılmasında hızlı, doğru ve ucuz olduğu görülmüştür.

Rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında mikroorganizmaları tanımlamada kullanılan konvansiyonel yöntemlerinin laboratuvar teknikerlerinin bilgi ve becerilerine göre subjektif kullanımı artık geride kalmaktadır. Mikroorganizmaların fenotipik olarak konvansiyonel yöntemlerle ayırt edilmesinde zorluklarla karşılaşıldığında en sık kullanılan yöntem olan MALDI-TOF MS bazlı mikroorganizma tanımlaması, klinik tanılar için kolayca uygulanabilir bir tekniktir.

Nadir türlerin insan patojenleri olarak MALDI-TOF MS ile tanımlanması klinik laboratuvardaki moleküler yöntemlere bir alternatif olabilir.

Elde edilen veriler, hastalara uygulanması gereken tedavilerinin şekillenmesine, tedaviler esnasında hastaya verilecek doğru antibiyotik ve ilaç seçiminin yapılabilmesine, kök kanal tedavilerinin başarısına önemli bir katkı sağlayacaktır.

Enfekte kök kanalından izole edilen anaerob bakterilerin MALDI-TOF MS ile hızlı ve güvenilir bir şekilde tanımlanmasının, rutin klinik tedavilerde yanıt vermeyen inatçı enfeksiyonlara, endodontik tedavilere ve diğer endodontik çalışmaların başarılarına katkı sağlayacaktır.

Endodonti kliniğinde periapikal doku hastalıklarına sebep olan bakterilerin MALDI-TOF MS ile tanımlandığı bu çalışmada, çıkardığımız kök kanal mikrobiyota profillerinin endodonti alanında gelişmeye açık temel basamak oluşturduğunu düşünüyoruz. Gelişmeler bu yönde hız kazandıkça endodonti alanında laboratuvarların önemi artacak ve klinik tanıya yardımcı olacak şekilde kişiye özgü mikroorganizmaların kütle parmakizi veri bankalarının gelişmesinin önü açılacaktır. MALDI-TOF MS veri tabanı genişledikçe ve kapsamlı verilere ulaşıldıkça bakteri profilleri ve hastalık ilerlemesi arasındaki ilişki yavaş yavaş açığa çıkacaktır.

MALDI-TOF MS ile yapılan bir çok çalışma sonucu ortaya çıkan dendrogramları, bu cihaz üzerinde otomatize edilmiş program paketlerle oluşturulmuş spektrumlardan elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada ise dendrogramları oluşturmak için hastalardan alınan örneklerle beraber periapikal doku hastalıklarını, periapikal indekslerini, hastaların yaşını, cinsiyetlerini içeren bir veri madenciliği yaratarak, hangi vakada hangi mikroorganizma türünün tanımlandığına bakılarak çok değişkenli veri içermesi nedeniyle kümeleme analizi yöntemi olarak hiyerarşik kümeleme yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışma ayrı bir önem kazanmıştır, gelecekte yapılacak çalışmalara farklı bir bakış açısı yaratacaktır.

KAYNAKLAR

1. Brynolf, I., *A histological and roentgenological study of the periapical region of upper human incisor.* . Odontol Revy., 1967. 18(suppl).
2. Green, T.L., et al., *Radiographic and histologic periapical findings of root canal treated teeth in cadaver.* Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1997. 83(6): p. 707-11.
3. Ørstavik, D., K. Kerekes, and H.M. Eriksen, *The periapical index: a scoring system for radiographic assessment of apical periodontitis.* Endod Dent Traumatol, 1986. 2(1): p. 20-34.
4. Siqueira, J.F., Jr., *Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail.* Int Endod J, 2001. 34(1): p. 1-10.
5. Sundqvist, G., *Bacteriological Studies of Necrotic Dental Pulps.* 1976: Department of Oral Microbiology, University of Umeå.
6. Torabinejad M., W.R., *Endodontics Principles and Practice.* 4th edition ed. 2011, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi
7. Gomes, B.P., et al., *Microbiological examination of infected dental root canals.* Oral Microbiol Immunol, 2004. 19(2): p. 71-6.
8. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections.* Oral Microbiol Immunol, 2006. 21(2): p. 112-22.
9. Siqueira JF Jr, R.I., *Molecular Analysis of Endodontic Infections.*, in *Endodontic Microbiology*, A.F. Fouad, Editor. 2017, John Wiley & Sons: USA. p. 81-128.
10. Tronstad, L. and P.T. Sunde, *The evolving new understanding of endodontic infections.* Endodontic Topics, 2003. 6(1): p. 57-77.
11. Kaufman, B., et al., *Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions.* J Endod, 2005. 31(12): p. 851-6.
12. Nair, P.N., *Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures.* Crit Rev Oral Biol Med, 2004. 15(6): p. 348-81.
13. Gatti, J.J., et al., *Bacteria of asymptomatic periradicular endodontic lesions identified by DNA-DNA hybridization.* Endod Dent Traumatol, 2000. 16(5): p. 197-204.
14. Sunde, P.T., et al., *Extraradicular infection: a methodological study.* Endod Dent Traumatol, 2000. 16(2): p. 84-90.
15. Tronstad, L., F. Barnett, and F. Cervone, *Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment.* Endod Dent Traumatol, 1990. 6(2): p. 73-7.

16. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens*. J Dent, 2003. 31(5): p. 333-9.
17. Singhal, N., et al., *MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis*. Front Microbiol, 2015. 6: p. 791.
18. De Carolis, E., et al., *Application of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology*. J Infect Dev Ctries, 2014. 8(9): p. 1081-8.
19. Kim, S., et al., *Digital genotyping using molecular affinity and mass spectrometry*. Nat Rev Genet, 2003. 4(12): p. 1001-8.
20. Reynaud af Geijersstam, A., et al., *Comparative analysis of virulence determinants and mass spectral profiles of Finnish and Lithuanian endodontic Enterococcus faecalis isolates*. Oral Microbiol Immunol, 2007. 22(2): p. 87-94.
21. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis*. J Endod, 2005. 31(6): p. 411-23.
22. Stingu, C.S., et al., *Rapid identification of oral anaerobic bacteria cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS*. Oral Microbiol Immunol, 2008. 23(5): p. 372-6.
23. Dorland, W.A.N., *Dorland's illustrated medical dictionary*. 2012, Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier.
24. Glickman, G.N., *AAE Consensus Conference on Diagnostic Terminology: background and perspectives*. J Endod, 2009. 35(12): p. 1619-20.
25. Seltzer, S., I.B. Bender, and M. Ziontz, *THE DYNAMICS OF PULP INFLAMMATION: CORRELATIONS BETWEEN DIAGNOSTIC DATA AND ACTUAL HISTOLOGIC FINDINGS IN THE PULP*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1963. 16: p. 969-77.
26. Hargreaves, K.M., L.H. Berman, and I. Rotstein. *Cohen's pathways of the pulp*. 2016; Available from: <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20110085009>.
27. *AAE Consensus Conference Recommended Diagnostic Terminology*. Journal of Endodontics, 2009. 35(12): p. 1634.
28. Abbott, P.V. and C. Yu, *A clinical classification of the status of the pulp and the root canal system*. Aust Dent J, 2007. 52(1 Suppl): p. S17-31.
29. McClannahan, S.B., M.K. Baisden, and W.R. Bowles, *Endodontic diagnostic terminology update*. Northwest Dent, 2011. 90(5): p. 25-7.
30. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis*. J Oral Microbiol, 2009. 1.
31. Torabinejad M., W.R., *Endodontics Principles and Practice* 4th edition ed. 2009, USA: Elsevier.

32. Adamkiewicz, V.W., G.J.C. Benoit, and L. Lemian, *Method for sampling bacteria of human dental enamel lesions*. Journal of Microbiological Methods, 1995. 22(2): p. 177-184.
33. McKay, G.S., *The histology and microbiology of acute occlusal dentine lesions in human permanent molar teeth*. Arch Oral Biol, 1976. 21(1): p. 51-8.
34. Wirthlin, M.R., Jr., *Acid-reacting stains, softening, and bacterial invasion in human carious dentin*. J Dent Res, 1970. 49(1): p. 42-6.
35. Baume, L.J., *Dental pulp conditions in relation to carious lesions*. Int Dent J, 1970. 20(2): p. 309-37.
36. Jontell, M., et al., *Immune defense mechanisms of the dental pulp*. Crit Rev Oral Biol Med, 1998. 9(2): p. 179-200.
37. Yamasaki, M., et al., *Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats*. J Endod, 1994. 20(1): p. 13-7.
38. Kakehashi, S., H.R. Stanley, and R.J. Fitzgerald, *THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1965. 20: p. 340-9.
39. Moller, A.J., et al., *Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys*. Scand J Dent Res, 1981. 89(6): p. 475-84.
40. Sundqvist, G. *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. 1976; Available from: <http://books.google.com/books?id=JOtpAAAAMAAJ>.
41. Slots, J., H. Nowzari, and M. Sabeti, *Cytomegalovirus infection in symptomatic periapical pathosis*. Int Endod J, 2004. 37(8): p. 519-24.
42. Garberoglio, R. and M. Brannstrom, *Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules*. Arch Oral Biol, 1976. 21(6): p. 355-62.
43. Zach, L. and G. Cohen, *PULP RESPONSE TO EXTERNALLY APPLIED HEAT*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1965. 19: p. 515-30.
44. Hamilton, A.I. and I.R. Kramer, *Cavity preparation with and without waterspray. Effects on the human dental pulp and additional effects of further dehydration of the dentine*. Br Dent J, 1967. 123(6): p. 281-5.
45. Takahashi, K., *Changes in the pulpal vasculature during inflammation*. J Endod, 1990. 16(2): p. 92-7.
46. Kayhan, F., N. Kucukkeles, and D. Demirel, *A histologic and histomorphometric evaluation of pulpal reactions following rapid palatal expansion*. Am J Orthod Dentofacial Orthop, 2000. 117(4): p. 465-73.
47. Taspinar, F., et al., *The histopathological investigation of pulpal tissue following heavy orthopaedic forces produced by rapid maxillary expansion*. J Int Med Res, 2003. 31(3): p. 197-201.

48. Bowden, J.R., M. Ethunandan, and P.A. Brennan, *Life-threatening airway obstruction secondary to hypochlorite extrusion during root canal treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2006. 101(3): p. 402-4.
49. Masillamoni, C.R., J.D. Kettering, and M. Torabinejad, *The biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants*. Int Endod J, 1981. 14(2): p. 115-20.
50. Langeland, K., *Management of the inflamed pulp associated with deep carious lesion*. J Endod, 1981. 7(4): p. 169-81.
51. Foschi, F., et al., *Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients*. Oral Microbiol Immunol, 2005. 20(5): p. 289-95.
52. Noguchi, N., et al., *Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens*. Appl Environ Microbiol, 2005. 71(12): p. 8738-43.
53. Nair, P.N., *Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response*. Periodontol 2000, 1997. 13: p. 121-48.
54. Churton, M.C. and N.D. Greer, *Intracranial abscess secondary to dental infection*. N Z Dent J, 1980. 76(344): p. 58-60.
55. Torabinejad, M., et al., *An animal model to study regenerative endodontics*. J Endod, 2011. 37(2): p. 197-202.
56. Asci, S.K., *Endodonti*. 2014, Quintessence Yayıncılık: İstanbul.
57. Abbott, P.V., *The periapical space--a dynamic interface*. Aust Endod J, 2002. 28(3): p. 96-107.
58. Clerehugh, V., *Periodontal diseases in children and adolescents*. Br Dent J, 2008. 204(8): p. 469-71.
59. Haapasalo, M., *[The genus Bacteroides in human dental root canal infections. Taxonomic, ultrastructural, and clinical studies]*. Proc Finn Dent Soc, 1987. 83(4): p. 209-11.
60. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis*. Braz Dent J, 2007. 18(4): p. 267-80.
61. Alacam, T., *Endodonti*. 2012, Ankara: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları.
62. Uda, A., et al., *Josamycin concentrations in human dental granuloma after a single oral administration of josamycin*. Gen Pharmacol, 1989. 20(6): p. 823-5.
63. Shimizu, E., et al., *Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure*. J Endod, 2012. 38(9): p. 1293-7.
64. Schwartz, S.A., *Journal of Endodontics*, 2008. 34(4): p. 495.

65. Montagner, F., et al., *Treponema species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates*. J Endod, 2010. 36(11): p. 1796-9.
66. Hedin, M. and L. Polhagen, *Follow-up study of periradicular bone condensation*. Scand J Dent Res, 1971. 79(6): p. 436-40.
67. Dahlen, G., *Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions*. Periodontol 2000, 2002. 28: p. 206-39.
68. Glenny, A.M., Simpson T, *Clinical practice guideline on emergency management of acute apical periodontitis (AAP) in adults*. Evid Based Dent, 2004. 5(1): p. 7.
69. Cogulu, D., et al., *PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2008. 106(3): p. 443-9.
70. Baumgartner, J.C., A.B. Picket, and J.T. Muller, *Microscopic examination of oral sinus tracts and their associated periapical lesions*. J Endod, 1984. 10(4): p. 146-52.
71. Alacam, T., *Endodonti*. 2000, Ankara: Fakülteler Kitabevi Barış Yayınları.
72. Boyne, P.J., *Application of bone morphogenetic proteins in the treatment of clinical oral and maxillofacial osseous defects*. J Bone Joint Surg Am, 2001. 83-A Suppl 1(Pt 2): p. S146-50.
73. Amler, M.H., *The time sequence of tissue regeneration in human extraction wounds*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1969. 27(3): p. 309-18.
74. Fouad, A.F., R.E. Walton, and B.R. Rittman, *Healing of induced periapical lesions in ferret canines*. J Endod, 1993. 19(3): p. 123-9.
75. Holland, G.R., *Periapical innervation of the ferret canine one year after pulpectomy*. J Dent Res, 1992. 71(3): p. 470-4.
76. Mason, A.G. and G.R. Holland, *The reinnervation of healing extraction sockets in the ferret*. J Dent Res, 1993. 72(8): p. 1215-21.
77. Leonardo, M.R., et al., *Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994. 78(2): p. 232-8.
78. Ricucci, D. and K. Langeland, *Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study*. Int Endod J, 1998. 31(6): p. 394-409.
79. Halse, A. and O. Molven, *Increased width of the apical periodontal membrane space in endodontically treated teeth may represent favourable healing*. Int Endod J, 2004. 37(8): p. 552-60.
80. Yusuf, H., *The significance of the presence of foreign material periapically as a cause of failure of root treatment*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1982. 54(5): p. 566-574.

81. Brynolf, I., *A histological and Roentgenological study of the periapical region of human upper incisors*. Vol. 18. 1967.
82. Pitt Ford, T.R., *The effects on the periapical tissues of bacterial contamination of the filled root canal*. *Int Endod J*, 1982. 15(1): p. 16-22.
83. Rowe, A.H. and W.H. Binnie, *The incidence and location of micro-organisms following endodontic treatment*. *Br Dent J*, 1977. 142(3): p. 91-5.
84. Fouad, A.F. and J. Burleson, *The effect of diabetes mellitus on endodontic treatment outcome: data from an electronic patient record*. *J Am Dent Assoc*, 2003. 134(1): p. 43-51; quiz 117-8.
85. Danin, J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000. 90(4): p. 514-7.
86. Leonardi, R., et al., *Immunolocalization of CD44 adhesion molecules in human periradicular lesions*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2000. 89(4): p. 480-5.
87. Hülsmann, M., Schäfer, E., Bargholz, C., & Barthel, C., *Problems in endodontics: Etiology, diagnosis, and treatment*. 2009, Quintessence: London.
88. Torabinejad M., W.R., *Endodontics Principles and Practice* 4th edition ed. 2009, USA: Elsevier.
89. Gutmann JL, D.T., Lovdahl PE. , *Problem solving in the assessment of treatment outcomes, quality assurance, and their integration into endodontic treatment planning*. 5th ed. 2010, Bellingham, WA, USA: Mosby-Elsevier.
90. Strindberg, L.Z., *The dependence of the results of pulp therapy on certain factors; an analytic study based on radiographic and clinical follow-up examinations. [Tr. from the Swedish manuscript]*. 1956, Stockholm.
91. Bender, I.B., S. Seltzer, and W. Soltanoff, *Endodontic success--a reappraisal of criteria. 1*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1966. 22(6): p. 780-9.
92. Reit, C. and H.G. Grondahl, *Application of statistical decision theory to radiographic diagnosis of endodontically treated teeth*. *Scand J Dent Res*, 1983. 91(3): p. 213-8.
93. Ørstavik, D., K. Kerekes, and H.M. Eriksen, *Clinical performance of three endodontic sealers*. *Dental Traumatology*, 1987. 3(4): p. 178-186.
94. Ørstavik, D., V. Qvist, and K. Stoltze, *A multivariate analysis of the outcome of endodontic treatment*. *Eur J Oral Sci*, 2004. 112(3): p. 224-30.
95. Waltimo, T.M., et al., *Clinical performance of 3 endodontic sealers*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 2001. 92(1): p. 89-92.
96. Estrela, C., et al., *A new periapical index based on cone beam computed tomography*. *J Endod*, 2008. 34(11): p. 1325-1331.

97. Wong, R., *Conventional endodontic failure and retreatment*. Dent Clin North Am, 2004. 48(1): p. 265-89.
98. Matsumoto, T., et al., *Factors affecting successful prognosis of root canal treatment*. J Endod, 1987. 13(5): p. 239-42.
99. R. Morse, D., et al., *A radiographic evaluation of the periapical status of teeth treated by the gutta-percha-eucapercha endodontic method: A one-year follow-up study of 458 root canals. Part III*. Vol. 56. 1983. 190-7.
100. Selden, H.S., *Pulpoperiapical disease: diagnosis and healing. A clinical endodontic study*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1974. 37(2): p. 271-83.
101. Seltzer, S., I.B. Bender, and S. Turkenkopf, *FACTORS AFFECTING SUCCESSFUL REPAIR AFTER ROOT CANAL THERAPY*. J Am Dent Assoc, 1963. 67: p. 651-62.
102. Zeldow, B.J. and J.I. Ingle, *Correlation of the positive culture to the prognosis of endodontically treated teeth: a clinical study*. The Journal of the American Dental Association, 1963. 66(1): p. 9-13.
103. Harty, F.J., B.J. Parkins, and A.M. Wengraf, *Success rate in root canal therapy. A retrospective study of conventional cases*. Br Dent J, 1970. 128(2): p. 65-70.
104. Swartz, D.B., A.E. Skidmore, and J.A. Griffin, Jr., *Twenty years of endodontic success and failure*. Journal of Endodontics, 1983. 9(5): p. 198-202.
105. Kvist, T., *Endodontic retreatment. Aspects of decision making and clinical outcome*. Swed Dent J Suppl, 2001(144): p. 1-57.
106. Reit, C., *On decision making in endodontics. A study of diagnosis and management of periapical lesions in endodontically treated teeth*. Swed Dent J Suppl, 1986. 41: p. 1-30.
107. Friedman, S., *Considerations and concepts of case selection in the management of post-treatment endodontic disease (treatment failure)*. Endodontic Topics, 2002. 1(1): p. 54-78.
108. Endodontology, E.S.o., *Quality guidelines for endodontic treatment: consensus report of the European Society of Endodontology*. International Endodontic Journal, 2006. 39(12): p. 921-930.
109. Seltzer, S., et al., *Endodontic failures--an analysis based on clinical, roentgenographic, and histologic findings. II*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1967. 23(4): p. 517-30.
110. Bystrom, A., et al., *Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis*. Endod Dent Traumatol, 1987. 3(2): p. 58-63.
111. Molven O , H.A., Fristad I, MacDonald-JankowskiD *Periapical changes following root-canal treatment observed 20—27 years postoperatively*. International Endodontic Journal, 2002. 35(9): p. 784-790.

112. Ørstavik, D., *Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man*. Int Endod J, 1996. 29(3): p. 150-5.
113. Grossman, L.I., L.I. Shepard, and L.A. Pearson, *ROENTGENOLOGIC AND CLINICAL EVALUATION OF ENDODONTICALLY TREATED TEETH*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1964. 17: p. 368-74.
114. Kerekes, K. and L. Tronstad, *Long-term results of endodontic treatment performed with a standardized technique*. J Endod, 1979. 5(3): p. 83-90.
115. Sjogren, U., et al., *Factors affecting the long-term results of endodontic treatment*. J Endod, 1990. 16(10): p. 498-504.
116. Smith, C.S., D.J. Setchell, and F.J. Harty, *Factors influencing the success of conventional root canal therapy--a five-year retrospective study*. Int Endod J, 1993. 26(6): p. 321-33.
117. De Moor, R.J., et al., *Periapical health related to the quality of root canal treatment in a Belgian population*. Int Endod J, 2000. 33(2): p. 113-20.
118. Kirkevang, L.L., et al., *Longitudinal study of periapical and endodontic status in a Danish population*. Int Endod J, 2006. 39(2): p. 100-7.
119. Segura-Egea, J.J., et al., *Periapical status and quality of root fillings and coronal restorations in an adult Spanish population*. Int Endod J, 2004. 37(8): p. 525-30.
120. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Periradicular status related to the quality of coronal restorations and root canal fillings in a Brazilian population*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2005. 100(3): p. 369-74.
121. Sunay, H., et al., *Cross-sectional evaluation of the periapical status and quality of root canal treatment in a selected population of urban Turkish adults*. Int Endod J, 2007. 40(2): p. 139-45.
122. Weiger, R., et al., *Periapical status, quality of root canal fillings and estimated endodontic treatment needs in an urban German population*. Endod Dent Traumatol, 1997. 13(2): p. 69-74.
123. Perry, E, S., S, Salem S. SalimpoorR, , Sharma, Sims, C, Skenderis, V, Sobli, V, Stern, B: , *Long-term success of implant versus endodontic treatment* J Endod, 2003.
124. Eriksen, H.M., *Endodontology--epidemiologic considerations*. Endod Dent Traumatol, 1991. 7(5): p. 189-95.
125. Bergenholtz, G., et al., *Influence of apical overinstrumentation and overfilling on re-treated root canals*. J Endod, 1979. 5(10): p. 310-4.
126. Sjogren, U., et al., *Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. Int Endod J, 1997. 30(5): p. 297-306.
127. Fors, U.G. and J.O. Berg, *Endodontic treatment of root canals obstructed by foreign objects*. Int Endod J, 1986. 19(1): p. 2-10.

128. Grossman, L.I., *Endodontic failures*. Dent Clin North Am, 1972. 16(1): p. 59-70.
129. Hartwell, G.R. and M.C. England, *Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: a longitudinal study*. J Endod, 1993. 19(7): p. 357-61.
130. Salis, S.G., et al., *Patterns of indirect fracture in intact and restored human premolar teeth*. Endod Dent Traumatol, 1987. 3(1): p. 10-4.
131. Trope, M., D.O. Maltz, and L. Tronstad, *Resistance to fracture of restored endodontically treated teeth*. Endod Dent Traumatol, 1985. 1(3): p. 108-11.
132. Seltzer, S., I. Sinai, and D. August, *Periodontal effects of root perforations before and during endodontic procedures*. J Dent Res, 1970. 49(2): p. 332-9.
133. Seltzer, S., et al., *Biologic aspects of endodontics. 3. Periapical tissue reactions to root canal instrumentation*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1968. 26(4): p. 534-46.
134. Morse, D.R., et al., *A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of gutta-percha root canal sealers*. J Endod, 1981. 7(12): p. 545-50.
135. Ricucci, D., *Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 1. Literature review*. Int Endod J, 1998. 31(6): p. 384-93.
136. Seltzer, S., *Long-term radiographic and histological observations of endodontically treated teeth*. J Endod, 1999. 25(12): p. 818-22.
137. Pekruhn, R.B., *The incidence of failure following single-visit endodontic therapy*. J Endod, 1986. 12(2): p. 68-72.
138. Wu, M.K., et al., *Fluid transport and bacterial penetration along root canal fillings*. Int Endod J, 1993. 26(4): p. 203-8.
139. Dalton, B.C., et al., *Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation*. J Endod, 1998. 24(11): p. 763-7.
140. Mandel, E., P. Machtou, and S. Friedman, *Scanning electron microscope observation of canal cleanliness*. J Endod, 1990. 16(6): p. 279-83.
141. Bystrom, A. and G. Sundqvist, *Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1983. 55(3): p. 307-12.
142. Sjogren, U., et al., *The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing*. Int Endod J, 1991. 24(3): p. 119-25.
143. Weiger, R., R. Rosendahl, and C. Lost, *Influence of calcium hydroxide intracanal dressings on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions*. Int Endod J, 2000. 33(3): p. 219-26.
144. Katebzadeh, N., J. Hupp, and M. Trope, *Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs*. J Endod, 1999. 25(5): p. 364-8.

145. Katebzadeh, N., A. Sigurdsson, and M. Trope, *Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study*. International Endodontic Journal, 2000. 33(1): p. 60-65.
146. Ray, H.A. and M. Trope, *Periapical status of endodontically treated teeth in relation to the technical quality of the root filling and the coronal restoration*. Int Endod J, 1995. 28(1): p. 12-8.
147. Alves, J., R. Walton, and D. Drake, *Coronal leakage: endotoxin penetration from mixed bacterial communities through obturated, post-prepared root canals*. J Endod, 1998. 24(9): p. 587-91.
148. Khayat, A., S.J. Lee, and M. Torabinejad, *Human saliva penetration of coronally unsealed obturated root canals*. J Endod, 1993. 19(9): p. 458-61.
149. Magura, M.E., et al., *Human saliva coronal microleakage in obturated root canals: an in vitro study*. J Endod, 1991. 17(7): p. 324-31.
150. Swanson, K. and S. Madison, *An evaluation of coronal microleakage in endodontically treated teeth. Part I. Time periods*. J Endod, 1987. 13(2): p. 56-9.
151. Molander, A., et al., *Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis*. Int Endod J, 1998. 31(1): p. 1-7.
152. Sundqvist, G., et al., *Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 1998. 85(1): p. 86-93.
153. Allen, R.K., C.W. Newton, and C.E. Brown, Jr., *A statistical analysis of surgical and nonsurgical endodontic retreatment cases*. J Endod, 1989. 15(6): p. 261-6.
154. Friedman, S. and A. Stabholz, *Endodontic retreatment--case selection and technique. Part 1: Criteria for case selection*. J Endod, 1986. 12(1): p. 28-33.
155. Hoen, M.M. and F.E. Pink, *Contemporary endodontic retreatments: an analysis based on clinical treatment findings*. J Endod, 2002. 28(12): p. 834-6.
156. Ruddle, C.J., *Nonsurgical retreatment*. J Endod, 2004. 30(12): p. 827-45.
157. Hepworth, M.J. and S. Friedman, *Treatment outcome of surgical and non-surgical management of endodontic failures*. J Can Dent Assoc, 1997. 63(5): p. 364-71.
158. Paik, S., C. Sechrist, and M. Torabinejad, *Levels of evidence for the outcome of endodontic retreatment*. J Endod, 2004. 30(11): p. 745-50.
159. Reit, C. and T. Kvist, *Endodontic retreatment behaviour: the influence of disease concepts and personal values*. Int Endod J, 1998. 31(5): p. 358-63.
160. Stabholz, A. and S. Friedman, *Endodontic retreatment--case selection and technique. Part 2: Treatment planning for retreatment*. J Endod, 1988. 14(12): p. 607-14.

161. Hulsmann, M., *Methods for removing metal obstructions from the root canal*. Endod Dent Traumatol, 1993. 9(6): p. 223-37.
162. Selbst, A.G., *Understanding informed consent and its relationship to the incidence of adverse treatment events in conventional endodontic therapy*. J Endod, 1990. 16(8): p. 387-90.
163. Buchanan, L.S., *Innovations in endodontic instruments and techniques: how they simplify treatment*. Dent Today, 2002. 21(12): p. 52-4, 56-61.
164. Kersten, D.D., P. Mines, and M. Sweet, *Use of the microscope in endodontics: results of a questionnaire*. J Endod, 2008. 34(7): p. 804-7.
165. Kim, S. and S. Baek, *The microscope and endodontics*. Dent Clin North Am, 2004. 48(1): p. 11-8.
166. Mamoun, J.S., *A rationale for the use of high-powered magnification or microscopes in general dentistry*. Gen Dent, 2009. 57(1): p. 18-26; quiz 27-8, 95-6.
167. Perrin, P., K.W. Neuhaus, and A. Lussi, *The impact of loupes and microscopes on vision in endodontics*. Int Endod J, 2014. 47(5): p. 425-9.
168. Relvas, J.B., et al., *Endodontic Treatment of Maxillary Premolar with Three Root Canals Using Optical Microscope and NiTi Rotatory Files System*. Case Rep Dent, 2013. 2013: p. 710408.
169. Selden, H.S., *The dental-operating microscope and its slow acceptance*. J Endod, 2002. 28(3): p. 206-7.
170. Utpal Kumar Das, S.D., *Dental Operating Microscope in Endodontics-A Review*. Vol. 5. 2013. 1-8.
171. Hulsmann, M. and I. Schinkel, *Influence of several factors on the success or failure of removal of fractured instruments from the root canal*. Endod Dent Traumatol, 1999. 15(6): p. 252-8.
172. Terauchi, Y., L. O'Leary, and H. Suda, *Removal of separated files from root canals with a new file-removal system: Case reports*. J Endod, 2006. 32(8): p. 789-97.
173. Nehme, W., *A new approach for the retrieval of broken instruments*. J Endod, 1999. 25(9): p. 633-5.
174. Souter, N.J. and H.H. Messer, *Complications associated with fractured file removal using an ultrasonic technique*. J Endod, 2005. 31(6): p. 450-2.
175. Friedman, S., A. Stabholz, and A. Tamse, *Endodontic retreatment--case selection and technique. 3. Retreatment techniques*. J Endod, 1990. 16(11): p. 543-9.
176. Iqbal, M.K., et al., *A comparison of three methods for preparing centered platforms around separated instruments in curved canals*. J Endod, 2006. 32(1): p. 48-51.

177. Fors, U.G. and J.O. Berg, *A method for the removal of broken endodontic instruments from root canals*. J Endod, 1983. 9(4): p. 156-9.
178. Okiji, T., *Modified usage of the Masserann kit for removing intracanal broken instruments*. J Endod, 2003. 29(7): p. 466-7.
179. Roig-Greene, J.L., *The retrieval of foreign objects from root canals: a simple aid*. J Endod, 1983. 9(9): p. 394-7.
180. de Oliveira, D.P., et al., *Comparison between gutta-percha and resilon removal using two different techniques in endodontic retreatment*. J Endod, 2006. 32(4): p. 362-4.
181. Ezzie, E., et al., *Efficacy of retreatment techniques for a resin-based root canal obturation material*. J Endod, 2006. 32(4): p. 341-4.
182. Hulsmann, M. and S. Stotz, *Efficacy, cleaning ability and safety of different devices for gutta-percha removal in root canal retreatment*. Int Endod J, 1997. 30(4): p. 227-33.
183. Sae-Lim, V., et al., *Effectiveness of ProFile .04 taper rotary instruments in endodontic retreatment*. J Endod, 2000. 26(2): p. 100-4.
184. Schirrmeister, J.F., et al., *Effectiveness of hand and rotary instrumentation for removing a new synthetic polymer-based root canal obturation material (Epiphany) during retreatment*. Int Endod J, 2006. 39(2): p. 150-6.
185. Wilcox, L.R., et al., *Endodontic retreatment: evaluation of gutta-percha and sealer removal and canal reinstrumentation*. J Endod, 1987. 13(9): p. 453-7.
186. Ladley, R.W., et al., *Effectiveness of halothane used with ultrasonic or hand instrumentation to remove gutta-percha from the root canal*. J Endod, 1991. 17(5): p. 221-4.
187. Wilcox, L.R., *Endodontic retreatment: ultrasonics and chloroform as the final step in reinstrumentation*. J Endod, 1989. 15(3): p. 125-8.
188. Chutich, M.J., et al., *Risk assessment of the toxicity of solvents of gutta-percha used in endodontic retreatment*. J Endod, 1998. 24(4): p. 213-6.
189. Hansen, M.G., *Relative efficiency of solvents used in endodontics*. J Endod, 1998. 24(1): p. 38-40.
190. Mandel, E. and S. Friedman, *Endodontic retreatment: a rational approach to root canal reinstrumentation*. J Endod, 1992. 18(11): p. 565-9.
191. Wilcox, L.R., *Endodontic retreatment with halothane versus chloroform solvent*. J Endod, 1995. 21(6): p. 305-7.
192. Moshonov, J., M. Trope, and S. Friedman, *Retreatment efficacy 3 months after obturation using glass ionomer cement, zinc oxide-eugenol, and epoxy resin sealers*. J Endod, 1994. 20(2): p. 90-2.
193. Ibarrola, J.L., K.I. Knowles, and M.O. Ludlow, *Retrievability of Thermafil plastic cores using organic solvents*. J Endod, 1993. 19(8): p. 417-8.

194. Imura, N., M.L. Zuolo, and D. Kherlakian, *Comparison of endodontic retreatment of laterally condensed gutta-percha and Thermafil with plastic carriers*. J Endod, 1993. 19(12): p. 609-12.
195. Lipski, M. and K. Wozniak, *In vitro infrared thermographic assessment of root surface temperature rises during thermafil retreatment using system B*. J Endod, 2003. 29(6): p. 413-5.
196. Wilcox, L.R., *Thermafil retreatment with and without chloroform solvent*. J Endod, 1993. 19(11): p. 563-6.
197. Wolcott, J.F., V.T. Himel, and M.L. Hicks, *Thermafil retreatment using a new "System B" technique or a solvent*. J Endod, 1999. 25(11): p. 761-4.
198. Zuolo, M.L., N. Imura, and M.O. Ferreira, *Endodontic retreatment of thermafil or lateral condensation obturations in post space prepared teeth*. J Endod, 1994. 20(1): p. 9-12.
199. Fachin, E.V., C.S. Wenckus, and C.E. Aun, *Retreatment using a modified-tip instrument*. J Endod, 1995. 21(8): p. 425-8.
200. Jeng, H.W. and M.E. EIDeeb, *Removal of hard paste fillings from the root canal by ultrasonic instrumentation*. J Endod, 1987. 13(6): p. 295-8.
201. Vranas, R.N., G.R. Hartwell, and P.C. Moon, *The effect of endodontic solutions on resorcinol-formalin paste*. J Endod, 2003. 29(1): p. 69-72.
202. Gambrel, M.G., et al., *The effect of endodontic solutions on resorcinol-formalin paste in teeth*. J Endod, 2005. 31(1): p. 25-9.
203. Torabinejad, M., et al., *Factors associated with endodontic interappointment emergencies of teeth with necrotic pulps*. J Endod, 1988. 14(5): p. 261-6.
204. Trope, M., *Flare-up rate of single-visit endodontics*. Int Endod J, 1991. 24(1): p. 24-6.
205. Walton, R. and A. Fouad, *Endodontic interappointment flare-ups: a prospective study of incidence and related factors*. J Endod, 1992. 18(4): p. 172-7.
206. Siqueira, J.F., Jr., *Microbial causes of endodontic flare-ups*. Int Endod J, 2003. 36(7): p. 453-63.
207. Henderson, B. and M. Wilson, *Commensal communism and the oral cavity*. J Dent Res, 1998. 77(9): p. 1674-83.
208. Nair, P.N., et al., *Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study*. J Endod, 1990. 16(12): p. 580-8.
209. W., M., *An introduction in the study of the bacteriopathology of the dental pulp*. Dent Cosmos 1894. 36: p. 505-527.
210. Aydin, M., *ANAEROBİZM [Anaerobism]*. 2004. p. 569-576.

211. Gürler, N., 'Anaerop İnfeksiyonlar ve Laboratuvar Tanısı', *Aneorop Bakteri İnfeksiyonları*, H.L. S. Ulusoy, Editor. 2005, Bilimsel Tıp Yayınevi: Ankara. p. 9-10.
212. Gürler, N., *Pasteur, Anaerobik Yaşam ve Fermentasyon*. ANKEM, 2011. 25 (Ek-2): p. 1-4.
213. Sundqvist, G., *Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994. 78(4): p. 522-30.
214. Sundqvist, G. and D. Figdor, *Life as an endodontic pathogen*. Endodontic Topics, 2003. 6(1): p. 3-28.
215. Le Goff, A., et al., *Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp*. Oral Microbiol Immunol, 1997. 12(5): p. 318-22.
216. Michelich, V.J., G.S. Schuster, and D.H. Pashley, *Bacterial penetration of human dentin in vitro*. J Dent Res, 1980. 59(8): p. 1398-403.
217. Hoshino, E., et al., *Bacterial invasion of non-exposed dental pulp*. Int Endod J, 1992. 25(1): p. 2-5.
218. Bergenholtz, G. and J. Lindhe, *Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp*. Scand J Dent Res, 1975. 83(3): p. 153-8.
219. Warfvinge, J. and G. Bergenholtz, *Healing capacity of human and monkey dental pulps following experimentally-induced pulpitis*. Endod Dent Traumatol, 1986. 2(6): p. 256-62.
220. Baumgartner, J., L.K. Bakland, and E.I. Sugita, *Microbiology of endodontics and asepsis in endodontic practice*. 2002.
221. Cvek, M., et al., *Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys*. J Endod, 1982. 8(9): p. 391-7.
222. Czamecki, R.T. and H. Schilder, *A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease*. J Endod, 1979. 5(8): p. 242-53.
223. Mazur, B. and M. Massler, *INFLUENCE OF PERIODONTAL DISEASE OF THE DENTAL PULP*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1964. 17: p. 592-603.
224. Torabinejad, M. and R.D. Kiger, *A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1985. 59(2): p. 198-200.
225. Wong, R., R.S. Hirsch, and N.G. Clarke, *Endodontic effects of root planing in humans*. Endod Dent Traumatol, 1989. 5(4): p. 193-6.
226. Kobayashi, T., et al., *The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis*. Int Endod J, 1990. 23(2): p. 100-6.

227. Langeland, K., H. Rodrigues, and W. Dowden, *Periodontal disease, bacteria, and pulpal histopathology*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1974. 37(2): p. 257-70.
228. Csernyei, J., *Anacoric Effect of Chronic Periapical Inflammations*. Journal of Dental Research, 1939. 18(6): p. 527-531.
229. Delivanis, P.D., R.B. Snowden, and R.J. Doyle, *Localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled root canals*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1981. 52(4): p. 430-2.
230. Grossman, L.I., *Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth*. J Dent Res, 1967. 46(3): p. 551-3.
231. Love, R.M. and H.F. Jenkinson, *Invasion of dentinal tubules by oral bacteria*. Crit Rev Oral Biol Med, 2002. 13(2): p. 171-83.
232. Sundqvist, G., *Associations between microbial species in dental root canal infections*. Oral Microbiol Immunol, 1992. 7(5): p. 257-62.
233. El, S., *Microbiology of endodontics*. , in *Endodontics 4th* B.L. Ingle JI, Editor. 1994, Lea&Febiger: Philadelphia. p. 608-622.
234. F., T., *Anaerop bakterilerin genel özellikleri*, in *Enfeksiyon hastalıkları ve mikrobiyolojisi*, S.G. Topçu AW, Doganay M, Editor. 2002, Nobel Tıp Kitabevleri: İstanbul. p. 2319- 2333.
235. Sundqvist, G., *Ecology of the root canal flora*. J Endod, 1992. 18(9): p. 427-30.
236. P.N., N., *Pathobiology of the periapex*. , in *Pathways of the pulp*, B.R. Cohen S, Editor. 2002, Mosby: USA. p. 412- 457.
237. Feuille, F., et al., *Mixed infection with Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in a murine lesion model: potential synergistic effects on virulence*. Infect Immun, 1996. 64(6): p. 2094-100.
238. Dahlen, G., et al., *Interactions within a collection of eight bacterial strains isolated from a monkey dental root canal*. Oral Microbiol Immunol, 1987. 2(4): p. 164-70.
239. Fabricius, L., et al., *Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure*. Scand J Dent Res, 1982. 90(2): p. 134-44.
240. Ter Steeg, P.F. and J.S. Van Der Hoeven, *Development of Periodontal Microflora on Human Serum*. Microbial Ecology in Health and Disease, 1989. 2(1): p. 1-10.
241. Persson, S., et al., *The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria*. Oral Microbiol Immunol, 1990. 5(4): p. 195-201.
242. Gibbons, R.J. and L.P. Engle, *VITAMIN K COMPOUNDS IN BACTERIA THAT ARE OBLIGATE ANAEROBES*. Science, 1964. 146(3649): p. 1307-9.

243. Grenier, D. and D. Mayrand, *Nutritional relationships between oral bacteria*. Infection and immunity, 1986. 53(3): p. 616-620.
244. Siqueira, J.F., Jr., *Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002. 94(3): p. 281-93.
245. Fabricius, L., *Oral bacteria and apical periodontitis: an experimental study in monkey*. 1982.
246. FABRICIUS, L., et al., *Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys*. European Journal of Oral Sciences, 1982. 90(3): p. 200-206.
247. Moller, A.J., et al., *Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains*. Eur J Oral Sci, 2004. 112(3): p. 207-15.
248. Sundqvist, G.K., et al., *Capacity of anaerobic bacteria from necrotic dental pulps to induce purulent infections*. Infect Immun, 1979. 25(2): p. 685-93.
249. Olsen, I. and G. Dahlén, *Salient virulence factors in anaerobic bacteria, with emphasis on their importance in endodontic infections*. Vol. 9. 2004. 15-26.
250. Bergenholtz G, Horsted- Bindslev P, and R. C., *Textbook of endodontology*. 1st ed. 2003, Oxford: Blackwell.
251. Rietschel, E.T. and H. Brade, *Bacterial endotoxins*. Sci Am, 1992. 267(2): p. 54-61.
252. Dahlen, G. and G. Bergenholtz, *Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps*. J Dent Res, 1980. 59(6): p. 1033-40.
253. Boneca, I.G., *The role of peptidoglycan in pathogenesis*. Curr Opin Microbiol, 2005. 8(1): p. 46-53.
254. Baumgartner JC, H.J., *Endodontic microbiology and treatment of infections*. , in *Pathways of the pulp* H.K. Cohen S, Editor. 2006, Mosby: Philadelphia. p. 580- 607.
255. Henderson, B., S. Poole, and M. Wilson, *Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis*. Microbiol Rev, 1996. 60(2): p. 316-41.
256. Heeg, K., et al., *Bacterial DNA as an evolutionary conserved ligand signalling danger of infection to immune cells*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1998. 17(7): p. 464-9.
257. PN, N., *Pathobiology of primary apical periodontitis.*, in *Pathways of the pulp*, H.K. Cohen S, Editor. 2006, Elsevier Mosby: Canada p. 541- 579.
258. Taichman, N.S., R.T. Dean, and C.J. Sanderson, *Biochemical and morphological characterization of the killing of human monocytes by a leukotoxin derived from Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect Immun, 1980. 28(1): p. 258-68.

259. Langeland, K., R.M. Block, and L.I. Grossman, *A histopathologic and histobacteriologic study of 35 periapical endodontic surgical specimens*. J Endod, 1977. 3(1): p. 8-23.
260. Szajkis, S. and M. Tagger, *Periapical healing in spite of incomplete root canal debridement and filling*. J Endod, 1983. 9(5): p. 203-9.
261. Goulhen, F., D. Grenier, and D. Mayrand, *Oral microbial heat-shock proteins and their potential contributions to infections*. Crit Rev Oral Biol Med, 2003. 14(6): p. 399-412.
262. Persson, S., R. Claesson, and J. Carlsson, *The capacity of subgingival microbiotas to produce volatile sulfur compounds in human serum*. Oral Microbiol Immunol, 1989. 4(3): p. 169-72.
263. Niederman, R., J. Zhang, and S. Kashket, *Short-chain carboxylic-acid-stimulated, PMN-mediated gingival inflammation*. Crit Rev Oral Biol Med, 1997. 8(3): p. 269-90.
264. Igarashi, K. and K. Kashiwagi, *Polyamines: mysterious modulators of cellular functions*. Biochem Biophys Res Commun, 2000. 271(3): p. 559-64.
265. Maita, E. and H. Horiuchi, *Polyamine analysis of infected root canal contents related to clinical symptoms*. Endod Dent Traumatol, 1990. 6(5): p. 213-7.
266. Mayrand, D. and S.C. Holt, *Biology of asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species*. Microbiol Rev, 1988. 52(1): p. 134-52.
267. van Steenberg, T.J., L.M. van der Mispel, and J. de Graaff, *Effects of ammonia and volatile fatty acids produced by oral bacteria on tissue culture cells*. J Dent Res, 1986. 65(6): p. 909-12.
268. Costerton, J.W., G.G. Geesey, and K.J. Cheng, *How bacteria stick*. Sci Am, 1978. 238(1): p. 86-95.
269. Donlan, R.M. and J.W. Costerton, *Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms*. Clin Microbiol Rev, 2002. 15(2): p. 167-93.
270. Caldwell, D.E., et al., *Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms*. Adv Dent Res, 1997. 11(1): p. 4-13.
271. Lazar, V., *Quorum sensing in biofilms--how to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power?* Anaerobe, 2011. 17(6): p. 280-5.
272. Flemming, H.C. and J. Wingender, *The biofilm matrix*. Nat Rev Microbiol, 2010. 8(9): p. 623-33.
273. Donlan, R.M., *Role of biofilms in antimicrobial resistance*. Asaio j, 2000. 46(6): p. S47-52.
274. Ingle JI, Bakland L, and B. JC., *Microbiology of Endodontic Disease.*, in *Ingle's Endodontics 6*, S.J.J. Baumgartner JC, Sedgley CM, Kishen A. , Editor. 2008, BC Decker p. 270- 85.

275. Miller, M.B. and B.L. Bassler, *Quorum sensing in bacteria*. Annu Rev Microbiol, 2001. 55: p. 165-99.
276. Winzer, K. and P. Williams, *Quorum sensing and the regulation of virulence gene expression in pathogenic bacteria*. Int J Med Microbiol, 2001. 291(2): p. 131-43.
277. Camilli, A. and B.L. Bassler, *Bacterial small-molecule signaling pathways*. Science, 2006. 311(5764): p. 1113-6.
278. Antunes, L.C., et al., *Quorum sensing in bacterial virulence*. Microbiology, 2010. 156(Pt 8): p. 2271-82.
279. Moore, W.E., *Microbiology of periodontal disease*. J Periodontal Res, 1987. 22(5): p. 335-41.
280. Leonardo, M.R., et al., *EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth*. J Endod, 2002. 28(12): p. 815-8.
281. Noiri, Y., et al., *Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis*. J Endod, 2002. 28(10): p. 679-83.
282. Sunde, P.T., et al., *Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy*. J Endod, 2002. 28(4): p. 304-10.
283. Wang, J., et al., *Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis*. J Endod, 2012. 38(7): p. 954-9.
284. Kıyan, M., *Anaerobic Bakteriler*, in *Temel Klinik Ve Mikrobiyoloji 1999*, Güneş Kitapevi p. 611-668
285. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Profiling of Root Canal Bacterial Communities Associated with Chronic Apical Periodontitis from Brazilian and Norwegian Subjects*. Journal of Endodontics, 2008. 34(12): p. 1457-1461.
286. Brook, I. and R.I. Walker, *Significance of encapsulated Bacteroides melaninogenicus and Bacteroides fragilis groups in mixed infections*. Infect Immun, 1984. 44(1): p. 12-5.
287. Murray, P.R. and E.J. Baron, *Manual of clinical microbiology*. 2007, Washington, D.C.: ASM Press.
288. *Anaerop Enfeksiyonların Rutin Tanısı*. KLİMUD-TMC. Haziran 2011, İstanbul: Marmara Üniversitesi.
289. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. J Clin Microbiol, 2005. 43(11): p. 5721-32.
290. Dethlefsen, L., et al., *Assembly of the human intestinal microbiota*. Trends Ecol Evol, 2006. 21(9): p. 517-23.
291. Aas, J.A., et al., *Subgingival plaque microbiota in HIV positive patients*. J Clin Periodontol, 2007. 34(3): p. 189-95.

292. de Lillo, A., et al., *Novel subgingival bacterial phylotypes detected using multiple universal polymerase chain reaction primer sets*. Oral Microbiol Immunol, 2006. 21(1): p. 61-8.
293. Kazor, C.E., et al., *Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients*. J Clin Microbiol, 2003. 41(2): p. 558-63.
294. Paster, B.J., et al., *Bacterial diversity in human subgingival plaque*. J Bacteriol, 2001. 183(12): p. 3770-83.
295. Paster, B.J., et al., *Prevalent bacterial species and novel phylotypes in advanced noma lesions*. J Clin Microbiol, 2002. 40(6): p. 2187-91.
296. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Diversity of endodontic microbiota revisited*. J Dent Res, 2009. 88(11): p. 969-81.
297. Munson, M.A., et al., *Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections*. J Dent Res, 2002. 81(11): p. 761-6.
298. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Treponema species associated with abscesses of endodontic origin*. Oral Microbiol Immunol, 2004. 19(5): p. 336-9.
299. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2--Redefining the endodontic microbiota*. J Endod, 2005. 31(7): p. 488-98.
300. Sakamoto, M., et al., *Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures*. Oral Microbiol Immunol, 2007. 22(1): p. 19-23.
301. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2007. 104(1): p. 122-30.
302. Vianna, M.E., et al., *In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue*. Int Endod J, 2006. 39(6): p. 484-92.
303. Siqueira, J.F., Jr., I.N. Rocas, and A.S. Rosado, *Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach*. Oral Microbiol Immunol, 2004. 19(6): p. 363-70.
304. Conrads, G., et al., *The use of a 16s rDNA directed PCR for the detection of endodontopathogenic bacteria*. J Endod, 1997. 23(7): p. 433-8.
305. Baumgartner, J.C., S.U. Khemaleelakul, and T. Xia, *Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections*. J Endod, 2003. 29(12): p. 794-7.
306. Rocas, I.N., et al., *Oral treponemes in primary root canal infections as detected by nested PCR*. Int Endod J, 2003. 36(1): p. 20-6.

307. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Checkerboard DNA-DNA hybridization analysis of endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2000. 89(6): p. 744-8.
308. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation*. J Endod, 2004. 30(9): p. 638-43.
309. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Peptostreptococcus micros* in Primary Endodontic Infections as Detected by 16S rDNA-based Polymerase Chain Reaction. Journal of Endodontics, 2003. 29(2): p. 111-113.
310. Gomes, B.P., et al., *Molecular analysis of Filifactor alocis, Tannerella forsythia, and treponema denticola associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment*. J Endod, 2006. 32(10): p. 937-40.
311. Siqueira Jr, J.F. and I.N. Rôças, *Detection of Filifactor alocis in endodontic infections associated with different forms of periradicular diseases*. Oral Microbiology and Immunology, 2003. 18(4): p. 263-265.
312. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Polymerase chain reaction detection of Propionibacterium propionicus and Actinomyces radicidentis in primary and persistent endodontic infections*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2003. 96(2): p. 215-22.
313. Fouad, A.F., et al., *PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2002. 40(9): p. 3223-31.
314. Chavez de Paz, L.E., A. Molander, and G. Dahlen, *Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment*. Int Endod J, 2004. 37(9): p. 579-87.
315. Chu, F.C., et al., *Identification of cultivable microorganisms from primary endodontic infections with exposed and unexposed pulp space*. J Endod, 2005. 31(6): p. 424-9.
316. Gomes, B.P., J.D. Lilley, and D.B. Drucker, *Clinical significance of dental root canal microflora*. J Dent, 1996. 24(1-2): p. 47-55.
317. Khemaleelakul, S., J.C. Baumgartner, and S. Pruksakorn, *Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2002. 94(6): p. 746-55.
318. Weiger, R., et al., *Microbial flora of sinus tracts and root canals of non-vital teeth*. Endod Dent Traumatol, 1995. 11(1): p. 15-9.
319. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rôças, *Campylobacter gracilis and Campylobacter rectus in primary endodontic infections*. Int Endod J, 2003. 36(3): p. 174-80.
320. Godon, J.J., et al., *Rarity associated with specific ecological niches in the bacterial world: the 'Synergistes' example*. Environ Microbiol, 2005. 7(2): p. 213-24.
321. Rôças, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Detection of novel oral species and phylotypes in symptomatic endodontic infections including abscesses*. FEMS Microbiol Lett, 2005. 250(2): p. 279-85.

322. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Uncultivated phylotypes and newly named species associated with primary and persistent endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2005. 43(7): p. 3314-9.
323. Siqueira, J.F., et al., *Novel Bacterial Phylotypes in Endodontic Infections*. Journal of Dental Research, 2005. 84(6): p. 565-569.
324. Vianna, M.E., et al., *Quantification and characterization of Synergistes in endodontic infections*. Oral Microbiology and Immunology, 2007. 22(4): p. 260-265.
325. Rocas, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Species-directed 16S rRNA gene nested PCR detection of Olsenella species in association with endodontic diseases*. Lett Appl Microbiol, 2005. 41(1): p. 12-6.
326. Rôças, I.N. and J.F. Siqueira, Jr., *Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis*. Journal of clinical microbiology, 2008. 46(11): p. 3599-3606.
327. Rolph, H.J., et al., *Molecular identification of microorganisms from endodontic infections*. J Clin Microbiol, 2001. 39(9): p. 3282-9.
328. Saito, D., et al., *Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries*. J Med Microbiol, 2006. 55(Pt 1): p. 101-7.
329. Vickerman, M.M., et al., *Phylogenetic analysis of bacterial and archaeal species in symptomatic and asymptomatic endodontic infections*. J Med Microbiol, 2007. 56(Pt 1): p. 110-8.
330. Pinheiro, E.T., et al., *Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions*. Int Endod J, 2003. 36(1): p. 1-11.
331. Rocas, I.N., et al., *Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. 98(6): p. 741-9.
332. Siqueira, J.F., Jr. and I.N. Rocas, *Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 2004. 97(1): p. 85-94.
333. Rocas, I.N., et al., *Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population*. J Endod, 2004. 30(7): p. 504-8.
334. Rocas, I.N., J.F. Siqueira, Jr., and K.R. Santos, *Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases*. J Endod, 2004. 30(5): p. 315-20.
335. Sedgley, C., et al., *Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals*. J Endod, 2006. 32(3): p. 173-7.
336. Zoletti, G.O., J.F. Siqueira, Jr., and K.R. Santos, *Identification of Enterococcus faecalis in root-filled teeth with or without periradicular lesions*

- by culture-dependent and-independent approaches. *J Endod*, 2006. 32(8): p. 722-6.
337. Cheung, G.S. and M.W. Ho, *Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions*. *Oral Microbiol Immunol*, 2001. 16(6): p. 332-7.
 338. Egan, M.W., et al., *Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis*. *Int Endod J*, 2002. 35(4): p. 321-9.
 339. Peciuliene, V., et al., *Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis*. *Int Endod J*, 2001. 34(6): p. 429-34.
 340. Citron, D.M., *Rapid Identification of Anaerobes in the Clinical Laboratory*. *Anaerobe*, 1999. 5(3): p. 109-113.
 341. Garcia, L.S. and H.D. Isenberg. *Clinical microbiology procedures handbook*. 2010; Available from: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817435>.
 342. Song, Y., *PCR-based diagnostics for anaerobic infections*. *Anaerobe*, 2005. 11(1-2): p. 79-91.
 343. Raheesa M Khatib, V.a.N.K., *Modern Identification Methods of Bacteria*. *RRJAAS*, 2014. 3(3): p. 32-38.
 344. Urban, E., et al., *Detection of periodontopathogenic bacteria in pregnant women by traditional anaerobic culture method and by a commercial molecular genetic method*. *Anaerobe*, 2010. 16(3): p. 283-8.
 345. Tokman, H.B., et al., *Prevalence and antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteria isolated from perforated corneal ulcers by culture and multiplex PCR: an evaluation in cases with keratitis and endophthalmitis*. *Clin Lab*, 2014. 60(11): p. 1879-86.
 346. Tüzüner Öncül, A.M., et al., *Detecting Gram-positive anaerobic cocci directly from the clinical samples by multiplex polymerase chain reaction in odontogenic infections*. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, 2015. 73(2): p. 259-266.
 347. Grein, J.D., et al., *Comparison of testing approaches for Clostridium difficile infection at a large community hospital*. *Clin Microbiol Infect*, 2014. 20(1): p. 65-9.
 348. Johnson, S., *Recurrent Clostridium difficile infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes*. *J Infect*, 2009. 58(6): p. 403-10.
 349. Lin, Y.T., et al., *Identification of clinically important anaerobic bacteria by an oligonucleotide array*. *J Clin Microbiol*, 2010. 48(4): p. 1283-90.
 350. Biswas, S. and J.M. Rolain, *Use of MALDI-TOF mass spectrometry for identification of bacteria that are difficult to culture*. *J Microbiol Methods*, 2013. 92(1): p. 14-24.

351. Li, Y., et al., *MALDI-TOF MS versus VITEK 2 ANC card for identification of anaerobic bacteria*. J Thorac Dis, 2014. 6(5): p. 517-23.
352. Thomson, J.J., *Bakerian Lecture*; Rays of positive electricity. Proceedings of the Royal Society of London. Series A, Containing Papers of a Mathematical and Physical Character, 1913. 89(607): p. 1-20.
353. Aston, F.W., *A positive ray spectrograph*. 1919, [London]: [Taylor & Francis].
354. Downard, K.M., *Francis William Aston: The Man Behind the Mass Spectrograph*. European Journal of Mass Spectrometry, 2007. 13(3): p. 177-190.
355. ; Available from: <https://www.americanlaboratory.com/347045-Growth-of-Mass-Spec-From-1960s-to-Present-Interview-With-Professor-O-David-Sparkman/>.
356. Karas, M. and F. Hillenkamp, *Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons*. Anal Chem, 1988. 60(20): p. 2299-301.
357. Mellmann, A., et al., *Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry in comparison to 16S rRNA gene sequencing for species identification of nonfermenting bacteria*. J Clin Microbiol, 2008. 46(6): p. 1946-54.
358. Seng, P., et al., *Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry*. Clin Infect Dis, 2009. 49(4): p. 543-51.
359. Mancini, N., et al., *Comparative evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry systems for identification of yeasts of medical importance*. J Clin Microbiol, 2013. 51(7): p. 2453-7.
360. Olander, D.P., *Instrumental Methods of Analysis, Sixth Edition (Willard, Hobart H.; Merritt, Lynne L.; Dean, John A.; Settle, Frank A., Jr.)*. Journal of Chemical Education, 1984. 61(8): p. A222.
361. Finehout, E.J. and K.H. Lee, *An introduction to mass spectrometry applications in biological research*. Biochem Mol Biol Educ, 2004. 32(2): p. 93-100.
362. Jurinke, C., P. Oeth, and D. van den Boom, *MALDI-TOF mass spectrometry: a versatile tool for high-performance DNA analysis*. Mol Biotechnol, 2004. 26(2): p. 147-64.
363. Biberoglu, G. *Kütle Spektrometresi ve Tıp Alanında Kullanımı*. 2003.
364. Anhalt, J.P. and C. Fenselau, *Identification of bacteria using mass spectrometry*. Analytical Chemistry, 1975. 47(2): p. 219-225.
365. Alan L. Rockwood, M.M.K.a.N.J.C., *Mass Spectrometry*, in *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*

N. Rifai, A.R. Horvath, and C. Wittwer, Editors. 2018.

366. Cooks, R., K. Busch, and G. Glish, *Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials*. Science Science, 1983. 222(4621): p. 273-291.
367. De Hoffmann, E. and V. Stroobant. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 2013; Available from: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:101:1-201411144161>.
368. *Manyetik sektörlü kütle spektrometresinin kısımları*. Available from: <http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/graphics/carey040c/ch13/figures/1334.gif>.
369. Skoog, D.A., F.J. Holler, and S.R. Crouch, *Principles of instrumental analysis*. 2018.
370. Kiser, R.W. and R.E. Sullivan, *Mass spectrometry*. Anal Chem, 1968. 40(5): p. 273r+.
371. Dougherty, R.C., *Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry*. Biomed Mass Spectrom, 1981. 8(7): p. 283-92.
372. Dougherty, R.C., J.D. Roberts, and F.J. Biros, *Positive and negative chemical ionization mass spectra of some aromatic chlorinated pesticides*. Anal Chem, 1975. 47(1): p. 54-9.
373. DiDonato, G.C. and K.L. Busch, *Derivatization of ketosteroids for fast atom bombardment mass spectrometry*. Biomed Mass Spectrom, 1985. 12(8): p. 364-6.
374. Mora, J.F., et al., *Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry*. J Mass Spectrom, 2000. 35(8): p. 939-52.
375. Kirpekar, F., et al., *DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry*. Nucleic Acids Res, 1998. 26(11): p. 2554-9.
376. Wolf, B. and R.D. Macfarlane, *Small molecules as substrates for adsorption/desorption in (252)CF plasma desorption mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, 1991. 2(1): p. 29-32.
377. Beranova-Giorgianni, S. and D.M. Desiderio, *Fast atom bombardment mass spectrometry of synthetic peptides*. Methods Enzymol, 1997. 289: p. 478-99.
378. Knochenmuss, R., *A quantitative model of ultraviolet matrix-assisted laser desorption/ionization*. J Mass Spectrom, 2002. 37(8): p. 867-77.
379. C., Ç. *Protein Tanımlanmasında MALDI-TOF Kütle Spektrometre Yöntemi*, . Available from: http://yunus.hacettepe.edu.tr/~mergen/sunu/s_tof.pdf.
380. Ekman, R., *Mass spectrometry : instrumentation, interpretation, and applications*. 2009, Hoboken: J. Wiley.
381. Schau, H.-P., J. F. MacFaddin, *Media for Isolation - Cultivation - Identification - Maintenance of Medical Bacteria, Volume I. XI + 929 S., 163 Abb., 94 Tab. Baltimore, London 1985. Williams and Wilkins. \$ 90.00. ISBN: 0-683-05316-7*. Journal of Basic Microbiology, 1986. 26(4): p. 240-240.

382. Stevenson, B.S., et al., *New strategies for cultivation and detection of previously uncultured microbes*. Appl Environ Microbiol, 2004. 70(8): p. 4748-55.
383. Sixou, M., *Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy*. Oral Dis, 2003. 9 Suppl 1: p. 54-62.
384. Leduc, A., D. Grenier, and D. Mayrand, *Outer membrane-associated deoxyribonuclease activity of Porphyromonas gingivalis*. Anaerobe, 1995. 1(2): p. 129-34.
385. Keer, J.T. and L. Birch, *Molecular methods for the assessment of bacterial viability*. J Microbiol Methods, 2003. 53(2): p. 175-83.
386. Patel, R., *MALDI-TOF MS for the diagnosis of infectious diseases*. Clin Chem, 2015. 61(1): p. 100-11.
387. Hsu, Y.M. and C.A. Burnham, *MALDI-TOF MS identification of anaerobic bacteria: assessment of pre-analytical variables and specimen preparation techniques*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014. 79(2): p. 144-8.
388. Bizzini, A., et al., *Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as an alternative to 16S rRNA gene sequencing for identification of difficult-to-identify bacterial strains*. J Clin Microbiol, 2011. 49(2): p. 693-6.
389. Raus, M., and Šebela, M., *BIOSPEAN: a free web tool for processing spectra from MALDI intact cell/spore mass spectrometry*. J. Proteomics. Bioinform., 2013. 6: p. 282–287.
390. Gibb, S. and K. Strimmer, *MALDIquant: a versatile R package for the analysis of mass spectrometry data*. Bioinformatics, 2012. 28(17): p. 2270-1.
391. Bohme, K., et al., *SpectraBank: an open access tool for rapid microbial identification by MALDI-TOF MS fingerprinting*. Electrophoresis, 2012. 33(14): p. 2138-42.
392. Ndukum, J., M. Atlas, and S. Datta, *pkDACLASS: Open source software for analyzing MALDI-TOF data*. Bioinformatics, 2011. 6(1): p. 45-7.
393. Strohm, M., et al., *mMass data miner: an open source alternative for mass spectrometric data analysis*. Rapid Commun Mass Spectrom, 2008. 22(6): p. 905-8.
394. Veloo, A.C.M., et al., *Validation of MALDI-TOF MS Biotyper database optimized for anaerobic bacteria: The ENRIA project*. Anaerobe, 2018. 54: p. 224-230.
395. Tronstad, L., Barnett, F., Flax, M., Slots, J., *Anaerobic bacteria in periapical lesion on human teeth*. J. Dent. Res., 1986. 65: p. 231.
396. Niazi, S.A., et al., *Propionibacterium acnes and Staphylococcus epidermidis isolated from refractory endodontic lesions are opportunistic pathogens*. J Clin Microbiol, 2010. 48(11): p. 3859-69.

397. M., A., *Endodontik Mikrobiyoloji*, in *Endodonti*, A. T., Editor. 2000, Fakülteler Kitabevi Barış yayınları: Ankara. p. 313-383.
398. Yeh, H.-C., et al., *Identification of microbiota in peri-implantitis pockets by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Scientific Reports, 2019. 9(1): p. 774.
399. J. Swierzbinski, M., et al., *Diagnostic Challenges in the Identification of Rothia aeria Bacteremia in a Patient With Relapsing Acute Myeloid Leukemia*. Vol. 23. 2015.
400. Wang, Q.Q., et al., *Prevalence of Enterococcus faecalis in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis*. Int J Oral Sci, 2012. 4(1): p. 19-23.
401. Maldonado, I., et al., *[Identification of Candida yeasts: Conventional methods and MALDI-TOF MS]*. Rev Iberoam Micol, 2018. 35(3): p. 151-154.
402. Waltimo, T.M., et al., *Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro*. Int Endod J, 1999. 32(2): p. 94-8.
403. Downes, J., et al., *Characterisation of Eubacterium-like strains isolated from oral infections*. J Med Microbiol, 2001. 50(11): p. 947-51.
404. Lee, M.Y., et al., *A case of bacteremia caused by Dialister pneumosintes and Slackia exigua in a patient with periapical abscess*. Anaerobe, 2016. 38: p. 36-38.
405. Stingu, C.S., et al., *Rapid identification of oral Actinomyces species cultivated from subgingival biofilm by MALDI-TOF-MS*. Journal of oral microbiology, 2015. 7: p. 26110-26110.
406. Srinivasan, R., et al., *Use of 16S rRNA gene for identification of a broad range of clinically relevant bacterial pathogens*. PLoS One, 2015. 10(2): p. e0117617.
407. Carbonnelle, E., et al., *Rapid identification of Staphylococci isolated in clinical microbiology laboratories by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry*. J Clin Microbiol, 2007. 45(7): p. 2156-61.
408. Valentine, N., et al., *Effect of culture conditions on microorganism identification by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry*. Appl Environ Microbiol, 2005. 71(1): p. 58-64.
409. Veloo, A.C., et al., *Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry methods for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria*. Clin Microbiol Infect, 2011. 17(10): p. 1501-6.
410. Veloo, A.C., G.W. Welling, and J.E. Degener, *The identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS*. Anaerobe, 2011. 17(4): p. 211-2.
411. van Winkelhoff, A.J., A.W. Carlee, and J. de Graaff, *Bacteroides endodontalis and other black-pigmented Bacteroides species in odontogenic abscesses*. Infect Immun, 1985. 49(3): p. 494-7.

412. Siqueira, J.F., Jr., et al., *Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin*. J Endod, 2001. 27(9): p. 563-6.
413. Whiley, R.A., et al., *Streptococcus parasanguis sp. nov., an atypical viridans Streptococcus from human clinical specimens*. FEMS Microbiol Lett, 1990. 56(1-2): p. 115-21.
414. Doern, C.D. and C.A. Burnham, *It's not easy being green: the viridans group streptococci, with a focus on pediatric clinical manifestations*. J Clin Microbiol, 2010. 48(11): p. 3829-35.
415. Suzuk Yildiz, S., et al., *[Comparison of MALDI-TOF and 16S rRNA methods in identification of viridans group streptococci]*. Mikrobiyol Bul, 2017. 51(1): p. 1-9.
416. Hettick, J.M., et al., *Discrimination of intact mycobacteria at the strain level: a combined MALDI-TOF MS and biostatistical analysis*. Proteomics, 2006. 6(24): p. 6416-25.
417. Hsieh, S.Y., et al., *Highly efficient classification and identification of human pathogenic bacteria by MALDI-TOF MS*. Mol Cell Proteomics, 2008. 7(2): p. 448-56.
418. Tao, L., et al., *Bacterial identification by protein mass mapping combined with an experimentally derived protein mass database*. Anal Chem, 2004. 76(22): p. 6609-17.
419. Welker, M., *Proteomics for routine identification of microorganisms*. Proteomics, 2011. 11(15): p. 3143-53.
420. Freiwald, A. and S. Sauer, *Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry*. Nat Protoc, 2009. 4(5): p. 732-42.
421. Cherkaoui, A., et al., *Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level*. J Clin Microbiol, 2010. 48(4): p. 1169-75.
422. Callaway, A., et al., *Identification of Lactobacilli from deep carious lesions by means of species-specific PCR and MALDI-TOF mass spectrometry*. Clin Lab, 2013. 59(11-12): p. 1373-9.
423. Cancio, V., et al., *Can the Enterococcus faecalis identified in the root canals of primary teeth be a cause of failure of endodontic treatment?* 2017. 75(6): p. 423-428.

EK 1. ETİK KURUL RAPORU



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu

Sayı : 46418926

Konu :

ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU

TOPLANTI TARİHİ : 26 HAZİRAN 2018 SALI
TOPLANTI NO : 2018/9
PROJE/ KARAR NO : 18/187 (Değerlendirilme Tarihi:26.06.2018)

Üniversitemiz Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalında görevli Prof. Dr. Ömer Cumhuri AYDIN'ın sorumlu araştırmacı olduğu, Dt. Mete AHLAT, Uzm. Biyolog Sinem KAYA ve Prof. Dr. Mehmet BAYSALLAR'ın yardımcı araştırmacı oldukları 18/187 kayıt numaralı, *"Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Aracılığıyla Periapikal İndekse (PAI) göre Sınıflandırılmış Periapikal Doku Hastalıklarındaki Kök Kanal Mikrobiyota Profillerinin İncelenmesi"* başlıklı diş hekimliğinde uzmanlık tezi önerisi, araştırmacının gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

BAŞKAN

Ahmet COŞAR
Prof. Dr.

ÜYE

~~KATILMADI~~
Levent KENAR
Prof. Dr.

ÜYE

~~KATILMADI~~
Cemal Nuri ERÇİN
Prof. Dr.

ÜYE

Ceyhan ALTUN
Doç. Dr.

ÜYE

Alper GÖZÜBÜYÜK
Prof. Dr.

ÜYE

Cumhuri SİPAHİ
Prof. Dr.

ÜYE

Kazım Emre KARAŞAHİN
Prof. Dr.

ÜYE

Ölçek YILDIZ
Doç. Dr.

ÜYE

Ayhan KILIÇ
Prof. Dr.

ÜYE

~~KATILMADI~~
Cumhuri AYDIN
Prof. Dr.

ÜYE

Murat ÇELİK
Doç. Dr.

EK 2. BAP KOMİSYON TOPLANTI TUTANAĞI



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ KOMİSYON
TOPLANTI TUTANAĞI

Evrak Tarih ve Sayısı: 14/12/2018-E.35204



KARAR TARİHİ 11/12/2018
KARAR NO 18

1. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne desteklenmesi istemiyle Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Dış Hekimliği Fakültesi (Endodonti Anabilim Dalı Bölümü) ilgili Proje No:2018/099 Prof. Dr. Ömer Cümhur AYDIN' in Bilimsel Araştırma Projeleri türündeki "Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) aracılığıyla periapikal indeks (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kok kanal mikrobiyota profillerinin incelenmesi" konulu projesinin 18.344,40-TL ile 12 ay süre ile n BAP Komisyonu Üyelerince desteklenmesine,

Oy birliği ile karar verilmiştir.

e-İmzalıdır

EK 3. TIPTA UZMANLIK EĞİTİM KURULU KARARI

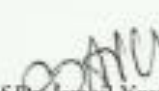
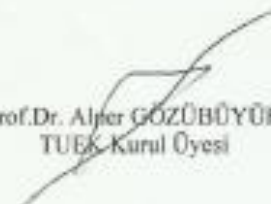
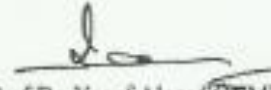
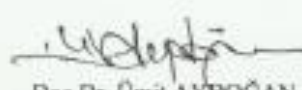



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK UYGULAMA ARAŞTIRMA MERKEZİ
TIPTA UZMANLIK EĞİTİMİ KURULU (TUEK)
KARAR DEFTERİ

KARAR TARİHİ: 20.12.2018
KARAR NO:12
20.12.2018 TARİHLİ 12. KURUL KARARININ DEVAMIDIR

16. GEAH Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Kliniğinde görev yapmakta olan **Dr. İbrahim GÜNDOĞMUŞ**'un 06.12.2018 tarihli, SAYI:50687469-799-E.18217 sayılı "Uygulama İzni İb." konulu dilekçesi ve "Şizofreni Hastalarında Relaps İle İlişkili Klinik ve Sosyodemografik Özelliklerin Belirlenmesi" başlıklı tez çalışması incelenmiş ve araştırma izni talebi oybirliği ile uygun görülmüştür.

17. Ankara Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü'nün 14.12.2018 tarihli, SAYI: 90169164.799.E.2651 sayılı ve "Dr. Mete AHLAT (Tez Çalışması)" konulu Dr. Mete AHLAT'ın "Matriks ile Desteklenmiş Lazer Desorpsiyon İyonizasyon Uçuş Zamanı Kütle Spektrometresi (MALDI-TOF MS) Aracılığıyla Periapikal İndekse (PAI) Göre Sınıflandırılmış Periapikal Doku Hastalıklarındaki Kök Kanal Mikrobiyota Profillerinin İncelenmesi" başlıklı tez çalışması incelenmiş ve araştırma izni talebi oybirliği ile uygun görülmüştür.

 Prof. Dr. İsmail Yusuf AVCI TUEK Kurul Üyesi	 Prof. Dr. Alper GÖZÜBÜYÜK TUEK Kurul Üyesi	KATILMADI Prof. Dr. Bülent ÜNAY TUEK Kurul Üyesi
KATILMADI Prof. Dr. Cemil YILDIZ TUEK Kurul Üyesi	 Prof. Dr. Yusuf Alper SÖNMEZ TUEK Kurul Üyesi	 Doç. Dr. Ümit AYBOĞAN SUAM Eğitim Koordinatörü TUEK Başkan Yardımcısı
 Prof. Dr. Mehmet Ali GÜLCELİK TUEK Başkanı		

Genel Tıp Fakültesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, ANKARA Tıp Fakültesi, 0312 304 2150
www.tuek.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr, www.gulhane.org.tr
Bu belge 3076 sayılı Elektronik İmza Kanunu gereğince elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK 4A. BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA TEDAVİ ONAM FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE DIŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANA BİLİM DALI

BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA TEDAVİ ONAM FORMU

Bilgilendirme

1. İLAÇLAR HAKKINDA

Antibiyotik, ağrı kesici, anestezi, yıkama solüsyonları ve diğer ilaçların; kızarıklık, dokuda şişlik, kaşıntı gibi deri ve dişeti belirtileri yapabileceği; bulantı, ishal, mide ile ilgili şikâyetlere (yanma tarzı ağrılar, kanama) neden olabileceği ve anesteziye bağlı şişlik, kızarıklık, geçici yüz felci oluşabileceği, çok ender olsa da anafilaktik şok gibi hayati tehlikeye arz eden alerjik etkilere yol açabileceği bilinmelidir. Kanal tedavisi sırasında uyuşmanın yeterli olmaması durumunda ağrı hissedilmesi ve ek anesteziye gereksinim olabilir.

2. KANAL TEDAVİSİ HAKKINDA

Kanal tedavisi; dişin ağızda tutulmasını amaçlayan, birkaç seans ve uzun sürebilen bir tedavidir. Kanal tedavisi gerçekleştirilirken birden fazla röntgen çekimi gerekmektedir.

Kanal tedavisi sırasında dişin durumuna göre bazı komplikasyonlar oluşabilir. Bunlar:

- Diş çürüğü temizlenirken veya kanal tedavisi sırasında dişte delinme (perforasyon).
- Kanal aletinin kanal içerisinde veya dışında kırılması.
- Kanal aletinin yutulması veya soluk borusuna kaçması.
- Kanal dolgu maddesinin ve yıkama solüsyonlarının dişin kök ucundan taşması sonucu;
 - Üst çene burun boşluğuna (maksiller sinüs) taşarsa; maksiller sinüste hasarlara.
 - Alt çene sinir kanalına (mandibular ve mental sinirlere) taşarsa; dudakta uzun süren uyuşukluk hissi gibi sinir hasarları meydana gelmesi.
- Kanal yıkama solüsyonlarının çevre dokulara ve ağız içine teması nedeniyle ağız içinde yanma, kızarıkların oluşması veya kabıci hasarlar oluşması riski.
- Kanal tedavisi seansları arasında veya sonrasında; ağrı ve yüzde veya ağız içinde şişlik oluşması, dişin çekimini gerektirecek kırıklar oluşması.
- Kanal tedavisi seanslarının uzun sürmesi sonucu ekdemde ağrı ve/veya çene ekdeminin çıkması.

•Direk kuafaj ve amputasyon tedavileri sonrasında tedavinin başarısız olması durumunda kanal tedavisi yapılması gerekebilir.

•Rejenerasyon tedavisi olan hastalarda, tedavinin istenen iyileşmeyi göstermemesi durumunda yeniden kanal tedavisi yapılması gerekebilir.

•Kanal tedavisi bittikten sonra, başarısız olması durumunda; kanal tedavisinin yenilenmesi, apikal cerrahi ve nihayetinde dişin çekimi gerekebilir.

3. DOLGU HAKKINDA

Dolgu; kaybolan diş dokularının çeşitli restorasyon maddeleriyle yerine konması için yapılan tedavidir. Dolgu yapılmasında ve sonrasında bazı komplikasyonlar oluşabilir. Bunlar;

- Dolgunun düşmesi ya da kırılması,
- Dişin kırılması,
- Derin çürüklerde dolgu sonrası gelişen şiddetli ağrı ve iltihabi reaksiyonlara yol açan problemler nedeniyle kanal tedavisinin gerekebilmesi,
- Bazı restorasyon maddelerine karşı dolgu sonrası devam eden hassasiyet ve alerjik reaksiyonlar,

EK 4B. BİLGİLENDİRİLMİŞ HASTA TEDAVİ ONAM FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ GÜLHANE DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ ENDODONTİ ANA BİLİM DALI

- Dolgu maddelerinin uygulanması sırasında bazı kimyasal ajanların çevre dişeti dokusunda oluşturabileceği lokal reaksiyonlar,
- Dişle yapılan restorasyon sonrası hastanın estetik beklentilerinin karşılanamaması.

UYGULANACAK TEDAVİLER

1. Kanal tedavisi
2. Kanal içi post uygulaması
3. Kompozit restorasyon
4. Amalgam restorasyon
5. Direk kuafaj
6. Amputasyon
7. Rejenerasyon tedavileri
8. İnley, onley restorasyonlar
9. Lamine restorasyonlar
10. Beyazlatma tedavisi
11. Dentin hassasiyeti tedavisi
12. Apikal cerrahi sırasında retrograd dolgu uygulanması

HASTANIN TEDAVİ İÇİN ONAMI

Bilgilendirme bölümündeki açıklamaları okudum anladım ve komplikasyonları hakkında bilgi edindim. Genel sağlık durumumla ilgili sorulan sorularda hiçbir eksik bilgi bırakmadım, hiçbir şeyi gizlemeden açıkça anlattım, benden istenen gerekli tetkikleri tam olarak yaptım. Benimle ilgili olan tedavi ya da tedavilerin uygulanmasını, tedavi sırasında ya da sonrasında olabilecek tüm komplikasyonların bilincinde ve benim sorumluluğumda olduğumu, olası bir durumda bir uzman tarafından tedavi edilmemi/ edilmesini ya da başka bir hastanede tedavi görmem/ görmesi gerekirse sevk edilmeyi/ edilmesini kabul ediyorum. Tedavim ve Form ile ilgili sorularımı yönelttim ve sorularımın cevaplarını aldım.

Bana / çocuğuma/ yakınıma uygulanacak ilaçlar, kanal tedavisi, dolgu tedavilerinin Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı kliniğinde; asistan, Dr. Asistan, Uzm. Dr. Yard. Doç. Dr., Doç., Dr. Ve Prof. Dr. titrine sahip hekimler tarafından yapılmasına, bu birimlerde çalışan yardımcı sağlık personelinin görevi alanına giren uygulamaları yapmasına, bir eğitim kurumu olan bu sağlık kuruluşunda stajyer dişhekimlerinin yukarıda belirtilen hekimlerin nezareti altında belirtilen tedavileri yapmasına, eğitim ve bilimsel amaçlı fotoğraf ve video görüntülerin alınmasına izin veriyorum.

Protokol no:

Formu dolduran:

İmza:

Tarih:

Hastanın adı soyadı:

Ebeveyni / velisinin adı soyadı:

Yakının adı soyadı:

Sorumlu hekimin

Adı soyadı:

İmza:

EK 5A. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

FORM 6E

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Araştırma Projesinin Adı: Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) aracılığıyla periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin incelenmesi.

Sorumlu Araştırıcının Adı: Prof.Dr. Ömer Cumhuri AYDIN

Diğer Araştırıcıların Adı: Dt. Mete AHLAT

Prof.Dr. Mehmet BAYSALLAR

Uzm.Biyolog Sinem KAYA

Desteleyici (varsa): BAP (Bilimsel Araştırma Projesi)

"Matriks ile desteklenmiş lazer desorpsiyon iyonizasyon uçuş zamanı kütle spektrometresi (MALDI-TOF MS) aracılığıyla periapikal indekse (PAI) göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalıklarındaki kök kanal mikrobiyota profillerinin incelenmesi" isimli bir çalışmada yer almak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmaya davet edilmenizden nedeni sizde periapikal indekse göre sınıflandırılmış periapikal doku hastalığının görülmüş olmasıdır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllüğü esasına dayalıdır. Çalışmaya katılma konusunda karar vermeden önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Çalışma hakkında tam olarak bilgi sahibi olduktan sonra ve sorularınız cevaplandıktan sonra eğer katılmak isterseniz sizden bu formu imzalamanız istenecektir. Bu araştırma, Endodonti Anabilim Dalında, Prof.Dr. Ömer Cumhuri AYDIN sorumluluğu altındadır.

Çalışmanın amacı nedir; benden başka kaç kişi bu çalışmaya katılacak?

- Çalışmamızda periapikal indekse göre sınıflandırılmış primer ve sekonder kök enfeksiyonlarının kök kanal mikrobiyotalarını oluşturan anaerob türlerin tanımlanmasını MALDI-TOF MS aracılığıyla araştırmak amaçlanmaktadır.
- Çalışmaya cinsiyet ayrımı olmaksızın 5 grup şeklinde 150 hastanın dahil edilmesi planlanmaktadır.

Bu çalışmaya katılmak mıyım?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, doktorunuz tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten doktor çalışmaya devam etmenizden sizin için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı burakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

Bu çalışmaya katılırsam beni ne bekliyor?

Çalışmaya Gülhane Diş Hekimliği Fakóltesi Endodonti Ana Bilim Dalı'na tedavi amacıyla başvuran sistemik olarak sağlıklı 150 hastanın dahil edilmesi planlanmaktadır. Hastalardan alınan ilk periapikal radyografilerine, anamnezlerine, çalışmaya alınma kriterlerine göre teşhis

EK 5B. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU



SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

FORM 6E

ve tedavi planlaması yapılarak periapikal doku hastalıklarına göre Grup I: Akut Apikal Periodontitis Grup II: Kronik Apikal Periodontitis Grup III: Akut Apikal Apse Grup IV: Kronik Apikal Apse Grup V: Retreatment (Kanal tedavisi yenileme) gerektiren periapikal lezyonlu vakalar olarak 5 gruba ayrılacaklardır.

Araştırmamızın süresi 6-12 ay olarak planlanmıştır.

Çalışmamız esnasında size rutin tedavi prosedürleri haricinde bir işlem uygulanmayacaktır.

Gruplarına göre ayrılan her hastanın kök kanal tedavisine başlarken nekrotik pulpal kök kanalından paper pointle materyal alınacaktır. Materyaller vakit kaybetmeden Gülhane Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı laboratuvarlarında MALDI-TOF aracılığıyla anaerop bakterilerin tanımlanması için gönderilecektir. Çıkan sonuçlar gruplara göre istatistiksel olarak değerlendirilecektir.

Çalışmanın riskleri ve rahatsızlıkları var mıdır?

Çalışmamızda size rutin tedavi prosedürleri haricinde girişimsel bir işlem uygulanmayacağından sizin açınızdan bir risk oluşturmamaktadır.

Çalışmada yer almamanın yararları nelerdir?

Bu çalışmaya katılarak endodontal enfeksiyonlara neden olan bakterilerin hızlı ve doğru şekilde tanımlanmasında özellikle endodontik tedavilere hatta diğer endodonti-periodonti, endodonti-cerrahi çalışmalarının başarılarına katkı sağlayacaksınız.

Bu çalışmaya katılmamanın maliyeti nedir?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Kişisel bilgilerim nasıl kullanılacak?

Çalışma doktorumuz kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarımızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

Daha fazla bilgi için kime başvurabilirim?

Çalışma ile ilgili ek bilgiye gereksiniminiz olduğumuzda aşağıdaki kişi ile lütfen iletişime geçiniz.

ADI : Mete AHLAT
GÖREVI : Araştırma Görevlisi (Asistan)
TELEFON : 0.312.3046033

EK 5C. BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU



SAÇLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

FORM 6E

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Endodonti Anabilim dalında, Prof.Dr. Ömer Cumhuri AYDIN tarafından tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı ve ilgili metni okudum. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya "katılımcı" olarak davet edildim.

Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımuma ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum. Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir neden göstermeden araştırmadan çekilebilirim. *(Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim)*. Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı da tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Araştırmadan elde edilen benimle ilgili kişisel bilgilerin gizliliğinin korunacağını biliyorum.

Araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Araştırma sırasında bir sağlık sorunu ile karşılaştığımda; herhangi bir saatte, Dt. Mete AHLAT'a , Gülhane Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı polikliniğinden ya da 0(312)3046033 'ten arayabileceğimi biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Bu koşullarla söz konusu klinik araştırmaya kendi rızamla, hiç bir baskı ve zorlama olmaksızın, gönüllülük içerisinde katılmayı kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel:

İmza:

Tarih:

EK 6A. HASTA TAKİP FORMU ÖRNEĞİ

Hastanın Genel Tıbbi Durumu	Hastanın Adı Soyadı	Kadın Erkek	Kimlik No	Yaşı	Sıra No
	Hastanın Adresi	Ankara			Vaka tarihi
Sistemik rahatsızlığı var mı?	Dr. Adı ve Soyadı	Prof.Dr.Ömer Cumhuri AYDIN & Dr.Mete AHLAT			
Evet	Tıbbi Hikaye				
Hayır	<input type="checkbox"/> ilaç alerjisi <input type="checkbox"/> diyabet <input type="checkbox"/> kalp hastalığı <input type="checkbox"/> romatizmal ateş <input type="checkbox"/> enfeksiyon hast. <input type="checkbox"/> eklem implantları <input type="checkbox"/> diğer				

Sürekli Kullanılan İlaçlar yok
Asıl Dental Şikayet Çiğneme Ağrısı

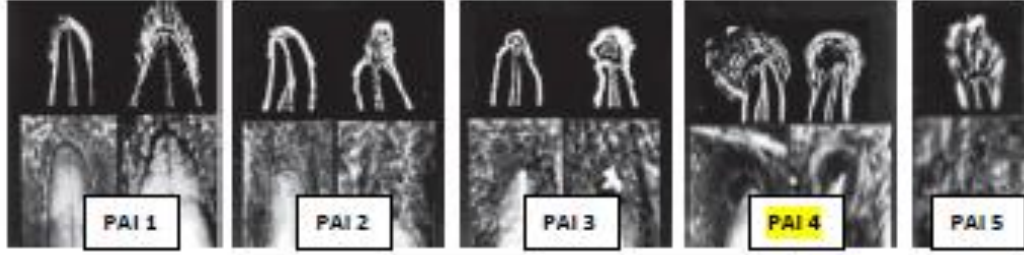
Subjektif Bulgular	Objektif Bulgular	Önceki Hikaye	Etyolojisi
<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Yok	<input type="checkbox"/> Çürük
<input type="checkbox"/> Önceden olan ağrı	<input type="checkbox"/> Ağız içi şişlik	<input type="checkbox"/> Derin çürük	<input type="checkbox"/> Travma
<input type="checkbox"/> Spontan ağrı	<input type="checkbox"/> Ağız dışı şişlik	<input type="checkbox"/> Çürükle perforasyon	<input type="checkbox"/> Periodontal lezyon
<input type="checkbox"/> Sıcak ağrısı	<input type="checkbox"/> Diş renklemeleri	<input type="checkbox"/> Mekanik perforasyon	<input type="checkbox"/> Sürmeye bozuklukları
<input type="checkbox"/> Soğuk ağrısı	<input type="checkbox"/> Lenfadenopati	<input type="checkbox"/> Pulpa kuşağı (direkt)	<input type="checkbox"/> Operatif yaralanma
<input type="checkbox"/> Çiğneme ağrısı	<input type="checkbox"/> Kronik kırığı	<input type="checkbox"/> Pulpa kuşağı (indirekt)	<input type="checkbox"/> Kendi isteği ile Endod.
<input type="checkbox"/> Yararıyan ağrı	<input type="checkbox"/> Çürük	<input type="checkbox"/> Travmatik yaralanma	<input type="checkbox"/> Diğer (açıkla)
<input type="checkbox"/> Sıcak veya soğukla rahatlayan ağrı	<input type="checkbox"/> Sinüs sarkması	<input type="checkbox"/> Diğer (açıkla)	
<input type="checkbox"/> Diğer (açıkla)	<input type="checkbox"/> Diğer (açıkla)		

Diagnostik Testler							
CY:cevap yok		N:Normal		A:Aşırı cevap			
Diş no	Soğuk	Sıcak	Perküsyon	Palpasyon	Mobilite	Uzunluğu	Son preparasyon çapı
25	-	-	++	++	+		

Radyografik Bulgular	
<input type="checkbox"/> Normal	<input type="checkbox"/> Kink enstrüman
<input type="checkbox"/> Periapikal RL	<input type="checkbox"/> Açık apiks
<input type="checkbox"/> Periapikal RO	<input type="checkbox"/> Kök dilasasyonu
<input type="checkbox"/> Lateral rarefaksiyon	<input type="checkbox"/> Çürük
<input type="checkbox"/> Kron kırığı	<input type="checkbox"/> Önceden yapılmış kanal dolgusu
<input type="checkbox"/> Kök kırığı	<input type="checkbox"/> Önceden yapılmış giriş kavitesi
<input type="checkbox"/> İnternal rezorbsiyon	<input type="checkbox"/> Pulpa kalsifikasyonu
<input type="checkbox"/> Eksternal rezorbsiyon	<input type="checkbox"/> Diğer (açıkla)

Teşhis	
Pulpanın Durumu	Periodontal Durum
<input type="checkbox"/> Normal pulpa	<input type="checkbox"/> Normal periodonsiyum
<input type="checkbox"/> Reversible pulpitis	<input type="checkbox"/> Akut apikal periodontitis
<input type="checkbox"/> İreversible pulpitis	<input type="checkbox"/> Kronik apikal periodontitis
<input type="checkbox"/> Nekrotik pulpa	<input type="checkbox"/> Akut apikal apse
<input type="checkbox"/> Önce yapılmış K.T.	<input type="checkbox"/> Kronik apikal apse
	<input type="checkbox"/> Süperatif apikal periodontitis
	<input type="checkbox"/> Condensing osteitis

EK 6B. HASTA TAKİP FORMU ÖRNEĞİ



- 1 = Normal periapikal yapılar
- 2 = Kemik yapısında küçük değişiklikler
- 3 = Bazı mineral kaybı ile kemik yapısındaki değişiklikler
- 4 = İyi tanımlanmış radyoluvent alanlı apikal periodontitte
- 5 = Şiddetli karakterli ciddi apikal periodontitte

Hastadan Alınan İlk Radyografi



Septanan Mikroorganizmalar

Anerob	Aerob
Enterococcus faecalis	

