



T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**ETİDRONİK ASİT (HEBP) 'İN ETKİN  
KONSANTRASYONUNUN BELİRLENMESİ VE  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ**

**Arş. Gör. Dt. Cevat Emre ERİK**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Doç. Dr. Murat MADEN**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı  
Koordinasyon Birimi tarafından ÖYP05260-DR-14 proje numarası ile  
desteklenmiştir  
Tez. No: 143**

**ISPARTA-2016**

## KABUL ve ONAY SAYFASI

Sağlık Bilimleri Enstitü Müdürlüğüne;

Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Endodonti Anabilim Dalı Yüksek Lisans/Doktora Programı** Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından **Doktora Tezi** olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 20/06/2016

Tez Danışmanı : Doç. Dr. Murat MADEN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi  
Endodonti AD

Üye : Prof. Dr. Özgür ER

Trakya Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD

Üye : Doç. Dr. Kamran GÜLŞAHI

Başkent Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD

Üye : Doç. Dr. Yasin TUNCER

Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda  
Müh. Bölümü

Üye : Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi  
Endodonti AD

ONAY: Bu doktora tezi, Enstitü Yönetim Kurulu'nca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve kabul edilmiştir.

Doç.Dr. Mustafa KAYAN

Enstitü Müdürü

## BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

### BEYAN

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

“Etidronik asit (HEBP)’in etkin konsantrasyonunun belirlenmesi ve antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan

Cevat Emre ERİK

İmza

Danışman

Doç. Dr. Murat MADEN

İmza

## ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bana sadece hocalık değil aynı zamanda abilik, babalık yapan, sıkıştığım her an yanımda olan, her koşulda maddi ve manevi desteği ile beni destekleyen danışman hocam **Doç. Dr. Murat MADEN'e**

Son seneye kadar danışmanım, bir nevi ablam olan desteğini hiç esirgemeyen hocam **Doç. Dr. Gül ÇELİK'e**

Tez Savunması için Ramazan ayında buralara kadar gelerek bizleri onurlandıran çok değerli hocalarım **Prof. Dr. Özgür ER'e** ve **Doç. Dr. Kamran GÜLŞAHI'na**

Mikrobiyolojik değerlendirmelerin tüm aşamalarında teorik ve pratik destekleri için hocam **Doç. Dr. Yasin TUNCER'e**, tez izleme komitemde yer alan, fikir ve önerileri ile bana destek olan hocam **Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA'ya**, istatistik değerlendirmelerindeki yardımları için **Doç. Dr. Hakan DEMİRGİL'e**

Doktora eğitimime katkılarından dolayı Anabilim dalı başkanımız **Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ'ye**, hocalarımız **Doç. Dr. Nejdet ADANIR'a** ve **Yrd. Doç. Dr. Feyza Özdemir KISACIK'a**.

Deney aşamalarındaki yardımlarından dolayı **Arş. Gör. Didem AKPINAR KANKAYA'ya**

Zekası, becerisi ve dostluğuyla her daim pampam **Dr. Dt. Erdal SARITEKİN'e**, muzip şakaları, eğlenceli ve araştırmacı tavrıyla dostum **Dr. Dt. Anıl TEKE'ye**, lisans eğitimimin yanı sıra doktora eğitimim boyunca da beni hiç yalnız bırakmayan, bana son dakika da SDÜ Endodonti 'yi tercih ettirerek burada olmamı sağlayan dostum **Dr. Dt. Emre ÇİÇEK'e**, dostluğu, kankalığı lisans dan beri devam eden deli, dolu arkadaşım **Dt. Elif BİLGİR'e** muhteşem becerisi ve zekası ile bana yol gösteren, kanal tedavisini sevdiiren, hayat tecrübesi ile de bana birçok şey katan abim **Dr. Dt. Ahmet SAVGAT'a** ve çalışmaktan mutluluk duyduğum Endodonti AD'daki tüm asistan arkadaşlarıma ve personele teşekkür ederim.

Tez projeme destek sağlayan Süleyman Demirel niversitesi ğretim yesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Hayatım, yaşama sevincim, yüzümdeki glmse, huzur ve mutluluğun sebebi kalbimin yarısı biricik oğlum aslanım **Kerem**'e ve kalbimin diğer yarısı sevgilim, hayat arkadaşım, aydınlığım, bana kadir gecesi doğmuş gibi hissettiren biricik eşim **Ayşem**'e bugünlere gelmemi sağladığı ve hep yanımda olduğu için teşekkür ederim.

**Isparta, 2016**



## İÇİNDEKİLER

<b>KABUL ve ONAY SAYFASI</b> .....	<b>ii</b>
<b>ÖNSÖZ</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vi</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Biyofilm.....	2
2.1.1. Biyofilmin Yapısı .....	2
2.1.2. Biyofilm Oluşumu .....	4
2.1.3. Biyofilm Gelişimi .....	4
2.1.4. Biyofilm Topluluğunda Yaşam .....	5
2.1.5. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç .....	6
2.1.5.1. Antimikrobiyal Ajanın Penetrasyonunun Biyofilm Yapısı İle Sınırlandırılması .....	6
2.1.5.2. Biyofilmdeki Bakterilerin Çeşitli Büyüme Oranları .....	7
2.1.5.3. ‘Persister ‘Bakterilerin Varlığı.....	7
2.1.6. Kök Kanallarında Biyofilm Oluşumu.....	7
2.1.7. Kök Kanallarında Biyofilmler .....	8
2.1.7.1. Kanal İçi Biyofilmler .....	8
2.1.7.2. Eksternal Kök Yüzeyi Biyofilmleri .....	10
2.1.7.3. Peripikal Biyofilmler.....	11
2.1.8. Kök Kanallarında Biyofilm Eliminasyonu .....	12
2.1.9. Biyofilmlerin Görüntülenmesinde Kullanılan Mikroskobik Teknikler ....	16
2.2. Kök Kanallarının Mikrobiyal Çeşitliliği .....	17
2.2.1. Enterokoklar ve <i>Enterococcus Faecalis</i> .....	19
2.2.1.1. <i>E. faecalis</i> 'in Endodontik Açından Önemi .....	20
2.2.1.2. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>E. faecalis</i> 'e Etkisi .....	22
2.2.2. <i>Candida</i> ve <i>Candida Albicans</i> .....	23
2.2.2.1. Genel Özellikler ve Sınıflandırma .....	23

2.2.2.2. Mantarların Morfolojik Özellikleri .....	24
2.2.2.3. Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar .....	25
2.2.2.3.1. Birincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar .....	26
2.2.2.3.2. İkincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar .....	27
2.2.2.4. Antimikrobiyal Medikamentlerin <i>C. albicans</i> 'a Etkisi .....	27
2.2.3. <i>Pseudomonas Aeruginosa</i> .....	28
2.3. Mikrobiyal Tanılama Metodları .....	29
2.3.1. Mikroskopi .....	29
2.3.2. Kültür Yöntemi .....	30
2.3.3. İmmünolojik Yöntemler .....	31
2.3.4. Moleküler Genetik Yöntemler .....	32
2.4. İrrigasyon .....	33
2.5. Endodontik Irrigasyon Solüsyonları .....	34
2.5.1. Antiseptik Solüsyonlar .....	34
2.5.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) .....	34
2.5.1.1.1. Tarihçesi .....	35
2.5.1.1.2. Etki Şekli .....	35
2.5.1.1.3. Konsantrasyon .....	36
2.5.1.1.4. Optimal Etki İçin Uygulama Zamanı .....	37
2.5.1.1.5. Sodyum Hipokloritin Dentin Üzerine Etkisi .....	37
2.5.1.1.6. NaOCl 'in Alerjik Reaksiyonları .....	38
2.5.1.1.7. Biyofilm Üzerine Etkisi .....	38
2.5.2. Dekalsifiye Edici Solüsyonlar .....	39
2.5.2.1. EDTA .....	40
2.5.2.1.1. Tarihçesi .....	40
2.5.2.1.2. Etki Şekli .....	40
2.5.2.1.3. Endodontik Olarak Uygulanması .....	40
2.5.2.1.4. EDTA NaOCl ve CHX Arasındaki Etkileşimler .....	41
2.5.2.2. HEBP .....	42
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM .....</b>	<b>43</b>
3.1. Hedefleri .....	43
3.2. Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması .....	43
3.2.1. Etidronik Asit (HEBP) Çözeltisinin Hazırlanması .....	43
3.2.2. NaOCl Çözeltisinin Hazırlanması .....	44

3.2.3. EDTA Çözeltilisinin Hazırlanması .....	44
3.3. Örneklerin Hazırlanması .....	45
3.3.1. Dişlerin Seçimi .....	45
3.3.2. Kronların Ayrılması.....	46
3.3.3. Çalışma Boyunun Belirlenmesi .....	46
3.3.4. SEM İncelemesine Gönderilecek Örneklerin Hazırlanması.....	46
3.3.5. Kök Kanallarının Kemo-mekanik Preperasyonu.....	46
3.4. Pilot Çalışma .....	48
3.4.1. Pilot Çalışmanın Amacı ve Hedefleri .....	48
3.4.2. Pilot Çalışma için Kullanılacak Örneklerin Seçilmesi ve Hazırlanması .....	48
3.4.3. Pilot Çalışma için Kullanılacak Dişlerin Kemo-mekanik Preperasyonu.....	48
3.4.4. Pilot Çalışma için Grupların Oluşturulması .....	49
3.4.5. Pilot Çalışmadaki Örneklerin Sterilizasyonu.....	49
3.4.6. Pilot Çalışmadaki Örneklerin Sterilizasyon Sonrası Değerlendirilmesi... 50	
3.5. Örneklerin Muhafaza Edilmesi .....	50
3.6. Örneklerin Sterilizasyonu.....	50
3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması .....	51
3.8. <i>E. faecalis</i> Kültürünün Aktifleştirilmesi ve Örneklere İndüksiyonu.....	55
3.8.1. <i>E. faecalis</i> Kültürünün Geliştirilmesi .....	55
3.8.2. <i>E. faecalis</i> Süspansiyonunun Hazırlanması .....	56
3.8.3. Örneklerin <i>E. faecalis</i> ile Enfekte Edilmesi .....	56
3.9. <i>C. albicans</i> 'ın Kültürünün Geliştirilmesi ve Örneklere İnokülasyonu.....	57
3.9.1. <i>C. albicans</i> Kültürünün Geliştirilmesi .....	57
3.9.2. <i>C. albicans</i> Süspansiyonunun Hazırlanması.....	58
3.9.3. Örneklerin <i>C. albicans</i> ile Enfekte Edilmesi .....	58
3.10. <i>P. aeruginosa</i> Kültürünün Geliştirilmesi ve Örneklere İnokülasyonu.....	59
3.10.1. <i>P. aeruginosa</i> Kültürünün Geliştirilmesi.....	59
3.10.2. <i>P. aeruginosa</i> Süspansiyonunun Hazırlanması .....	60
3.10.3. Örneklerin <i>P. aeruginosa</i> ile Enfekte Edilmesi .....	60
3.11. Biyofilm Oluşmasının Değerlendirilmesi .....	61
3.12. Örneklerin SEM (Taramalı Elektron Mikroskopu) İçin Hazırlanması.....	61
3.13. Deney Grupları .....	62



3.14. Final İrrigasyonu Yapılan Örneklerden Mikroorganizmaların Elde Edilmesi .....	64
3.15. Örneklerin Değerlendirilmesi .....	66
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>69</b>
4.1. Örnekleri Sabitleme ve Sterilizasyon Kontrolü İçin Yapılan Pilot Çalışmaya Yönelik Bulgular .....	69
4.2. <i>E. faecalis</i> ile oluşturulan Biyofilm Oluşumunun İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	70
4.3. <i>C. albicans</i> ile Oluşturulan Biyofilm Oluşumunun İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	77
4.3. <i>P. aeruginosa</i> ile Oluşturulan Biyofilm Oluşumunun incelenmesine Yönelik Bulgular .....	84
4.4. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin <i>E. faecalis</i> ile oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	92
4.5. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin <i>C. albicans</i> ile Oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	95
4.6. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin <i>P. aeruginosa</i> ile oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	97
4.7. HEBP'in Etkin Konsantrasyonunun Belirlenmesi .....	98
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>100</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....</b>	<b>122</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>125</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>126</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>127</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>153</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>NaOCI</b>	: Sodyum Hipoklorit
<b>EDTA</b>	: Etilendiamintetraasetikasit
<b>CHX</b>	: Klorheksidin Glukonat
<b>HEBP</b>	: Etidronik Asit
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskopu
<b>CLSM</b>	: Lazer taramalı konfokal mikroskopi
<b>MTAD</b>	: Tetrasiklin isomer asit deterjan
<b>MBK</b>	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
<b>FESEM</b>	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopu
<b>MBEK</b>	: Minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonunu
<b>FISH</b>	: Floresan in situ hibridizasyon
<b>AFM</b>	: Atomik kuvvet mikroskopisi
<b>ATCC</b>	: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu
<b>VBNC</b>	: Canlı fakat kültürize edilemeyen faz
<b>PCR</b>	: Polimeraz zincir reaksiyonu
<b>Ca(OH)<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum hidroksit
<b>ELISA</b>	: Enzim bağlı immünosorbent test
<b>DGGE</b>	: Denatüre Edici Gradient Jel Elektroforezi
<b>T-RFLP</b>	: Terminal Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi
<b>PCA</b>	: Parakloroanil
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>FTS</b>	: Fizyolojik Tuzlu Su
<b>TSA</b>	: Tyriptic Soy Agar
<b>TSB</b>	: Tyriptic Soy Broth
<b>KOB</b>	: Koloni Oluşturan Birim
<b>SDA</b>	: Sabouraud Dextrose Agar
<b>SDB</b>	: Sabouraud Dextrose Broth

<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>Log<sub>10</sub></b>	: Logaritma 10 tabanı
<b>°C</b>	: Derece santigrat
<b>pH</b>	: Hidrojenin gücü (Power of Hidrojen)
<b>Ltd.</b>	: Limited
<b>mm</b>	: Milimetre
<b>KOB</b>	: Koloni oluşturan birim



## TABLULAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Kültür metodunun avantaj ve dezavantajları.....	31
<b>Tablo 2.</b> İdeal irrigasyon solüsyonunda aranılan özellikler.....	34
<b>Tablo 3.</b> <i>E. faecalis</i> için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir .....	94
<b>Tablo 4.</b> <i>C. albicans</i> için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir .....	96
<b>Tablo 5.</b> <i>P. aeruginosa</i> için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir .....	97
<b>Tablo 6.</b> Final irrigasyonu sonrası 3 farklı Mikroorganizmanın istatistiksel değerlendirme tablosu .....	99



## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlar; Etidronik Asid (A), Sodyum Hipoklorit (B), EDTA (C). .....	45
<b>Resim 2.</b> Genişletme ve yıkama işlemleri bitmiş olan dişlerin saklanması için kullanılan şeffaf mikrokuyucuklar .....	47
<b>Resim 3.</b> Örneklerin otoklava girmeden önce poşetlenmesi ( Bir sterilizasyon poşetinin içerisinde 4 veya 5 tane ependorf bulunmaktadır.) .....	51
<b>Resim 4.</b> <i>E. faecalis</i> 'den oluşturulan stok solüsyonu .....	56
<b>Resim 5.</b> Örneklerin <i>E. faecalis</i> ile enfekte edilmeden hemen öncesi.....	57
<b>Resim 6.</b> <i>C. albicans</i> 'dan oluşturulan stok solüsyonu.....	58
<b>Resim 7.</b> Örneklerin <i>C. albicans</i> ile enfekte edilmeden hemen öncesi .....	59
<b>Resim 8.</b> Örneklerin <i>P. aeruginosa</i> ile enfekte edilmeden hemen öncesi.....	61
<b>Resim 9.</b> Final irrigasyon işlemlerinin ve dişlerden örnek alma işlemlerinin yapıldığı steril airflow kabin .....	65
<b>Resim 10.</b> Vortex .....	66
<b>Resim 11.</b> Mikroorganizmaların seri dilüsyonlarının hazırlanması .....	67
<b>Resim 12.</b> TSB besiyerine ekimi yapılan bakterilerin inkübasyondan sonra koloni geliştirmiş görüntüsü.....	67
<b>Resim 13.</b> Sürme yapılmış <i>C. albicans</i> ATCC 10231 suşunun SDB besiyerinde gelişen koloni görüntüsü .....	68
<b>Resim 14.</b> Pilot çalışmada silikona gömülmüş bulanıklık testi sonrası steril olmadığı gözlemlenen örneklerden biri .....	69
<b>Resim 15.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	71
<b>Resim 16.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	72
<b>Resim 17.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	73
<b>Resim 18.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 3000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	74
<b>Resim 19.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	75
<b>Resim 20.</b> <i>E. faecalis</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	76
<b>Resim 21.</b> <i>C. albicans</i> 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	78

<b>Resim 22.</b> <i>C. albicans</i> 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	79
<b>Resim 23.</b> <i>C. albicans</i> 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	80
<b>Resim 24.</b> <i>C. albicans</i> 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	81
<b>Resim 25.</b> <i>C. albicans</i> 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 10000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	82
<b>Resim 26.</b> <i>C. albicans</i> 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	83
<b>Resim 27.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	85
<b>Resim 28.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	86
<b>Resim 29.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	87
<b>Resim 30.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 3000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	88
<b>Resim 31.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	89
<b>Resim 32.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 10000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	90
<b>Resim 33.</b> <i>P. aeruginosa</i> 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi .....	91
<b>Resim 34.</b> TSB besiyerine ekimi yapılan <i>E. faecalis</i> 'in ekimi yapıldıktan sonraki koloni geliştirme görüntüsü.....	93
<b>Resim 35.</b> SDB besiyerine ekimi yapılan <i>C. albicans</i> 'ın ekimi yapıldıktan sonraki koloni geliştirme görüntüsü.....	95

## GRAFİKLER DİZİNİ

<b>Grafik 1.</b> Dünya çapında yapılan araştırmalar sonucunda diş hekimlerinin primer irrigasyon solüsyonu tercihlerinin grafiksel gösterimi .....	35
<b>Grafik 2.</b> İrrigasyon ile elimine edilen <i>E. faecalis</i> bakterisinin yüzdesel dağılımı .....	94
<b>Grafik 3.</b> İrrigasyon ile elimine edilen <i>C. albicans</i> 'ın yüzdesel dağılımı .....	96
<b>Grafik 4.</b> İrrigasyon ile elimine edilen <i>P. aeruginosa</i> miktarı .....	98
<b>Grafik 5.</b> Konsantrasyonlara göre başlangıç bakteri sayısındaki değişimler .....	99



## 1. GİRİŞ

Bakteriler pulpal ve periapikal lezyonların gelişiminde primer etyolojik faktör olarak kabul edilmiştir (1). Kök kanal tedavisinin temel amacı, kontamine olmuş kök kanal sisteminden mikroorganizmaları elimine etmektir (2). Kompleks kök kanal sisteminin dezenfeksiyonunda ve debrislerin uzaklaştırılmasında, mekanik temizlik, intrakanal medikamentleri ve irrigasyon solüsyonları tek başlarına yeterli değildir. Bunun nedeni kök kanal sisteminin tahmin edilemeyen anatomisidir. Mekanik temizlikle birlikte irrigasyonun yapılması kanalların temizlenme etkinliğini artırır (3). İrrigasyon solüsyonu olarak en sık NaOCI kullanılmaktadır. Ucuz olması, kolay bulunması, etkili fungusid ve germisid özelliğinden sebebiyle NaOCI en çok tercih edilen irrigasyon solüsyonudur. Yüksek toksisite ve alerjik reaksiyonlara sebep olması gibi dezavantajları vardır. Konsantrasyon oranı arttıkça toksisitesi de artmaktadır. Ayrıca dentinin fiziksel özelliklerini de değiştirebilmektedir(4-5).

Klorheksidin endodontide invivo (6) ve invitro (7) çalışmalarda irrigant ve intrakanal medikamenti olarak kullanılmaktadır. Zehnder tarafından önerilen bir protokole göre kök kanal dolgusu yapılmadan önce ilk olarak dentin üzerindeki organik yapıyı çözmek için NaOCI ile irrigasyon yapılmalıdır. Ardından EDTA ile irrigasyon yapıp smear tabakası ortadan kaldırılmalı ve son olarak CHX ile irrigasyon yapıp antimikrobiyal aktivite ve dayanıklılık artırılmalıdır (8). İrrigantlar ile yapılan bu kombinasyonlar antimikrobiyal etkinliği artırır. Fakat irrigantlar arasında kimyasal etkileşimler gerçekleşebilir. Bazı çalışmalar NaOCI ve CHX'in birlikte kullanılması sonucu pembe renkli çökelti oluştuğunu göstermiştir. Bu çökelti NaOCI ile CHX karıştırıldığında gerçekleşen asit baz reaksiyonunun sonucu meydana gelmektedir (3).Bu özelliklerinden dolayı NaOCI ile reaksiyona girmeyecek yeni bir irrigant bulma ihtiyacı doğmuştur (9).

Hem NaOCI dezavantajları hemde EDTA ve sitirik asidin dezavantajları sebebiyle birçok yeni endodontik irrigant arayışına gidilmiş bunlardan birisi de HEBP dir (1). HEBP ile ilgili Arias-moliz ve ark çalışma yapmıştır (2). Ancak etkili konsantrasyonu bilinmemektedir. Bu çalışma ile hem HEBP için ideal konsantrasyonun belirlenmesi hem de bu konsantrasyonlar da HEBP'in antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesi planlandı.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Biyofilm

Biyofilm, canlı veya cansız bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak tutunmuş, ekzopolimerik yapılar, proteinler, polisakkarikler ve nükleik asitlerden oluşan bir ekstraselüler matris tarafından çevrelenmiş çok hücreli mikrobiyal topluluklara (bakteriler, mantarlar ve protozoalar) verilen isimdir (3-6). Biyofilm oluşturma yeteneği bir virülans faktör olarak tanımlanmıştır ve biyofilm oluşumu için sıvı ortamda serbest halde bulunan planktonik mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması gerekmektedir (7). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler matris, mikroorganizmaların yalnızca bir yüzeye tutunmasını sağlamakla kalmaz ayrıca mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak biyofilm yapısına katılmalarını da sağlar (8). Bu sürecin devamında yüzeye birçok farklı mikroorganizma tutunmaya devam eder. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların kolonizasyonu ve konakta canlılıklarını sürdürebilmeleri adına oldukça önemlidir (9). Mikroorganizmaların biyofilm içerisinde bulunmalarının kazandırdığı en önemli avantaj planktonik türdeşlerine oranla dış etkenlere karşı daha korunaklı ve daha dirençli hale gelmeleridir (9). Gıda ve su endüstrisinde karşılaşılan en önemli problemlerden birinin biyofilm oluşumu olduğu bildirilmiştir (10). Günümüzde biyofilmlerin tıp alanında da giderek artan bir öneme sahip olduğu kabul edilmektedir. Özellikle kataterler, kalça protezleri, kalp kapağı protezleri, kontakt lensler gibi tıbbi implantların yüzeyinde biyofilm oluştuğu ve bu oluşumun hastane enfeksiyonlarının %65'inden sorumlu olduğu kabul edilmektedir (6,11). Diş hekimliğinde en çok çalışılan biyofilm yapısı dental plaktır (12). Kök kanallarında biyofilm oluşumu ilk kez ortaya koyan araştırmacı ise 1987 yılında Nair olmuştur (13).

#### 2.1.1. Biyofilmin Yapısı

Biyofilm bir yüzey üzerinde olgunlaşırken, bakteriler tarafından devamlı olarak ekstraselüler polisakkarit, protein ve nükleik asit sentezlenir ve oluşan ekstraselüler matris biyofilmin hacimsel olarak %85'ini oluşturur (14). Mikroorganizmalar biyofilmin ancak %15'ini oluştururlar. Ekstraselüler matris

yalnızca biyofilmin yapısını belirleyen fiziksel bir iskele olmakla kalmaz, aynı zamanda biyolojik olarak aktif, biyofilm için gerekli olan besinler, su ve esansiyel enzimleri içerisinde barındıran bir taşıyıcı görevi görür (15). Farklı popülasyonlar ve mikrokolonilerdeki topluluk üyeleri, biyofilm matriksinin bir ucundan diğer ucuna uzanan ve ilkel bir dolaşım sistemi oluşturan açık su kanalları ile birbirinden ayrılmıştır (6). Su kanalları biyofilm içindeki birincil dolaşım sistemidir ve bu kanallardaki sıvı içerisinde substrat, bakteri metabolizması son ürünleri ve bakteriyel etkileşimden sorumlu sinyal molekülleri taşınır (15).

Biyofilm oluşumunun erken evrelerinde bakteriler birçok konak proteinine bağlanır ve diğer bakterilerle etkileşime girerler. Bu etkileşimler büyüme oranlarında, gen ekspresyonlarında ve protein sentezinde değişimlere neden olur. Proteomik teknikler ve DNA analizlerine göre biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların planktonik türdeşlerine göre % 20-70 oranında daha fazla gen ekspresyonu gösterdiği belirtilmiştir (16,17). Bu durum biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların farklı bir fenotipe dönüşmesine neden olur (18).

Biyofilmler içinde gen ekspresyonlarını koordine etmek için hücrelerarası bir iletişim mekanizması olan “Quorum Sensing” kullanılır (19). “Quorum Sensing”, bir popülasyondaki gen ekspresyonlarının koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır (20). Bu iletişim mekanizması sayesinde tek hücreli prokaryotik mikroorganizmalar, çok hücreli ökaryotik organizmalar gibi hareket etmekte ve bu da onlara tek başlarına elde edemeyecekleri simbiyotik hareket etme, biyofilm oluşumu, virülans özelliklerin paylaşılması, antibiyotik üretimi ve ekstraselüler enzimlerin salgılanması gibi bir takım avantajlar kazandırmaktadır (21). Biyofilm oluşumu sırasında görülen; yüzeye bağlanma, çoğalma, matriks üretimi ve biyofilm yapısındaki parçalanmalar “Quorum Sensing” mekanizması ile kontrol edilmektedir (22).

### 2.1.2. Biyofilm Oluşumu

Mikrobiyal biyofilm oluşumu hücrelerin bir yüzey aracılığıyla tutunması ile başlayan gelişimsel bir süreçtir. Mikrobiyal biyofilm oluşumu temel olarak çeşitli adımları içeren 2 ana bölüm altında toplanır:

- a) Hücreler ile alt tabakalarının başlangıç etkileşimleri
- b) Biyofilmin büyümesi ve gelişimi

Biyofilm formasyonu başlangıcında planktonik yapıdaki hücreler polimer matriks veya koşullandırılmış film yüzeyine organik olarak bağlanarak toplanır. Şartlandırılmış filmler su, tuz iyonları, albumin yada fibronektin gibi yerel çevre bileşenlerinden oluşmaktadır. İlk bakteri hücreleri geldiğinde hücre ve koşullandırılmış film tabakası arasında brown hareketi, yerçekimi, difüzyon veya elektrostatik etkileşimler gibi zayıf ve geri dönüşebilir fiziksel etkileşimler vardır (23). Flagella ve pilus gibi bakteri yüzey yapıları ile olan özel bağlantılar biyofilmin ilk oluşumunda önemli bir yere sahiptir. Bir sonraki adım hücrelerin geri dönüşümsüz bir şekilde adezyonudur. Hücreler tarafından salgılanan katı exopolimerler sayesinde iki yüzey arasındaki itici kuvvetlerin etkileri azaltılmış olur. Bu hidrofilik exopolimerler kompleks ve dinamik bir yapıdadır (24).

Biyofilmin gelişmesi biyofilme yapışan ek hücreler tarafından ve bu hücreleri taklit eden hücrelerin bir sonucu olarak meydana gelir (25). Bu tamamıyla dinamik bir süreçtir, mikroorganizmalar önce kendi içlerinde sonra diğer bir mikroorganizma ile bağlanırlar ve bu ilişki aktif topluluklarda meydana gelir. Sonuç olarak büyüme esnasında bazı hücreler zamanla biyofilmden ayrılacaktır (26-29).

### 2.1.3. Biyofilm Gelişimi

Bakteriler besin içeren sıvıya temas etmiş herhangi bir yüzey üzerinde biyofilm oluşturabilirler. Biyofilm oluşumunda yer alan üç ana bileşen bakteriyel hücreler; katı bir yüzey ve sıvı bir ortamdır. Biyofilm gelişimi üç aşamadan oluşur:

Aşama 1: Katı yüzey üzerine çeşitli inorganik ve organik moleküllerin tutunması.

Aşama 2: Biyofilm oluşacak yüzeye mikrobiyal hücrelerin adezyonu: Sıcaklık, pH, substrat yüzey enerjisi, beslenme durumu, bakterilerin temas süresi, bakteri hücre yüzey hidrofobisitesi gibi bakteriyel bağlanmayı etkileyen birçok faktör vardır. Bakteri yüzey etkileşimi üç aşamadan oluşur:

1. Faz: Fimbriya, pili, kamçı ve ekstraselüler polisakkaritlerin aracılığıyla substrat yüzeyine mikroorganizmaların taşınması (glycocalyx).

2. Faz: Elektrostatik çekim, kovalent ve hidrojen bağları, dipol ve hidrofobik etkileşimlerin kombinasyonu sonucu ilk non-spesifik mikrobiyal-substrat bağı oluşur.

3. Faz: Spesifik mikrobiyal substrat bağlanma aşamasıdır. Bu aşamada, adhesin veya bakteriyel hücre yüzeyi üzerindeki ligand substrat üzerindeki reseptörlere bağlanır.

Aşama 3: Bu aşamada biyofilm oluşumu ve genişlemesi meydana gelir. Bu aşamada, ilk yerleşen mikroorganizmalar mikrokoloni oluşturan sekonder bakterileri çeker ve mikrokolonilerin toplanması biyofilmin son halinin oluşmasına neden olur (9,30).

#### **2.1.4. Biyofilm Topluluğunda Yaşam**

Doğal olarak meydana gelen biyofilmlerin çoğu çeşitli mikrobiyataya sahiptir. Çeşitli mikrobiyataya sahip bu biyofilmler sadece pasif bakteriyel bir topluluk değil bir yüzeye yapışan topluluk içerisinde dağınık halde bulunmayan fonksiyonel olarak organize olan, popülasyondaki kompleks biyolojik sistemlerdir (31). Nitekim popülasyonda optimal metabolik etkileşimi sağlamak ve ekosistem içerisindeki ekolojik role en iyi şekilde katkı yapmak amacıyla biyofilm içerisinde stratejik olarak konumlandırılmışlardır. Biyofilm oluşturan türlerin bireysel özellikleri dikkate alınmaksızın yeni fizyolojik fonksiyonlar popülasyonda türler arasındaki ilişki ile belirlenir. Sonuç olarak biyofilm çevresel zorluklara ortak bir fizyoloji ile uyum içinde yanıt verir.

Biyofilm topluluklarında bakterilerin koloniler halinde yaşamasının: Geniş bir yaşam alanı kurulması, metabolik çeşitliliğin ve verimliliğin artması, genetik değişim ve bakteriyel haberleşme için gelişmiş olanaklar (çekirdek algılama sistemleri),

dışarıdan gelen tehditlere karşı koruma (rakip mikroorganizmalar, konak savunması, antimikrobiyal ajanlar ve çevresel stres) gibi çeşitli avantajları bulunmaktadır (32).

Biyofilm organizasyonu patojenite de artmaya sebep olabilir. Bakteriler hastalık yapabilmek için konak besinlerini almak ve çoğalmak, konak savunmasından kaçabilmek veya konak savunmasının üstesinden gelebilmek, konak ta doku hasarına neden olabilmek için konak yüzeyine yapışmalıdırlar (33). Virülans özelliklerinin geniş bir aralıkta olması, hastalık sürecinin belirli aşamaları için gerekli olan topluluktaki her bir bakterinin birlikte hareketini gerektirecektir. Biyofilm içersindeki belirli türler hastalık ta birden fazla role sahip olabilir ve farklı türler benzer işlevleri yerine getirebilir. Bu durum farklı bakteri kompozisyona sahip topluluklarda benzer hastalıklarda farklı bireylerin bulunmasını açıklayabilir. Çeşitli türlerin bulunduğu topluluklarda ilişki spektrumunun geniş olması bileşen türler arasında sinerjistik patojenik etki veya patojenik etkinin yok olması veya azalması gibi etkileri ortaya çıkarabilir. Endodontik abseler bireysel olarak düşük virülansa sahip bakteri türleri ve hastalığa sebep olmayan bakteri türleri ile ilişkili karışık bir konsorsiyum içeren polimikrobiyal enfeksiyon örneğidir (patojenik sinerjizm) (34,35).

### **2.1.5. Antimikrobiyal Ajanlara Direnç**

Klinik açıdan bakıldığında biyofilme artan antimikrobiyal ajanlara karşı direnç özel bir endişe kaynağıdır. Biyofilmlerdeki bakterilerin planktonik olan aynı hücrelere göre antimikrobiyal ajanlara daha fazla direnç geliştirdikleri kabul edilir (36). Biyofilmeindeki bakterileri öldürmek için gerekli antibiyotik konsantrasyonu aynı türdeki planktonik formdaki bakteriyi öldürmek için gerekli olan konsantrasyondan yaklaşık 100-1000 kat daha fazladır (37).

Biyofilmlerdeki antimikrobiyal direncin birkaç mekanizma ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

#### **2.1.5.1. Antimikrobiyal Ajanın Penetrasyonunun Biyofilm Yapısı İle Sınırlandırılması**

Antimikrobiyal ajan biyofilm yüzeyindeki bakteriler tarafından daha çok inhibe ve absorbe edilir. Biyofilm içerisinde daha derine penetre olmuş hücreler

etkilenmeden kalabilir. Antimikrobiyal ajanı inaktive edebilen konsantrasyonlarda nötrale edici hücreler biyofilm matriksindeki hücelere bağlanır ve onlara tutunabilir (38).

### **2.1.5.2. Biyofilmdeki Bakterilerin Çeşitli Büyüme Oranları**

Birçok antibiyotik biyofilm matriks üzerine penetre olabilir, buna rağmen hücreler hala korumalıdır. Biyofilmdeki bakterilerde açlık görüldüğünde biyofilm durağan bir faza girer buda antimikrobiyallere karşı biyofilm popülasyonunun direncini etkileyen önemli faktör olarak gözükmektedir. Biyofilm oluşurken besin durumunun yeterli olmadığı koşullarında bakterilerin büyümesi yavaş olur ve hızlı bölünen hücelere göre bu bakterilerin hassasiyeti azalmıştır. Çoğu antibiyotik en azından bir dereceye kadar hücrel aktivite gerektirebilir. Bu yüzden durağan fazdaki bakteri hücreleri biyofilmin antibiyotik resistansının genel mekanizmasını temsil edebilir (7).

### **2.1.5.3. 'Persister' Bakterilerin Varlığı**

Antibiyotiklere karşı bazı biyofilmlerin artan toleransı popülasyonun içerisinde öne çıkan bakterilerin varlığına bağlı olabilir (39). Bu bakteri popülasyonu içerisindeki en dirençli olanların ayrı bir fenotipi olan bakterilerin olup olmadığı hala belirsizdir (7).

### **2.1.6. Kök Kanallarında Biyofilm Oluşumu**

Mikrobiyal topluluklarla ilişkili yüzeylerde kolonizasyon ve retansiyon ağızdaki oral bakteriler tarafından sağlandığı için mine ve sement yüzeyindeki bakterilerin biyofilm oluşturan bakteriler ile aynı aileden olduğu düşünülmektedir. Mikroorganizmalar kök kanallarının bütün uzantılarında dentin duvarına yapışık halde kolonize bir şekilde bulunmuşlardır. Bu mikroorganizma yığılmaları aksesuar kanallarda karmaşık apikal anatomiye sahip iç duvarlarda da gözlenmektedir (13,40). Bu durum da antimikrobiyal ajanın ve mekanik kaldırmanın ulaşamadığı yüzeylerde, nekrotik doku artıklarından oluşan konak proteinleri ve bakterilerin ürettikleri yapışkan yüzeyler bakterilerin yaşayabilmeleri için uygun ortam sağlayacaktır.

Svensäter ve Bergenholtz 2004 yılında kök kanallarında biyofilm oluşumu için bir hipotez önerdiler. kök kanallarındaki biyofilm oluşumu muhtemelen pulpa enflamasyonu esnasında pulpa odasının oral mikroorganizmalar tarafından ilk işgalinden hemen sonra başlamaktadır. Enflamatuvar lezyon apikale doğru hareket eder ve bu sırada kök kanal duvarlarına yapışır(12). İlginç bir şekilde bakterilerin kök kanalının iç kısmından ayrıldığı ve genellikle kendiliğinden bu enflamatuvar lezyona kümelendiği gözlenmiştir (23,24). Bu gözlem kök kanallarının ötesinde bakteriyel biyofilmin ayrılması ve kolonizasyonu için lezyonun nasıl bir besin kaynağı gibi işlev gördüğünü açıklamaktadır.

### **2.1.7. Kök Kanallarında Biyofilmler**

Endodontide biyofilmler kanal içi, kanal dışı (sement) ve periapikal biyofilmler olarak 3 gruba ayrılabilir (33).

#### **2.1.7.1. Kanal İçi Biyofilmler**

Kök kanallarında biyofilm oluşumu ilk kez ortaya koyan araştırmacı 1987 yılında Nair olmuştur (13). Çekilmiş periapikal lezyonlu dişlerin taramalı elektron mikroskopu (SEM) ile incelenmesi sonucu elde edilen görüntülerde kök kanal duvarı boyunca uzanan yoğun miktarda koklar, çomaklar, filamentöz bakteriler ve spiroketler izlenmiştir. Bakteriler arasındaki boşluklarda bulunan amorf materyal ise ekstraselüler polimerik matris olarak yorumlanmıştır.

Şen ve ark. enfekte dişlerin kök kanal duvarlarını SEM ile incelediklerinde bakterilerin kanal duvarları ve dentin tübüllerinde yoğun koloniler oluşturduğunu, bakterilere ek olarak mantarların da birbirinden ayrı yoğun koloniler oluşturduğunu belirtmişlerdir (41).

Bergmans ve ark. aerobik, anaerobik, besin yönünden zengin ve besinden yoksun bırakılan ortamlarda *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma yeteneğini değerlendirdikleri çalışmada, *E. faecalis* hücrelerinin besin yönünden zengin, aerobik koşullarda 500-1000 µm çapında düzensiz şekilli, amorf makro yapılar oluşturduğunu bildirmişlerdir. Amorf yapıları daha yakın büyütme altında incelediklerinde ise bu yapıların bakteriyel hücre agregatları olduğunu görmüşlerdir. Besin yönünden zengin,

anaerobik koşullarda bırakılan *E. faecalis* hücrelerinin SEM ve CLSM ile incelenmesinde ise kök kanal duvarlarındaki olgun biyofilmlerin su kanalları ile birbirinden ayrıldığı görülmüştür. Besinden yoksun bırakılan aerobik ortamda oluşturulmuş biyofilmler incelendiğinde dentin yüzeyindeki bozulmalar dikkat çekmiştir ve bu bozulmalara neden olarak substrat yüzeyi, abiyotik bozulma ürünleri, bakteri hücreleri ve bunların metabolik ürünleri arasındaki etkileşimler gösterilmiştir. Besin yönünden zengin koşullarda oluşturulmuş biyofilmlerin SEM ve CLSM’de incelenmesi sonucu elde edilen görüntülerin aksine, besinden yoksun ortamda yoğun bakteriyel kümelenmeler görülmemiştir (42).

Nair ve ark. tek seansta kök kanal tedavileri tamamlanmış 16 enfekte dişin 14’ünde, ana kanalın işlem görmemiş bölgelerinde, istmus ve aksesuar kanallarda biyofilm oluşturmuş mikroorganizmalar görüldüğünü bildirmişlerdir. Kök kanalları ile enflamatuar lezyon arasında gerçekleşen sıvı akışının kök kanalını istila eden mikroorganizmalar için hem besin kaynağı oluşturduğunu hem de mikroorganizmaların çoğalıp kök kanal duvarında biyofilm oluşturmalarına olanak sağladığını belirtmişlerdir. Ayrıca, biyofilm içerisinden bakterilerin ayrılma sürecinin kök kanalı içerisinde de gerçekleştiğini ve kök kanalı içerisindeki biyofilmlerden ayrılan bakteriler enflamatuar lezyonun içerisinde kolonize olabildiğini bildirmişlerdir (43).

Kishen ve ark *E. faecalis* ve kök kanal dentini arasındaki ilişkiyi 2, 4 ve 6 haftalık aralıklarla X-ışını diffraksiyonu, SEM ve CLSM ile inceledikleri çalışmada, *E. faecalis* ile dentin ilişkisinin farklı aşamalarının olduğunu belirtmişlerdir. Bununla birlikte olgun biyofilm üzerinde bakteri kaynaklı apatit oluşumu gözlemlemişler ve *E. faecalis*’in kalsifiye biyofilmlere dönüşebilme yeteneğinin, onun kök kanallarındaki sürekliliğine katkıda bulunan bir faktör olabileceğine vurgu yapmışlardır (44).

Ricucci ve Siqueira kök kanal tedavisi yenilenmiş olmasına rağmen iyileşmenin sağlanamadığı, radyografik olarak kırık hattı görülen semptomatik bir dişi çekiminin ardından histopatolojik yöntemlerle incelemişler ve kırık hattı boyunca uzanan, kanal içi dezenfeksiyon prosedürlerine rağmen elimine edilememiş biyofilm tabakasını görüntülemişler ve bunu endodontik başarısızlığın sorumlusu olarak göstermişlerdir (45).



### 2.1.7.2. Eksternal Kök Yüzeyi Biyofilmleri

Bu tip biyofilmlerin asemptomatik apikal periodontitis görülen dişler ve fistül yolu ile ilişkili kronik apikal apseli dişlerde görüldüğü belirtilmiştir (33). Tronstad ve ark. endodontik tedaviye direnç gösteren inatçı enfeksiyonlu dişlerin çekilmesini takiben kök uçlarından alınan örnekleri SEM ile inceledikleri çalışmada, apikal foramen ve çevresinde ekstraselüler ağısı bir yapı aracılığı ile birbirine tutunan koklar, çomaklar ve fibriler yapıdaki bakterileri görüntülemişlerdir. Ekstraselüler bir yapı yardımıyla birbirine tutunan bu mikroorganizmaların büyük kısmının koklar, çomaklar ve az da olsa fibriler yapıdaki bakterilerden oluştuğu belirtilmiştir (46). Ricucci ve ark. sekonder apikal periodontitisli dişlerin kök uçlarını inceledikleri çalışmada kalsifiye oluşumların varlığını göstermişlerdir (47). Harn ve ark. geleneksel kök kanal tedavisine direnç gösteren periapikal lezyonlu dişlerin apikal kök yüzeylerinde kalsifiye biyofilm oluşumunu gözlemlemişlerdir (48).

Siqueira ve Lopes geniş çürüğe sahip asemptomatik periapikal lezyonlu çekilmiş dişleri SEM ile inceledikleri çalışmada, koklar ve çomakların kök kanalı ile sınırlı olduğunu, sadece bir dişte bakterilerin apikal foramen çevresinde görüldüğünü ve çoğu bakterinin kök kanalı içerisinde sıvı fazda asılı halde bulunduğunu belirtmişlerdir. Kendi bulgularına dayanarak, kök ucu aggregasyonlarının görüldüğü ekstraradiküler enfeksiyonların tedavi edilmemiş enfekte pulpalı dişler için ortak bir durum olmayabileceğini bildirmişlerdir (49).

Lomçalı ve ark. kronik apikal periodontitisli dişlerin apikal kök yüzeylerini SEM ile incelemişler, kök yüzeyinde laküner rezorpsiyon alanlarının bulunduğunu ve bu alanlarda bakteriler ve mantarların yoğun şekilde bulunduğunu bildirmişlerdir. Bu bulgulara ek olarak, apikal foramen çevresinde mikroorganizmaların ekstraselüler matris içerisinde gömülü halde bulunduğu, düzgün şekilli bir yapı ile kaplanmış periapikal bakteriyel plak görüldüğünü bildirmişlerdir. Bu bulgulardan yola çıkarak, konak savunma mekanizmalarının bakterileri kök kanalında tutmak için yeterli olmadığını, apikal foramen çevresinde mikroorganizmaların içerisinde gömülü halde bulunduğu yapının geleneksel endodontik tedavi prosedürleri veya sistemik antibiyotik kullanımı ile elimine edilemeyeceği sonucuna varmışlardır (50).

Leonardo ve ark. çeşitli pulpal duruma sahip çekilmiş dişlerin kök uçlarını SEM ile inceledikleri çalışmada, yalnızca apikal periodontitisli dişlerde biyofilm oluştuğunu belirtmişler ve bu biyofilmlerde koklar, basiller ve filamentöz bakterilerin birlikte bulunduğunu bildirmişlerdir (51).

Noiri ve ark. inatçı apikal patolojiye sahip çekilmiş dişlerin kök uçlarını ve endodontik tedavi sırasında kök kanalından çıkarılan gütä perka konlarını SEM ile inceleyerek biyofilm oluşumunu inceledikleri çalışmada, apekten dışarıya çıkmış olan gütä perka konlarının tamamının glikokaliks benzeri bir yapı ile kaplandığını ve çekilmiş dişlerin eksternal kök yüzeylerinde filamentöz bakteriler ve çomakları içeren biyofilm oluşumunu görüntülemişlerdir (52).

Carr ve ark. endodontik tedavileri 10 yıl önce yapılmış ve yaklaşık 2 yıl önce başarısızlığa bağlı olarak kanal tedavileri yenilenmiş ancak buna rağmen tedaviye direnç göstermesi nedeniyle çekilmiş alt molar dişlerin kök uçlarını elektron mikroskobu ile inceledikleri çalışmada, örneklerin tümünde kompleks yapıda çoklu tür içeren biyofilmlerin bulunduğunu belirtmişlerdir (53).

Ricucci ve ark. endodontik tedavi görmüş 12 semptomatik, 12 asemptomatik dişin kök uçlarının çekim veya rezeksiyon yardımıyla elde edildiği ve histolojik olarak incelendiği çalışmada, 23 dişte periapikal lezyon bulgusuna rastlamışlar ve kok, çomak ve filamentöz bakterilerden oluşan biyofilmleri görüntülemişlerdir. Endodontik tedavi sonrası görülen başarısızlığın esas nedeninin biyofilm oluşumu olduğunu belirtmişlerdir (54).

### **2.1.7.3. Peripikal Biyofilmler**

Bu tip biyofilmler endodontik tedavi ile ilişkili dişlerin apikal bölgelerinden izole edilen biyofilmlerdir. Kök kanal enfeksiyonlarına bağımlı ya da bağımsız olabilirler (33). Apikal periodontitis ile ilişkili dişlerin birçoğunda mikrobiyota kök kanalı ile sınırlandırılmıştır çünkü kök kanalını enfekte eden türlerin birçoğu fırsatçı patojendir ve periapikal dokularda konak savunmasına karşı hayatta kalma şansları çok zayıftır. Nadiren belirli türler ya da bir tür içerisindeki bazı suşlar çeşitli stratejiler geliştirerek hayatta kalırlar ve periapikal dokuları enfekte ederler (33). *Actinomyces*

genusu üyeleri ve *Propionobacterium propionicum* türünün endodontik tedaviye direnç gösteren asemptomatik lezyonlardan izole edildiği belirtilmiştir (55).

### 2.1.8. Kök Kanallarında Biyofilm Eliminasyonu

Antimikrobiyal ajanlar tek tür mikroorganizmanın hızlı büyüyen, dağılık popülasyonları üzerinde genellikle daha etkilidirler (12,56). Ancak bilindiği üzere olgun biyofilmler içerisindeki mikrobiyal topluluklar antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler ve eradike edilmeleri oldukça zordur. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların planktonik türdeşlerine oranla antimikrobiyal alanlara karşı 100-1000 kat daha fazla direnç gösterdiklerine dair sonuçlar paylaşılmıştır (9,56).

Spratt ve ark. NaOCl (%2,25), klorheksidin glukonat (%0,2), povidon iyodin (%10), koloidal gümüş (5 ppm) ve fosfat tamponlu salin (PBS) solüsyonunun *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus intermedius*, *Fusobacterium nucleatum* ve *E. faecalis* klinik izolatlarının monokültür biyofilmleri üzerindeki etkinliklerini karşılaştırmışlar ve NaOCl'nin en etkili antimikrobiyal ajan olduğunu, NaOCl'yi iyodin solüsyonunun takip ettiğini belirtmişlerdir (57).

Clegg ve ark. üç farklı konsantrasyondaki NaOCl (%6, %3 ve %1'lik), %2'lik klorheksidin (CHX) ve BioPure MTAD solüsyonlarının apikal dentin biyofilmleri üzerindeki etkinliğini karşılaştırmışlar ve yalnızca %6'lık NaOCl'nin tüm bakterileri öldürüp biyofilmi fiziksel olarak kaldırabildiğini belirtmişlerdir (58).

Özok ve ark. *F. nucleatum* ve *P. micros*'un in vitro koşullarda oluşturulmuş 24 ve 96 saatlik tekli ve ikili biyofilmleri üzerinde NaOCl'nin etkinliğini karşılaştırmışlar ve zamanla birlikte biyofilmin NaOCl'ye gösterdiği direncin arttığını ve ikili biyofilmlerin tekli biyofilmlere göre daha fazla direnç gösterdiğini belirtmişlerdir (59).

Dunavant ve ark. NaOCl (%6 ve %1'lik), Smear Clear, klorheksidin (%2), REDTA ve MTAD solüsyonlarının in vitro *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini karşılaştırmışlar %6 ve %1'lik NaOCl'nin diğer solüsyonlara göre daha etkin eliminasyon sağladığını ancak %6 ve %1'lik NaOCl'nin eliminasyon düzeyleri arasında da istatistiksel olarak anlamlı düzeyde farklılık olduğunu belirtmişlerdir (60).

Giardino ve ark. selüloz nitrat membran filtrelerde 48 saatlik inkübasyon sonrası oluşan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde NaOCl (%5,25'lik) ve MTAD solüsyonlarının etkinliğini karşılaştırmışlar ve NaOCl'nin 5 dakika uygulanmasının biyofilmi parçalara ayırıp uzaklaştırdığını bildirmişlerdir (61).

Distel ve ark. *E. faecalis*'in CaOH<sub>2</sub> uygulanmış kök kanallarında biyofilm oluşturabildiğini belirtirken (56), Chai ve ark. CaOH<sub>2</sub>'in %100 biyofilm eliminasyonu sağlayabildiğini belirtmişlerdir (57).

Brandle ve ark. *E. faecalis*, Streptococcus sobrinus, Candida albicans, Actinomyces naeslundii ve F. nucleatum'un planktonik ve tekli veya çoklu biyofilmleri üzerinde alkalın stresinin etkinliğini değerlendirmişler ve mikroorganizmaların planktonik formlarının CaOH<sub>2</sub> (pH=12,5)'ye dirençli olduğunu ancak *E. faecalis* ve Candida albicans'ın canlılığını koruduğunu, mikroorganizmaların dentine adezyon yeteneği ve çoklu biyofilmlerdeki türler arası etkileşimlerin CaOH<sub>2</sub> direncini etkileyen faktörler olduğunu belirtmişlerdir (62).

Williamson ve ark. NaOCl (%6'lık), CHX (%2), Chlor-Xtra (<%6'lık NaOCl ve yüzey düzenleyici kombinasyonu) ve CHX-Plus (%2'lik CHX ve yüzey düzenleyici kombinasyonu)'n 1, 3 ve 5 dakikalık uygulamalarının *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmişler, NaOCl ve Chlor-Xtra solüsyonlarının CHX ve CHX-Plus solüsyonlarına göre 1 ve 3 dakikalık uygulamalar sonunda daha etkin eliminasyon sağladığını bildirmişlerdir (63).

Arias-Moliz ve ark. NaOCl, CHX, etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), sitrik asit ve fosforik asit solüsyonlarının 1, 5 ve 10 dakikalık uygulamalarının polistiren yüzeylerde oluşturulan 24 saatlik *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini minimal biyofilm eradikasyon konsantrasyonunu (MBEK) belirleyerek değerlendirdikleri çalışmada, % 0,00625'lik NaOCl'nin 1 dakikalık uygulama sonunda eradikasyon sağlarken %2'lik CHX'in ancak 5 dakika sonunda eradikasyon sağladığını, EDTA, sitrik asit ve fosforik asit solüsyonlarının biyofilmler üzerinde herhangi bir antimikrobiyal etkiye sahip olmadığını belirtmişlerdir (64).

Bryce ve ark. NaOCl, CHX, EDTA ve iyodin solüsyonlarının kök kanalından izole edilen biyofilmler üzerindeki etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada,

biyofilmleri parçalama konusunda en etkili ajanın NaOCl olduğunu, NaOCl'yi iyodin solüsyonunun takip ettiğini belirtmişlerdir (65).

Chavez de Paz ve ark. %1'lik NaOCl'nin *E. faecalis*, *Lactobacillus paracasei*, *Streptococcus anginosus* ve *Streptococcus gordonii*'nin membran bütünlüğünü bozduğunu ve bu bakterilerden oluşan biyofilmler içerisindeki hücrelerin çoğunu elimine ettiğini, EDTA solüsyonunun (50 mmol/l) bakterilerin membran bütünlüğü üzerine etki gösterdiği ancak bu etkinin biyofilm eliminasyonu sağlayacak düzeyde olmadığı ve %2,5'lik CHX'in membran bütünlüğüne hafif düzeyde etki gösterdiği ve biyofilmlerin ancak %50'sini elimine edebildiğini bildirmişlerdir (66).

Prabhakar ve ark. %5'lik NaOCl'nin dış yüzeyinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde en etkili ajan olduğunu, tripala, yeşil çay polifenoller ve MTAD'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir(67).

Liu ve ark. aç bırakılan *E. faecalis* biyofilmlerinin durağan fazdakilere oranla %5,25'lik NaOCl'ye daha dirençli olduğunu ve biyofilmin olgunlaşması ile birlikte NaOCl'nin biyofilm üzerindeki etkinliğinin azaldığını belirtmişlerdir (68).

Shrestha ve ark. kitosan ve çinko oksit nanopartiküllerinin biyofilmin yapısal bütünlüğünü bozduğunu ve biyofilmler üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir (69).

Ferrer-Luque ve ark. maleik asit, setrimid-maleik asit, setrimid-sitrik asit ve setrimid-EDTA kombinasyonlarının biyofilm eradikasyonunu inceledikleri çalışmada, Maleik asitin MBEK değerinin 30 saniyelik uygulama sonunda %0,88, 2 dakikalık uygulama sonrası ise %0,11 olduğunu belirtmişlerdir. Sitrik asit ve EDTA'nın %0,2'lik setrimid ile kombine kullanılmasının ise 1 dakika sonunda eradikasyon sağladığını bildirmişlerdir (70).

Lundstrom ve ark. polimikrobiyal biyofilmler üzerinde %0,04'lük stabil klorin dioksit (ClO<sub>2</sub>), %3'lük NaOCl, %2'lik CHX ve steril distile suyun antibakteriyel etkinliğini karşılaştırmışlar ve NaOCl'nin ClO<sub>2</sub>'ye göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla eliminasyon sağladığını bildirmişlerdir (71).

Bhuva ve ark. çekilmiş tek köklü insan dişlerinin kanallarında oluşturdukları *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde %1'lik NaOCl ile 2 dakika boyunca 6 ml irrigasyon yapılmasının %95'in üzerinde biyofilm eliminasyonu sağladığını bildirmişlerdir (72).

Ordinola-Zapata ve ark. sığır dişlerinden elde ettikleri dentin bloklarını ortodontik apaceylere sabitleyerek insan ağızında enfekte ederek biyofilm oluşturdukları çalışmada, dentin bloklarının 5 dakika boyunca 1 ml %1'lik NaOCl içerisinde bekletilmesi sonucu oluşan eliminasyonun %2'lik klorheksidin uygulanan gruptan daha düşük miktarda biyofilm eliminasyonu oluşturduğunu belirtmişlerdir (73).

Wu ve ark. kök dentini üzerinde oluşturulan 4 haftalık erişkin *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde gümüş nanopartikülleri (%0,1'lik), NaOCl (%2'lik) ve steril salin solüsyonlarının 2 dakikalık uygulanması sonrası biyofilm eliminasyonlarını SEM ve CLSM kullanarak değerlendirmişler ve gümüş nanopartiküllerinin biyofilmin yapısal bütünlüğünü bozmadığını bildirmişlerdir (74).

Noiri ve ark. Er:YAG lazerin *A. Naeslundii*, *E. faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Propionibacterium acnes*, *F. Nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* ve *Prevotella nigrescens* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini değerlendirmişler ve *L. casei* dışındaki türler üzerinde lazer uygulamasının etkili olduğunu bildirmişlerdir (75).

Soukos ve ark. deneysel olarak enfekte edilmiş kök kanallarında oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde fotodinamik terapinin etkinliğini inceledikleri çalışmada, metilen mavisi çözeltisinin (25 µg/ml) 5 dakika kanalda bekletilmesi 665 nm kırmızı ışığın 30 J/cm<sup>2</sup>'lik enerji kaynağı ile kök kanalı içerisine uygulanması sonrası %53 biyofilm eliminasyonu sağladığı, ışık kaynağının gücü 222 J/cm<sup>2</sup>'ye çıkarıldığında ise %97 biyofilm eliminasyonu oluşturduğunu bildirmişlerdir (76).

Hems ve ark. ozon uygulamasının *E. faecalis*'in planktonik formları üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu ancak, biyofilmler üzerinde NaOCl kadar etkili olmadığını belirtmişlerdir (77).

Kuştarıcı ve ark. potasyum titanyum fosfat (KTP) lazer, ozon gazı ve %2,5'lik NaOCl'nin enfekte kök kanallarındaki antibakteriyel etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada, ozon gazının KTP lazer uygulamasından daha etkili eliminasyon sağladığı, ancak en etkili ajanın NaOCl olduğunu belirtmişlerdir (78).

Meire ve ark. Nd:YAG lazer, Er:YAG lazer, antimikrobiyal fotodinamik terapi ve NaOCl'nin *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğini inceledikleri çalışmada, NaOCl'nin en etkili ajan olduğunu, Er:YAG lazerin ise istatistiksel olarak oldukça anlamlı düzeyde bakteriyel eliminasyon oluşturduğunu belirtmişlerdir (79).

### **2.1.9. Biyofilmlerin Görüntülenmesinde Kullanılan Mikroskopik Teknikler**

Biyofilmi oluşturan yapıların ve bakterilerin incelenmesinde taramalı elektron mikroskobu, ışık mikroskopisi, floreson mikroskopisi, elektron mikroskopisi, atomik kuvvet mikroskopisi ve lazer taramalı konfokal mikroskopi gibi yöntemler kullanılabilir (80). Işık mikroskopları biyofilmlerin incelenmesinde kullanılan en temel araçlardır. Bu yöntemle doğrudan in vitro örnekler incelenebildiği gibi, biyofilmleri içeren histolojik kesitler de incelenebilmektedir ancak ışık mikroskopu ile incelenecek örnekler saydam olmalıdır. Bu nedenle biyofilmler hücre yoğunluğundan dolayı bu yöntem ile detaylı olarak incelenemezler (81). Işık mikroskopları yardımı ile hücrelerin şekilleri hakkında (çomak, kok veya spiral gibi) ve Gram boyama yöntemi kullanılarak, Gram-pozitif veya Gram-negatif olduklarına dair genel bir fikir sahibi olunabilir (82). Floresan mikroskobu floresan görselleştirme ile ışık mikroskopunun büyütme özelliklerini birleştiren bir araçtır. Bakteriler floresan boyalarla boyanıp, UV ışınları altında mikroskopta incelendiğinde, ışık saçan parlak cisimcikler halinde görülürler (83).

Bugüne kadar mikrobiyal biyofilmlerin yapısal özelliklerini görüntülemeye yönelik yapılan çalışmalarda en çok kullanılan yöntem taramalı elektron mikroskopisi (SEM)'dir (81). SEM yüksek enerjili elektronların küçük bir alana odaklanması ve yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Işık mikroskopuna oranla geleneksel SEM kullanılarak 400 kat daha yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilebilir (81). SEM'e alan emisyonu özelliğinin eklenmesi ile oluşturulan alan emisyonlu taramalı elektron mikroskobu (FESEM) örnek üzerindeki elektrostatik bozulmaları önleyerek daha keskin görüntü elde edilmesine olanak tanımıştır (84,85).

Biyofilmlerin görüntülenmesinde kullanılan en son tekniklerden biri de lazer taramalı konfokal mikroskopi (CLSM)'dir. Bu teknikte elektron mikroskopisinde

karşılaşılan dehidrasyon veya deformasyon gibi istenmeyen değişikliklerle karşılaşılmaz (88). Eğer örnekler uygun floresan boyalar ile boyanabilirse canlı/ölü organizmaların analizi yapılabildiği gibi, 50-200 µm kalınlığına kadar biyofilmlerin 3 boyutlu, kantitatif analizi de yapılabilmektedir (88). Ancak ışık mikroskopisindeki kısıtlamalara bağlı olarak biyofilmleri oluşturan matriks ve hücrelerin yapısal özellikleri detaylı olarak incelenememektedir (84).

Atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) örnek hazırlama süreci gerektirmeyen bir tekniktir. Bu teknikte özel tarayıcı bir uç kullanılarak örneğin 3 boyutlu analizi yapılır ve işlem sonunda 3 boyutlu bir imaj elde edilir (42). (86)

Floresan antisera ve floresan in situ hibridizasyon (FISH) teknikleri kullanılarak karma bir biyofilm topluluğu içerisindeki spesifik türlerin tanımlaması yapılabilir. Yeşil floresan proteini kullanılarak fiksasyon veya boyamaya gerek kalmadan biyofilmlerin noninvaziv incelenmesi yapılabilmektedir (93).

## **2.2. Kök Kanallarının Mikrobiyal Çeşitliliği**

Endodontik enfeksiyonlarda, enfeksiyon tipine göre mikrobiyota çeşitlilik göstermektedir. Oral kavitedeki tüm mikroorganizmalar kök kanal sistemine girebilmesine rağmen, kök kanal ortamındaki besin varlığı, ortamın pH'ı, oksijen gerilimi, ısı, bakteri etkileşimleri ve konak direnci gibi faktörler nedeniyle enfekte kök kanallarından izole edilen bakteri türlerinin sayısı daha sınırlıdır (87).

Kök kanal enfeksiyonları dinamik bir süreçtir ve farklı evrelerde farklı türler baskın olurlar. Pulpal enfeksiyonun başlangıç aşamasında fakültatif bakteriler baskındır (88). Zamanla pulpa nekrozu ve fakültatif bakterilerin tüketimine bağlı olarak kök kanalı içerisindeki oksijen tükenir. Dolayısıyla, ortam anaerobik bakterilerin hayatta kalıp gelişebileceği bir şekil alır. Zamanla anaerobik koşullar daha da belirginleşir, özellikle kök kanalının apikal üçlüsünde fakültatif bakterilerin sayısı azalırken anaeroblar baskın hale gelir. Kök kanal sistemine kolonize olan bakteriler için temel besin kaynakları şunlardır (89).



- a. Nekrotik pulpa dokusu,
- b. Apikal ve lateral foramenler aracılığı ile kök kanal sistemine sızan doku sıvıları ve eksudada bulunan proteinler ve glikoproteinler,
- c. Kök kanalına koronal yoldan ulaşabilen tükürük içeriği,
- d. Diğer bakterilerin metabolik son ürünleri.

Oksijen seviyelerindeki değişikliğin kök kanalında kolonize olan mikrobiyotayı etkilemesinin yanında, bakterilerin besinleri kullanabilme dinamikleri de mikrobiyal çeşitliliği etkiler. Enfeksiyon sürecinin başlangıç aşamalarında sakkarolitik bakteriler baskınken, ilerleyen evrelerde besin kaynağının değişimine bağlı olarak proteolitik türler baskın hale gelirler (49).

Primer endodontik enfeksiyon varlığında kök kanal mikroflorası çoğunlukla anaerop mikroorganizmalardan oluşur. Apse vakaları da dahil olmak üzere, primer enfeksiyonlardan izole edilen türler genellikle Gram-negatif; *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* ve *Veillonella* ve Gram-pozitif; *Porvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ve *Eubacterium* bakterilerinden oluşur (90).

Kök kanal tedavisi sırasında uygulanan kemomekanik preperasyondan sonra genellikle primer enfeksiyondan sorumlu Gram-negatif bakteriler elimine edilmektedir. Ancak enstrumantasyon sonrası alınan örneklerde, *F.nucleatum*, *Prevotella* türleri ve *Campylobacter rectus* gibi bazı anaerobik çomakların izole edildiği belirtilmiştir (91,92). Tedavi prosedürlerine direnç gösteren vakalarda daha çok Gram-pozitif fakültatif ve anaerob bakterilerin izole edildiği, bu bakteriler arasında ise daha çok streptokoklar, *P. micro*, *Actinomyces* türleri, *Propionibacterium* türleri, *P. alactolyticus*, laktobasiller, *E. faecalis* ve *Olsenella uli*'nin izole edildiği belirtilmiştir (91,93). Çeşitli kültür ve moleküler biyoloji tekniklerinin kullanıldığı çalışmalarda, kök kanal tedavisi görmüş dişlerden en sık izole edilen türün % 90'a varan oranla *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (94).

### 2.2.1. Enterokoklar ve *Enterococcus Faecalis*

Enterokoklar tek başlarına, çiftler veya kısa zincirler halinde bulunabilen küre veya ovoid şekilli, hareketsiz, gram-pozitif koklardır. Fakültatif anaerob oldukları için oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilirler (95). Karbonhidratlar, gliserol, laktat, malat, sitrat, arjinin, agmatin ve birçok  $\alpha$ -keto asidi katabolize ederek enerji kaynağı olarak kullanabilirler. Enterokok türleri insan bağırsak lümeninde yüksek miktarlarda (dışkıının her gramında 10<sup>5</sup>-10<sup>8</sup> CFU) bulunurlar ve çoğunlukla konağa zarar vermezler. Ayrıca daha düşük miktarlarda, kadınların ürogenital bölgesinde ve oral kavitede de bulunurlar (96). Yüksek alkalın pH (9,6) ve tuz konsantrasyonları gibi zor çevre koşullarında bile hayatta kalabilirler. Safra tuzları, deterjanlar, ağır metaller, etanol, asid ve kurutmaya direnç gösterirler. 10-45°C arasında üreyebilir ve 60°C sıcaklıkta 30 dakika hayatta kalabilirler (97).

Enterokoklar önceleri D grubu streptokoklar içerisinde yer alırken, 1984 yılında enterokok ve nonenterokok D grubu streptokoklar, nükleik asit analizleri yapılarak içinde farklı türler bulunan yeni bir cins, *Enterococcus* olarak tekrar sınıflandırılmıştır (98).

Enterokoklar içerisinde 23 adet tür tanımlanmıştır ve bu türler mannitol, sorboz ve arjininle etkileşimine bağlı olarak 5 grupta toplanmıştır. *E. faecalis*; *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. gallinarum* ile birlikte aynı grubun üyesidir. Bu beş tür, mannitol besi yeri içerisinde asit oluşturup arjinini hidrolize ederken, sorboz besi yeri içerisinde asit oluşturamazlar. *E. faecalis* arabinoz negatiftir ve bu gruptaki diğer üyelerden farklı olarak, piruvatı kullanır ve tellüriti tolere eder (99)

Enterokokların subakut endokardit, bakteriyemi, bakteriyel menenjit ve üriner sistem enfeksiyonlarına yol açabildiği belirtilmiştir (100). Bu bakteriler, çoğu beta laktamaz içeren çeşitli antibiyotiklere (sefalosporinler ve sentetik penisilinler), klindamisine, düşük konsantrasyonlu aminoglikozidlere ve florokinolonlara karşı doğal olarak dirençlidirler. Doğal genetik dirençlerine bağlı olarak, sıklıkla hastane enfeksiyonlarıyla ilişkilendirilirler. ABD’de görülen hastane enfeksiyonlarının %12’sine enterokokların neden olduğu ve bunların %80’den fazlasının *E. faecalis* veya *E. faecium* kaynaklı olduğu belirtilmiştir (101). Ampisilin ve vankomisin’e karşı duyarlı olmalarına rağmen, bu antibiyotiklerin uzun süre kullanımıyla direnç

geliştirebilirler (102). Direnç geliştirebilme özelliklerinden dolayı, enterokokal enfeksiyonların tedavisinde kombine antibiyotik kullanımı tavsiye edilmiştir.

Günümüzde ATCC (Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu) Bakteriyoloji Koleksiyonu, ticari olarak bulunabilen 69 adet *E. faecalis* izolatu listelemiştir. *E. faecalis*, çapı 0,5-2 µm arasında olan bir bakteridir, kültür ortamında kolayca üretilebilir, %5 koyun kanlı agar besiyerinde 1-1,5 mm çapında, sınırları düzgün, S tipinde, yuvarlak, beyazımsı koloniler oluşturur (103).

*E. faecalis*, oral kavitenin olağan sakinlerindendir. Hem primer endodontik enfeksiyonlar hem de sekonder/inatçı enfeksiyonlar gibi periradiküler hastalıkların farklı formlarıyla ilişkilendirilmiştir. Primer endodontik enfeksiyonlu dişlerde, baskın türler arasında zorunlu anaerop ve bazı fakültatif anaeroplara bulunduğu, enterokok türlerinin ise primer enfeksiyonda yer almadığı kabul edilmektedir.

Ancak modern moleküler teknikler kullanılarak yapılan çalışmalarda, primer enfeksiyonlarda *E. faecalis* prevalansının %4-40 arasında değiştiği belirtilmiştir (95). Sekonder/inatçı enfeksiyonlarda bu oran artarak, %90'a ulaşmaktadır (94). Prevalanslarda görülen bu dalgalanmanın nedeni olarak, farklı tanımlama tekniklerinin kullanılması, coğrafik farklılıklar ve örnek sayılarının farklı olması gösterilmiştir.

#### **2.2.1.1. *E. faecalis*'in Endodontik Açısından Önemi**

*E. faecalis* kök kanallarına tedavi sırasında, seanslar arasında ve tedavi tamamlandıktan sonra ulaşabilmektedir. Bu bakterinin endodontik tedavi görmüş dişlerde, primer endodontik enfeksiyonlu dişlere oranla yaklaşık 9 kat daha fazla oranda bulunduğu bildirilmiştir (90). Bu durum, primer enfeksiyonlarda bulunan diğer türlerin *E. faecalis*'in yayılımını sınırladığı ve doldurulmuş bir kök kanalı içerisindeki yetersiz çevresel koşulların *E. faecalis*'in hayatta kalmasına engel olmadığı anlamına gelmektedir. Aslında *E. faecalis*'in sıklıkla birden fazla seansta tedavi edilmiş ve/veya drenaj için açık bırakılmış dişlerden izole ediliyor olması (104), bu türün kök kanalına sekonder invaze olarak kolonize olabildiğini, sekonder enfeksiyona neden olduğunu ve sonrasında enfeksiyonun inatçı hale geldiğini desteklemektedir (105). Tedavi görmüş dişlerin kök kanallarında hayatta kalmış mikroorganizmalar arasında, *E. faecalis* kanal içi dezenfeksiyon prosedürlerine daha dirençlidir ve tedavi sonucu

oluşan yetersiz çevresel koşullara daha iyi adapte olur. *E. faecalis*'in salgıladığı serin proteaz, jelatinaz ve Ace enzimleri bakterinin dentine bağlanmasını ve dentin tübüllerinin derinlerine penetre olabilmelerini sağlayarak (106,107), mekanik preperasyondan ve irrigasyon ajanlarından daha az etkilenmesine neden olur (108). Ek olarak *E. faecalis* biyofilm formuna dönüşmesi halinde, biyofilm oluşturmamış formlarına göre fagositoz, antibiyotikler ve kanal içi antimikrobiyal işlemlere karşı daha da dirençli hale gelir (56). *E. faecalis* bünyesinde bulunan proton pompası sayesinde yüksek pH'lara sitoplazmasını asitleştirerek karşı koyar (109), dolayısı ile ara seanslarda medikament olarak kullanılan kalsiyum hidroksit (CaOH<sub>2</sub>)'e karşı dirençlidir (110). Onbir buçuk ve üstü pH değerlerinde *E. faecalis*'in hayatta kalamadığı bildirilmiştir, ancak dentinin tamponlama kapasitesi nedeniyle kök kanalı içerisinde 11,5 pH'ya ulaşmak günümüzde kullanılan tekniklerle mümkün değildir.

Primer enfeksiyonlarda bulunan birçok patojenin aksine, diğer bakterilerle simbiyotik bir ilişkiye gereksinim duymadığı için *E. faecalis* tek başına enfeksiyona neden olabilecek kapasitededir (111), bu nedenle tedavi görmüş dişlerden tek başına izole edilebilir (112). Çevresel şartlar *E. faecalis*'in gen ekspresyonlarını düzenleyerek, çeşitli koşullara adaptasyon yeteneği kazandırır (113). Böylelikle *E. faecalis* uygun olmayan çevresel koşullar için geliştirdiği bir hayatta kalma mekanizması olan, canlı fakat kültürize edilemeyen (VBNC) faza geçiş yapabilir. VBNC fazındaki bakteriler kültür ortamında üreme yeteneğini kaybeder, fakat yaşayabilirlik ve patojenite kazanırlar. Uygun çevresel koşullar yeniden oluştuğunda bölünmeye devam edebilirler (113).

*E. faecalis*'in besin kıtlığı yaşanan çevresel koşullarda hayatta kalabilme yeteneğine sahip olduğu ve tekrar besin kaynağına ulaştığında gelişimine devam ettiği belirtilmiştir. Ayrıca, besin sıkıntısı çekmesi durumunda serumu besin kaynağı olarak kullanabilmektedir. Doldurulmuş kök kanallarında uzun süreli açlık fazına karşı koyma yeteneğine sahiptir (114), bu durum kök kanal dolumu sırasında hayatta olan ve kanal içerisine gömülmüş olan bakterilerin daha sonra oluşacak enfeksiyon için bir odak oluşturduğunu düşündürmektedir. Bütün bu özellikler, *E. faecalis*'in kök kanal tedavisi görmüş dişlerdeki yüksek prevalansını açıklar niteliktedir.

### 2.2.1.2. Antimikrobiyal Medikamentlerin *E. faecalis*'e Etkisi

Hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dezenfeksiyon ve sterilizasyon için sıklıkla kullanılan bir biyosittir (115). Siqueira ve ark NaOCl ve  $H_2O_2$  solüsyonlarının birleşiminin ex vivo olarak *E. faecalis*'le kontamine edilen kök kanallarında yalnız başına NaOCl'e göre daha etkili olduğunu bulmuşlardır (93).

CHX glukonat antimikrobiyal özelliklerinden, düşük toksisitesinden dolayı uzun süredir diş hekimliğinde kullanılmaktadır. CHX'in avantajlarına rağmen, aktivitesi pH'a bağlıdır ve organik madde bulunduğu zaman etkinliği azalmaktadır (116). Geniş bir antimikrobiyal spektruma sahiptir ve Gr pozitif ve Gr negatif bakterilere ve mantarlara karşı etkilidir (73). Heling&Chandler (72) irrigant kombinasyonlarının (%3  $H_2O_2$ , CHX ve NaOCl) in vitro olarak dentin tubüllerinin içinde bulunan *E. faecalis*'e karşı antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmişlerdir. CHX'in antibakteriyel etkisinin daha çok olduğu gösterilmiştir.

Porteiner ve ark. sığır serum albumininin CHX'in toplam aktivitesini kaybetmesine neden olduğunu saptamışlardır. Bu albumin gibi proteinden zengin iltihabi eksudanın apikal foramenden kök kanalına doğru girişi CHX'in antibakteriyel aktivitesini zayıflatabileceğini göstermektedir (98).

Gomes ve ark. CHX ve NaOCl solüsyonlarının enterokoklar üzerine etkilerinin farklılıklarını ortaya koymuşlardır (117).

MTAD doksisisiklin, sitrik asit ve Tween-80 deterjanı içermektedir. Shabahang ve Torabinejad çekilmiş insan dişlerinde *E. faecalis* veya tükürükle kontamine edilen kök kanallarında MTAD'nin iyi bir antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu bulmuşlardır. Bu çalışmada %1.3 NaOCl irrigasyonu ve MTAD ile final tedavi kombinasyonunun insan dişinin sement ve dentin örneklerinden *E. faecalis*'i elimine ettiği bulunmuştur (118).

Dentin geçirgenliğinin artması ve kök dentini ile kök kanal dolgusu arasındaki sızıntıdaki azalma, smear tabakasının EDTA'nın yardımıyla uzaklaştırılmasıyla sağlanmaktadır ve buna ek olarak fazla sayıda lateral kanal tıkamak da mümkün olmaktadır. EDTA, kök dentinin geçirgenliğinde artışı ve endodontik aletlerin aktivitesinin artmasını sağlamaktadır. EDTA az bir antibakteriyel etkiye sahiptir, ama

smear tabakasının inorganik kısmını uzaklaştırarak diğer irrigantların dentin tubüllerine girişine yardım etmektedir (119). %10'luk sitrik asit solüsyonu EDTA gibi smear tabakasını kaldırır ve *E. faecalis*'e az bir etkisi vardır.

*E. faecalis*'i elimine etmede etkili olan diğer irrigantlar ozonlanmış su ve stanöz floriddir (120). Ozonlanmış su %2.5'luk NaOCl'le aynı antimikrobiyal etkiyi göstermiştir. Stanöz florid *E. faecalis*'e göre daha yüksek bir antimikrobiyal etkiye sahiptir (80).

Ca(OH)<sub>2</sub> bugünlerde kullanılan en popüler pansuman materyalidir ve *E. faecalis*'e karşı etkinliği tartışma konusudur. CHX antibakteriyel potansiyeli ve kolay uygulama özelliğinden dolayı pansuman materyali olarak kullanılmaktadır (121).

## **2.2.2. Candida ve Candida Albicans**

### **2.2.2.1. Genel Özellikler ve Sınıflandırma**

Candida cinsi mantarlar, Cryptococcaceae familyasından olup 30'dan fazla türü tarif edilmiştir. *C. albicans* dışında, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. pseudotropicalis*, *C. viswanathii*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondi* ve *C. krusei* diğer önemli Candidalardan bazılarıdır. Doğal kaynağı insandır. Toprak ve bitkilerden de üretilebilir. Candida cinsi mantarlar bifaziktir. Maya fazındayken tek hücrelidir, konağa girdiklerinde basit tomurcuklanma ile oluşan blastosporlar ile ürerler. Yaptığı hastalıklara genel olarak kandidiyaz (kandidiyoz) veya moniliyaz ismi verilir (122).

İnsanda hastalık yapan Candida'ların başında *C. albicans* gelir. *C. albicans*'lar içerisinde GDH18, GDH3339, CA1957, ATCC 28366 ve ATCC 10321 suşları daha virülandır. Diğer Candidalar insanda nadiren hastalık yapar veya avirülandır (123). *C. albicans*, eşeyli çoğalan, diploit, maya tipi bir mantar türü ve insanlarda oral ve vajinal fırsatçı enfeksiyonların etmenidir. Candida cinsine ait 200 tür olmasına karşın Candida enfeksiyonlarının %75'inin sorumlusu *C. albicans*'tir. *C. albicans* insan ağızı ve sindirim sistemi içinde yaşayan pek çok organizmadan biridir. Sağlıklı yetişkinlerin %40'ının ağızında, sağlıklı kadınların %20-25'inin vajinasında varlığı bulunmaktadır (124).

### 2.2.2.2. Mantarların Morfolojik Özellikleri

Mantarlar 2 temel formda bulunabilen kemoorganotofik ökaryotik mikroorganizmalardır. Bu iki form; mayalar ve küflerdir. Küfler, silindirik tubül dalları içeren çok hücreli filamentöz mantardır. Bir filamente “hifa” denir. Hifalar ya septattır (bölümlere ayrılmış) ya da konositikdir (çapraz duvarları olmayan çok çekirdekli). Bunlar genellikle yüzeyel büyür ve sonra dallanarak tufları oluşturur ve buna “mycelium” denir. Hifayla birlikte büyük sitoplazmik bir yapı bulunur. Bu genellikle hifa tipine doğrudur ve hifanın eski kısmı vakuolize olur ve sitoplazmada kaybolur.

Mayalar tek hücreli mantarlardır ve hücreler sferik veya oval şekillidirler. Hücre bölünmesi genellikle bir ana hücreden küçük büyümeler şeklinde olan tomurcuklanmayla oluşmaktadır. Septum formasyonu büyük miktarda kitin içeren filament bir halka görünümüyle meydana gelmektedir. Tomurcuk yavaşça büyümekte ve sonra ana hücreden ayrılmaktadır. Bu oluşan tomurcuklara “blastoconida” denir. Maya hücresinden büyüyen filamentöz hücre zincirlerine “pseudohifa” denir.

*C. albicans* tomurcuklanma yaparak üreyen ve en çok çalışılan mantar türüdür. Maya hücrelerinin oluşumuyla sonuçlanır ve bunlara “blastopors” veya “blastoconidia” denir. Germ tüplerinin gelişimiyle hifaya doğru bir değişim oluşmaktadır. Maya hücreleri tomurcuklanmayla büyürken eğer komşu hücreden ayrılma olmazsa “pseudohifalar” oluşmaktadır. *C. albicans*’lar, yuvarlak ince hücre duvarlı klamidyosporlar oluşturmaktadırlar. Bu morfolojik değişim mantarların farklı koşullara ve farklı alanlara adapte olabilmesini açıklamaktadır. Mantarlar, nükleer bir membranla kapatılmış, bir nukleusa sahiptirler. Bunların hücre membranları lipitlerden (steroller) ve glikoproteinlerden oluşmaktadır. Bunlar aynı zamanda mitokondri, golgi, ribozom, endoplazmik retikulum ve hücre duvarına sahiptirler. N-glukozamin polimeri olan kitin mantar hücre duvarının en önemli maddesidir. Çoğu mantar, hücre duvarında selüloz bulundurmaktadır. Hücre duvarı genellikle %80-90 polisakkarittir. Protein, lipit, polifosfatlar ve inorganik iyonlar da hücre duvarının yapıştırıcı matriks kısmını oluşturur. *C. albicans*’ın hücre duvarının yaklaşık %80-90’ını karbonhidratlar oluşturmaktadır. Bunlar temel olarak 3 ana polisakkarit’ten

oluşmaktadır. B-glukans, kitin ve mannopteinler. Aynı zamanda *C.albicans*'ların hücre duvarlarında proteinler (%6-25) ve lipitler (%1-7) bulunmaktadır (125).

### 2.2.2.3. Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar

Patojenik mantarlar şu gruplara girerler:

1. Ascomycetes
2. Basidiomycetes
3. Zygomycetes
4. Deuteromycetes
  - a. Candida
  - b. Aspergillus

Candida ve Aspergillus en sık rastlanılan fırsatçı fungal patojenlerdir. Candida'lar insanda normal florada bulunur ve yüzeysel hastalıklara ve hayatı tehdit eden hastalıklara neden olabilmektedir. Candida türleri insanda oral kavitede, gastrointestinal yollarda, anüste, kasıkta, vajinal kanalda ve vulvada bulunmaktadır. Oral hastalığı olmayan bireylerin hemen hemen 1/3'ü mantar taşımaktadır (125).

Endojen mantarların çoğu fırsatçı patojenlerdir ve geniş spektrumlu antibiyotiklerin, immunsupresyonla ve koruyucu engellerin hasarlanmasıyla normal mikrobiyotada meydana gelen dengesizlik ile enfeksiyonlara neden olurlar. Fungal enfeksiyonlar genellikle hastalığın hastalığıdır (125).

Dil dorsumu *C. albicans*'ın primer oral habitatıdır. Mukoza, supragingiva, dentin, kök yüzeyi, subgingiva ve periodontal cepler sekonder olarak kolonize oldukları diğer yerlerdir (126).

Ağız mantarlarının en önemlisi Candida ailesindedir. *C. albicans* en baskın mantar türüdür. Bunu *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis* takip eder. *C. dubliniensis* *C. albicans* 'la yakından ilişkili yeni bir çeşittir. *Saccharomyces* spp. ve *Geotrichum* spp. gibi diğer mantar türleri oral



kaviteden izole edilmiştir. Bunlar Candida türü ile karşılaştırıldığında patojenik önemi sınırlıdır (127).

### **2.2.2.3.1. Birincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar**

Mantarlar birincil endodontik enfeksiyonların mikrobiyatısında bulunmamaktadır (128). Buna rağmen bazı araştırmacılar mantarları kültür ve moleküler genetik metotlarla tespit etmişlerdir. Son 10 yılda, mantarların enfekte kanallardan izole edildiği bilinmektedir. Enfekte kök kanallarında mantarların bulunma oranı %1 ve %17 arasında değişmektedir (129,130). Maya hücrelerinin varlığı periapikal kök yüzeyindeki rezorbsiyon alanlarında ve periradiküler granülomalarda gösterilmiştir (41).

Möller, sağlam kuronlu dişlerin nekrotik pulpa örneklerinden Candida türlerini (131), Siqueira PCR ile 50 enfekte kök kanalını incelemiştir (132). Şen ve ark periradiküler lezyonlu çekilmiş 10 dişte *C. albicans* bulunma sıklığını (41) ve Siqueira SEM ile primer kök kanal enfeksiyonlarında mantar bulunma olasılığını araştırmışlardır(133).

Nekrotik kök kanallarındaki ekolojik şartlar mantar ve streptokok üremesini ve varlığını artırmaktadır. Buna ek olarak *C. albicans*, *S. gordonii*, *S. mutans*, *S. sanguis* gibi streptokoklarla koagrasyon olup biyofilm oluşumunu kolaylaştırmaktadır (134). Biyofilmler yine kolonizasyonu arttırarak bulunan türlerin yaşamasına olanak sağlamaktadır. Bu da nekrotik kanallarda streptokok ve mantarların ilişkili bulunmasını açıklamaktadır (135).

Moleküler teknikler kullanılarak yapılan tanısal işlemler konvansiyonel kültür tekniklerine göre daha yüksek hassasiyete sahiptir. Fazla sayıdaki mikrobiyal çeşitler, PCR esaslı moleküler tanımlama teknikleri kullanılarak kök kanallarından elde edilmiştir (136). Periapikal radyolüsentli vakaların bulunduğu Baumgartner ve ark. çalışmasında, birincil apikal periodontitisli dişlerde PCR ile *C. albicans* bulunma sıklıkları araştırılmıştır (130).

#### 2.2.2.3.2. İkincil Endodontik Enfeksiyonlarda Mantarlar

Mantarlar birincil kök kanal enfeksiyonlarında bulunsa da, başarısız kanal tedavili dişlerde daha sık görülmektedir. Nair ve ark. endodontik tedavili dişlerin periradiküler lezyonlarından alınan biyopsilerden maya varlığını incelemiştir (137). Sundqvist ve ark. çalışmalarında başarısız endodontik tedavili dişlerden *C. albicans* bulunma sıklığını araştırmışlardır (138). Hancock ve ark. periapikal radyolusenti olan kanal dolgulu dişlerin mikroflorasını araştırmışlardır (139). Pinherio ve ark. seçici ortam kullanmadığı çalışmasında kültür yöntemi ile periapikal lezyonlu kanal dolgulu dişlerde *Candida* cinsini araştırmışlardır (140). Peciuline ve ark. çalışmasında kronik apikal periodontitisli kanal dolgulu dişlerde seçici ortam kullanarak *C. albicans* bulunma sıklığını araştırmışlardır (141).

#### 2.2.2.4. Antimikrobiyal Medikamentlerin *C. albicans*'a Etkisi

Antimikrobiyal medikamentlerden biri olan NaOCl, %0.5'den %5.25 kadar değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Güçlü bir antimikrobiyal ajandır ve pulpa artıklarını ve dentinin organik içeriklerini etkili bir şekilde çözmektedir. %0.5-%5.25 konsantrasyonlarda tamponlanmamış solüsyon olarak kullanıldığında pH 11, bikarbonat ile tamponlandığında pH 9'dur (142). İyot preparasyonları NaOCl ile birlikte kullanıldığında mantarlara karşı ek bir etki göstermez çünkü aynı aktiviteye sahiptir. Buna ek olarak, iyodin dişleri boyar ve potansiyel olarak allerjiktir.

Waltimo ve ark. ve Viana ve ark. %0.5 ve %5 NaOCl solüsyonunun mantarlar üzerine olan antimikrobiyal etkisini değerlendirmişlerdir (143,144) .

Şen ve ark. %0.12 CHX, %1 NaOCl ve %5 NaOCl'ün antifungal özelliklerini araştırmışlar. Aynı araştırmacılar, EDTA'nın *C. albicans* üzerine antifungal etkisini diğer dezenfektanlarla kıyaslamıştır (145). Ferguson ve ark. NaOCl, hidrojen peroksit ve CHX diglukonatın *C. albicans*'a etkisini değerlendirmişlerdir (146).

EDTA kanal tedavisinde en sık kullanılan şelatördür ve dentinin inorganik içeriğini eriterek smear tabakasını ortadan kaldırır (147). EDTA'nın antimikrobiyal etkinliği tarif edilmiştir ama günümüzde direkt temas testinde, diğer endodontik

irrigantlarla karşılaştırıldığında mantarları öldürme yeteneği tam olarak bilinmemektedir (148).

EDTA'nın 2 yolla antifungal aktivite gösterdiği bulunmuştur. 1 0 Antikolonizasyon özelliğiyle *C. albicans*'ın adeziv özelliğini azaltmaktadır, büyüme engelleyici özelliğiyle *C. albicans*'ın Ca ihtiyacını hem hücre duvarından hem de ortamdan uzaklaştırarak, metabolik aktivitesini ve patojenitesini azaltarak etki etmektedir.

CHX 1962'den beri diş hekimliğinde antibakteriyel ajan olarak kullanılmaktadır. CHX genellikle antiseptik ürünlerde en sık kullanılan biosiddir. CHX hücre duvarına veya en dış membrandan bakterinin sitoplazmasına veya daha alt membranına veya mantarın plazma membranından içeri girme yeteneğine sahiptir. CHX'nin yüksek konsantrasyonları hücreler arası içeriklerin koagülasyonuna neden olmaktadır (144).

Ca(OH)<sub>2</sub>'in etkili sıvı dezenfektanlarla birleşimi gelişmiş bir pansuman sağlamaktadır. Bu artan antimikrobial spektrum *C. albicans* gibi inatçı mikroorganizmalara etki etmektedir (142). Ca(OH)<sub>2</sub>'in NaOCl veya CHX solüsyonlarıyla birleşimi sıvı Ca(OH)<sub>2</sub> suspansiyonlarının alkalın kapasitesini sürdürmektedir ve dentin tubüllerini dezenfekte etme etkinliğini artırmaktadır (127).

Siquiera ve ark. in vitro olarak *C. albicans* ile enfekte edilen sığır dentininde 4 kanal içi medikamentin etkinliğini değerlendirmişlerdir. Bunlar Ca(OH)<sub>2</sub>/CPMC/G patı, CHX/Çinko oksit patı, Ca(OH)<sub>2</sub>/G patı ve Ca(OH)<sub>2</sub>/CHX patıdır (149).

Waltimo ve ark. Yedi *C. albicans* türünün iodin potasyum iodid, CHX asetat, NaOCl ve Ca(OH)<sub>2</sub> 'e karşı duyarlılığını değerlendirmişlerdir (150).

### **2.2.3. Pseudomonas Aeruginosa**

*Pseudomonas aeruginosa* düz veya hafif kıvrımlı çubuklar (rod) şeklinde 0,5 ile 1µm uzunluğunda bir mikroorganizmadır. Gram negatif boyanırlar. Bir veya birkaç kutupsal flajel ile kendi kendine hareket edebilirler. Aerobiktirler ve oksijeni terminal elektron kaynağı olarak kullandıkları bir solunum sistemleri vardır. *Pseudomonas* türünün en patojen üyelerinden biridir ve saprofitir. β-hemolitikdir ve 35-42°C

arasında yaşamını sürdürebilir. Kimyasal dezenfeksiyona karşı son derece dirençlidir. Protein sentezi inhibisyonu yapan en az üç farklı egzotoksini bulunmaktadır (104).

*P. aeruginosa* küçük hacimsel yapısından ve hareketli mikroorganizma oluşundan dolayı kök kanal sisteminin üçboyutlu yapısının test edilmesi açısından çok kullanışlıdır. Kök kanal florasının bir bölümünü oluşturan ve kolay infiltrasyonu bu mikroorganizmayı araştırmalar için popüler kılmaktadır (151).

Love ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın smear olsun ya da olmasın kolaylıkla dentin tübülleri içine penetre olabildiklerini rapor etmişlerdir (152). Piccolomini ve arkadaşlarına göre *P. aeruginosa* kök kanal sistemi florasındaki tüm bakterilerden dentin tübüllerine daha çok ve daha derin yerleşim gösteren birkaç bakteriden biridir (153). Böylelikle kök kanal irrigasyon solüsyonlarının ve ilaçlarının antibakteriyel etkilerinden korunabilmektedir (154).

Leonardo ve arkadaşları revaçta olan kök kanal patlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlar ve *E. faecalis* ile *P. aeruginosa*'nın var olan diğer mikroorganizmalara oranla daha dirençli olduklarını bildirmişlerdir(155).

### **2.3. Mikrobiyal Tanılama Metodları**

Endodontik hastalıklara neden olan patojenlerin tanımlanabilmesi kök kanal tedavisinin başarı oranını arttırmıştır. Geçmişten günümüze patojen bakterilerin tespit edilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (156). Günümüzde moleküler biyoloji gibi çeşitli alanlardaki gelişmeler sayesinde bir örnekte az sayıda (1-10) bakteri bulunsa dahi tespitleri kısa sürede yapılabilmektedir (157). Kök kanal patojenlerinin tespit edilmesinde mikroskopi, kültür yöntemleri ve antibiyotik duyarlılık testleri, immünolojik ve moleküler biyolojik yöntemler kullanılmaktadır (158).

#### **2.3.1. Mikroskopi**

Mikrobiyal örneklerin mikroskopik incelenmesi kolay, hızlı ve ucuz bir yöntemdir. Ancak pek çok türün farklı morfolojik biçimlerde (pleomorfik) olabilmesi ve araştırmacıların öznel yorumlarının önemi, bakteriyel morfoloji ile ilgili mikroskopik bulguların güvenilirliğini azaltmaktadır. Mikroskopi, mikroorganizmaların tespitinde sınırlı duyarlılık ve özgüllük sağlamaktadır.

Duyarlılığının sınırlı olması mikroskop altında incelenebilmesi için nispeten fazla miktarlarda (örn; 104 bakteriyel hücre/ sıvı mL) mikrobiyal hücreye ihtiyaç duymasından ileri gelmektedir (159).

Mikrobiyolojik örnekler doğrudan mikroskop altında incelenebildiği gibi çeşitli yöntemlerle (gram boyama, floresan boyama, gümüş boyama) boyanarak da incelenebilir. Gram boyama mikrobiyolojide en fazla kullanılan yöntemlerden birisidir (156).

### 2.3.2. Kültür Yöntemi

Endodontik mikrobiyata geleneksel kültür yöntemleri kullanılarak incelenmiştir. Kültür, sıcaklık, nem, hava, tuz konsantrasyonu, pH da dahil olmak üzere mikroorganizmalar için gerekli olan besin ve uygun fiziko-kimyasal koşullar sağlanarak laboratuvarında mikroorganizmaların yayılması işlemidir (160). Esasen kültür analizi şu adımları içerir: Örnek toplama ve taşıma, dağıtma, seyreltme, ekim, izolasyon ve tanımlama (161). Endodontik örnekler destekleyici, canlılığını koruyucu anaerobik ortamlarda laboratuvara taşınmaktadır. Daha sonra örnekler vortex veya sonik titreşim sağlayan karıştırıcılarda karıştırılıp, seyreltilir, çeşitli tip agar üzerine dağıtımı sağlanır ve aerobik veya anaerobik koşullar altında yetiştirilir. Uygun inkübasyon periyodunun ardından gram boyama, oksijen tolerans, fenotip bazlı hücre morfolojisi belirleme, metabolik son ürün analiz yöntemi olan gaz-sıvı kromatografi yöntemi, kapsamlı biyokimyasal karakterizasyon yöntemi gibi yöntemler kullanılarak koloniler alt kolonilere ayrılır ve tanımlanır. Bazı türlerin tanımlanmasında hücre zarının dışındaki protein profilinin jel elektroforezi, ultraviyole ışık altında floresan boyama, antibiyotik duyarlılık testleri gibi yöntemlerin kullanılması gerekli olabilir (162). Diğer bazı türlerin tanımlanmasında ise önceden paketlenmiş hazır enzim testleri satılmaktadır. Endodontik enfeksiyonlarda kültür analiz yöntemi apikal periodontitisin oluşturan bakterilerin yapısı, farklı klinik koşullardaki endodontik mikrobiyatanın yapısı, mikrobiyal eliminasyon prosedürlerinin tedaviye etkisi, endodontik mikroorganizmaların antibiyotiklere duyarlılıkları hakkında bilgiye erken ulaşmamızı sağlar. Kültür analizi yönteminin avantajları ve dezavantajları aşağıda (**Tablo 1**) listelenmiştir.

İnsanlarda bulunan ve oral kaviteyi oluşturan bakteri türlerinin %50-%80'lik kısımları hala tam olarak bilinmemekte ve yetiştirilememektedir (163-170). Şimdilerde kültüre edilemeyen bu özel türlerde ilerleyen dönemlerde kültür metodunun uygulanmayacağı anlamına gelmez. 1900 lü yılların başlarında sayısız anaerobik bakteri için kültür yöntemi uygulanmamış ancak günümüzde gelişen teknolojilerle birlikte bu sorunun çözümünde çok yol katedilmiş kültür yöntemi uygulanan anaerobik bakteri sayısı artmıştır. Literatürde çeşitli türlerdeki mikroorganizmaları izole etmek için tek bir yöntem olarak kültür metodunun kullanılmasının uygun olmadığı kabul edilmiştir (171).

**Tablo 1.** Kültür metodunun avantaj ve dezavantajları

Kültür metodunun avantajları	Kültür metodunun sınırlandırmaları
Geniş bir kullanım alanı sunar, beklenmedik türlerin tanımlanmasını sağlar	Günümüze kadar belirlenen çok sayıda bakteri türüne kültür metodunun uygulanabilirliğinin sınırlı olması
Örneklerdeki bütün ekilebilen büyük canlı mikroorganizmaların kantitatif olarak değerlendirilebilmesini sağlar	Tüm canlı bakterilerde uygulanabilirliğinin olmaması
İzolatların antimikrobiyal duyarlılıklarının belirlenmesine izin verir	Bakteri izolasyonundan sonra tanımlama için bir takım teknikler gerektirebilir.
Patojenite çalışmalarını mümkün kılar	Metodun özgünlüğü mikrobiyologun becerisine bağlıdır.
Geniş bir kullanım alanı vardır.	Hassasiyeti düşüktür.

### 2.3.3. İmmünojenik Yöntemler

İmmünojenik yöntemler hedef türleri doğrudan tespit etmek için spesifik mikrobiyal antijenleri tanıyan antikorların kullanıldığı testlerdir. Bir türe özel konak immunoglobulinleri hedef alan antikorlar dolaylı tespit analizi için kullanılabilir. Reaksiyon doğrudan ve dolaylı immunfloresan, flow sitometri ve enzim bağlı immünosorbent test (ELISA) gibi çeşitli tekniklerle gösterilebilir (172). Kültür yöntemine bağlı tekniklerle karşılaştırıldığında hassasiyet açısından aralarında anlamlı bir farklılık yoktur. Bu yöntemlerin özellikle enfeksiyon oluşturan bakterilerin izole

edilmesinin ve tanımlanmasının zor olduğu veya önceki enfeksiyonun doğrulanması gereken durumlarda kullanılması yararlıdır (173,174).

ELISA, duyarlılığının yüksek olmasından dolayı endodontik araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır (175,176). Bu yöntemde antijene karşı antikor ya da antikora karşı antijen aramak mümkündür. Antikor aranacak ise bilinen antijen reaksiyonun gerçekleşeceği kabın yüzeyine yapıştırılır ve hasta örneği kaba ilave edilir. Gerekli bekleme süresi sonrası yıkama işlemi sonunda ortamda aranan antikor varsa antijene yapışacaktır. Sonrasında bir enzimle birleştirilmiş başka bir antikor örneğe gönderilir. Antikorlar doğrudan ilgili oldukları antijene bağlanırlar ve ardından antikorla birleştirilmiş olan enzimin substratı gönderilir. Antijene bağlanmış olan antikorun üzerindeki enzim bu substratı başka bir maddeye çevirir ve bu durum genelde bir renk değişikliğine neden olur. Renk değişikliği aranan hedefin varlığına işaret eder (177).

Doğrudan immunofloresans yönteminde incelenecek örnek içinde aranan antijeni tanıyan ve floresan boya ile birleştirilmiş antikorlar kullanılır. Antikorlar örneğe gönderilir ve örnekler floresan ışık veren mikroskop altında incelenir. İmmunofloresan mikroskopi hücrelerin morfolojik yapılarını görüntüleyebildiğinden dolayı diğer immünolojik metotlara göre bir avantaj sağlayabilir, diğer organizmaların antikorlarının çapraz reaksiyonunun sebep olduğu yanlış-pozitif sonuçları azaltabilir ancak; ELİSA spesifik mikroorganizmaların küçük miktarlarını tespit etmede daha hassas bir yöntemdir (177).

#### **2.3.4. Moleküler Genetik Yöntemler**

Mikrobiyal çeşitliliğin ne kadar fazla olduğu kültürden bağımsız yöntemlerin kullanıldığı farklı alanlardaki pek çok çalışma ile gösterilmiştir (178-180). Gerçekte mikroorganizmaların kültür ortamında üretilebilen üyeleri tüm popülasyonun %1'inden daha azdır (181,182). Moleküler çalışmalar ağız ortamındaki bakterilerin yaklaşık %40-50'si (168) ile bağırsaktaki bakterilerin yaklaşık % 70'inin (170) şimdiye kadar kültüre edilememiş bakteriler olduğunu göstermiştir.

Moleküler tanı yöntemleri sayesinde hem kültürü yapılabilen hem de yapılamayan bakteri türleri saptanabilir. Mikrobiyal tanımlama bakımından diğer yöntemlere göre avantajları şu şekilde sıralanabilir: Bu yöntemler yüksek özgüllük

gösterir ve mikrobiyal türlerin kesin tanımlanmasına olanak sağlar, kültür yöntemine ve diğer moleküler biyolojik yöntemlere göre daha duyarlıdır, mikroorganizmaları tanımlamak amacıyla onların canlılıklarına gerek duymaz, genellikle daha kısa zamanda sonuç verirler, antimikrobiyal tedavi sırasında da kullanılabilirler, örnek miktarının az olması sorun yaratmaz, epidemiyolojik çalışmalar için çok sayıda örnek kullanıldığında örnekler düşük sıcaklıklarda saklanıp bir seferde incelenebilir (183).

Günümüzde, araştırılan soruya bağlı olarak farklılık gösteren çok sayıda moleküler yöntem kullanılmaktadır. Geniş spektrumlu polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) belirli bir ortamdaki mikrobiyal çeşitliliği araştırmak için kullanılabilir. Mikrobiyal komünite yapısı Denatüre Edici Gradient Jel Elektrofrezisi (DGGE) ve Terminal Restriksiyon Uzunluk Polimorfizmi (T-RFLP) gibi tekniklerle analiz edilebilir. Floresan İn Situ Hibridizasyon (FISH) belirli türlerin miktarını ölçebilir ve dokulardaki dağılımı hakkında bilgi verebilir. İç içe (Nested) PCR, Çoklu (Multipleks) PCR ve Gerçek Zamanlı (Real-Time) PCR gibi diğer uygulamalar da hedef türlerin tespitinde birçok klinik örneği taramak için kullanılabilir (158).

#### **2.4. İrrigasyon**

Bakteriler, pulpal ve periapikal lezyonların gelişiminde primer etyolojik faktör olarak kabul edilmiştir (184). Başarılı kök kanal tedavisi pulpal dokuların dentin debrislerinin ve enfekte mikroorganizmaların kemomekanik olarak uzaklaştırılmasına bağlıdır (185). Tedavi süresince olumlu sonuçlara ulaşmak için problemlerin tanınması ve etyolojik faktörlerin uzaklaştırılması gerektirir.

İrrigasyon yara veya vücut boşluklarının su veya ilaçlı bir solüsyon ile yıkanması, Aspirasyon ise vücut sıvılarının yada gazlarının bir emme cihazı ile çekilmesi olarak tanımlanır. Dezenfeksiyon; hastalığa sebep olan mikroorganizma aktivitesini azaltan yada ortadan kaldıran bir ajan olarak tanımlanır (186).

Endodonti de irrigasyonun amacı mekanik, biyolojik ve kimyasal olarak ele alınmalıdır. Mekanik ve kimyasal olarak: Debris in çıkarılması, kanal lubrikasyonu, smear tabakasının oluşumunun engellenmesi veya smear tabakasının çözünmesi amaçlanır. Biyolojik olarak ise: İrrigantların antimikrobiyal etki göstermesi amaçlanır ve her irrigant için spesifiktir. İrrigasyon solüsyonu Anaerobik ve fakültatif



mikroorganizmalardan elde edilen planktonik ve biofilm üzerine yüksek etkili olmalı ve endotoksinlerini inaktive edebilmeli, canlı dokulara temas ettiğinde toksik olmamalı, periodontal dokular için kostik olmamalı ve anafilaktik reaksiyon potansiyeli minimum olmalıdır (187). İdeal irrigasyon solüsyonlarında aranılan özellikler (**Tablo 2**) verilmiştir (188).

**Tablo 2.** İdeal irrigasyon solüsyonunda aranılan özellikler

Etkili bir mikrop ve mantar öldürücüdür	Dentin / dentin tübüller dezenfekte edebilmelidir.
Kararlı bir çözelti olmalıdır.	Periapikal dokuların onarımına müdahale etmemelidir
Kan, serum ve doku protein türevlerinin varlığında aktif olmalıdır.	Bir kültür ortamını inaktive edebilmelidir.
Düşük yüzey gerilimi 'ne sahip olmalıdır	Dentinin fiziksel özellikleri üzerine olumsuz bir etkisi olmamalıdır.
Periapikal dokularda tahriş edici olmamalıdır.	Diş üzerinde leke yapmamalıdır. Kolay uygulanabilmeli pahalı olmamalıdır
Kullanımdan sonra bile uzun süreli bir antimikrobiyal etkisi olmalıdır.	Toksik olmamalı, dişi çevreleyen yapılara kanserojen olmamalı, antijenik olmamalıdır.
Smear tabakasını tamamiyle uzaklaştırabilmelidir	Dolgu materyallerinin sızdırmazlıklarını olumsuz etkilememelidir

## 2.5. Endodontik Irrigasyon Solüsyonları

### 2.5.1. Antiseptik Solüsyonlar

#### 2.5.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

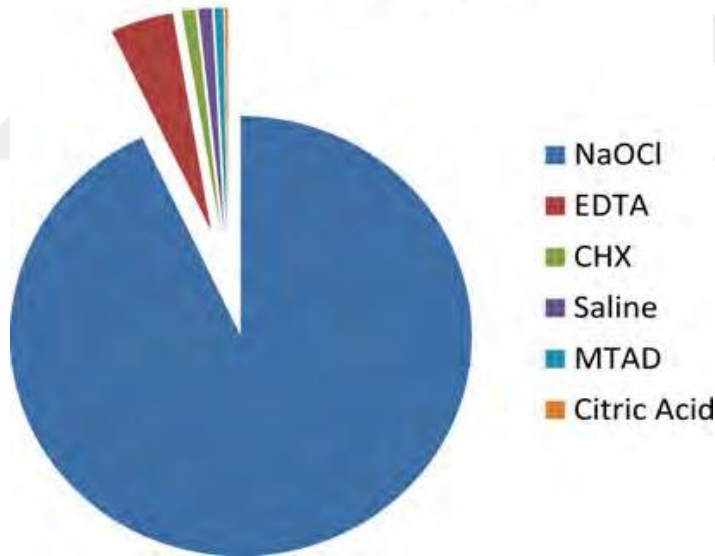
Dünyanın her yanında yapılan araştırmalar sonucunda sodyum hipoklorit endodonti de en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonudur (189-191). (**Grafik 1**) Amerikan endodonti derneğine kayıtlı endodontistlere yapılan bir anket de primer dezenfektan ajanı olarak ne kullanıyorsunuz sorusunun cevabı görülmektedir. Sodyum hipoklorit, etkili bir antimikrobiyal ve proteolitik ajan (192,193), mükemmel organik doku çözücü (194), oldukça hızlı etkili olan lubrikantdır. NaOCl hem oksitleyici

hemde hidroliz edici bir maddedir. Ticari sodyum hipoklorit çözeltileri kuvvetli alkalindir, hipertondiktir ve genellikle %14 oranında nominal konsantrasyonlarda klorin içerir.

#### 2.5.1.1.1. Tarihçesi

NaOCI 1789 'da Javel Fransada sodyum karbonat solüsyonun içerisinde klorine gazı geçirilerek elde edilmiştir. Bu sıvı 'eu de javelle' veya 'javel water' olarak bilinen çamaşır suyu zayıf sodyum hipoklorit çözeltilisidir. Ancak bu yöntem çok etkili olmadığı için alternatif üretim yöntemleri aranmıştır. Bu tür yöntemlerin biri daha düşük konsantrasyonlarda klorin elde etmek için klorinli sodyum karbonattan klorinin uzaklaştırılmasıdır. %0.5 lik sodyum hipoklorit solüsyonu 1. dünya savaşından yaraların temizlenmesi için kullanılması Dakin tarafından tavsiye edilmiştir.

#### PRİMER İRRİGASYON AJANI



**Grafik 1.** Dünya çapında yapılan araştırmalar sonucunda diş hekimlerinin primer irrigasyon solüsyonu tercihlerinin grafiksel gösterimi (189-191).

#### 2.5.1.1.2. Etki Şekli

Sodyum hipokloritin pH'ı 11 dir. Estrella (195) sodyum hipokloritin dinamik bir denge sergilediğini bildirmiştir.

#### Sabunlaşma reaksiyonu

Organik ve yağ çözücü olan sodyum hipoklorit, yağ asitlerini çözerek yağ asidi tuzuna (sabun) ve gliserole dönüştürerek yüzey gerilimini azaltır.

#### Nötralizasyon reaksiyonu

Sodyum hipoklorit su ve tuz oluşturarak amino asitleri nötralize eder. Hidroksil iyonlarının çıkışı ile, pH değerini azaltır.

#### Hipokloroz asit oluşumu

Klor suda çözünür ve bir organik maddeyle temas ettiğinde hipokloroz asit oluşur. Bir oksitleyici olarak görev alan ve HClO kimyasal formülüne sahip olan hipokloroz asit zayıf bir asittir. Hipokloroz asit ve hidroksil iyonları aminoasit çözünmesi ve hidrolizine yol açar.

#### Çözücü etkisi

Sodyum hipoklorit bir çözücü olarak hareket eder ve klorin açığa çıkarır klorinler proteinlerin amino grupları ile birleşerek kloraminleri oluşturur ( kloraminasyon reaksiyonu). Kloraminler hücre metabolizmasını engeller; Klorin güçlü bir oksitleyicidir ve sülfidril grup ile dönüşebilir oksidasyona sebep olur ve bu şekilde gerekli bakteriyel enzimleri inhibe eder.

#### Yüksek ph

Sodyum hipoklorit güçlü bir yapıdadır (ph:11). Sodyum hipokloritin antimikrobiyal etkinliğinin temelinde yüksek ph a bağlıdır( hidroksil iyon hareketi), bu kalsiyum hidroksitin etki mekanizmasına benzemektedir. Yüksek ph sitoplazmik membran bütünlüğünde geri dönüşü olmayan enzimatik yıkımlara, hücre metabolizmasında biyosentetik değişikliklere ve lipidik peroksidasyon sonucu gözlenen fosfolipid yıkılımına neden olur.

#### **2.5.1.1.3. Konsantrasyon**

Literatürde NaOCI'nin %0.5 ile %6 oranları arasında değişik konsantrasyonlarda kullanılabildiği belirtilmiştir. NaOCI'in hem antimikrobiyal hemde doku çözücü etkisi konsantrasyon oranı ile direkt ilişkilidir (196).

Grossman yaptığı çalışmada %5 'lik NaOCI 'in pulpa dokusunu çözme süresinin 20 dakika ile 2 saat arasında olduğunu gözlemlemiştir (196).

Estrella ve ark yaptığı çalışmada NaOCI 'in farklı konsantrasyonlardaki doku çözme kapasitesini karşılaştırmış NaOCI solüsyonunun başlangıç konsantrasyonu ne kadar büyükse ph'ı azaltma oranı o kadar düşük olduğunu bildirmişlerdir (197).

#### **2.5.1.1.4. Optimal Etki İçin Uygulama Zamanı**

Literatürde sodyum hipokloritin antimikrobiyal etkisi için çeşitli görüşler bulunmaktadır (198). Bazı kaynaklarda düşük konsantrasyonda bile NaOCI 'in hedef mikroorganizmaları saniyeler içinde öldürdüğünü göstermektedir (199). Bazı kaynaklarda da bazı türlerin ölmesi için çok daha fazla zaman bekletilmesi gerektiği vurgulanmıştır (200). Bu farklılık çalışmalarda kafa karıştırıcı faktörlerin sebebiyledir. Happasalo ve ark. %1 'lik NaOCI'nin dentin yokluğunda E.feacalis 'in ölümüne sebep olduğunu göstermişlerdir (198). Bazı faktörler elimine edildiğinde %0.1 den düşük konsantrasyondaki NaOCI'in mikroorganizmaları öldürücü etkisinin olduğu gösterilmiştir (98,144). Bu nedenle NaOCI irrigasyonun sürekliliği ve zamanı NaOCI 'in etkinliği için önemli bir faktördür.

#### **2.5.1.1.5. Sodyum Hipokloritin Dentin Üzerine Etkisi**

Dentinin yaklaşık %22'si organik komponenten oluşur. Bu organik komponentin çoğunluğunu dentinin mekanik özelliklerini sağlayan tip 1 kollagen den oluşur (201). Sodyum hipoklorit uzun peptid zincirlerini ve proteinlerin terminal gruplarını parçalar ve klorin açığa çıkar sonuçta oluşan N-kloraminler diğer türlerden ayrılır. Sonuç olarak sodyum hipoklorit dentinin organik komponentinin degradasyonu yoluyla dentinin mekanik özelliklerini değiştirir.

Sığır dentini üzerinde yapılan çalışmada kök kanal tedavisi süresi içinde konsantre NaOCI solüsyonu dentinin biyomekanik özellikleri üzerinde istenmeyen etkilere sebep oldu (202). Dentin 2 saat NaOCI'e maruz kaldığında fizyolojik salin solüsyonuna göre %3 den daha fazla elastik modül ve flexural dirençlerin azaldığı tespit edilmiştir (203). Yeni yapılan bir çalışmada organik dentin matriksinin parçalanmasından kaynaklanan dentinin mekanik özellikleri NaOCI çözeltilisinin

konsantrasyonunun temizleme etkinliğine bağlı olduğu gösterilmiştir (119). Bu değişiklikler dentinin sadece inorganik fazının değil organik fazında özelliklerini değiştirmiştir. Dahası tam anlamıyla dezenfeksiyonu sağlamak amacıyla dişhekimi NaOCI'in sadece konsantrasyonu değil aynı zamanda hacmini, süresini, akış hızını ayarlamalıdır (119). Literatürde açık olan şey NaOCI konsantrasyonu ne kadar artarsa dentin üzerine zararlı etkileri o kadar artar. Bu etkilerden bazıları elastik modül ve fleksural direncin azaltılmasıdır.

#### **2.5.1.1.6. NaOCI 'in Alerjik Reaksiyonları**

Sodyum hipokloritin alerjik reaksiyonları ile ilgili çok az yayın olmasına rağmen, sodyum hipokloride bağlı gerçek alerji görülmemektedir. Çünkü hem sodyum hem klorin insan vücudu için gerekli elementlerdendir. Ancak nadir vakalarda kontak dermatitis ve hipersensivite meydana gelmektedir. Sodyum hipokloride hipersensivite olan vakalarda klorheksidin klor içerdiği için kullanılmamalıdır. Bazı vakalarda alternatif irrigant olarak yüksek antimikrobiyal etkiye sahip iyodin potasyum iyodid kullanımı tavsiye edilmektedir. Kullanılmadan önce hastaya iyodine karşı alerjisi olup olmadığının sorulması zorunludur. Mikroorganizmalar ve nekrotik doku çözünmesinde kullanılan su ve alkol gibi çözeltiler daha az antimikrobiyaldır (204,205).

#### **2.5.1.1.7. Biyofilm Üzerine Etkisi**

Kronik apikal periodontitisli dişlerde ve kök kanal tedavisine yanıt vermeyen dişlerde kök yüzeylerindeki biyofilmin kalınlığı gösterilmiştir. Biyofilm halinde organize olan bakteriler nekrotik pulpa boşluklarının ulaşılamayan alanlarında, kök yüzeylerinde ve semental boşluklarda bulunmuştur. Rekabetçi bir ortamda büyüyen, biyofilmlerdeki organizmalar genellikle düşük metabolizma hızına sahiptirler ve antimikrobiyal maddelere karşı çok dirençli olma eğilimindedir. Matriks içindeki negatif yüklü polimerler kuvvetli oksidan ajanları nötralize edebilir ve bu durum mikroorganizmalara penetre olmasını ve onları öldürmesini zorlaştırır. Biyofilm içindeki bakteriyel hücrelerin yakınlığından dolayı, DNA değişimi kolayca gerçekleşir ve hızla antibiyotik direnci aktarımı olur. Bu nedenle, serbest dolaşan organizmaları

kolaylıkla öldüren antimikrobiyal maddeler biyofilm menşeyli aynı organizmalar üzerinde aynı etkinliği göstermemişlerdir. İlaveten, biyofilm yapısı immün savunmada yerleşik bakteriler için bir koruma sağlar. Biyofilmin bu özellikleri bazı endodontik enfeksiyonların kronik doğası ve direncini açıklamaya yardım eder (52).

Clegg ve arkadaşları biyofilmlerin üzerindeki NaOCl etkisi konusundaki klasik yayınlarda, % 6'lık NaOCl'in hem yapay biyofilmin fiziksel olarak kaldırılması hem de bakterileri öldürme yeteneğine sahip tek ajan olduğunu bildirdi. Daha yüksek konsantrasyonlar daha fazla anti-bakteriyel olduğu için bakterilere karşı NaOCl'in doza bağımlı bir etkisi vardır. Bu, aynı zamanda NaOCl'in konsantrasyona bağı antibakteriyel doğasını gösteren önceki çalışmaların sonuçlarını teyit eder. SEM ile bakıldığında, % 1 ve % 3 NaOCl bazı parçalanmaları ve bakterilerin fiziksel olarak kaldırılmasını gösterdi. Ama dentin talaşları kültüre edilince, her ikisinde de dentin tübüllerini istila eden irriganların etkisinden kaçan bakterileri gösteren pozitif kültürler elde edildi. NaOCl'in düşük konsantrasyonunda daha fazla bakteri hayatta kalır. Ancak eğer antimikrobiyal özelliklerin ortaya çıkması için ekstra süre verilir ya da takviye edilirse düşük konsantrasyonun etkisi artabilir. NaOCl'in antibiyofilm etkisi organik dokuların çıkarılmasının bir sonucu olabilir, dolayısıyla dentin ve diğer organizmaların bakteriyel ataşmanları elimine edilir (58).

### **2.5.2. Dekalsifiye Edici Solüsyonlar**

Şimdiye kadar endodontide dekalsifiye edici solüsyon olarak şelatörler, asitler, ve sıklıkla EDTA ve sitrik asit kullanılmıştır. Ancak son birkaç yılda tedaviye yardımcı olmak amacıyla onların ana fonksiyonları dekalsifiye edici özellikleri ve kendi karakteristik özellikleri düşünülerek çeşitli karışımlar üretilmeye başlanmıştır. Bu özelliklerin yanında yüzey gerilimini azaltmaları belkide antibakteriyel etkinlikten çok daha önemli bir karakteristik özellik olarak görülmüştür. Yeni kombinasyonların temelinde EDTA veya sitrik asit mevcuttur.

Kök kanal formasyonu boyunca smear tabakası görülmektedir. Smear tabakası hem organik hemde inorganik komponentler içerir. Bu yüzden smear tabakasını tamamen temizlemek için hem NaOCl hemde dekalsifiye edici ajan kullanılmalıdır. Smear tabakasının tam olarak temizlenip temizlenmediği hala açık değildir. Zayıf

asitler (carbamid peroksit, aminoaquinaldinyum diasetat (salvizol) ve EDTA smear tabakasının uzaklaştırılmasında etkilidir. Tarafsız çalışmalar carbamid peroksit ve salvizolün smear tabakasını uzaklaştırmada az etkili olduğunu göstermiştir (239,240).

### **2.5.2.1. EDTA**

EDTA bir şelatör olması ve smear tabakasının mineralize kısmını uzaklaştırması sebebiyle sık kullanılan irrigasyon solüsyonudur. EDTA etilendiamintetraasetik asidin  $[\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_2]_2$  kısaltması şeklinde yaygın olarak kullanılır. Katıdır suda çözünür ve çoğu uygulamada kullanılabilmesi için renksiz olarak üretilir. EDTA'nın şelasyon kabiliyeti yapısındaki di ve tri katyonik metal iyonlarının (demir ve kalsiyum gibi) 'sekestr' ı sayesinde yapabilir. EDTA ile sınırlama yapmaksızın metal iyonları çözeltide kalır ve daha düşük aktivite gösterirler.

#### **2.5.2.1.1. Tarihçesi**

Bileşim ilk olarak 1935 yılında Ferdinand Munz tarafından etilendiamin ve kloroasetik asidin bileşimi şeklinde tanımlanmıştır. Bugün EDTA'nın ana yapısı etilendiamin formaldehit ve sodyum siyanidin bir sentezinden elde edilmiştir.

#### **2.5.3.1.2. Etki Şekli**

Uzun bir süre EDTA'ya doğrudan maruz kalındığında hücre zarları metal iyonları ile birleşerek bakteri ölümlerine sebep olabilir.

#### **2.5.2.1.3. Endodontik Olarak Uygulanması**

EDTA yalnız başına smear tabakasının uzaklaştırılmasında etkili değildir. proteolitik komponentin uzaklaştırılmasında NaOCI ile kombine olarak (tercihen önce EDTA) kullanılmalıdır (241). Ticari amaçlı olarak kombinasyonlar üretilebilir. EndoDilator N-0 (Union Broach, York, PA) de EDTA ile 4 lü amanyum bileşiği kombine edilmiştir.

EDTA normalde %17'lik konsantrasyonlarda kullanılır. Eğer solüsyon kök kanal duvarlarının tüm yüzeyine ulaşabilirse smear tabakası üzerinde 1 dak dan çok

daha kısa sürede etkilidir. Şelatör olduğu için dekalsifiye prosesini kendi sınırlandırır. Kök kanal preperasyonunda EDTA dar kanalların açılmasını sağladığı için önemli bir yere sahiptir. Yeterli zaman verilirse çok dar kanalları açabilir ve 50 um'luk dekalsifikasyon yapabilir. Bu da karşılıklı iki kanal duvarı için 100 um demektir bu miktarda 10'luk eğenin ucuna tekabül etmektedir (242).

Sitrik asid daha az konsantrasyonda EDTA'dan daha etkili gibi gözükmesine rağmen, her iki ajanında smear tabakasını kaldırma üzerine etkisi yüksektir. Bunların temizleme yeteneğinin yanında şelatörler kök kanal duvarına yapışan biyofilm tabakasını kaldırmada etkilidirler. EDTA'nın antiseptik kapasitesi sınırlı olmasına rağmen kanal içi mikrobiyatayı azaltmada oldukça üstün olduğu açıklanmıştır. Rastgele yapılan klinik çalışmalarda alternatif bir irrigant olarak NaOCI ve EDTA yalnız başına NaOCI'ye göre kanal içi bakteriyel etkinliği azaltmada çok daha fazla etkilidir.

Kuaterner amonyum bileşikleri (EDTAC) veya tetrasiklin antibiyotikler (MTAD) gibi antiseptikler antimikrobiyal kapasitesini artırmak için, sırasıyla, EDTA ve sitrik asit irrigantlarına eklenmiştir. EDTAC'ın smear tabakasını kaldırma etkinliği EDTA'ya benzer ancak çok daha kostiktir. Şelasyon ajanları sıvı veya paste formunda olurlar orjinal paste tip preparasyon 1961 yılında steawart tarafından üretilmiş peroksit ile gliserol karıştırılarak yapılmıştır. Daha sonra endodontide EDTA kullanımı ile ilgili ilk başarılı uygulama üre peroksit ile EDTA'nın suda çözünebilir bir carbowax araç içinde kombine edilmesi sonucu elde edilmiştir. Bu bileşim ticari olarak kullanıldı (242).

#### **2.5.2.1.4. EDTA NaOCI ve CHX Arasındaki Etkileşimler**

Grawehr'in yaptığı çalışmada EDTA'nın kalsiyum kompleks yeteneğinin NaOCI ile karıştırıldığında değişmediğini göstermiştir. Ancak EDTA, NaOCI'in doku çözme yeteneğinde azalmalara sebep olmuş ve karışımda hiç serbest klorin bulunmamıştır (243). Klinik olarak NaOCI ve EDTA ayrı ayrı uygulanmalıdır. NaOCI EDTA'dan sonra EDTA'nın kalıntılarını temizlemek için uygulanmalıdır (243).

Chx ve EDTA kombinasyonu ise beyaz bir çökelti oluşturur. Rasimick ve ark (138) çökelti içerisinde klorheksidin degradasyonu olduğunu tespit etmişlerdir (244).



Bu çalışmanın sonuçlarına göre klorheksidin ile EDTA kombinasyonu kimyasal reaksiyon geçiren kombinasyona göre daha çok tercih edilmelidir.

#### **2.5.2.2. HEBP**

Etidronik asit, dentin yapısına daha az olan etkilerinden dolayı geleneksel şelatörlere alternatif olarak düşünülmektedir (245). NaOCI'in antimikrobiyal özelliğini etkilemeden NaOCI ile birlikte kullanılabilen tek şelatör olduğu düşünülmektedir (246). Zayıf bir şelatördür, %2,5 NaOCI ve %9 Etidronik asit (HEBP) kombinasyonu anatomik düzensizliklerindeki debrisleri uzaklaştırmak için önerilmiştir. Bu irrigantın smear tabakası uzaklaştırma etkinliği EDTA ve sitrik aside benzer ancak NaOCI ile karıştırıldığında NaOCI 'in antimikrobiyal özelliklerini değiştirmedeği gözlenmiştir (246). Yeni sunulan rapora göre, Etidronik asit NaOCI ile karıştırıldığında NaOCI 'in doku çözücü etkinliğinde azalma olmadığı görülmüştür (247). Sonuç olarak NaOCI ve HEBP karışımı final şelasyon ajanı yerine enstrümantasyon boyunca ve enstrümantasyondan sonra tek bir irrigant olarak kullanılabilir (2).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarı ve Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü Bakteriyel-Genetik Laboratuvarında gerçekleştirildi. Biyofilm oluşumunun SEM ile görüntülenmesi amacıyla Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi SEM Laboratuvarı kullanıldı. Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu ‘nun 03.12.2014/204 tarih/sayılı karar ile etik kurul izni alındı.

#### 3.1. Hedefleri

*Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* ile enfekte edilen kök kanallarının 21 gün sonunda biyofilm oluşturduğu belirlenen örnekler üzerine %5, %7, %9, %18 konsantrasyona sahip Etidronik asit (HEBP) (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Co., St. Louis-ABD) ile final irrigasyonu yapıldığındaki Etidronik asit (HEBP) konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesi hedeflendi.

#### 3.2. Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması

##### 3.2.1. Etidronik Asit (HEBP) Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Etidronik Asit (HEBP) (Sigma Aldrich, Sigma Aldrich Co., ABD) %60 Aqueous solüsyon halinde üretici firmadan temin edildi (**Resim 1a**). Bu tez çalışmasında kullanılacak olan Etidronik Asit (HEBP)’in %5, %7, %9, %18’lik konsantrasyonları,

1. %5 ‘lik HEBP konsantrasyonu için, 28,7 ml %60 ‘lık HEBP Aqueous solüsyon ile 471,3 ml distile su (Botafarma, Üçel medikal, ANKARA) eklenerek 500 ml %5 ‘lik Etidronik asit (HEBP) elde edildi.
2. %7 ‘lik HEBP konsantrasyonu için, 40,25 ml %60 ‘lık HEBP Aqueous solüsyon ile 459,75 ml distile su (Botafarma, Üçel medikal, ANKARA) eklenerek 500 ml %7 ‘lik Etidronik asit (HEBP) elde edildi.

3. %9 'luk HEBP konsantrasyonu için, 51,7 ml %60 'lık HEBP Aqueous solüsyon ile 448,3 ml distile su (Botafarma, Üçel medikal, ANKARA) eklenerek 500 ml %9 'luk Etidronik asit ( HEBP) elde edildi.
4. %18 'lik HEBP konsantrasyonu için, 103,4 ml %60 'lık HEBP Aqueous solüsyon ile 396,6 ml distile su (Botafarma, Üçel medikal, ANKARA) eklenerek 500 ml %18 'lik Etidronik asit ( HEBP) elde edildi.

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarında hazırlanmıştır. Solüsyonlar hazırlandıktan sonra koyu renkli, ışık geçirmez, kapaklı plastik kaplarda oda sıcaklığında muhafaza edilmiştir.

### 3.2.2. NaOCI Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak bir diğer ajan olan NaOCI %5 'lik hazır solüsyon ( Wizard, Rehber Kimya, İstanbul, Türkiye) olarak temin edildi. Kullanılmadan önce Distile su (Botafarma, üçel medikal, ANKARA) hazır olarak temin edildi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Laboratuvarında 1000 ml 'lik beher (Medikal lab., Fındıkzade-İstanbul) içerisine 500 ml 'ye kadar distile su üzerine 500 ml %5 lik NaOCI solüsyonu kullanarak hacimce %2.5'luk NaOCI çözeltisi hazırlandı. Solüsyon hazırlandıktan sonra koyu renkli, ışık geçirmez, kapaklı plastik kaplarda oda sıcaklığında muhafaza edildi (**Resim 1b**).

### 3.2.3. EDTA Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak EDTA çözeltisi %17 'lik hazır solüsyon olarak (Werax, Spot Dental, İzmir-Türkiye) temin edildi (**Resim 1c**).

Çalışmada negatif kontrol grubu olarak kullanılan Distile su hazır solüsyon olarak (Botafarma, üçel medikal, ANKARA) temin edilmiştir. Koyu renkli cam şişesinde muhafaza edilmiştir.



**Resim 1.** Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlar; Etidronik Asid (A), Sodyum Hipoklorit (B), EDTA (C).

### 3.3. Örneklerin Hazırlanması

#### 3.3.1. Dişlerin Seçimi

Çalışma için öncelikle yaşları 25 ile 45 arası değişen hastalardan periodontal ve ortodontik sebeplerle çekilmiş, 184 tane tek köklü apikal forameni açık olmayan, kök kırığı ve mine çatlağı bulunmayan, dentinde herhangi bir çürüğü olmayan düz tek köklü ve tek kanallı çekilmiş insan dişleri seçildi. Dişlerin tek köklü ve tek kanallı olduğu 15 no 'lu K-tipi eğe kullanılarak radyografik olarak saptandı. Birden fazla kanallı ve kökleri olan dişler çalışma dışı bırakıldı yerlerine aynı şartları sağlayan insan dişleri seçildi. Diş üzerindeki yabancı dokular ve sert kalıntılar Scaler ( Hu-Friedy, Chicago, USA) yardımıyla temizlendi.

### **3.3.2. Kronların Ayrılması**

Örneklerin koronal kısımları, kök uzunluğu 14mm olacak şekilde elektrikli mikro motor ( Strong, Saeshin Precision, Korea) yardımıyla 0,3 mm kalınlığında 6mm çapındaki elmas diskler (Horico Diamond Discs, Horico Dental, Berlin, Germany) kullanarak kesildi.

### **3.3.3. Çalışma Boyunun Belirlenmesi**

Çalışma boyunu saptamak için Souza ve ark (248) tarafından kullanılan yöntemden yararlanılmıştır. Bu yöntemde göre Horizontal olarak kesilmiş olan kök parçası üzerinde 15 no'lu K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) kanal eğesi ile kanala girilerek kök kanal yolunun belirlenmesi ve açılması işlemi yapıldı. 15 no 'lu K tipi kanal eğesinin ucu majör foramende görüldüğü zaman, kök kanal eğesi 1 mm geri çekilerek lastik rondel sabitlendi. Daha sonra kök kanal eğesi kanal boyu ölçümünü yapmak için kök kanalından çıkarıldı ve endodontik cetvel (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) kullanılarak kök kanallarının çalışma boyu belirlendi.

### **3.3.4. SEM İncelemesine Gönderilecek Örneklerin Hazırlanması**

SEM incelemesine gönderilmek üzere her bir mikroorganizma türünden 3 tane olmak üzere toplam 9 tane dişin üzerinde elektrikli mikro motor ( Strong, Saeshin Precision, Güney Kore) yardımıyla 0,3 mm kalınlığında 6mm çapındaki elmas diskler (Horico Diamond Discs, Horico Dental, Berlin, Almanya) kullanarak kökler üzerinde Bukko-lingual yönde koronal-apikal olarak oluk açıldı.

### **3.3.5. Kök Kanallarının Kemo-mekanik Preperasyonu**

Kök kanalları ProTaper kanal aletleri (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ile üretici tavsiyesi üzerine saat yönünde crown down yöntemine göre koronal kısım SX kullanılarak genişletildi. Kök kanal genişletmesi sırasıyla ProTaper S1, S2, F1, F2, F3 kullanılarak saat yönünde ana apikal eğe F4 olacak şekilde yapıldı. Preparasyon boyunca dişlere her bir eğe değişiminde sırasıyla 2ml %2.5 'lik NaOCI (Wizard, Rehber kimya, İstanbul, Türkiye), 2ml distile su ve 2ml %17'lik EDTA (Werax, Spot

Dental, İzmir-Türkiye) toplam süre 3 dakika olacak şekilde uygulandı. Preperasyon sonrası, sırasıyla 3ml %2.5' luk NaOCI (Wizard, Rehber kimya, İstanbul), distile su, 3 ml % 17'lik EDTA (Werax, Spot Dental, İzmir-Türkiye) ve sonrasında 1 dak boyunca distile su ile irrigasyon yapıldı. Bütün yapılan irrigasyon işlemleri esnasında 5ml'lik enjektörlerin gövdeleri (Genject, SAYBERK, Ankara) ve uç kısım için de 27galyandan perfore irrigasyon iğnesi (Endo-EZE, Ultradent, Utah-ABD) kullanıldı. Her bir örnek için enjektör gövdesi ve iğne değiştirildi. Genişletme ve yıkama işlemleri bitmiş olan dişlerin Kök uçları siyanoakrilat (ASR, Alcan Ltd., Başakşehir, İstanbul) ile kapatılarak sızdırmaz hale getirildi. Daha sonra dişler içerisinde % 0,1 lik Timol (GBL, Gül Biyoloji Laboratuvarı Ltd Şti., İstanbul) solüsyonu bulunan şeffaf mikrokuyucuklarda (SPL, SPL Lifesciences Co. Ltd., Pocheon şehri-Güney Kore) 4 °C'de ( Lg buzdolabı, LG Company, Güney Kore) bekletildi (**Resim 2**).



**Resim 2.** Genişletme ve yıkama işlemleri bitmiş olan dişlerin saklanması için kullanılan şeffaf mikrokuyucuklar

### **3.4. Pilot Çalışma**

#### **3.4.1. Pilot Çalışmanın Amacı ve Hedefleri**

Bu tez çalışmasında kontrol edilebilen dış etkileri en aza indirmek için deney aşamasından önce bir pilot çalışma planlandı. Bu pilot çalışmanın amacı ve hedefleri;

1. Deney safhası öncesi örnekleri sabitlemek için en uygun metodu belirlemek
2. Sabitlenen örneklerin sterilizasyon aşamasındaki tepkilerini ve sterilizasyon derecesini belirlemek

#### **3.4.2. Pilot Çalışma için Kullanılacak Örneklerin Seçilmesi ve Hazırlanması**

Pilot çalışma için 10 tane tek köklü apikal forameni açık olmayan, #15 K tipi eğenin apikalde sıkıştığı, kök kırığı, çatlağı ve dentinde çürüğü bulunmayan, düz tek kanallı çekilmiş insan dişleri seçildi. Kök uzunluğu apikalden 14 mm olacak şekilde dişlerin kronları ve gerekliyse kök kısımları kesilerek çıkarıldı. Çalışma uzunluğu, #15 K tipi eğe (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ile apikal foramenden 1 mm kısa olacak şekilde belirlendi.

#### **3.4.3. Pilot Çalışma için Kullanılacak Dişlerin Kemo-mekanik Preperasyonu**

Kök kanalları aynı deney aşamasında olduğu gibi ProTaper kanal aletleri (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ile üretici tavsiyesi üzerine saat yönünde crown down yöntemine göre koronal kısım için SX kullanılmak üzere genişletildi. Kök kanal genişletmesi sırasıyla ProTaper S1, S2, F1, F2, F3 kullanılarak saat yönünde ana apikal eğe F4 olacak şekilde yapıldı. Preparasyon boyunca dişlere her bir eğe değişiminde sırasıyla 2ml %2.5' lik NaOCI (Wizard, Rehber kimya, İstanbul, Türkiye), 2ml distile su ve 2ml %17'lik EDTA (Werax, Spot Dental, İzmir-Türkiye) toplam süre 3 dakika olacak şekilde uygulandı. Preperasyon sonrası, sırasıyla 3ml %2.5' luk NaOCI (Wizard, Rehber kimya, İstanbul), distile su, 3 ml % 17'lik EDTA (Werax, Spot Dental, İzmir-Türkiye) ve sonrasında 1 dak boyunca distile su ile

irrigasyon yapıldı. Bütün yapılan irrigasyon işlemleri esnasında 5ml'lik enjektörlerin gövdeleri (Genject, SAYBERK, Ankara) ve uç kısım için de 27ga. yandan perfore irrigasyon iğnesi (Endo-EZE, Ultradent, Utah-USA) kullanıldı. Her bir örnek için enjektör gövdesi ve iğne değiştirildi. Genişletme ve yıkama işlemleri bitmiş olan dişlerin Kök uçları siyanoakrilat (ASR, Alcan ltd., Başakşehir, İstanbul) ile kapatılarak sızdırmaz hale getirildi. Daha sonra dişler içerisinde % 0,1 lik Timol (GBL, Gül Biyoloji Laboratuvarı Ltd Şti., İstanbul) solüsyonu bulunan şeffaf mikrokuyucuklarda (SPL, SPL Lifesciences Co. Ltd., Pocheon city-Korea) 4 °C'de ( Lg buzdolabı, LG Company, Güney Kore) bekletildi.

#### **3.4.4. Pilot Çalışma için Grupların Oluşturulması**

Kemomekanik preperasyondan sonra Grup 1 olarak adlandırılan dişlerin 5 tanesi mikrokuyucuklar (SPL, SPL Lifesciences Co. Ltd., Pocheoncity-Kore) içerisine yerleştirilerek ölçü silikonu (Zetaplus, Zhermack SpA, İtalya) yardımıyla sabitlendi. Üretici tavsiyesi üzerine 8 dakika bekleyip Silikonun donmasını takiben mikrokuyucuklar steril olması için Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sterilizasyon ünitesine verildi

Grup 2 olarak adlandırılan kalan 5 diş ayrı ayrı ependorf (Biosigma, Dominique Dutscher Group, İtalya ) tüplere konarak Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sterilizasyon ünitesine verildi.

#### **3.4.5. Pilot Çalışmadaki Örneklerin Sterilizasyonu**

Kemomekanik preperasyonları tamamlanan ve sabitleme şekline göre 2 gruba ayrılan 10 diş Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sterilizasyon ünitesine ayrı ayrı gruplar halinde sterilizasyon amacıyla verildi. Her bir grup ayrı olarak aynı otoklavda (Nüve OT32VS, Nuve Sanayi Malzemeleri İmalat ve Tic. A.Ş, Akyurt, ANKARA) 121°C'de 25 dakika steril edilmiştir.



### **3.4.6. Pilot Çalışmadaki Örneklerin Sterilizasyon Sonrası Değerlendirilmesi**

Ölçü silikona sabitlenen dişler ile eppendorf tüplere konan dişlerin steril olup olmadığı Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümü Bakteriyel-Genetik laboratuvarında bakteriyel gelişim kontrol edilerek test edildi.

Bu amaçla sterilizasyon işlemine tabi tutulan diş örnekleri aseptik koşullar altında TSB ortamına aktarıldı ve 37°C 'de 24-48 saat inkübe edildi daha sonra her tüpten 100 µL örnek alınarak TSA besiyerine aktarılarak Drigolski spatülü ile yüzeye yayıldı. Test sonucunda silikon içerisinde mikrokuyucuklara sabitlenen 5 dişten 3 tanesinde üreme görüldüğü yani dişlerin steril olmadığı tespit edildi. Eppendorf tüp (Biosigma, Dominique Dutscher Group, İtalya) içerisine yerleştirilen 5 dişin hiçbirinde mikrobiyal gelişim gözlenmemesine bağlı olarak dişlerin hepsinin steril olduğu belirlendi. Pilot çalışmanın sonuçları doğrultusunda çalışmadaki örnekler otoklavda 121°C 'de 25 dakika da steril edilecek ve dişler ayrı ayrı eppendorf tüpler içerisine koyulacaktır

### **3.5. Örneklerin Muhafaza Edilmesi**

Örneklerin kök uçları siyanoakrilat (ASR, Alcan ltd., Başakşehir, İstanbul) kullanılarak kapatıldı. Kurumaya bırakılan örnekler ertesi gün içerisinde % 0,1 'lik timol solüsyonu bulunan Polisitren düz tabanlı her biri 24 adet kuyucuk içeren mikrokuyucuklar (SPL, SPL Lifesciences Co. Ltd., Pocheon city-Kore) içerisine ölçü silikonu olmadan sadece dişlerin muhafaza edilmesi amacıyla yerleştirildi. Her biri 11 örnekten oluşan her diş bir kuyucuk içerisine gelecek şekilde her grup için ayrı bir mikrokuyucuk içerisine yerleştirildi. Örnekler sterilizasyon işlemi yapılana kadar bu kuyucuklar içerisinde muhafaza edildi.

### **3.6. Örneklerin Sterilizasyonu**

Kimyasal ve mekanik preperasyonu tamamlanan örneklerin herbiri muhafaza edildiği mikrokuyucuklar (SPL, SPL Lifesciences Co. Ltd., Pocheon city-Kore) içerisinden steril bir kabin (Chemocell LRC X UV Class II B2, Teknomar A.Ş.,

Ankara-Türkiye) içerisinde alındı. Alınan örnekler steril edilmiş bir şekilde hazır olarak alınan eppendorf tüplerin içerisine steril presel kullanarak alındı. Tüm örneklerin eppendorf tüpler içerisine taşınmasından sonra eppendorf tüpler sterilizasyon poşetlerinin içerisine 4 veya 5 tanesi bir poşetin içerisine gelecek şekilde yerleştirildi (**Resim 3**). Poşetlenen örneklerin hepsi aynı anda otoklava yerleştirildi. Örnekler otoklavda 121°C 'de 25 dakika da steril edildi.



**Resim 3.** Örneklerin otoklava girmeden önce poşetlenmesi ( Bir sterilizasyon poşetinin içerisinde 4 veya 5 tane eppendorf bulunmaktadır.)

### 3.7. Deney Gruplarının Oluşturulması

Deney gruplarının oluşturulmasında kullanılan mikroorganizmalar baz alındı. Toplam 174 örnek her bir ana grupta 58 olmak üzere 3 ana gruba ayrıldı. 3 ana grubun her biri de 5 alt gruba (grup1: distile su (negatif kontrol grubu), grup 2: HEBP' in %5'lik konsantrasyonu, grup 3: HEBP'in %7'lik konsantrasyonu, HEBP'in %9 'luk konsantrasyonu, HEBP'in %18 'lik konsantrasyonu ile irrigate edilecek şekilde) ayrıldı. Alt grupların herbirinde örnek sayısı 11 olarak belirlendi. Deney gruplarındaki irrigasyon solüsyonu hacimleri ve uygulama zamanları Siqueira ve ark (249) çalışması baz alınarak modifiye edilmiştir. Her bir ana gruptan 3 örnek (toplam da 9 örnek) biyofilm oluşup oluşmadığını değerlendirmek için SEM incelemesinde kullanılmak üzere hazırlandı.

**Ana Grup A (*E. faecalis* ATCC 29212) (n:55):** *E. faecalis* ile enfekte edilmiş 58 örneğin, 55 tanesi sırasıyla,

**Grup 1: Distile su grubu (D) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu sadece Distile su ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 2: %5 'lik Etidronik asit (HEBP) grubu (K5) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 3: %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 4: %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 5: %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

Kalan 3 örnekte biyofilm oluşumunu gözlemlemek için *E. Faecalis* ile inoküle edilmek üzere ayrıldı.

**Ana Grup B (*C. albicans*) (ATCC 10231) (n:55):** *C. albicans* ile enfekte edilmiş 58 örneğin, 55 tanesi sırasıyla

**Grup 1: Distile su grubu (D) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml Distile su ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 2: %5 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K5) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 3: %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 4: %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 5: %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

Kalan 3 örnekte biyofilm oluşumunu gözlemlemek için *C. albicans* ile inoküle edilmek üzere ayrıldı.

**Ana Grup C (*P. aeruginosa* ATCC 15442) (n:55):** *P. aeruginosa* ile enfekte edilmiş 58 örneğin, 55 tanesi sırasıyla,

**Grup 1: Distile su grubu (D) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece Distile su ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 2: %5 'lik Etidronik asit (HEBP) grubu (K5) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 3: %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 4: %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

**Grup 5: %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11):** Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika yıkanmasıyla oluşturulan deney grubu.

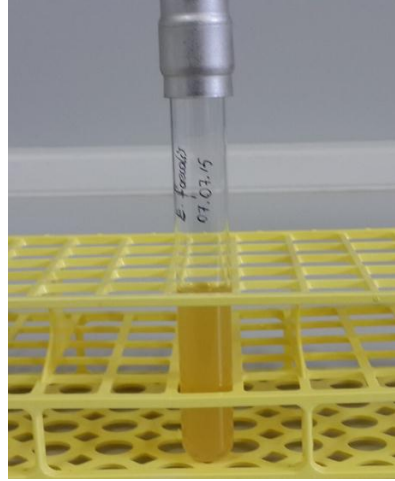
Kalan 3 örnekte biyofilm oluşumunu gözlemlemek için *P. aeruginosa* ile inoküle edilmek üzere ayrıldı.

Deneyde pozitif kontrol grubu kullanma gereği duyulmadı, çünkü pozitif deney grubu olarak bir grup belirlendiğinde bu grupta NaOCI kullanılacaktı, NaOCI'in kullanılan mikroorganizmalar üzerine antimikrobiyal etkisi yıllardan beri çok iyi bilindiğinden ve yapılan farklı deneylerle kanıtlandığından dolayı pozitif kontrol grubu oluşturulmadı.

### 3.8. *E. faecalis* Kültürünün Aktifleştirilmesi ve Örneklerle İndüksiyonu

#### 3.8.1. *E. faecalis* Kültürünün Geliştirilmesi

Deneyde test organizmalarından biri olarak kullanılan *E. faecalis* ATCC 29212 suşu Ankara Halk Sağlığı Genel Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edildi. *E. faecalis* ATCC 29212 suşu Triptik soy broth (TSB, LabM Ltd., İngiltere) besiyeri ortamında 37°C 'de 18 saat süre ile geliştirildi. Ertesi gün aynı besiyeri ortamında %1 oranında ekim yapılarak ATCC 29212 suşu tekrar 37°C 'de 18 saat kültüre edildi. Aktifleştirilmiş ATCC 29212 suşunun saflık kontrolü TSB agar ortamına sürme, Gram boyama ve katalaz testi ile kontrol edildi. Gram boyama, hazırlanmış preparatın üzerine kristal viyole boyası damlatılıp 1 dakika beklenir ve iyot-lugol çözeltisi ile yıkanarak kristal viyole uzaklaştırıldı. Preparata tekrar iyot-lugol çözeltisi damlatılarak 1 - 2 dakika bekletilip, distile su ile yıkanarak iyot-lugol çözeltisi uzaklaştırıldı. Preparatın üzerine %96 'lık etil alkol veya eter – aseton çözeltisi damlatılarak 15 - 30 saniye beklendi, distile su ile yıkandı ve karşıt boya olarak safranin damlatıldı ve 40 - 50 saniye bekletildi. Preparat distile su ile yıkanarak havada kendi halinde kurumaya bırakıldı, preparata immersiyon yağı damlatıldı ve 100 'lük objektifle incelendi, katalaz testi saflık kontrolü için TSB agar ortamında gelişen koloniler kullanılarak test edildi Petri kutusunda gelişen koloniler üzerine 1-2 damla H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> damlatılarak gaz çıkışı kontrol edildi. Katalaz testinde *staphylococcus* ATCC 29213 suşu pozitif kontrol olarak kullanıldı. *E. faecalis* ATCC 29212 suşunun stok kültürü %20 steril Gliserol (BBL Middlebrook 7H9 Braoth Glycerol Becton, Dickinson, Amerika) içeren TSB (tyriptic soy broth) besiyeri ortamında -20°C'de derin dondurucu (beko, beko A.Ş, Rayong-Tayland) içerisinde muhafaza edildi (**Resim 4**).



**Resim 4.** *E. faecalis* 'den oluşturulan stok solüsyonu

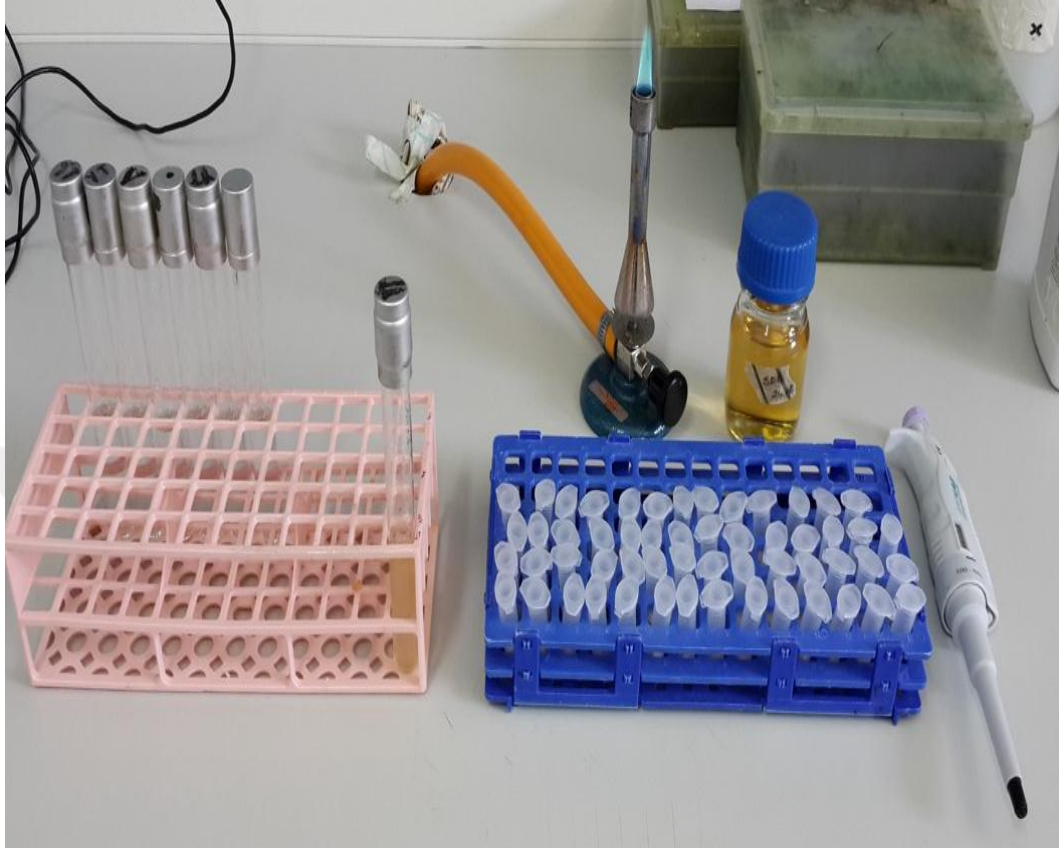
### **3.8.2. *E. faecalis* Süspansiyonunun Hazırlanması**

*E. faecalis* (ATCC 29212) suşu 37 °C 'de TSB besiyeri içerisinde inkübatörde (Elektromag M420 BP, Labor teknik Ltd., İstanbul-Türkiye) aktifleştirildi. 18 saatlik aktif kültürden mikropipet (interlab10-1000ul, interlab laboratuvar hizmetleri a.ş, Ankara) yardımı ile 1 mL alınıp 100 mL TSB (tyriptic soy broth) besiyeri içerisine aktarılarak bakteriyel süspansiyon hazırlandı. Bakteriyel süspansiyon içerisinde bulunan hücre sayısının belirlenmesi için süspansiyonun %0.85 'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonları hazırlandı ve TSA( tyriptic soy agar) besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan petri kutuları (Fıratmed, Fırat plastik A.Ş, İstanbul) 37 °C 'de 48 saat süre ile inkübe edildi (**Resim 5**). İnkübasyon süresi sonunda petri kutusundaki (Fıratmed, Fırat plastik A.Ş, İstanbul) koloniler sayıldı.

### **3.8.3. Örneklerin *E. faecalis* ile Enfekte Edilmesi**

Mililitresinde 7,45 log<sub>10</sub> KOB (Koloni oluşturan birim) *E. faecalis* ATCC 29212 suşu bulunan bakteri süspansiyonundan mikropipet (interlab10-1000ul, interlab laboratuvar hizmetleri a.ş, Ankara) yardımı ile 1'er mL alınarak eppendorf tüpü (Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy) içerisinde bulunan 58 diş üzerine aktarıldı. Dişin tamamının besiyeri içerisinde kalması sağlanarak kök kanal enfeksiyonu başlatıldı. Estrella ve ark. (250) öngördüğü şekilde 21 gün boyunca 2'şer gün ara ile 0.5 mL besiyeri eppendorf tüplerden (Biosigma, Dominique Dutscher

Group, Italy) mikropipet (interlab10-1000ul, interlab laboratuvar hizmetleri a.ş., Ankara) ile alınıp yerine 0.5 ml steril TSB (tyryptic soy broth) besiyeri eklendi.



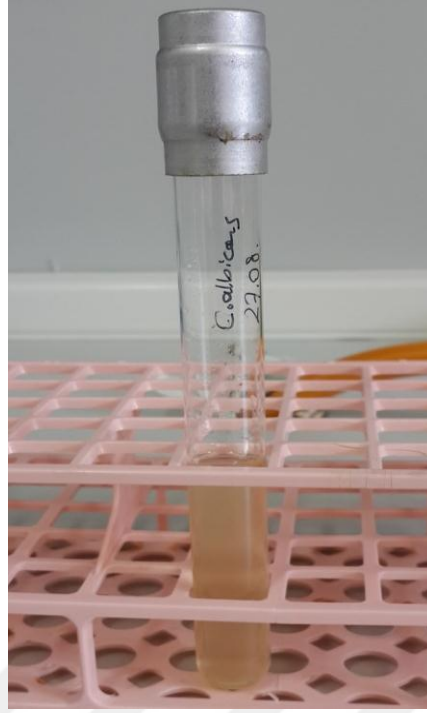
**Resim 5.** Örneklerin *E. faecalis* ile enfekte edilmeden hemen öncesi

### **3.9. *C. albicans*'ın Kültürünün Geliştirilmesi ve Örneklerle İnokülasyonu**

#### **3.9.1. *C. albicans* Kültürünün Geliştirilmesi**

Deneyde test organizmalarından biri olarak kullanılan *C. albicans* ATCC 10231 suşu Ankara Halk Sağlığı Genel Merkezi Laboratuvarı'ndan temin edildi. *C. albicans* 25 °C 'de SDB (Sabouraud Dextrose Broth) (Lab M, Lab M limited, İngiltere) içerisinde aktifleştirildi. Kültür %20 steril gliserol ( BBL Middlebrook 7H9 Braoth Glycerol Becton, Dickinson, Amerika) içeren SDB (Sabouraud Dextrose Broth) besiyeri içerisinde -20°C 'de (Beko, Beko A.Ş, Rayong-Tayland) stoklandı (**Resim 6**).





**Resim 6.** *C. albicans*'dan oluşturulan stok solüsyonu

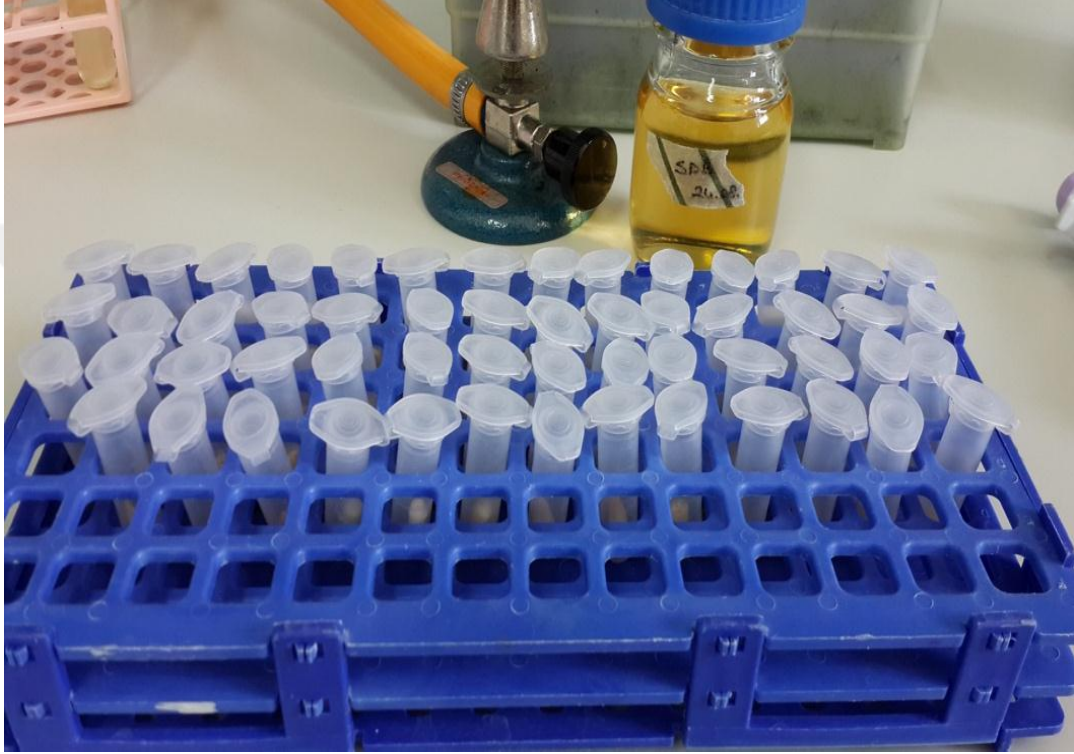
### **3.9.2. *C. albicans* Süspansiyonunun Hazırlanması**

*C. albicans* ATCC 10231 suşu 25 °C 'de SDB (Sabouraud Dextrose broth) (Lab M, Lab M limited, UK) besiyeri içerisinde inkübatörde (Elektromag M420 BP, Labor teknik Ltd., İstanbul-Türkiye) aktifleştirildi. 18 saatlik aktif kültürden 1 mL alınıp 100 mL SDB besiyeri içerisine aktarılarak bakteriyel süspansiyon hazırlandı. Bakteriyel süspansiyon içerisinde bulunan hücre sayısının belirlenmesi için süspansiyonun fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonları hazırlandı ve SDA (Sabouraud Dextrose Agar ) besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan Petri kutuları 25°C 'de 48 saat süre ile inkübe edildi (**Resim 7**). İnkübasyon süresi sonunda Petri kutusundaki (Fırat-med, Fırat plastik A.Ş, İstanbul) koloniler sayıldı.

### **3.9.3. Örneklerin *C. albicans* ile Enfekte Edilmesi**

Örneklerin kök kanalları, mililitresinde 5,95 log<sub>10</sub> KOB /mL (Koloni Oluşturan Birim) *C. albicans* bulunan SDB besiyeri ile enfekte edildi. Bunun için hazırlanan bakteri süspansiyonundan mikropipet (interlab10-1000ul, interlab laboratuvar hizmetleri a.ş, Ankara) yardımı ile 1'er mL alınarak eppendorf tüp ( Biosigma,

Dominique Dutscher Group, Italy ) içerisinde diş örneği bulunan toplam 58 eppendorf tüpüne aktarıldı. Dişin tamamının besiyeri içerisinde kalması sağlanarak kök kanal enfeksiyonu başlatıldı. Estrella ve ark. (250) öngördüğü şekilde 21 gün boyunca 2 ‘şer gün ara ile 0.5 mL besiyeri eppendorf tüplerden ( Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy ) alınıp yerine 0.5 ml steril SDB (Sabouraud Dextrose Brouth) besiyeri eklendi.



**Resim 7.** Örneklerin *C. albicans* ile enfekte edilmeden hemen öncesi

### **3.10. *P. aeruginosa* Kültürünün Geliştirilmesi ve Örneklerle İnokülasyonu**

#### **3.10.1. *P. aeruginosa* Kültürünün Geliştirilmesi**

Deneyde test organizmalarından biri olarak kullanılan *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 suşu Ankara Halk Sağlığı Genel Merkezi Laboratuvarı’ndan temin edildi. *P. aeruginosa* 37 °C ‘de TSB (Lab M, Lab M limited, İngiltere) besiyeri kullanılarak çalkalayıcı yardımı ile aktiveleştirildi. Gram boyama ve katalaz reaksiyon testleri ile ürünün saflığı kontrol edildi. Kültür %20 steril Gliserol (BBL Middlebrook 7H9 Braoth Glycerol Becton, Dickinson, Amerika) içeren TSB (tyriptic soy broth) besiyeri ortamında -20°C ‘de (beko, beko A.Ş, Rayong-Tayland) stoklandı.

### 3.10.2. *P. aeruginosa* Süspansiyonunun Hazırlanması

*P. aeruginosa* ATCC 15442 suşu 37 °C 'de TSB (tryptic soy broth) besiyeri içerisinde inkübatörde (Elektromag M420 BP, Labor teknik Ltd., İstanbul-Türkiye) çalkalayıcı kullanılarak aktiveleştirildi. 18 saatlik aktif kültürden 1 mL alınıp 100 mL TSB (tryptic soy broth) besiyeri içerisine aktararak bakteriyel süspansiyon hazırlandı. Bakteriyel süspansiyon içerisinde bulunan hücre sayısının belirlenmesi için süspansiyonun %0.85 'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) ile seri dilüsyonları hazırlandı ve TSA (tryptic soy agar) besiyerine yayma kültür yöntemi ile ekim yapıldı. Ekim yapılan Petri kutuları 37 °C 'de 48 saat süre ile inkübe edildi (**Resim 8**). İnkübasyon süresi sonunda Petri kutusundaki (Fıratmed, Fırat plastik A.Ş, İstanbul) koloniler sayıldı.

### 3.10.3. Örneklerin *P. aeruginosa* ile Enfekte Edilmesi

Mililitresinde 7,01 log<sub>10</sub> KOB/mL (Koloni Oluşturan Birim) *P. aeruginosa* ATCC 15442 bulunan bakteri süspansiyonundan mikropipet (interlab10-1000ul, interlab laboratuvar hizmetleri a.ş, Ankara) yardımı ile 1 mL alınarak eppendorf tüp (Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy) içerisinde bulunan 58 diş üzerine aktarıldı. Dişin tamamının besiyeri içerisinde kalması sağlanarak kök kanal enfeksiyonu başlatıldı. Estrella ve ark. (250) öngördüğü şekilde 21 gün boyunca 2'şer gün ara ile 0.5 mL besiyeri eppendorf tüplerden (Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy) alınıp yerine 0.5 ml steril TSB besiyeri eklendi.



**Resim 8.** Örneklerin *P. aeruginosa* ile enfekte edilmeden hemen öncesi

### **3.11. Biyofilm Oluşmasının Değerlendirilmesi**

Bakterilerin ekimi ve Estrella ve ark. (273) öngördüğü şekilde 21 gün beslenmesinin sonucunda her bir ana grup için 3 tane olmak üzere daha önceden oluk yerleri hazırlanmış toplam 9 diş (Ana grup A ‘dan 3 tane, Ana grup B ‘den 3 tane, Ana grup C ‘den 3 tane) steril bir keski yardımıyla vertikal olarak 2’ye ayrılarak biyofilm oluşumunun gözlenmesi için Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi ‘ne gönderilmek üzere hazırlandı.

### **3.12. Örneklerin SEM (Taramalı Elektron Mikroskobu) İçin Hazırlanması**

Her Ana Gruptan 3 ‘er toplamda 9 örnek SEM ile biyofilm oluşup oluşmadığının değerlendirilmesi için hazırlandı. Her bir örnek öncelikle %2,5 ‘luk Gluteraldehit çözeltisi içerisinde fikse edildi. Bir diğer aşamada her bir örnek tampon çözeltisi ile 3 kez yıkandı ve etanol ile havada kurutuldu. Daha sonra örnekler çift taraflı bant (Scotch, 3M, ABD) kullanılarak numune tutucular üzerine yapıştırıldı.

Örnekler Minisputter Coater (Polaron SC7620, İngiltere) cihazı ile 30 sn süre ile Altın/Palladyum alaşımı ile kaplandı (cihaz saniyede yaklaşık 3 angstrom kalınlığında au/pd kaplaması yapmaktadır). Tek bir örnek için yaklaşık 90 angstrom kaplama kalınlığı elde edilmiş oldu. Kaplama işlemi tamamlandıktan sonra bütün örnekler SEM (taramalı elektron mikroskobu) (LEO440 Zyfic, İngiltere) ile 1000x, 2500x, 5000x, 10000x ve 25000x büyütmede vakum altında ayrı ayrı incelendi ve fotoğraflar alındı.

### 3.13. Deney Grupları

Tüm konsantrasyonlarda kullanılan irrigasyon prosedürü ve zamanı Siqueira ve ark (249) yaptıkları çalışmadan yararlanılarak modifiye edilmiştir.

**Ana Grup A (*E. faecalis*) (ATCC 29212) (n:58):** *E. faecalis* ile enfekte edilmiş 58 örnek 21 gün boyunca gün aşırı beslenerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. 3 örnek 21 gün sonra biyofilm oluşup oluşmadığının incelenmesi amacıyla Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi 'ne SEM incelenmesine gönderildi. Geriye kalan 55 tanesi sırasıyla,

**Grup 1:** Distile su grubu (D) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml Distile su ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 2:** %5 'lik Etidronik asit (HEBP) grubu (K5) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı

**Grup 3:** %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 4:** %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 5:** %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Ana Grup B (*C. albicans*) (ATCC 10231) (n:58):** *C. albicans* ile enfekte edilmiş 58 örnek 21 gün boyunca gün aşırı beslenerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. 3 örnek 21 gün sonra biyofilm oluşup oluşmadığının incelenmesi amacıyla Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi 'ne SEM incelenmesine gönderildi. Geriye kalan 55 tanesi sırasıyla,

**Grup 1:** Distile su grubu (D) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml Distile su ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 2:** %5 'lik Etidronik asit (HEBP) grubu (K5) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı

**Grup 3:** %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 4:** %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 5:** %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Ana Grup C (*P. aeruginosa*) (ATCC 15442) (n:58):** *P. aeruginosa* ile enfekte edilmiş 58 örnek 21 gün boyunca gün aşırı beslenerek biyofilm oluşumu sağlanmıştır. 3 örnek 21 gün sonra biyofilm oluşup oluşmadığının incelenmesi amacıyla Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi 'ne SEM incelenmesine gönderildi. Geriye kalan 55 tanesi sırasıyla,

**Grup 1:** Distile su grubu (D) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml Distile su ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 2:** %5 'lik Etidronik asit (HEBP) grubu (K5) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %5 lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı

**Grup 3:** %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K7) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %7 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 4:** %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) grubu (K9) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %9 'luk Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

**Grup 5:** %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) grubu (K18) (n:11): Preperasyonu tamamlanan 11 örneğin, final solüsyonu olarak sadece 3ml %18 'lik Etidronik Asit (HEBP) ile 2 dakika aynı operatör tarafından yıkanması tamamlandı.

### **3.14. Final İrrigasyonu Yapılan Örneklerden Mikroorganizmaların Elde Edilmesi**

Deney grubu ve kontrol grubundaki tüm örneklere final irrigasyon solüsyonlarının uygulanmasının ardından tüm kök kanalları serum fizyolojik ile doldurulduktan hemen sonra siqueira ve ark yaptığı çalışmadaki gibi 1 adet 45 no'lu 0.2 açılı kağıt kon (Diadent, Diadent Group International, Kyonggi-Do, Korea) steril presel (Jensen, jensen grup, kazakistan) ile 30 sn tutularak kanallar kurulandı. Kurutulan kök kanallarından çıkarılan bu kağıt kon daha sonra içerisinde 1ml steril salin bulunan ependorf ( Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy )tüpüne atıldı.



Kanallar tekrar Serum Fizyolojik ile doldurulduktan sonra 15 no'lu H- file kanal eğesi ile çevresel eğeleme yapıldı. Çevresel eğelemeden sonra 45 no 'lu 0.2 açılı Paperpoint kullanılarak kök kanallarından bir daha örnek alındı. Bu paperpoint de aynı ependorf içerisine konuldu. Kanallar tekrar Serum Fizyolojik ile doldurulduktan sonra 45 no 'lu 0.2 açılı Paperpoint kullanılarak kök kanallarından üçüncü bir örnek daha alındı. Bu paperpoint de aynı ependorf içerisine konuldu. Böylece her bir dişin kök kanalı için 3 Paperpoint kullanılarak örnek alındı. Bütün dişlerde kullanılan paperpointler ve el eğeleri ayrı ayrı Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Sterilizasyon ünitesinde 121<sup>0</sup>C de otoklav (Nüve, Nüve sanayi malzemeleri imalat, Ankara) içerisinde steril edilmiş olup her diş için uygulama yapılacağı sırada ayrı ayrı açılıp kullanıldı. Bütün eğeleme işlemleri ve paperpointle örnek alma kanalların serum fizyolojik ile doldurulması işlemleri aynı operatör tarafından Steril kabin (Chemocell LRC X UV Class II B2, Teknomar A.Ş., Ankara-Türkiye) içerisinde yapıldı (**Resim 9**).



**Resim 9.** Final irrigasyon işlemlerinin ve dişlerden örnek alma işlemlerinin yapıldığı steril airflow kabin

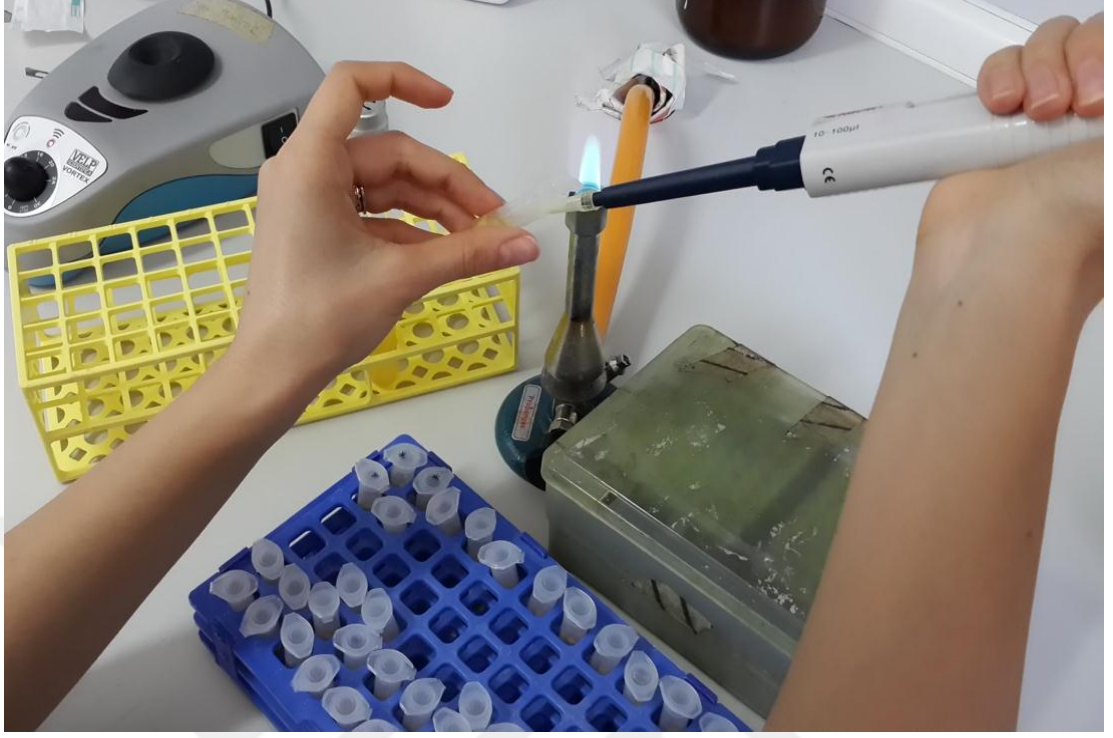


### 3.15. Örneklerin Değerlendirilmesi

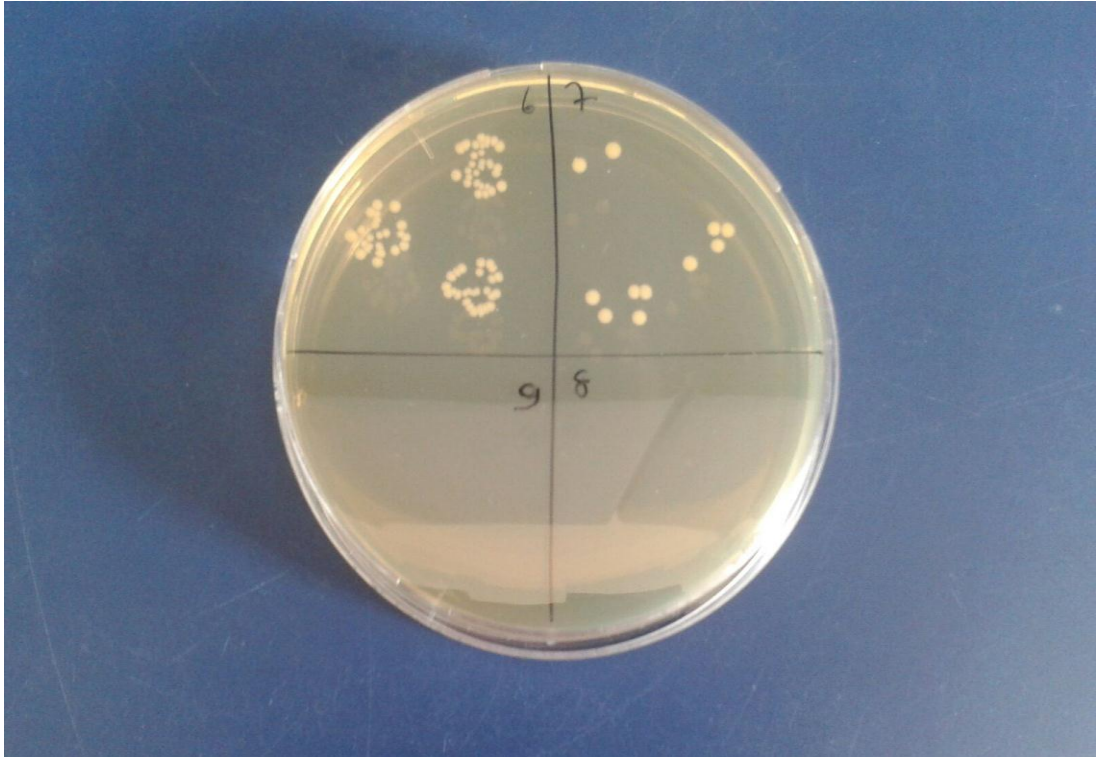
Deney sonucunda kök kanalında hayatta kalan mikroorganizmaların sayısı, damla kültürel sayım yöntemi ile belirlendi. Örnekleri toplamak için kullanılan paperpointler, (Her dişin kök kanalı için 3 tane olmak üzere) içerisinde 1ml steri salin bulunan ependorf tüplere transfer edildi ve hemen ardından 1 dakika boyunca vortekslendi (Velp Scientifica F202A0175, Velp Scientifica, İtalya) (**Resim 10**). Steril salin (0,85%, w/v) solüsyonu ile örneklerin 10 kat seri dilüsyonları hazırlandı ve her dilüsyondan 10 µl alınarak *E. faecalis* için TSA (Tryptic Soy Agar), *C. albicans* için SDA (Subouraud Dekstroz Agar), *P. aeruginosa* için TSA (Tryptic Soy Agar) bulunan Petri (Fıratmed, Fırat plastik, Ankara) kutularına Mikropipet yardımıyla damlatıldı (**Resim 11**). 37°C'de 24 saatlik inkübasyondan sonra tüm örnekler için mikroorganizma kolonileri sayıldı (**Resim 12,13**).



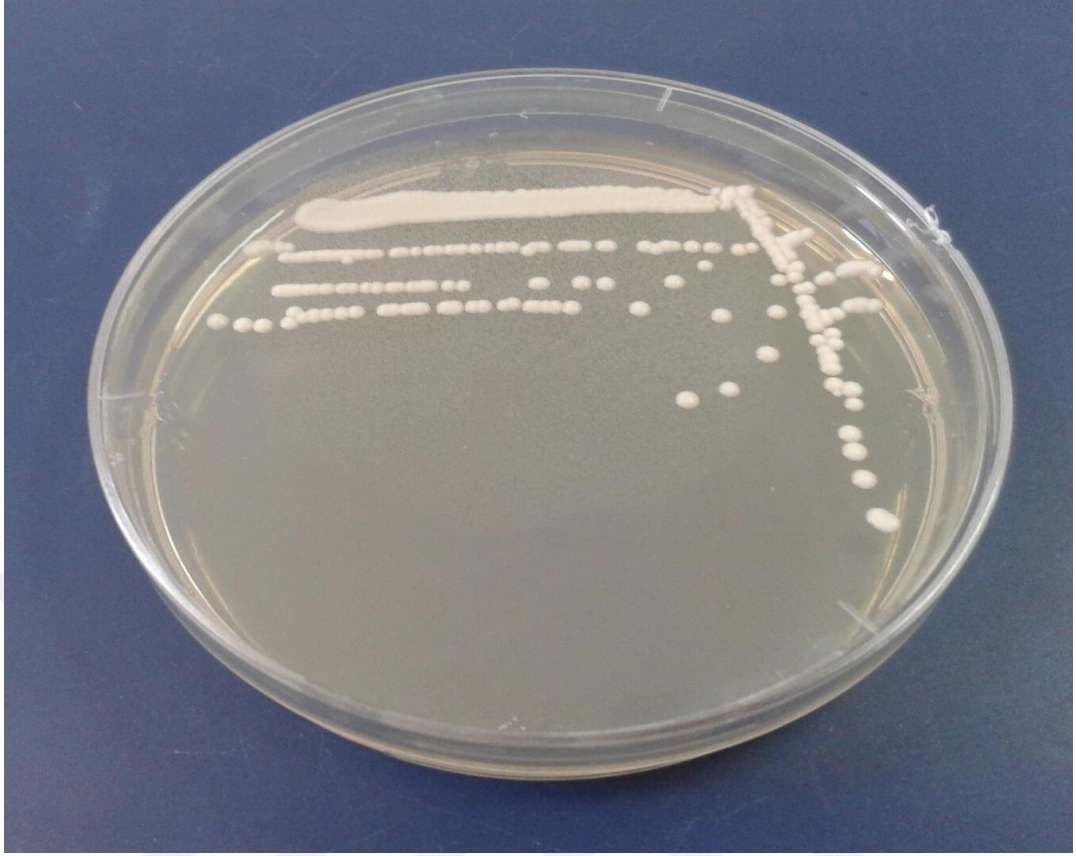
**Resim 10.** Vortex



**Resim 11.** Mikroorganizmaların seri dilüsyonlarının hazırlanması



**Resim 12.** TSB besiyerine ekimi yapılan bakterilerin inkübasyondan sonra koloni geliştirmiş görüntüsü



**Resim 13.** Sürme yapılmış *C. albicans* ATCC 10231 suşunun SDB besiyerinde gelişen koloni görüntüsü

## 4. BULGULAR

### 4.1. Örnekleri Sabitleme ve Sterilizasyon Kontrolü İçin Yapılan Pilot Çalışmaya Yönelik Bulgular

Örneklerin sabitlenmesi ve sterilizasyon kontrolü için ölçü silikonu ile sabitlenen dişler ile ependorf tüplere konan dişlerin steril olup olmadığı Süleyman Demirel Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Gıda Mühendisliği bölümü Bakteriyel-Genetik laboratuvarında mikrobiyal gelişim test edildi. Test sonucunda silikon içerisinde mikrokuyucuklara sabitlenen 5 dişten 3 tanesinde üreme görüldüğü yani steril olmadığı gözlemlendi (**Resim 14**). Ependorf tüp ( Biosigma, Dominique Dutscher Group, Italy ) içerisine yerleştirilen 5 dişin hiçbirinde üreme gözlemlenmedi yani dişlerin hepsi steril oldu. Pilot çalışmanın sonuçları doğrultusunda çalışma da örneklerin nasıl muhafaza edileceği ve nasıl steril edileceği belirlendi.



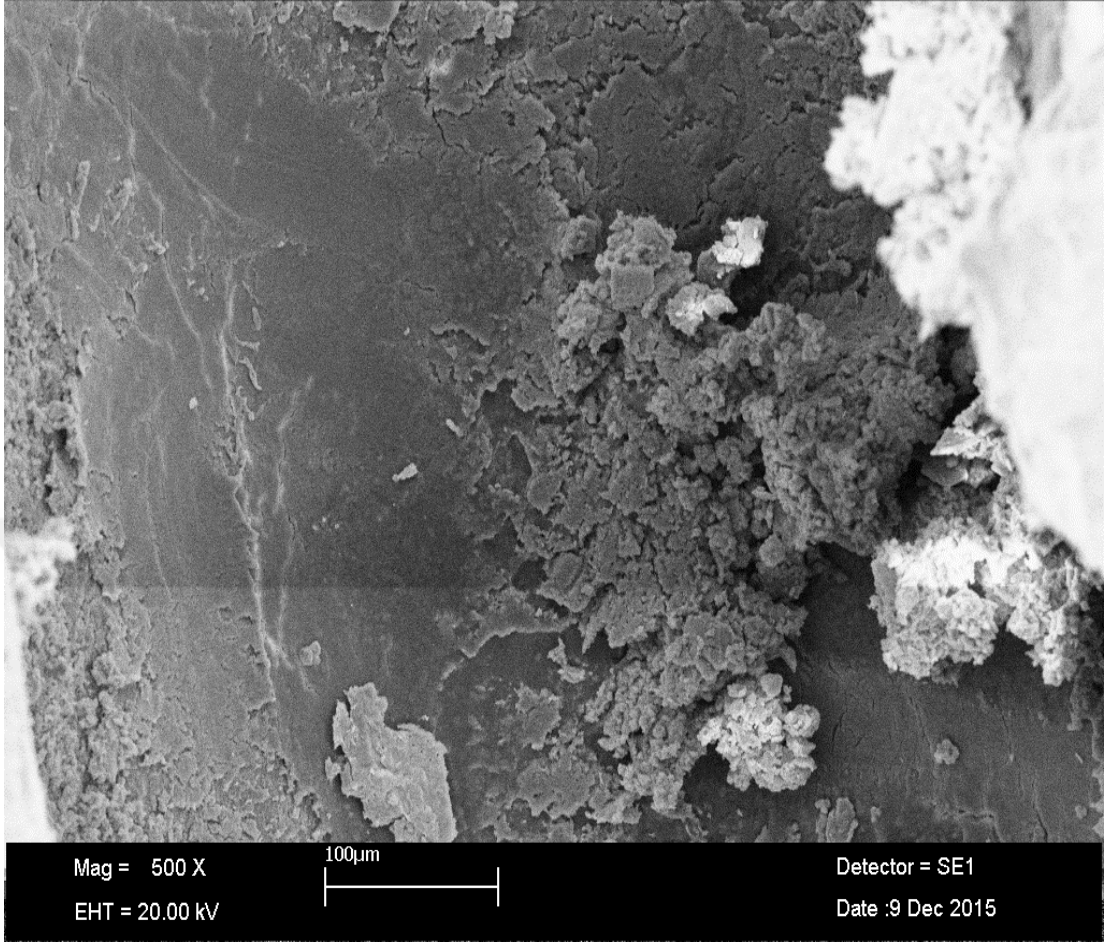
**Resim 14.** Pilot çalışmada silikona gömülmüş bulanıklık testi sonrası steril olmadığı gözlemlenen örneklerden biri

#### 4.2. *E. faecalis* ile oluşturulan Biyofilm Oluşumunun İncelenmesine Yönelik Bulgular

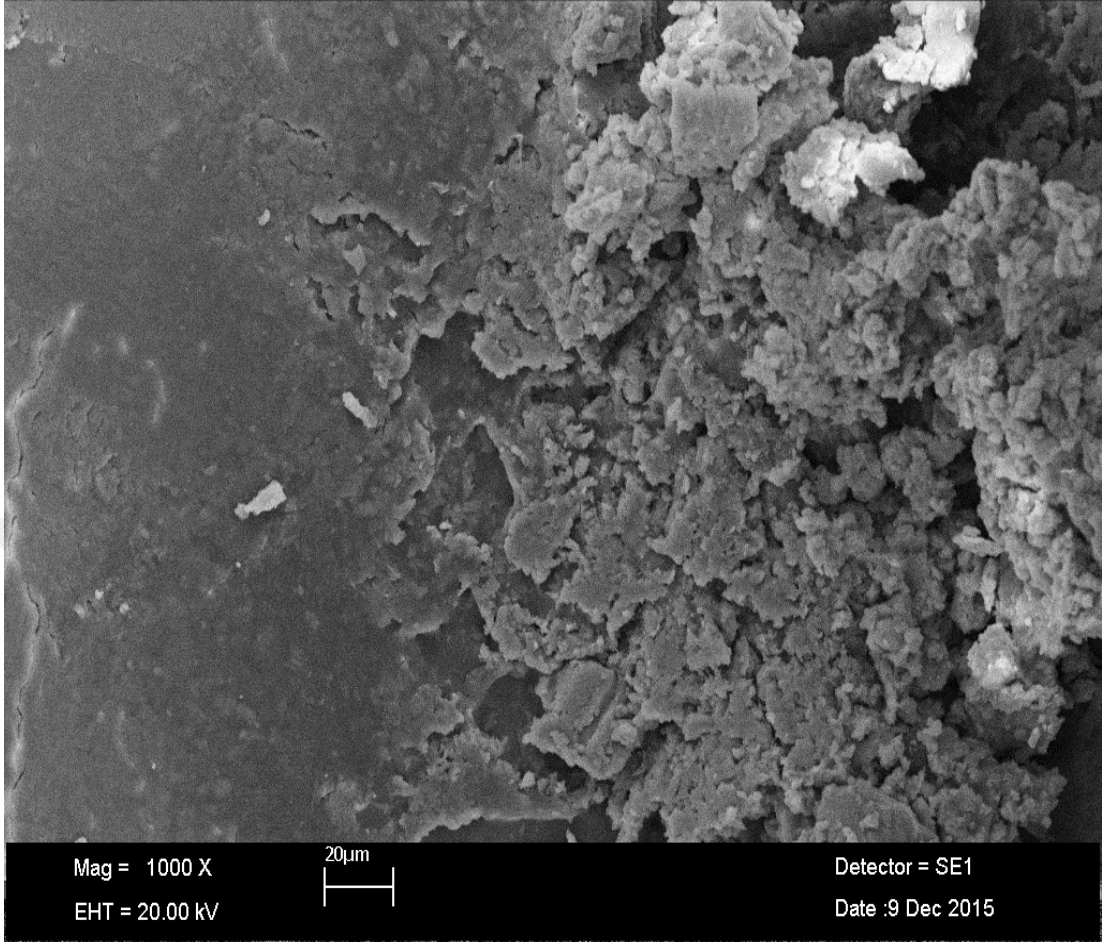
Stok solüsyonu 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyeri üzerinde oluşan koloniler sayıldı. Stok solüsyonunun 1 ml 'sinde 7,45 log<sub>10</sub> KOB *E. faecalis* bulunduğu belirlendi. Bu sonuca göre deney grubunda bulunan her bir kök kanalına mililitresinde 7,45 log<sub>10</sub> KOB *E. faecalis* olacak şekilde ekim yapıldı ve 21 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kök kanallarından alınan örneklerden damla kültür yöntemi kullanılarak bakteri sayımı yapıldı.

21 günlük inkübasyon periyodundan sonra 3 diş örneği ortadan ikiye bölünerek etanol ile fikse edildi ve biyofilm oluşumunun belirlenmesi için örnekler, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi SEM laboratuvarına gönderildi. Örnekler SEM( taramalı elektron mikroskobu) yardımıyla incelendi. Örneklerin apikal, orta üçlü ve koronal bölgeden 1000x, 2500x, 5000x, 10000x, 25000x büyütme altında alınan bütün görüntülerde *E. faecalis* bakterisi ve biyofilm oluşumu gözlemlendi (**Resim 15, 16, 17, 18, 19, 20**). SEM görüntülerinde elde edilen sonuçlara göre örneklerin tüm yüzeylerinde yoğun ve yaygın biyofilm oluşumu gözlemlendi.

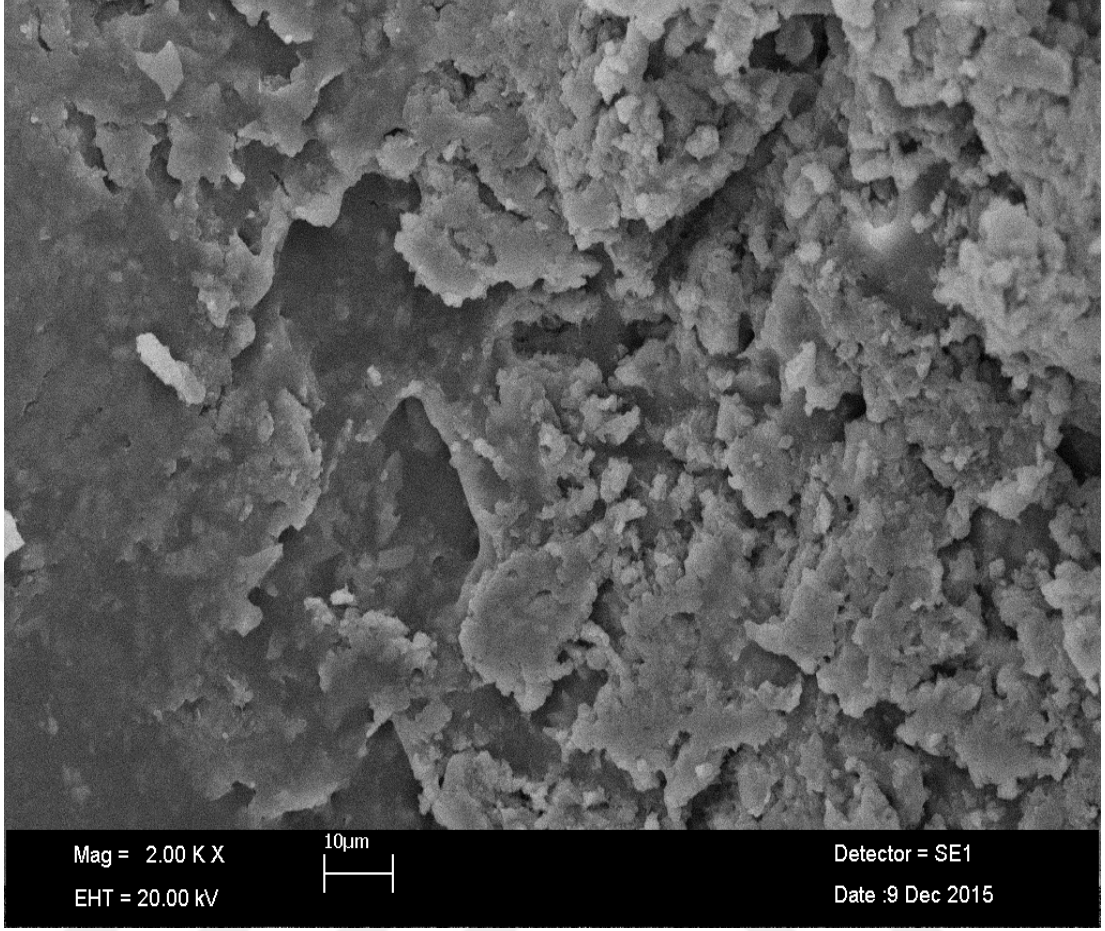




**Resim 15.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

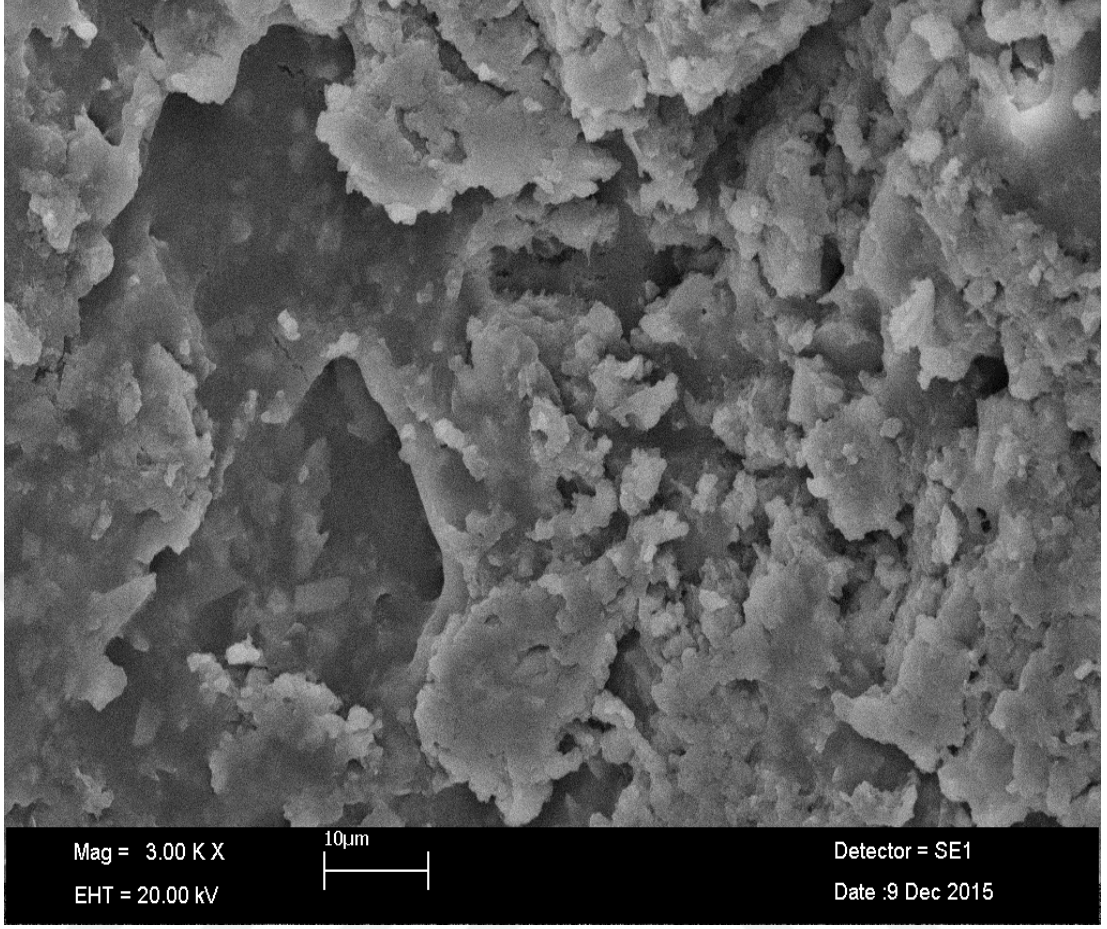


**Resim 16.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

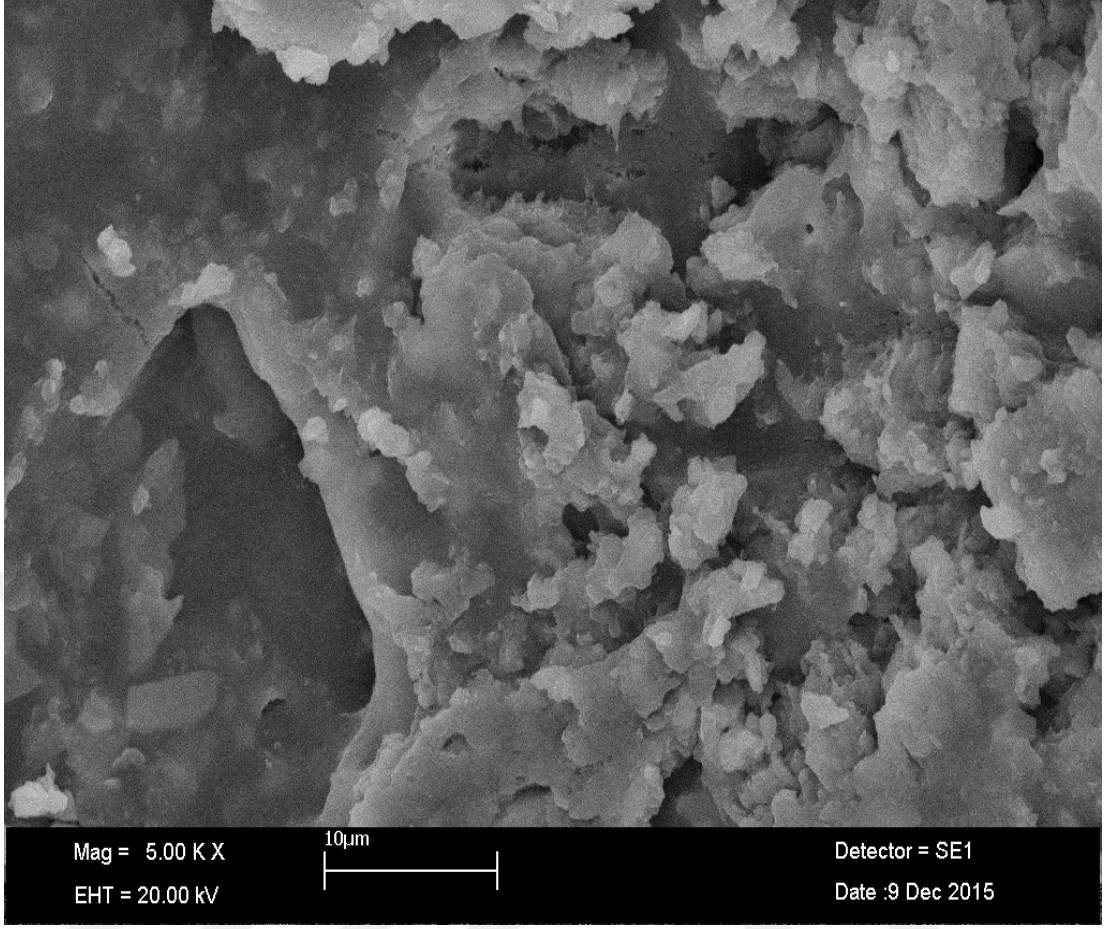


**Resim 17.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

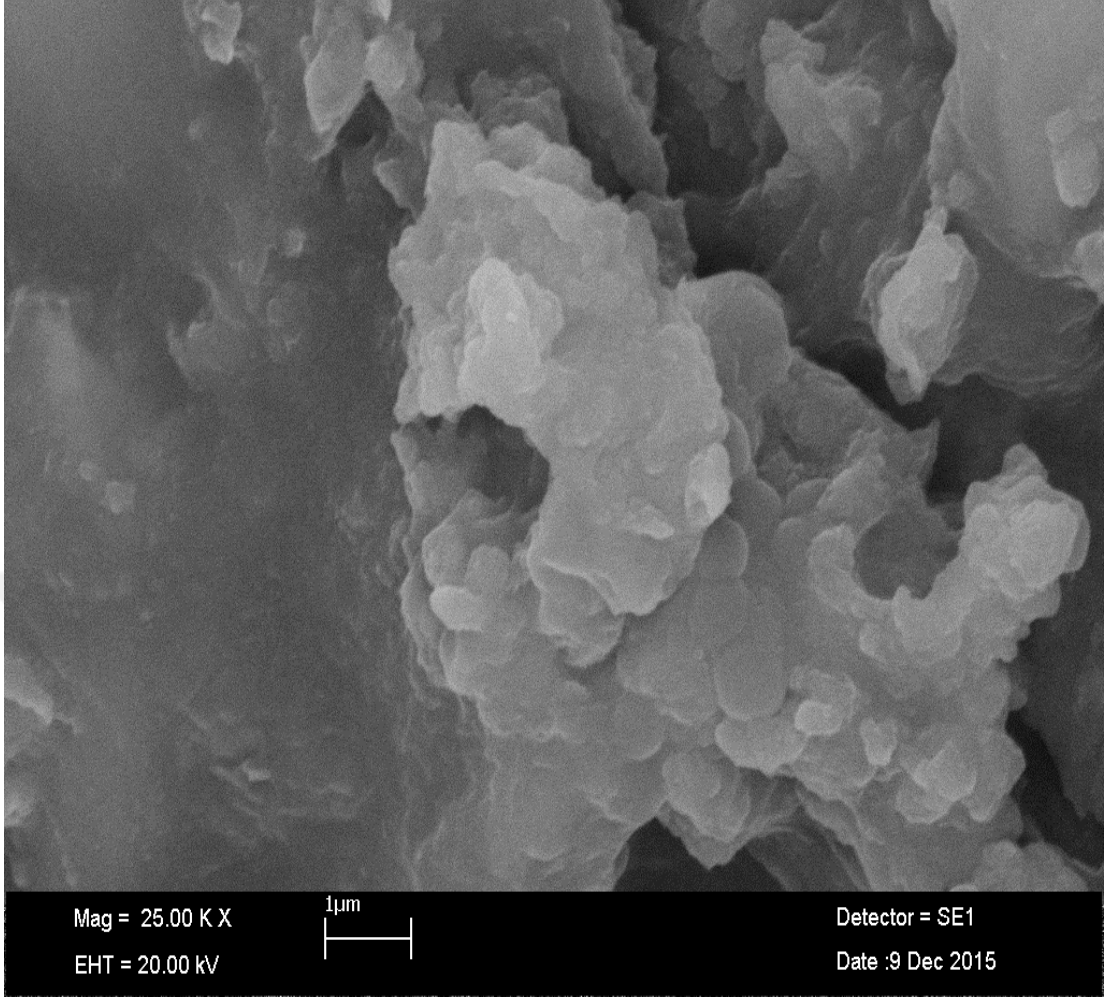




**Resim 18.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 3000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



**Resim 19.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

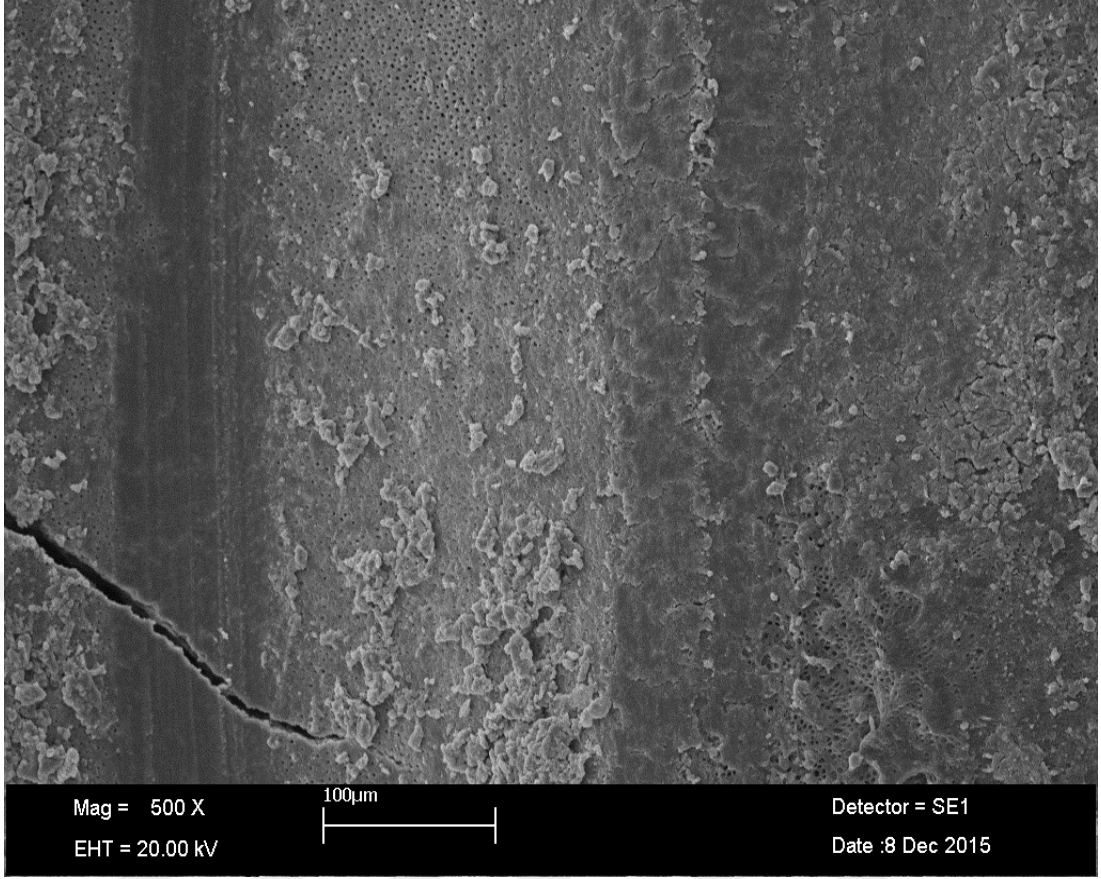


**Resim 20.** *E. faecalis* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

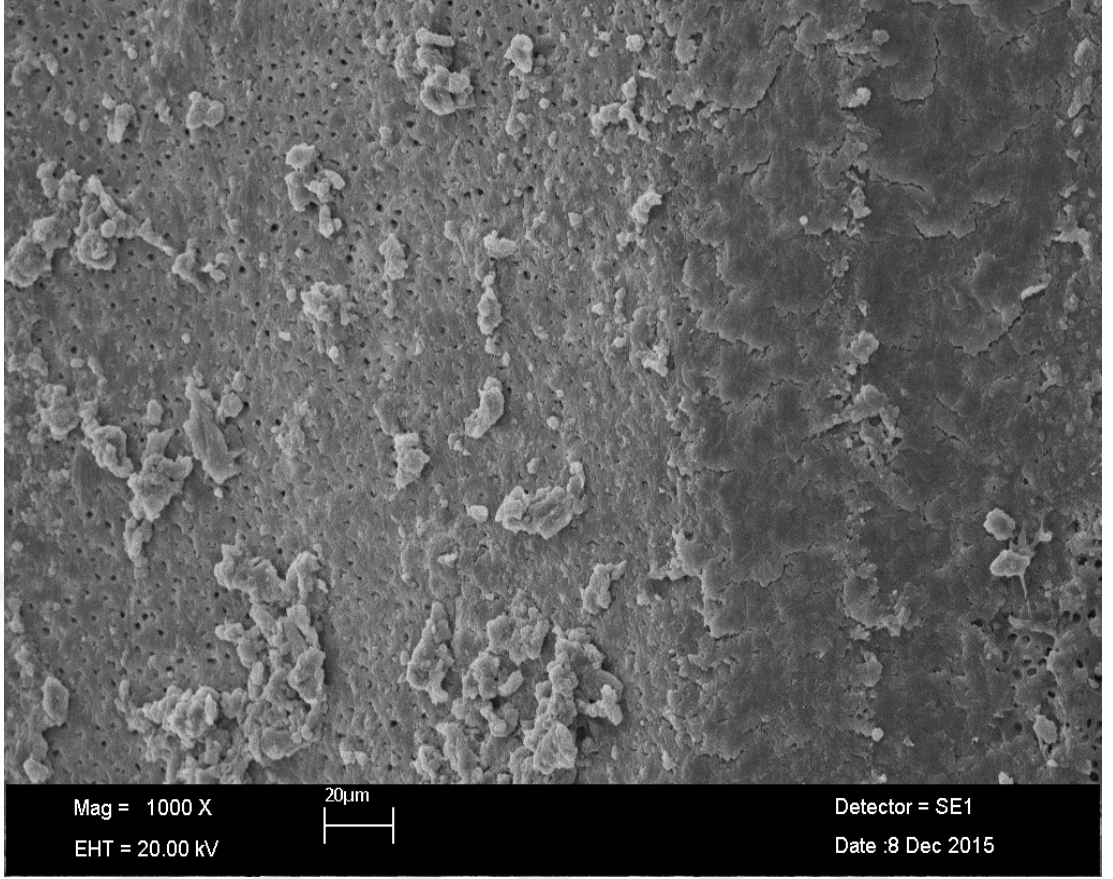
### 4.3. *C. albicans* ile Oluşturulan Biyofilm Oluşumunun İncelenmesine Yönelik Bulgular

Stok solüsyonu 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyeri üzerinde oluşan koloniler sayıldı. Stok solüsyonunun 1ml 'sinde 5,95 log<sub>10</sub> KOB (koloni oluşturan birim) *C. albicans* bulunduğu belirlendi. Bu sonuca göre deney grubunda bulunan her bir kök kanalına mililitresinde 5,95 log<sub>10</sub> KOB olacak şekilde ekim yapılmış ve 21 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kök kanallarından alınan örneklerde kültür yöntemi kullanılarak bakteri sayımı yapıldı.

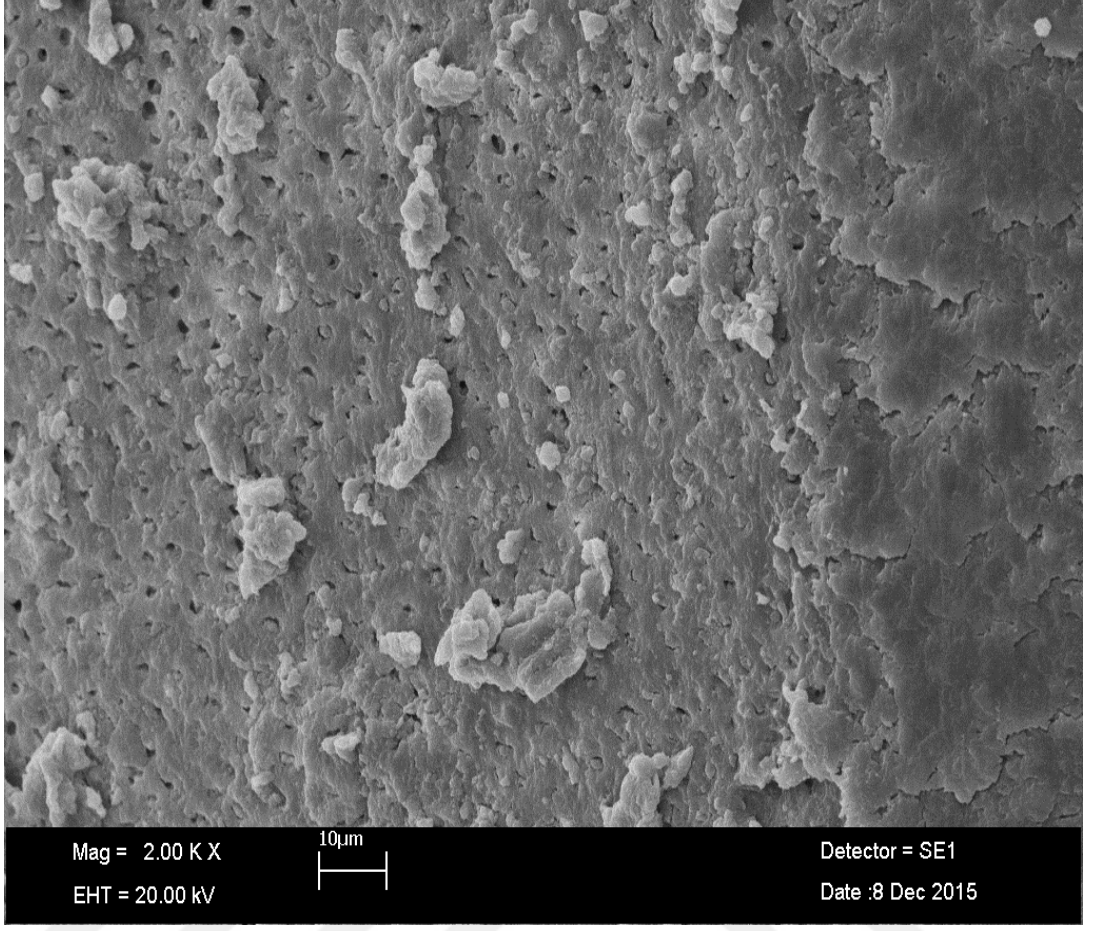
21 günlük inkübasyon periyodundan sonra 3 diş örneği ortadan ikiye bölünerek etanol ile fikse edildi ve biyofilm oluşumunun belirlenmesi için örnekler, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi SEM laboratuvarına gönderildi. Örnekler SEM( taramalı elektron mikroskobu) yardımıyla incelendi. Örneklerin apikal, orta üçlü ve koronal bölgeden 1000x, 2500x, 5000x, 10000x, 25000x büyütme altında alınan bütün görüntülerde *C. albicans* ve biyofilm oluşumu gözlemlendi (**Resim 21, 22, 23, 24, 25, 26**). SEM görüntülerinde elde edilen sonuçlara göre örneklerin tüm yüzeylerinde yoğun ve yaygın biyofilm oluşumu gözlemlendi.



**Resim 21.** *C. albicans* 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

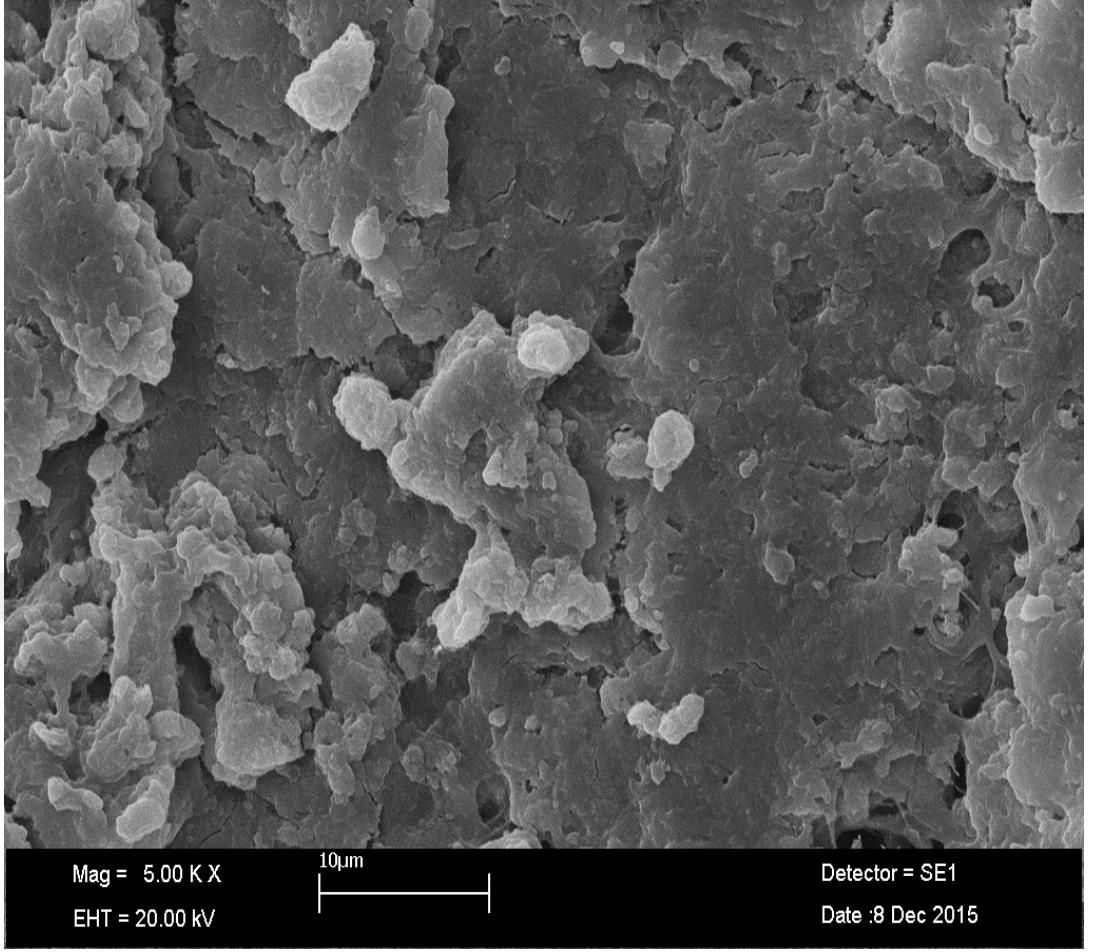


**Resim 22.** *C. albicans* 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



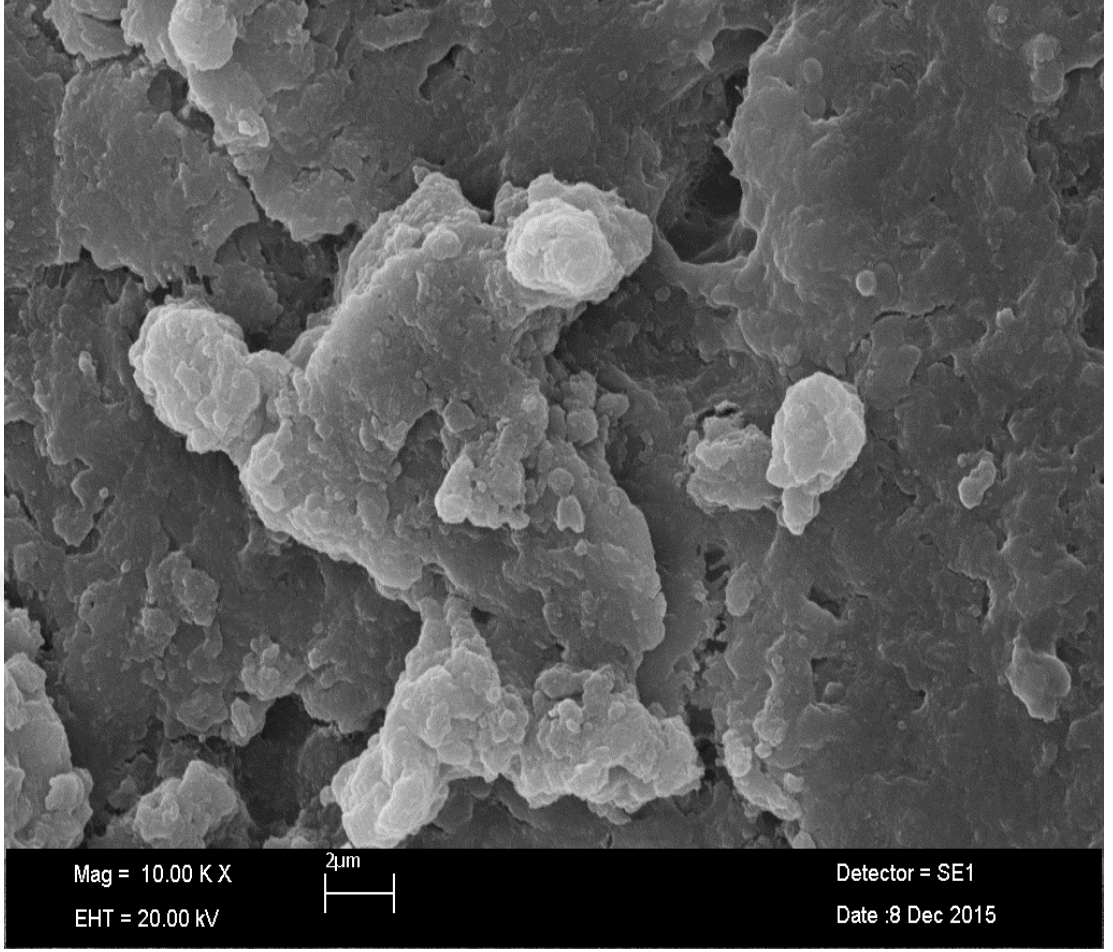
**Resim 23.** *C. albicans* 'ın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



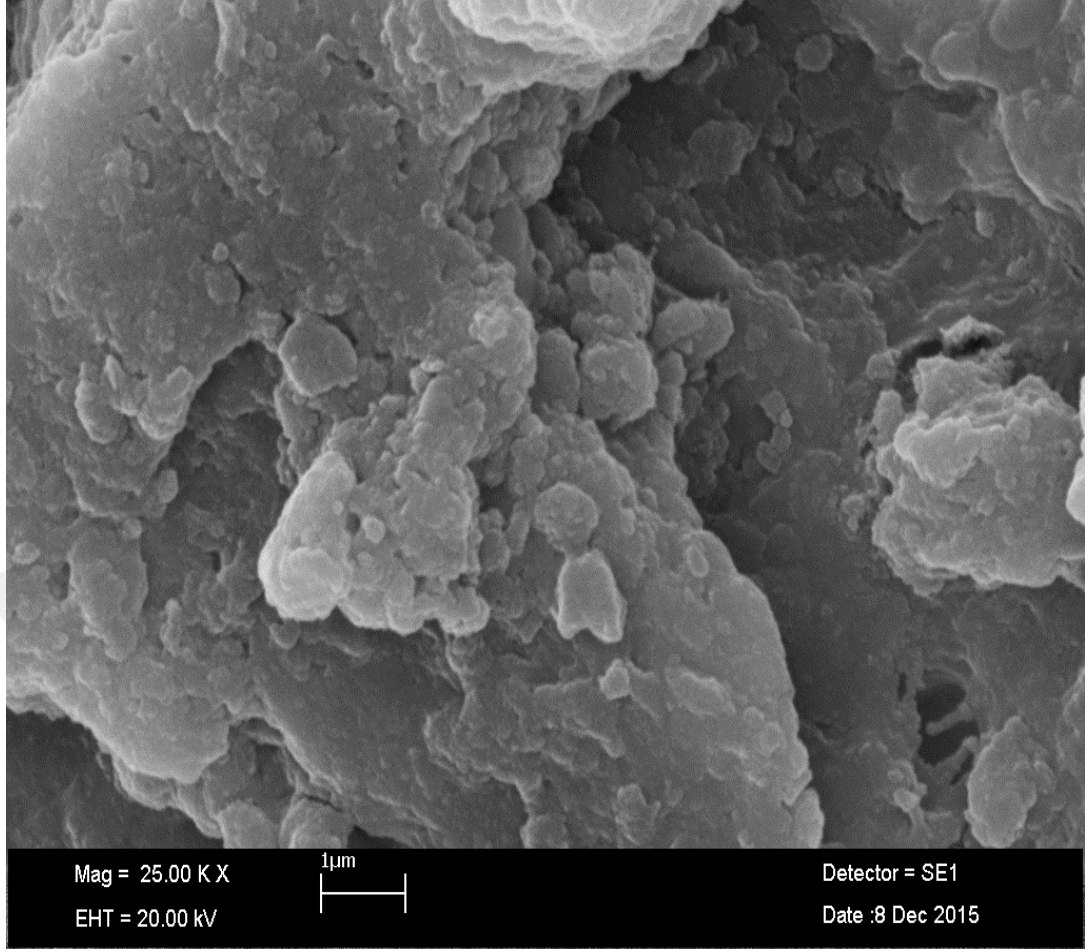


**Resim 24.** *C. albicans* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi





**Resim 25.** *C. albicans* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 10000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

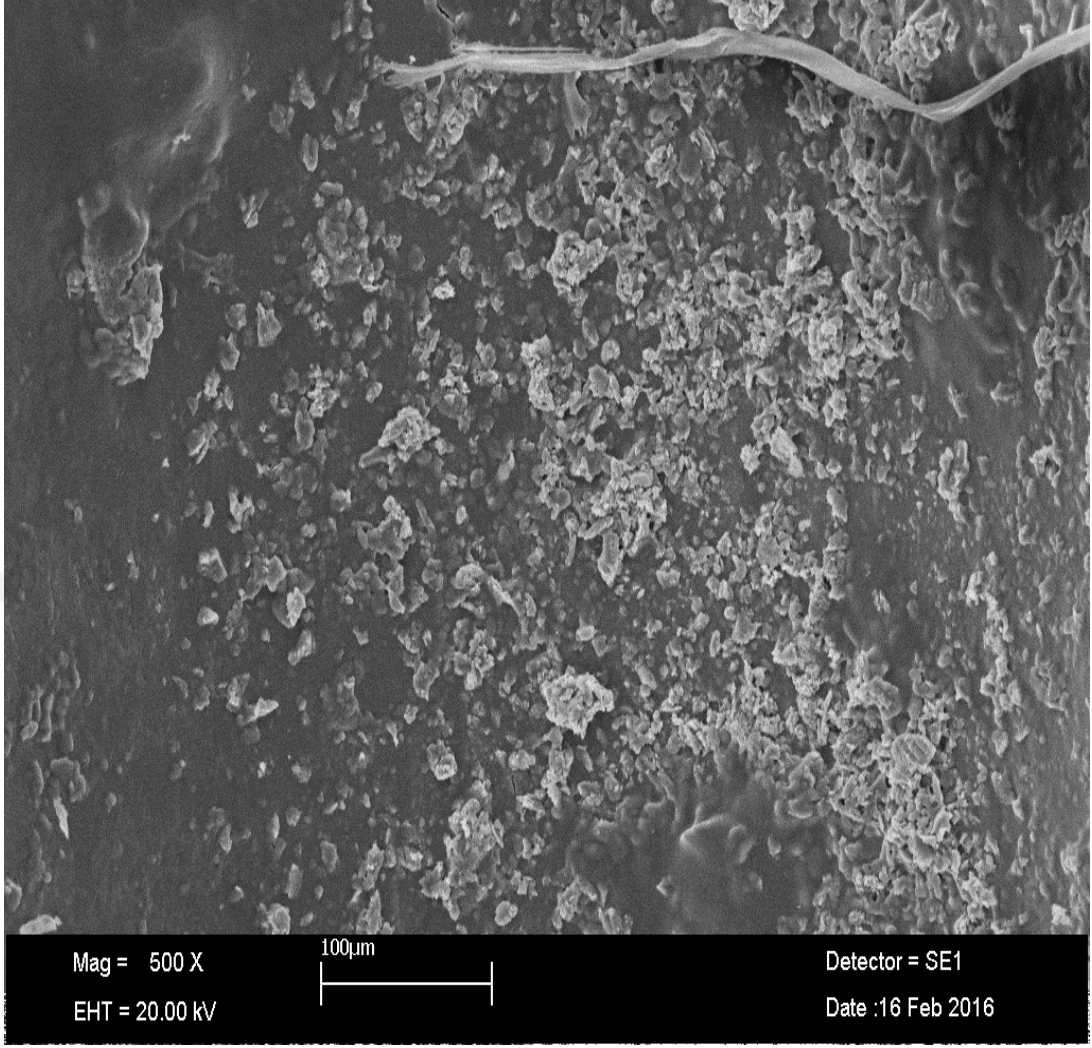


**Resim 26.** *C. albicans* 'in 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

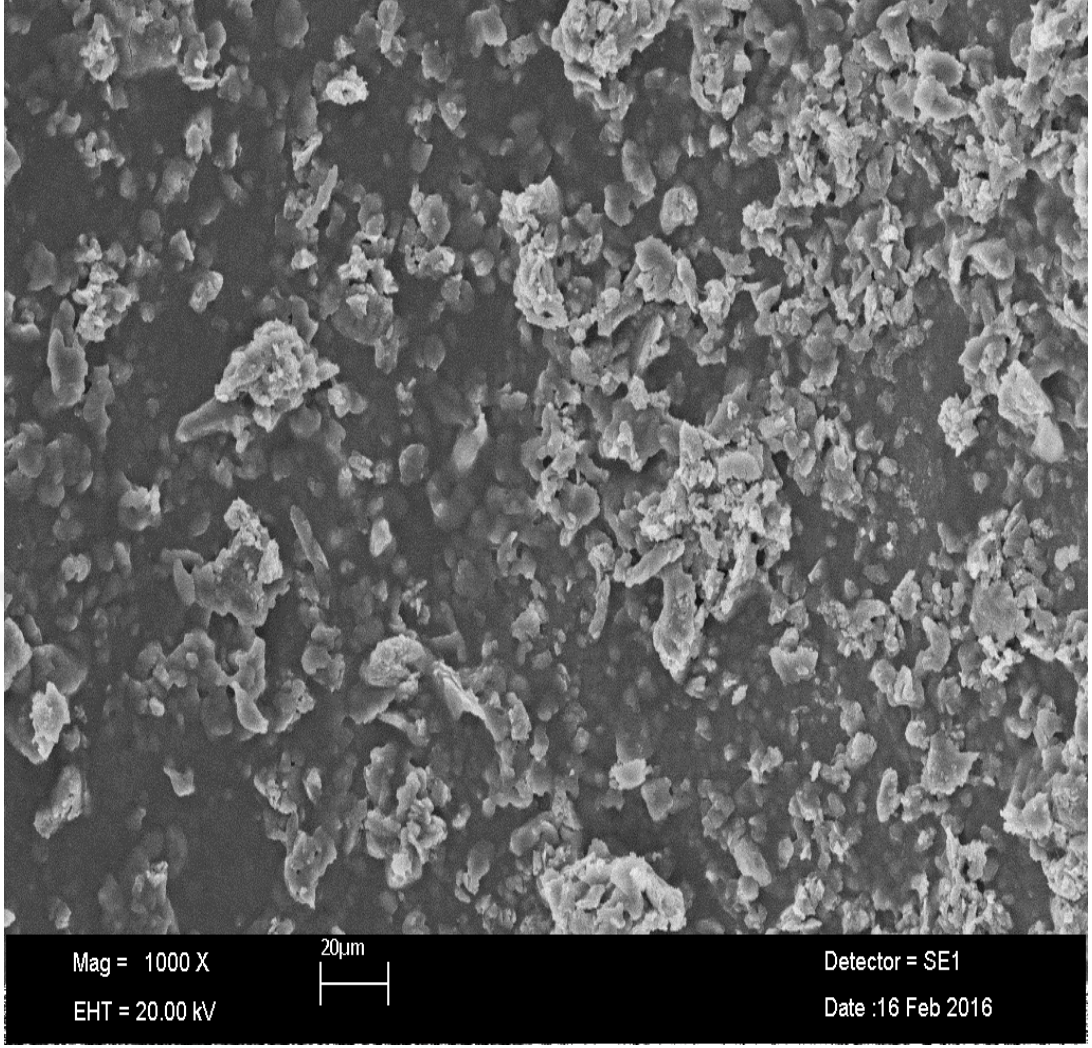
### 4.3. *P. aeruginosa* ile Oluşturulan Biyofilm Oluşumunun incelenmesine Yönelik Bulgular

Stok solüsyonu 24 saat süre ile inkübe edildikten sonra besiyeri üzerinde oluşan koloniler sayıldı. Stok solüsyonunun 1ml 'sinde 7,01 log<sub>10</sub> KOB (koloni oluşturan birim) *P. aeruginosa* bulunduğu belirlendi. Bu sonuca göre deney grubunda bulunan her bir kök kanalına mililitresinde 7,01 log<sub>10</sub> KOB olacak şekilde ekim yapılmış ve 21 gün inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kök kanallarından alınan örneklerde kültür yöntemi kullanılarak bakteri sayımı yapıldı.

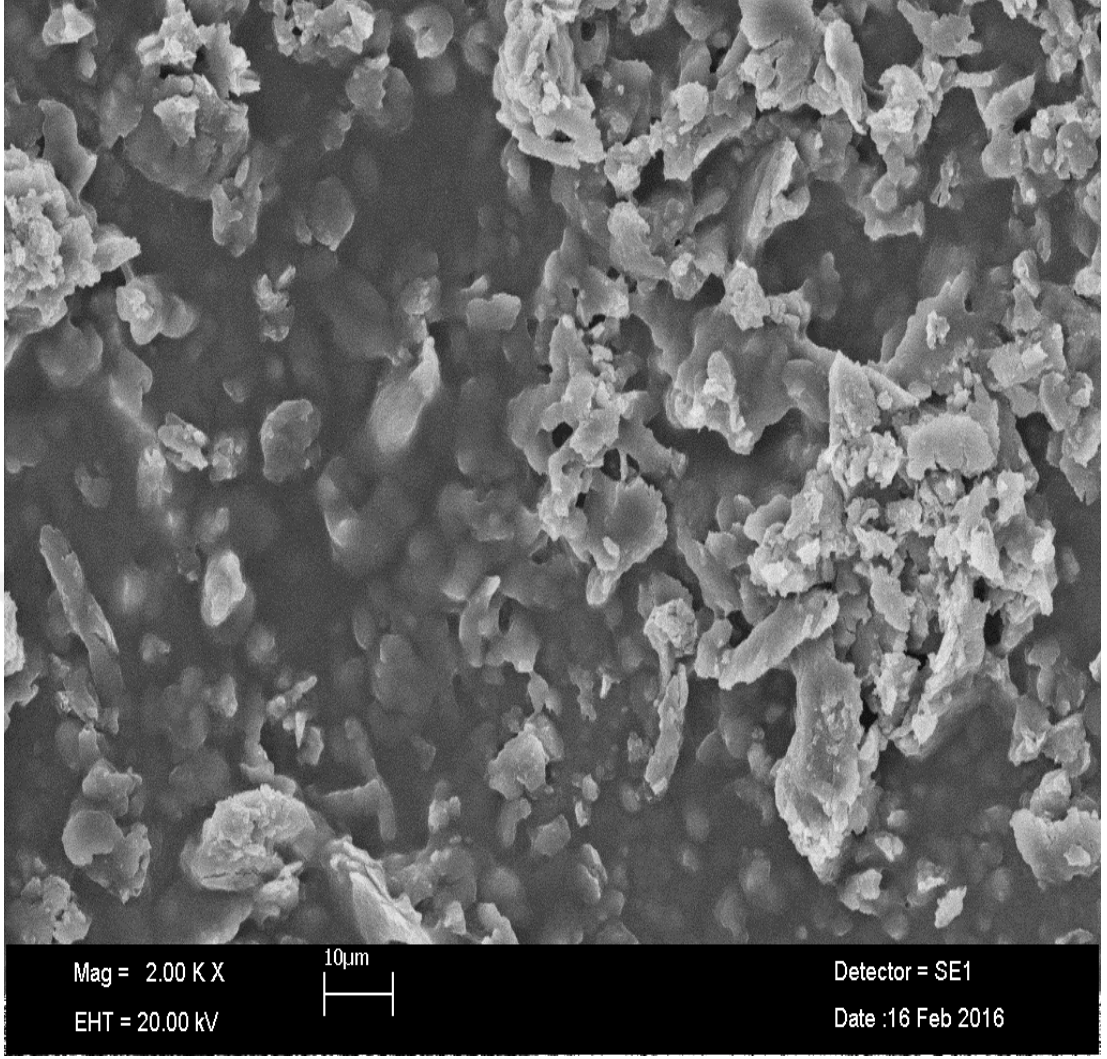
21 günlük inkübasyon periyodundan sonra 3 diş örneği ortadan ikiye bölünerek etanol ile fikse edildi ve biyofilm oluşumunun belirlenmesi için örnekler, Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma Uygulama Merkezi SEM laboratuvarına gönderildi. Örnekler SEM (taramalı elektron mikroskobu) yardımıyla incelendi. Örneklerin apikal, orta üçlü ve koronal bölgeden 1000x, 2500x, 5000x, 10000x, 25000x büyütme altında alınan bütün görüntülerde *P. aeruginosa* ve biyofilm oluşumu gözlemlendi (**Resim 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33**). SEM görüntülerinde elde edilen sonuçlara göre örneklerin tüm yüzeylerinde yoğun ve yaygın biyofilm oluşumu gözlemlendi.



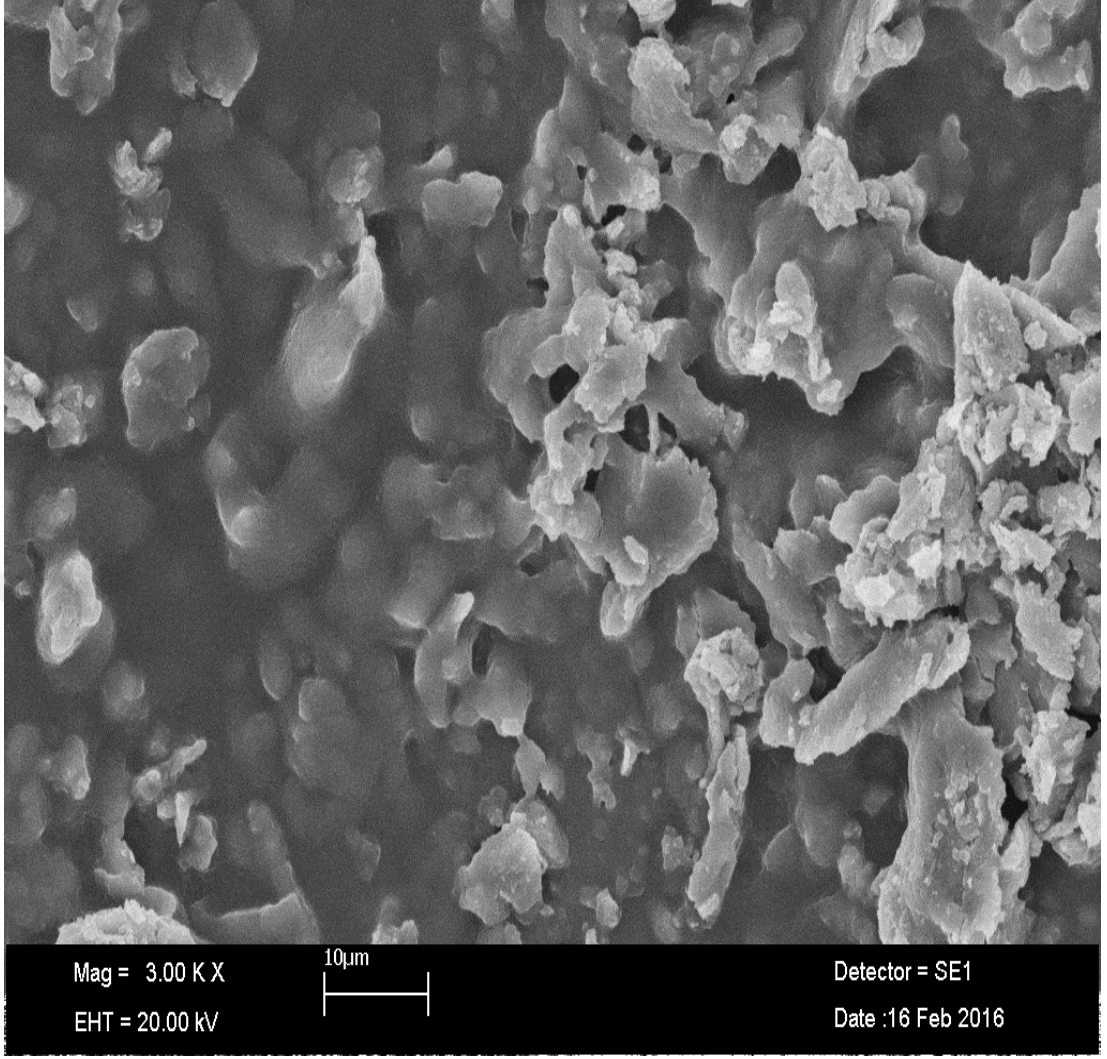
**Resim 27.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 500x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



**Resim 28.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 1000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

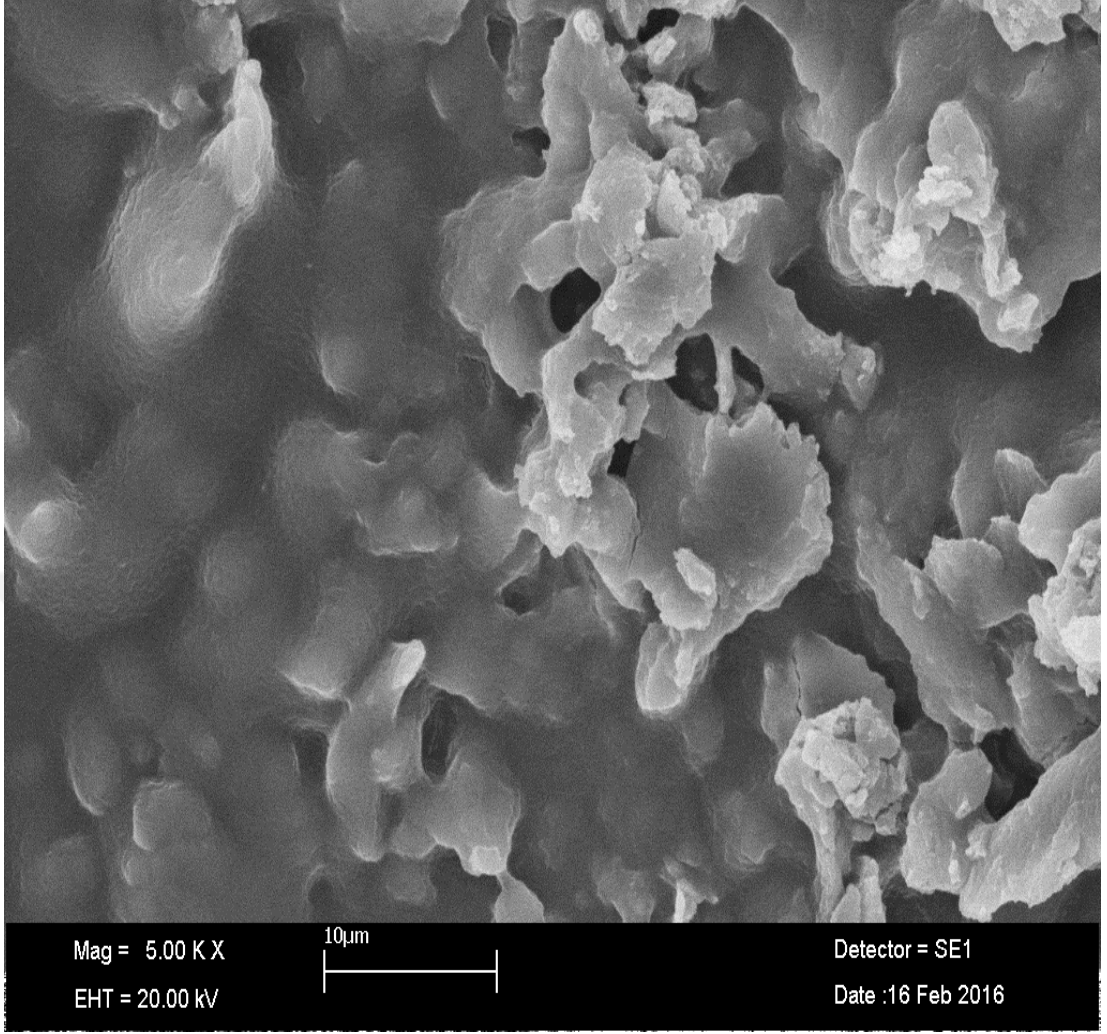


**Resim 29.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 2000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



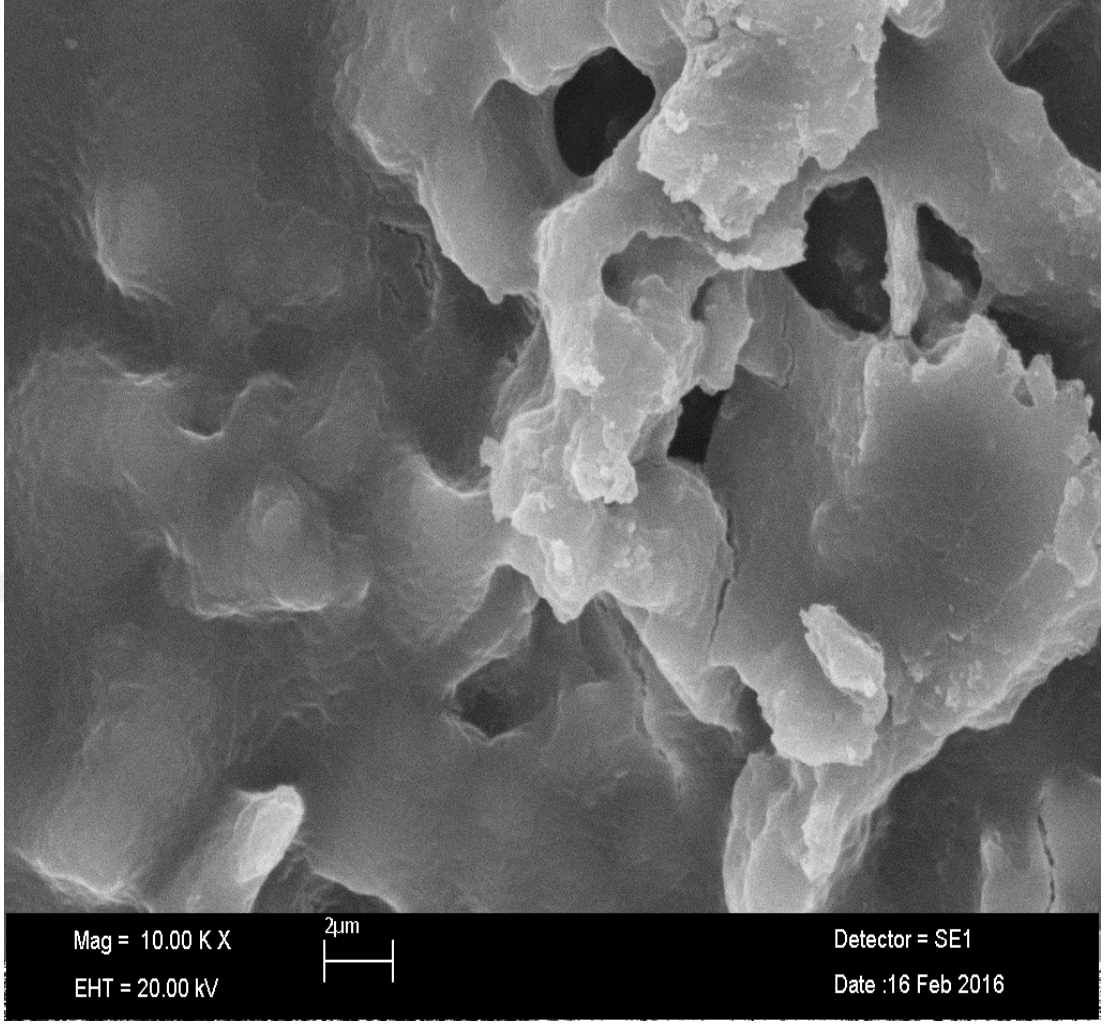
**Resim 30.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 3000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



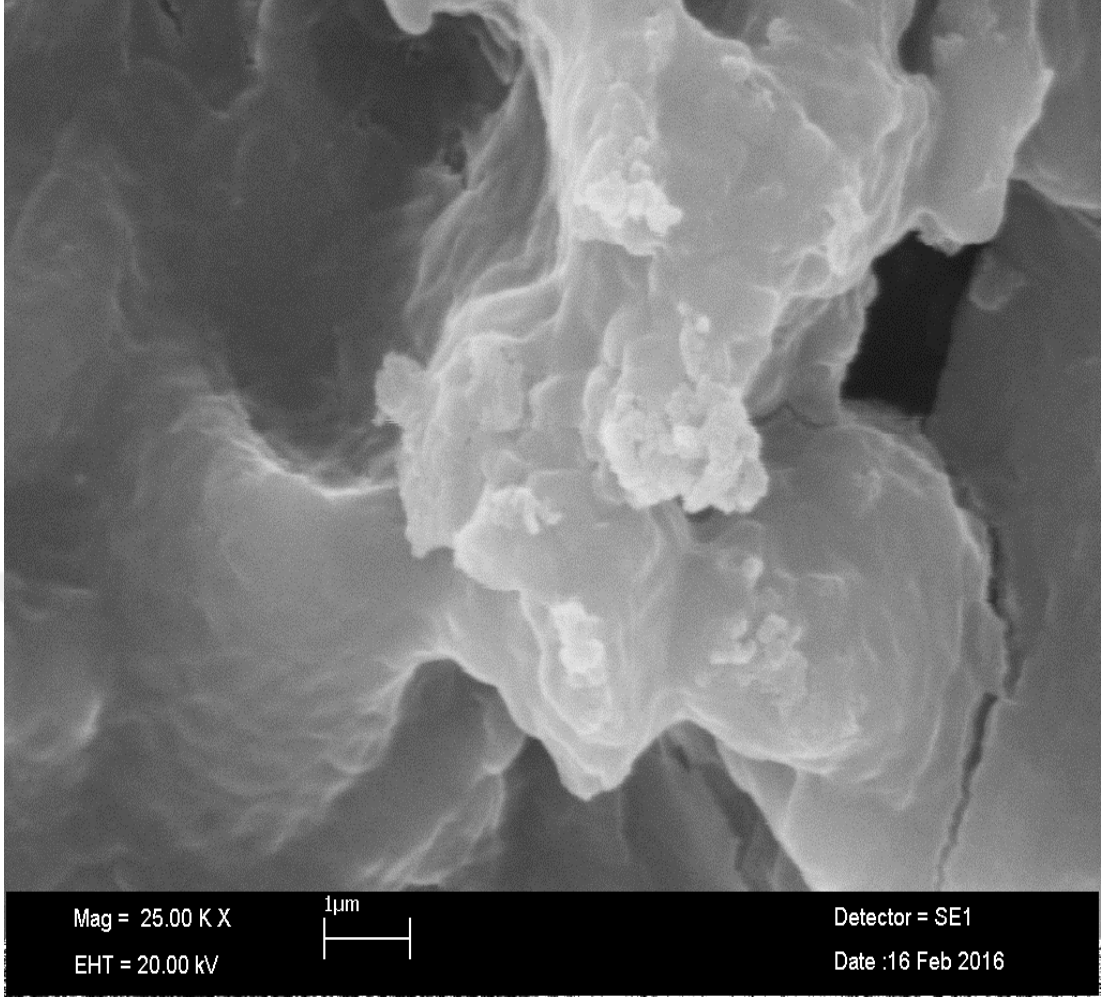


**Resim 31.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 5000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi





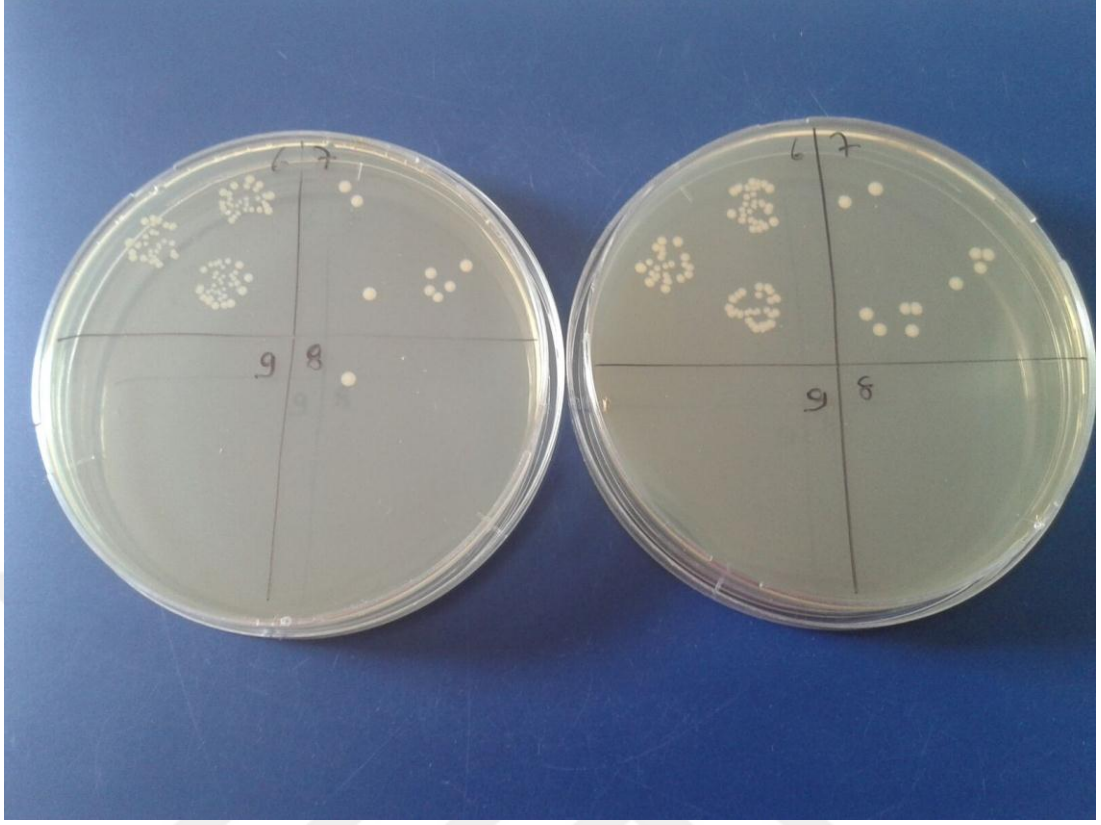
**Resim 32.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 10000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi



**Resim 33.** *P. aeruginosa* 'nın 21 gün inkübasyon periyodundan sonra SEM ile 25000x büyütme altında biyofilm oluşumunun izlenmesi

#### 4.4. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin *E. faecalis* ile oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular

Biyofilm oluşumları belirlenen örneklere deney prosedürleri uygulandıktan sonra sayım yapılmış olup her bir örnekteki mikroorganizma sayıları belirlendikten sonra (**Resim 34**) istatistiksel inceleme yapılarak  $\text{Log}_{10}$  değerleri belli olan grubun normallik testi Shapiro-Wilk analizi kullanılarak belirlendi. Analiz sonucunda bakteri sayılarının dağılımının normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Bundan dolayı analiz için Nonparametrik testler kullanılmasına karar verildi. Bakteri sayılarındaki Logaritmik ortalamaların karşılaştırılması için Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda *E. faecalis* kullanılan grupta kontrol grubu ile %5'lik HEBP ve %7 'lik HEBP kullanılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede herhangi bir fark gözlenmedi ( $P>0,05$ ). %9'luk ( $P<0,01$ ) ve %18 'lik HEBP ( $P<0,01$ ) kullanılan grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark ortaya çıktı. Ancak %9 ile %18 'lik HEBP grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ( $P>0,05$ ). Diğer bir bulgu olarak Beklendiği üzere konsantrasyonun artışına bağlı olarak mikroorganizmaların elimine edilmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark ortaya çıkmaktadır ( $P<0,01$ ) (**Tablo 3**) (**Grafik 2**).

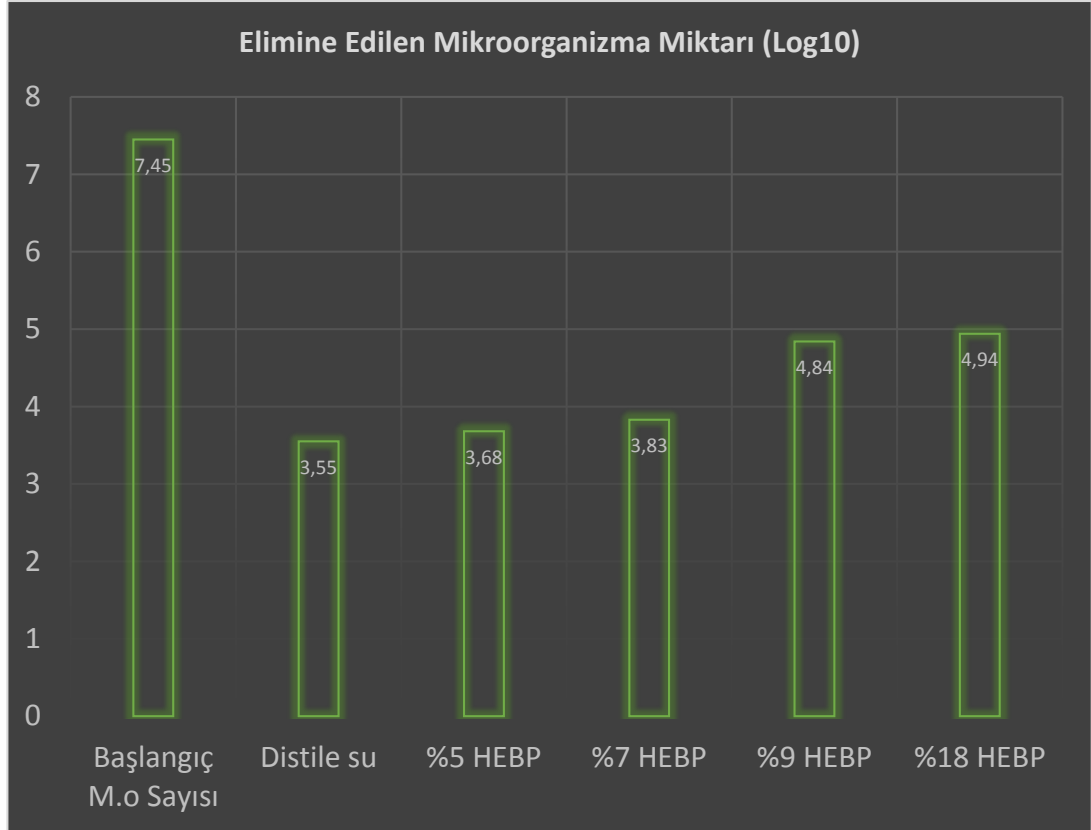


**Resim 34.** TSB besiyerine ekimi yapılan *E. faecalis*'in ekimi yapıldıktan sonraki koloni geliştirme görüntüsü

**Tablo 3.** *E. faecalis* için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir

<i>E. faecalis</i>	Örnek Sayısı	Başlangıç M.o Sayısı (Log <sub>10</sub> )	İrrigasyon sonrası kalan M.o sayısı (Log <sub>10</sub> ) ± SS	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	11	7,45	3,90±0,1 <sup>a</sup>	0,1	3,60	4,204
% 5 HEBP	11	7,45	3,77±0,3 <sup>a</sup>	0,3	3,04	3,90
% 7 HEBP	11	7,45	3,62±0,6 <sup>a</sup>	0,6	2,301	3,99
% 9 HEBP	11	7,45	2,61±0,4 <sup>b</sup>	0,4	1,77	3,00
% 18 HEBP	11	7,45	2,51±0,6 <sup>b</sup>	0,6	1,301	3,01

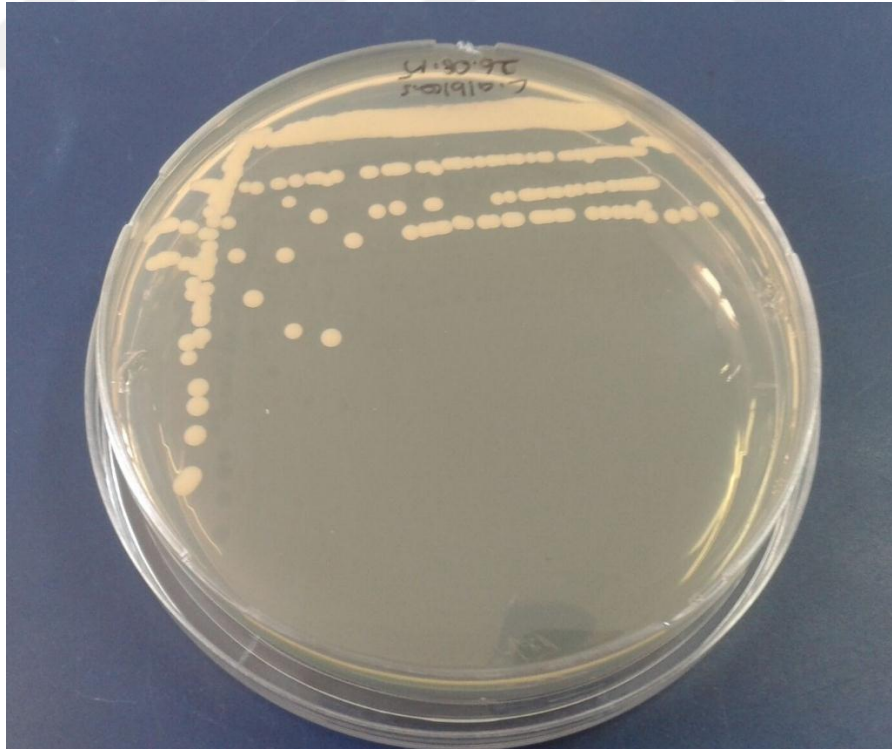
Üst karakterdeki farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P < 0.01$ )



**Grafik 2.** İrrigasyon ile elimine edilen *E. faecalis* bakterisinin yüzdesel dağılımı

#### 4.5. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin *C. albicans* ile Oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular

Biyofilm oluşumları belirlenen örneklere deney prosedürleri uygulandıktan sonra sayım yapılmış olup her bir örnekteki mikroorganizma sayıları belirlendikten sonra (**Resim 35**) istatistiksel inceleme yapılarak Log<sub>10</sub> değerleri belli olan grubun normallik testi Shapiro-Wilk analizi kullanılarak belirlendi. Analiz sonucunda bakteri sayılarının dağılımının normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Bundan dolayı Analiz için Nonparametrik testler kullanılmasına karar verildi. Bakteri sayılarındaki Logaritmik ortalamaların karşılaştırılması için Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda *C. albicans* kullanılan grupta kontrol grubu ile %5'lik HEBP, %7 'lik HEBP ve %9 'luk HEBP kullanılan grup arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede herhangi bir fark bulunamadı (P>0,05). %18 'lik HEBP kullanılan grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark ortaya çıktı (P<0,01) (**Tablo 4**) (**Grafik 3**).

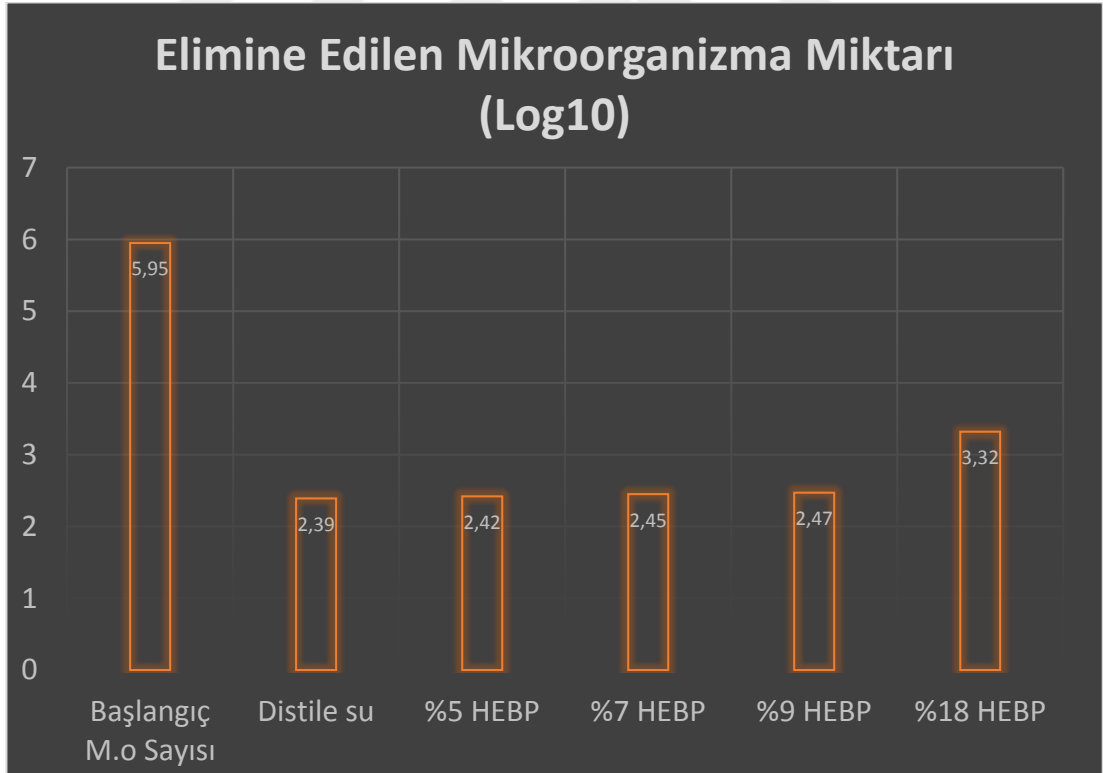


**Resim 35.** SDB besiyerine ekimi yapılan *C. albicans*'ın ekimi yapıldıktan sonraki koloni geliştirme görüntüsü

**Tablo 4.** *C. albicans* için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir

<i>C. albicans</i>	Örnek Sayısı	Başlangıç M.o Sayısı (Log <sub>10</sub> )	İrrigasyon sonrası kalan M.o sayısı (Log <sub>10</sub> ) ± SS	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	11	5,95	3,56±0,1 <sup>a</sup>	0,1	3,0	3,86
% 5 HEBP	11	5,95	3,53±0,1 <sup>a</sup>	0,1	2,47	3,85
%7 HEBP	11	5,95	3,50±0,2 <sup>a</sup>	0,2	2,90	3,85
%9 HEBP	11	5,95	3,38±0,4 <sup>a</sup>	0,4	2,47	3,84
% 18 HEBP	11	5,95	2,63±0,1 <sup>b</sup>	0,1	2,0	2,94

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



**Grafik 3.** İrrigasyon ile elimine edilen *C. albicans* 'ın yüzdesel dağılımı

#### 4.6. Antimikrobiyal Ajanın Etkinliğinin *P. aeruginosa* ile oluşturulan Biyofilm Eliminasyonunun İncelenmesine Yönelik Bulgular

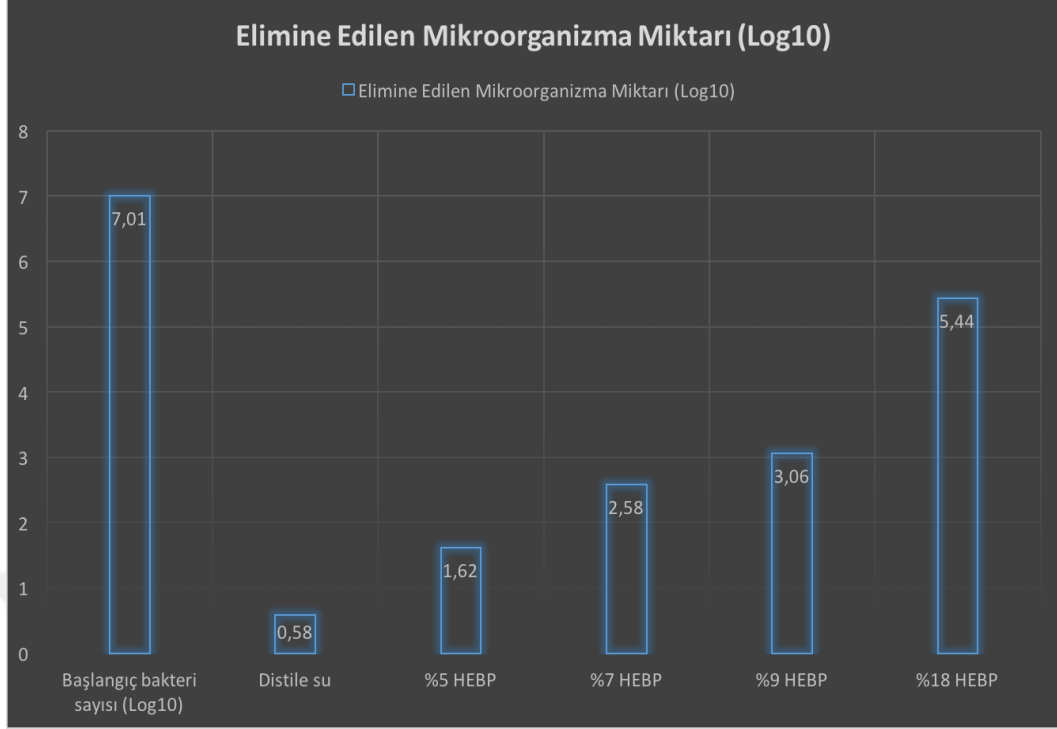
Biyofilm oluşumları belirlenen örneklere deney prosedürleri uygulandıktan sonra sayım yapılmış olup her bir örnekteki mikroorganizma sayıları belirlendikten sonra (**Resim 36**) istatistiksel inceleme yapılarak Log<sub>10</sub> değerleri belli olan grubun normallik testi Shapiro-Wilk analizi kullanılarak belirlendi. Analiz sonucunda bakteri sayılarının dağılımının normal dağılıma uymadığı gözlemlendi. Bundan dolayı Analiz için Nonparametrik testler kullanılmasına karar verildi. Bakteri sayılarındaki Logaritmik ortalamaların karşılaştırılması için Tukey ve Bonferroni testi kullanıldı. Çoklu karşılaştırmalar için Non-parametrik test olan Kruskal-Wallis testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda *P. aeruginosa* kullanılan grupta %5'lik HEBP (P<0,01) ve %18'lik HEBP (P<0,01) kullanılan grup ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. %9 'luk HEBP kullanılan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede bir fark bulundu (P<0,01). %7'lik HEBP kullanılan grup ile kontrol grubu arasında anlamlı derecede bir fark varken (P<0,01), % 5 'lik HEBP grubu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı derecede bir fark bulunamadı (P>0,05) (**Tablo 5**). (**Grafik 4**).

**Tablo 5.** *P. aeruginosa* için final irrigasyonu sonrası kalan bakteri sayısı tabloda verilmiştir

<i>P. aeruginosa</i>	Örnek Sayısı	Başlangıç M.o Sayısı (Log <sub>10</sub> )	İrrigasyon Sonrası Kalan M.o Sayısı ± SS (Log <sub>10</sub> )	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
Kontrol	11	7,01	6,43±0,4 <sup>a</sup>	0,4	5,60	6,94
% 5 HEBP	11	7,01	5,39±0,6 <sup>b</sup>	0,6	4,30	6,03
%7 HEBP	11	7,01	4,43±0,6 <sup>c</sup>	0,6	3,30	4,90
%9 HEBP	11	7,01	3,95±0,4 <sup>c</sup>	0,4	3,30	4,60
% 18HEBP	11	7,01	1,57±0,2 <sup>d</sup>	0,2	1,90	2,74

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





**Grafik 4.** İrrigasyon ile elimine edilen *P. aeruginosa* miktarı

#### 4.7. HEBP'in Etkin Konsantrasyonunun Belirlenmesi

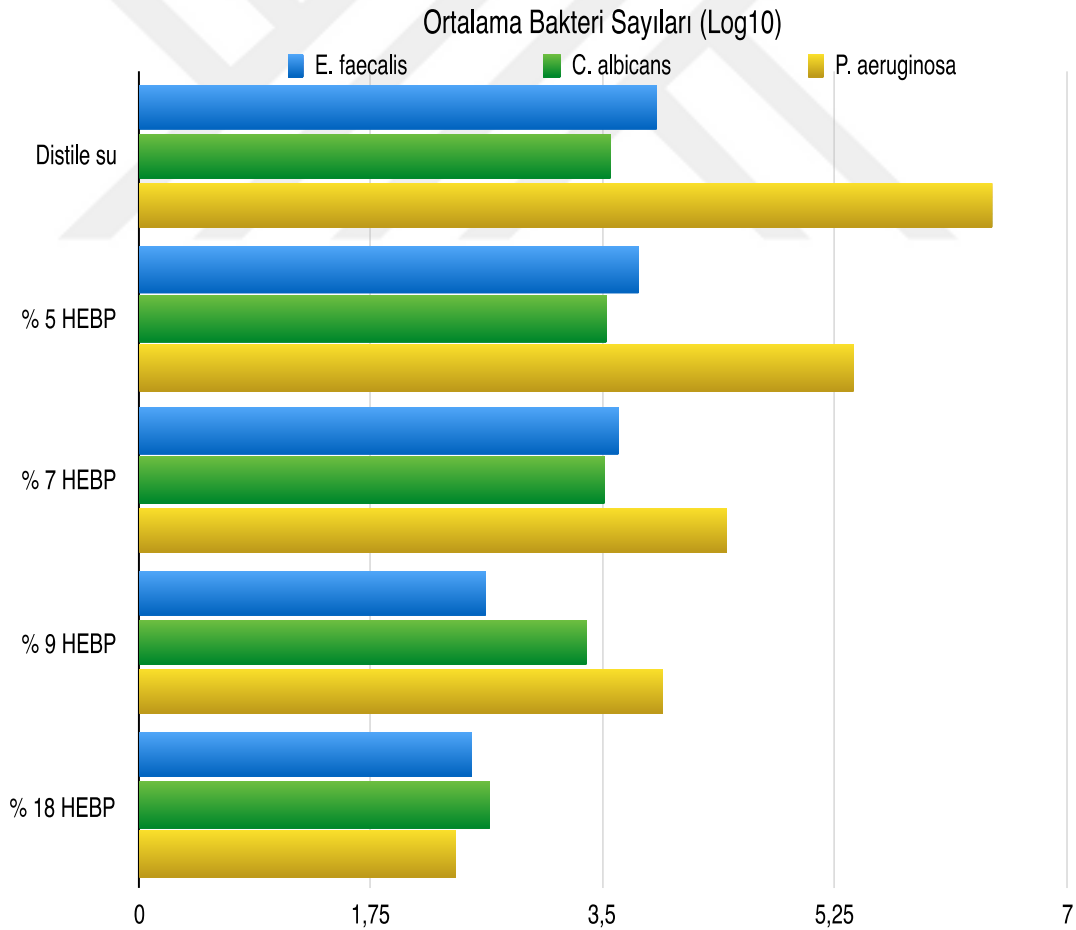
Bu deneyi yapmadaki amacımız güncel bir şelatör olan HEBP'in antibakteriyel etkinliğinin olup olmadığını değerlendirmek eğer antibakteriyel etkinliği varsa hangi konsantrasyonlarda etkin olduğunu belirlemektir. Bu amaçla *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* üzerinde %5, %7, %9, %18 'lik konsantrasyona sahip HEBP uygulandı. Kültür metodu kullanılarak sayım yapıldı.

Elde edilen sonuçlar Anova testi yapılarak değerlendirildi (**Tablo 6**). Grupların herbiri kendi içerisinde değerlendirildiğinde grup içinde istatistiksel olarak anlamlı derecede fark varken ( $P < 0,05$ ) gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamaktadır ( $P > 0,05$ ). Bütün gruplar arasında kontrol grubu ile %5 'lik HEBP grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yokken ( $P > 0,05$ ), %7'lik HEBP ile %9'luk HEBP arasında anlamlı derecede fark bulunmaktadır ( $P < 0,01$ ). %7 'lik HEBP ile %18'lik HEBP arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmaktadır ( $P < 0,01$ ). %9'luk HEBP ile %18'lik HEBP arasında istatistiksel olarak anlamlı derecede fark bulunmaktadır ( $P < 0,01$ ). Tüm gruplarda %5 HEBP ile %7 HEBP konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmazken ( $P > 0,05$ ),

%7 HEBP ile %9 HEBP konsantrasyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmaktadır. ( $P < 0,05$ ) HEBP 'in konsantrasyonunun artması bakteri elimine etme yeteneğini arttırmaktadır (**Grafik 5**).

**Tablo 6.** Final irrigasyonu sonrası 3 farklı Mikroorganizmanın istatistiksel değerlendirme tablosu

	Örnek Sayısı	Başlangıç Mikroorganizma Sayısı (Log <sub>10</sub> )	Median	Standart Sapma	Minimum	Maksimum
<i>E. faecalis</i>	55	7,45	3,23	0,78	1,30	4,20
<i>C. albicans</i>	55	5,95	3,25	0,51	2,08	3,86
<i>P. aeruginosa</i>	55	7,01	4,11	0,89	1,90	7,16



**Grafik 5.** Konsantrasyonlara göre başlangıç bakteri sayısındaki değişimler

## 5. TARTIŞMA

Literatürdeki birçok çalışma kök kanallarındaki enfeksiyonun yaygın olarak anaerobik karakterde polimikrobiyal yapıda olduğunu göstermektedir (251-253). Ancak kök kanal tedavisi, kök kanalının ekolojisini etkileyen çeşitli faktörleri örneğin beslenme faktörlerini değiştirebilir. Bu değişiklik Endodontik enfeksiyonlarda baskın olan mikroorganizmaları sınırlandırabilir (254-257). İnatçı endodontik enfeksiyonlara genellikle *E. faecalis* neden olur, Ancak bununla beraber gram negatif enteric rodlar örneğin *Enterobakter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* veya gram pozitif fakültatif örneğin *Aktinomyces*'ler sebep olabilir (105,152,258,259). Bu bakteriler bir veya birkaç tür birleşerek mono-enfeksiyona sebep olabilirler. *E. faecalis*'in besin olmadan alkali bir ortamda uzun süre yaşamını sürdürdüğü rapor edilmiştir (106,110).

Siren ve ark. endodontik vakalardaki mikrobiyal bulguları incelemek için yaptıkları çalışmada endodontik vakalardan aldıkları örnekleri incelemişler. Kök kanallarından izole ettikleri bakterileri enterik ve enterik olmayan olmak üzere 2 gruba ayırmışlar enterik grup içerisinde en fazla (%33) *E. faecalis* izole etmişlerdir. Kök kanallarından izole ettikleri diğer enterik bakteriler ise *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter sakazakii*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella oxytoga*, *Acinetobacter* ve *Pseudomonas aeruginosa* dır. Kök kanallarından izole edilen ve enterik bakteri grubuyla birleşen enterik olmayan diğer mikroorganizmalar ise *Streptococcuslar*, *Fusobacterium nucleatum*, *Candida albicans* ve *Prevotella intermedia/nigrescens* dir. Aynı çalışmada primer enfeksiyonlarda 55 vakanın 22'sinde enterik bakterilere rastlanırken 31 vakada enterik olmayan bakteriler gözlenmiştir. Retreatment vakalarında ise 17 hastanın 12'sinde enterik bakterilere rastlanırken 5 vakada enterik olmayan bakteriler gözlenmiştir(104).

Wang ve ark. kök kanal tedavisi yenilenen dişlerdeki *E. faecalis* prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 135 dişin 53'ünde (%39,26) *E. faecalis* izole edildiğini, bu 53 dişin 40'ından (%75,5) izole edilen suşların biyofilm oluşturabildiğini göstermişlerdir (260).

*E. faecalis* başarısız kanal tedavileri ile ilişkilendirilmiş dirençli bir bakteridir ve tek başına enfeksiyona neden olabilecek düzeyde virülansa sahiptir (112-114). Kök kanal duvarlarına bağlanabilmesi ve kolonize olup biyofilm oluşturabilmesi sayesinde olumsuz çevresel koşullara rağmen yaşamsal aktivitelerini sürdürebilmektedir. Aynı zamanda, konak hücrelerine bağlanabilmekte ve konak savunmasını etkisizleştirebilmektedir (112,261). İkincil enfeksiyonlarda *E. faecalis*'in kök kanalından %90'a varan bir oranda izole edildiği bildirilmiştir (94,256). Antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda, dirençli olduğu kanıtlanmış mikroorganizmalarla çalışmak, elde edilen bulguların diğer pek çok mikroorganizma için de geçerli olması bakımından tercih nedeni olmaktadır. Bu nedenle *E. faecalis* seçilmiştir.

Antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde, klinik koşulları daha iyi yansıttığı düşünülerek enfekte dişlerden izole edilmiş suşların kullanıldığı çalışmalar da vardır (117,262-265). Ancak klinik izolatların çevresel faktörlere bağlı olarak zamanla uğradığı genetik değişimler bazı genleri aktifleştirirken, bazı genlerin işlevini yitirmesine neden olur. Bu nedenle klinik izolatların bir kısmı biyofilm oluşturabilir (266,267). Baldassarri ve ark. (267) klinik enfeksiyonlardan izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının %80 oranında biyofilm oluşturabildiğini belirtmişlerdir. Toledo-Arana ve ark. (268) bu oranın %87 olduğunu belirtirken, Mohammed ve ark. (269) %93 olduğunu belirlemiş, Dworniczek ve ark. (270) ise elde ettikleri *E. faecalis* klinik izolatlarının %59 oranında biyofilm oluşturabildiğini bildirmişlerdir. *E. faecalis*'in sahip olduğu *fsr*, *GeLE*, *esp*, *epa*, *atn* gibi genlerin biyofilm oluşumu ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (112,266). Toledo-Arana ve ark. (268) *E. faecalis*'in klinik izolatlarının biyofilm oluşturmasından sorumlu genleri inceledikleri bir çalışmada, *esp*-pozitif izolatların %93,5 oranında biyofilm oluşturabildiğini, bununla birlikte *esp*-negatif izolatların biyofilm oluşturamadığını belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar, iki farklı mutant *E. faecalis* izolatının *esp* geninin inaktive edilmesiyle biyofilm oluşumunun zarar gördüğünü belirtmişlerdir (268). Yine jelatinaz (*GeLE*) ve serin proteaz (*SprE*), *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmasından sorumlu tutulan enzimlerdir. *GeLE* ve *SprE* hücrenin otolizini düzenleyerek eDNA salımını uyarmaktadır (260,271). Özellikle *esp*-negatif izolatların biyofilm oluşturabilmesinde *GeLE* enziminin büyük rol oynadığı bildirilmiştir (272,273). *fsr* geninin jelatinaz enziminin salımını uyararak, durağan

fazdaki *E. faecalis* hücrelerinin biyofilm oluşturmalarını uyardığı belirtilmiştir (269,273). atn geninin *E. faecalis* hücrelerini otolize uğratarak biyofilm oluşumunun erken dönemlerinde, ekstraselüler matris oluşumu için ihtiyaç duyulan ekstraselüler DNA'nın ortama salınmasını sağladığı bildirilmiştir (274,275). Wang ve ark. (260) kök kanal tedavisi yenilenen dişlerdeki *E. faecalis* prevalansını belirlemek amacıyla yaptıkları çalışmada, 135 dişin 53'ünde (%39,26) *E. faecalis* izole edildiğini, bu 53 dişin 40'ından (%75,5) izole edilen suşların biyofilm oluşturabildiğini, biyofilm oluşturan suşların %88,68'inde GelE salımının artmış olduğunu bildirmişlerdir. Tüm bu özellikler dikkate alındığında Wang ve ark (123), Pappen ve ark (2), Badr ve ark (266). Stojicic ve ark (265) ve Deng ve ark (267) klinik olarak elde edilen izolatları kullanmışlardır. Baca ve ark (1), Ariaz-mollis ve ark (70), Guerreiro- Tanomaru ve ark.(280), Li ve ark (281) ise standart suşları kullanmışlardır. Görüldüğü gibi, sahip olduğu genler *E. faecalis*'in biyofilm oluşturabilmesini doğrudan etkilemektedir. Biyofilm çalışmalarında genetik özellikleri tam olarak bilinmeyen klinik izolatların kullanılması ve standart suşlar kullanılması arasında farklı sonuçlar elde edilebilir ve diğer çalışmalar ile kıyaslamak zorlaşır. Ayrıca klinik izolatları laboratuvar ortamında işlem yapılacağı için ortamın değişmesiyle mutasyona uğrayabilirler. Bu nedenle çalışmamızda sekonder/inatçı enfeksiyonlardan izole edilen bir suş yerine genetik özellikleri bilinen, mutasyona uğramamış saf soy olan, biyofilm oluşturabilen ve birçok çalışmada kullanılmış olan ATCC 29212 suşu tercih edilmiştir (64,276-280).

Mantarların tedavi edilmemiş kök çürüklerinde (281), dentin tubüllerinde (282), inatçı apikal periodontitise sahip tedavi edilmiş kök kanallarında (138), asemptomatik apikal periodontitisli dişlerin apikal kök yüzeylerinde (50) ve periapikal dokulardaki varlığı (152) kültür yöntemi ve mikroskopik inceleme ile kanıtlanmıştır. Mantarlar kök kanallarına başlangıç tedavisi sırasında, restorasyonların sızıntısıyla veya dentin tubüllerine kolonizasyonla ulaşabilmektedirler (283).

Mantarların yaklaşık 50000 türünün bilinen 200 tanesi insan ve hayvanlarda hastalık yapmaktadır (284). Patojenik mantarların çoğu Ascomycetes, Basidiomycetes, zigomycetes ve Deuteromycetes ailesinin türleridir. Fırsatçı patojeniteye sahip en çok karşılaşılan türler ise *Candida*, *Aspergillus* ve *Deuteromycetes* ailesine ait üyelerdir (285). Candidalar yüzeyel hastalıklardan hayati

tehdit eden hastalıklara kadar insanlarda çok geniş aralıkta hastalıklara neden olabilir. Patojenik mantarların çoğu normalde insan mikrobiyotasının bir parçası olup çevresel etkenler altında yüksek insidansa sahip Candidiazis gibi hastalıklara sebep olur. Candidalar sağlıklı bireylerde oral kavite, gastrointestinal sistem, anüs, kasık, vajinal kanalda bulunmaktadır (286). Bu endojen Candidaların çoğu fırsatçı patojenlerdir. Normal mikrobiyata da herhangi bir dengesizlikte enfeksiyona sebep olabilirler (285).

Mantarlar oral mikrobiyatanın küçük bir parçasıdır. Mantar mikrobiyotasının büyük bir kısmını ise Candidalar oluşturmaktadır. *C. albicans* ise hem sağlıklı hemde immün sistemi baskılanmış kişilerde en çok görülen mantar türüdür (287). *C. albicans* 'ın sağlıklı kişilerde Oral kavitedeki insidansının %30 ile %45 oranında olduğu, immün sistemi baskılanmış kişilerde ise bu oranın %95 olduğu bildirilmiştir (288). Dil dorsumu *C. albicans* 'ın ilk doğal habitatı mukoza (289), kök (290), periodontal dokular (291), dentin (292) ise ikincil habitatıdır. Oral kaviteden *C. albicans* 'dan sonra büyük oranda izole edilen diğer mantar türleri ise *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, *Candida inconspicua*, *Candida dubliniensis*, *Candida tropicalis*, ve *Saccharomyces* türleridir (138).

Son dönemlerde çalışmalarda dikkat edilen konu patojenik mantarların endodontik enfeksiyonlarla ilişkisidir. Bu çalışmalarda endodontik tedaviye dirençli mantarların varlığı tanımlanmaktadır (111,293). Waltimo ve ark (293) kronik apikal periodontitis tedavisine direnç gösteren 692 vakada %7 oranında mantar bulunduğunu bildirmişlerdir. 48 olan mantar türü sayısının 47 sini bu çalışma doğrultusunda elde edilen türlerde tanımlayabilmişlerdir. Baumgartner ve ark (130) yaptığı çalışmada teşhis düzeyinde görülen 20 mayanın 16 sının *C. albicans* olduğu bildirilmiştir. Diğer mantar türleri ise *Candida glabrata*, *Candida guilliermondii* ve *Geotrichum candidum* olduğu bildirildi. Aynı çalışmada tek bir örnekte *C. albicans* ile birlikte bir zincirden gelişen *C. glabrata* belirlendi. Bu çalışmada *C. albicans*'ın enfekte kök kanallarında en yaygın mantar türü olduğu bir kez daha belirlenmiş oldu (293).

Çeşitli araştırmalarda birincil enfeksiyonlarda kök kanallarında mantarların bulunması %0.6'dan %10'a kadar değişen oranlarda bulunmuştur (257,294,295) ve bu oran tedaviye dirençli vakalarda %3.7-10 arasında değişmektedir.

Endodontik tedavi uygulanmamış enfekte kök kanalında bulunma oranları Scully (296), McDonald ve arkadaşları (297), Leavitt ve arkadaşları (294), Goldman ve Pearson (257), Kessler'e (295) göre %0,6 ile %10 arasında değişkenlik göstermektedir.

Endodontik tedavi görmüş inatçı periapikal patolojili vakalarda Molander ve arkadaşları, Sunqvist ve arkadaşlarına göre *C. albicans* bulunma oranı %3,7 ile %10 arasındadır (161, 298). Waltimo ve arkadaşları tedavi görmemiş dişlerin enfekte pulpasında %7, kronik inatçı patolojili dişlerde ise bu oranın %55 olduğunu bildirmişlerdir (127,150).

*Candida* türlerini Siqueira PCR ile 50 enfekte kök kanalından yalnızca 1'inde saptamıştır (157). Siqueira, SEM ile primer kök kanal enfeksiyonlarında mikrobiyal kolonizasyon varlığını göstermiş ve 15 dişin 1'inde maya benzeri hücreler görmüştür ve bu maya benzeri hücreler tomurcuklanmayla büyük koloniler oluşturmuşlardır (107).

Egan ve ark. yaptıkları çalışmada birincil enfeksiyonlu dişlerde mantar bulunma sıklığını %5,7, ikincil enfeksiyonlu dişlerde %16 olarak bildirmiştir (283).

Araştırmalar enfekte kök kanallarındaki en yaygın mantar türünün *C. albicans* olduğunu göstermektedir (293).

*C. albicans* 5 mikrometre çapında blastospor görünümünde ve düşük ısı seviyeleri ile besin kıtlığında pseudohif yapısında olan bir mayadır. 20-25°C'de inkübe edildiğinde yuvarlak, kalın hücre duvarlı, sağlam yapıli formlara dönüşürler. İnsan bedeninde neden olduğu enfeksiyonlar bilinmekle birlikte, oral kavite, dentin tübülleri ve periapikal bölgedeki varlıkları mikrobiyolojik tekniklerin gelişmesiyle ortaya çıkmıştır (296).

Şen ve ark bakteri ve mantar türlerini gözlemlemek için SEM kullanarak yaptıkları çalışmada çekilmiş enfekte 10 insan molar dişinin SEM altında incelenmesi sonucunda 4 dişin kök kanalları ve dentin tübüllerinde *C. albicans* türünün bulunduğunu bildirmişlerdir (41).

Araştırmacılar kültür yöntemlerini kullanarak kanal tedavili dişlerde *C. albicans*'ı %3'den %18'e ulaşan değerlerde izole etmişlerdir (299-302).

Şen ve arkadaşları, Waltimo ve arkadaşları Candidaların dentin tübüllerine veya kök kanalına sızdıktan sonra kompleks biyofilm yapılar oluşturduklarını ve bu yapı içinde sodyum hipoklorit ve kalsiyum hidroksit gibi kök kanal antimikrobiyal ajanlarına yüksek oranda direnç gösterdiklerini rapor etmişlerdir (127,145). Waltimo ve arkadaşları (127) *C. albicans*'ın bu tez çalışmasındaki sonuçlarla desteklendiği gibi *E. faecalis* 'ten daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Hagihara ve arkadaşlarının çalışmalarına göre Candidalar kollajenik aktiviteleri ile dentinin kendisini besin kaynağı olarak kullandığını bildirmişlerdir. Tüm bu faktörler alt alta sıralandığında Candidaların bakterilere göre çok daha dirençli olmaları kök kanal tedavisi sırasında geleneksel antimikrobiyal ajanlarla onları inhibe etmeyi zorlaştırmaktadır (303).

Mantarların dirençli mikroorganizmalar olması (130,146,304) ve mantar türleri içerisinde *C. albicans* ın en çok izole edilen tür olması nedeniyle (149,305,306) bu tez çalışmasında *C. albicans* (ATCC 10231) suşu kullanılmıştır.

Etidronik Asidin mikroorganizmalara karşı etkin konsantrasyonunun bulunması amacıyla yaptığımız çalışmada *C. albicans* 'ın *E. faecalis* ve *P. aeruginosa* dan çok daha dirençli olduğu görülmüştür. Etidronik asit *E. faecalis* için %9 'luk, *P. aeruginosa* için %5 lik konsantrasyonda bile anlamlı derecede etkin iken *C. albicans* için %18'lik konsantrasyonda etkin bulunmuştur.

*P. aeruginosa* kalın alginik bir kapsüle sahiptir. klinik olarak izole edilen *P. aeruginosa* dış yüzeyinde polisakkarit bir tabakaya sahip olabilir. Tekrarlayan şeker zincirlerinden oluşan mukoid veya glikokaliks bir tabakaya sahiptir. Bu tabaka antibiyotikler için bir bariyer görevi görürken antikorlar için opsanizasyon sağlar (307).

Love ve arkadaşları *P. aeruginosa*'nın smear olsun ya da olmasın kolaylıkla dentin tübülleri içine penetre olabildiklerini rapor etmişlerdir (152). Piccolomini ve arkadaşlarına göre *P. aeruginosa* kök kanal sistemi florasındaki tüm bakterilerden dentin tübüllerine daha çok ve daha derin yerleşim gösteren birkaç bakteriden biridir. Böylelikle kök kanal irrigasyon solüsyonlarının ve ilaçlarının antibakteriyel etkilerinden korunabilmektedir (154).



Leonardo ve arkadaşları revaçta olan kök kanal patlarının antimikrobiyal aktivitelerini araştırmışlar ve *E. faecalis* ile *P. aeruginosa*'nın var olan diğer mikroorganizmalara oranla daha dirençli olduklarını bildirmişlerdir(155).

*Pseudomonas aeruginosa* bu tez çalışmasında kök kanal mikroflorasında antimikrobiyal ajanlarla direkt temas halinde iken dirençsiz mikroorganizmaları örnekleme için seçildi. Ancak bu bakteri hareketli olmasından dolayı dentin tübüllerinde kolaylıkla göç edebilir, smear tabakasını delebilir ve kök kanal antimikrobiyal ajanlarına direnç gösterebilir.

Bakterilerin biyofilm oluşturabilmeleri için ortamda tutunabilecekleri bir yüzey ve sıvı akışı olmalıdır. Endodontide biyofilm çalışmalarında bakterilerin tutunacağı yüzey olarak çekilmiş dişlerin kök kanalları (67,71,308,309), çekilmiş dişlerden hazırlanan dentin örnekleri (58,79,277), hidroksiapatit diskler (75,264,310), polistiren yüzeyler (64,66,68,70,276,311), cam yüzeyler (63,264,312,313), seramik yüzeyler (60) ve sellüloz nitrat membran filtreler (57,61,65) kullanılmıştır.

Bu tez çalışmasında bakterilerin tutunacağı yüzey olarak çekilmiş dişlerin kök kanal yüzeylerini tercih ettik. Çekilmiş dişlerin kök kanallarını tercih etme nedenimiz aynı anda dişin apikal üçlünün, orta üçlünün, koronal üçlünün enfekte edilebilmesi ve klinik uygulamaları daha iyi taklit etmesidir.

Etidronik asit proteolitik ve antimikrobiyal özellikleri sağlayan etkilerinin dışında NaOCI ile bileşik olarak kullanılabilen bir şelatördür (232).

Christensen ve ark yaptıkları çalışmada EDTA 'nın aksine Etidronik asit'in zayıf bir dekalsifiye edici ajan olduğu görülmüştür(257).

Aubut ve ark tarafından yapılan çalışmada NaOCI ve Etidronik asit kombinasyonunun sonucu oluşan çözeltinin %2.5 'luk NaOCI 'den daha iyi bir doku çözücü etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (314).

De-Deus ve ark'nagöre Etidronik asit, Sodyum hipoklorit ile hipokloroz asidi denge tutar. Aynı zamanda NaOCI+HEBP kombinasyonu kullanımı rezilon /epipaninin dentine bağlanmasını optimize eder (315).

Etidronik asit kalsiyum hipoklorit ile birleşebildiği için havuz suyunun dezenfeksiyonunda kullanılır. Etidronik asit inorganik bileşiklerle karşılaştığında renk

değişikliği oluşturmaz. Bunun yanında, Paqué ve ark göre rotary enstrümantasyon sırasında kök kanalına dentin artıkları birikimini azaltır (316).

Zehnder ve ark tarafından yapılan çalışmada Etidronik asit, sitrik asit veya EDTA'ya olası bir alternatif olarak önerilmiştir (246,317).

Tartari ve ark tarafından yapılan çalışmada NaOCI ve Etidronik asit bileşik olarak kullanıldığında NaOCI'in doku çözücü özelliğinde herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir (247).

NaOCI ile herhangi bir tepkimeye girmemesi, NaOCI ile bileşik olarak kullanılabilmesi, EDTA ve Sitrik aside alternatif olarak önerilmesi, yeni bir irrigasyon ajanı olması, antimikrobiyal etkinliği ve bu etkinliğin hangi konsantrasyonlarda olduğunun ortaya çıkarılması amacıyla bu tez çalışmasında Etidronik asit kullanıldı.

Dünyanın her yanında yapılan araştırmalar sonucunda patojenik mikroorganizmaların ve pulpanın uzaklaştırılması üzerine etkisinden dolayı sodyum hipoklorit endodonti de en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonudur (166-168).

NaOCI ile yapılan biyomekanik preperasyonun kök kanal sistemindeki mevcut mikroorganizmaların elimine edilmesinde etkili olduğu kanıtlanmıştır (306).

Byström ve Sundqvist'in yaptığı çalışmada %0.5 'lik NaOCI 'in antimikrobiyal özelliklerinin steril salin solüsyonundan daha fazla olduğu bildirilmiştir (318)r.

Siquera ve ark yaptıkları çalışmada NaOCI 'in konsantrasyonu azaldıkça antimikrobiyal etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (319).

Önçağ ve ark çeşitli irrigasyon ajanlarının antibakteriyel özelliklerini ve toksik etkilerini karşılaştırmak için yaptıkları çalışmada *E. faecalis* ile oluşturulan biyofilm üzerine %2'lik cetroxidine ilave edilmiş klorheksidin jelin % 5,25'lik NaOCI'e göre daha fazla etkin olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada 2 hafta sonra %5,25'lik NaOCI in klorheksidine göre daha fazla toksik etki gösterdiği bildirilmiştir (320).

Oliveira ve ark yaptıkları *E. faecalis*'e karşı çeşitli irrigasyon ajanlarının antibakteriyel etkinliklerini değerlendirmek için yaptıkları in-vitro çalışmada %5,25 NaOCI ve %2 klorheksidin final irrigasyon solüsyonu olarak kullanıldığında her iki irrigasyon ajanında da *E. faecalis* bakterisini elimine etmede herhangi bir fark

bulunamamıştır. Ancak aynı çalışmada kök kanal enstrümantasyonu sırasında %1.5 'luk NaOCI konsantrasyonunun bakterileri elimine etmede kontrol grubu olarak kullanılan distile su ile arasında istatistiksel olarak herhangi bir fark bulunamamıştır (321).

Rizvi ve ark yaptıkları çalışmada MTAD, klorheksidin ve NaOCI'in antibakteriyel etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmada bu 3 irrigasyon ajanında antibakteriyel etkinliği arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamışlardır (322).

Shih ve ark yaptıkları çalışmada NaOCI'in konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal özelliğinin arttığı gösterilmiştir. Ancak bunun yanında konsantrasyonun artması NaOCI'in sitotoksik etkinliğinde arttırmıştır (323).

Ayhan ve ark. çeşitli endodontik irrigantların Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis, Streptococcus salivarius, Str. pyogenes, Escherichia coli ve Candida albicans üzerindeki etkinliklerini inceledikleri çalışmada %5,25'lik NaOCI'in tüm mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin bulunduğunu göstermişlerdir. Ayrıca NaOCI 'in konsantrasyonu azaldıkça antibakteriyel etkinliğinin azaldığını bildirmişlerdir (324).

Gomez ve ark yaptıkları diğer bir çalışmada ise farklı konsantrasyonlarda NaOCI (0.5%, 1%, 2.5%, 4% ve 5.25%) ve Klorheksidin glukonat (0.2%, 1% ve 2%) kullanımının E. faecalis ile oluşturulan biyofilm üzerine antibakteriyel etkilerinin incelendiği çalışmada 5 dakika uygulanması sonrasında klorheksidin glukonat (0.2%, 1% ve 2%) ve NaOCI (%5,25) konsantrasyonların en etkili konsantrasyonlar olduğunu bildirmişlerdir. Aynı çalışmada %2.5' luk NaOCI kullanımının 4 dakika uygulanması ile %5,25'lik NaOCI konsantrasyonunun 30 sn den daha kısa süre uygulanmasının aynı antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir (325).

Bu tez çalışmasında standardizasyon amacıyla süre sabit tutulmuştur. Ancak daha sonra yapılacak olan Etidronik Asit'in farklı antibakteriyel etkinliklerinin inceleneceği çalışmalarda daha düşük konsantrasyonlardaki Etidronik asidin daha uzun süre uygulanmasının, yüksek konsantrasyonda daha kısa süre uygulanması arasında fark olup olmadığı ayrı bir çalışma olarak değerlendirilip deney olarak uygulanabilir.

Khademi ve ark çeşitli irrigantların antibakteriyel etkinliklerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada NaOCI, doksisisiklin ve klorheksidin 7, 14, 21, 28. günlerdeki antibakteriyel etkinliklerine bakmışlar ilk gün en etkin irrigantın NaOCI olduğunu görmüşlerdir (326).

Siqueira ve ark tarafından yapılan %1, %2,5, %5' lik NaOCI'in bakteri popülasyonu üzerindeki etkilerinin incelendiği çalışmada NaOCI'in konsantrasyonu arttıkça inhibisyon zonunda arttığı görülmüştür (319).

Baumgartner ve Cuenin yaptıkları çalışma ile NaOCI'in %2.5 ve %5,25' lik konsantrasyonlarının enstrümente edilmemiş dentin duvarlarındaki predentini ve pulpal kalıntıları kaldırdığını göstermiştir. Bu sonuçlardan NaOCI 'in düşük konsantrasyonlarda (%2.5) kullanımının yeterli bir doku çözücü ve antimikrobiyal özellik sağladığı anlaşılmıştır (33).

NaOCI 'in antimikrobiyal özellikleri ve doku çözücü özellikleri ile yapılan çalışmalar dikkate alındığında bu tez çalışmasında her ege değişiminde kullanılmak üzere ara irrigasyon solüsyonu olarak %2,5 'luk NaOCI kullanmaya karar verdik. Bu konsantrasyonu seçmemizde etkili olan sebeplerden biri de NaOCI'in konsantrasyonu arttıkça toksik etkisinin de fazla olmasıdır. Bu tez çalışmasında Etidronik Asit'in konsantrasyonu arttıkça antimikrobiyal etkinliğinin arttığı gözlemlendi. Bu sonuç ara yıkamada kullanılan NaOCI'in antimikrobiyal etkinliğine destek verdiğini gösterir.

NaOCI tek başına yeterli bir irrigasyon solüsyonu gibi gözüksede, dentinin inorganik kısmını çözemez bu yüzden enstrümentasyon sırasında smear tabakası oluşumunu engelleyemez (327).

Kök kanal sisteminde mekanik preperasyonu engelleyen kalsifikasyonlara sık rastlanmaktadır (328). Bu kalsifikasyonların önlenmesi ve inorganik maddelerin çözülebilmesi için kök kanal tedavisi sırasında EDTA ve Sitrik asit gibi demineralize edici ajan kullanımı tavsiye edilmektedir (329). Biyouyumlu olduğu birçok araştırmada açığa çıkarıldığı için EDTA ve Sitrik asit günümüzde kök kanal preperasyonunda sıklıkla kullanılmaktadır (330).

Sitrik asit EDTA 'ya göre daha düşük konsantrasyonda etkin iken, her iki solüsyonda smear tabakası kaldırma da yüksek verimlilik gösterirler . Bunların smear

tabakasını kaldırma etkinliğinin yanında kanal duvarlarında kolonize olan biyofilmleri kaldırma etkinliği de vardır (246).

Patterson ve ark ile Yoshida ve ark yaptıkları çalışmalarda Antiseptik kapasitesi sınırlı olmasına rağmen, EDTA'nın kanal içi mikrobiyatayı azaltmada serum fizyolojiktan daha etkin olduğu kanıtlanmıştır (331, 332).

Byström ve ark yaptıkları çalışmada kök kanal sistemlerindeki mevcut bakterilerin azaltılması için NaOCI 'in tek başına yeterli olmadığını, NaOCI ve EDTA'nın kombine kullanımının çok daha etkili olduğunu bildirmektedir (91).

Bütün bu özellikler dikkate alındığında bu tez çalışmamızda her ege değişiminde NaOCI 'in yanında demineralize edici ajan olarak %17 'lik EDTA tercih ettik.

Bu tez çalışmasında örneklerin seçimi konusunda literatür taraması yapıldığında aynı metodolojiye sahip antimikrobiyal etkinliğin değerlendirildiği çalışmalarda

Arias-moliz ve ark (2), Mohammadi ve ark (333), Estrella ve ark (197), De paz ve ark(72), Roçaz ve ark (93), Jacob ve ark(291) insan dişlerinden elde edilen dentin örnekleri kullanırken

Giardino ve ark (61), Sena ve ark (334), Spratt ve ark (57), Bryce ve ark(71), Shrestha ve ark(75), Zapata ve ark(79) selüloz nitrattan yapılan membran filtreleri kullanmışlar

Twankoli ve ark (89), Arias-moliz ve ark(278), Aubut ve ark (315),Shen ve ark(310), Stojicic ve ark(346) hidroksiapatit diskler kullanmışlar

Lundstorm ve ark (77), Arias moliz ve ark(278), Paque ve ark (317), Coons ve ark(318) cam yüzeyler kullanırken, Liu ve ark (74) seramik yüzey kullanmıştır.

Bhuva ve ark(78), Wu ve ark(80), Soukas ve ark(82), Kuştarcı ve ark(84), Aendorf ve ark (290), De deus ve ark(316) Polisitren yüzey kullanmış

Siquera ve ark (149), Eddy ve ark (335), Evans ve ark (336), Schafer ve ark (337) sığır kesici dişleri kullanmışlar

Ercan ve ark (338), Delgado ve ark (339), Ferrer luque ve ark (340), Cachovan ve ark (341), Oliviera ve ark. (321), Ruff ve ark (342) çekilmiş tek köklü tek kanallı insan dişleri kullanmışlardır.

Klinik uygulamaları daha iyi taklit edebileceğini düşündüğümüz için bu tez çalışmasında örnek seçiminde yaşları 25-45 arasında değişen hastalardan ortodontik veya periodontal sebeplerle çekilmiş insan dişleri kullanıldı. Dişlerin tek köklü ve tek kanallı olduğu radyografik olarak belirlendi. Birden fazla kök kanalına sahip dişler çalışma dışı bırakıldı yerlerine şartları sağlayan çekilmiş insan dişleri kullanıldı.

Ferrer-Luque ve ark maleik asit, laktik asit ve EDTA'nın *E. faecalis* ile oluşturulan biyofilm üzerine antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada örnek olarak tek köklü ve tek kanallı çekilmiş insan dişi kullanmışlardır. Dişlerin köklerinin uzunluğu 14 mm olacak şekilde elmas diskler kullanarak dişleri kesmişlerdir. Çalışma boylarını 15 no'lu K-file eğe kullanarak göz ile eğenin apikalden çıktığını görüp eğeyi 1mm geri çekip lastik rondeli çalışma boyuna sabitleyerek çalışmayı planlamışlardır (340).

Baca ve ark farklı irrigasyon solüsyonlarının *E. faecalis* ile enfekte edilmiş kök kanalları üzerinde antibakteriyel etkinliklerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada ise örnek olarak tek köklü ve tek kanallı çekilmiş insan dişi kullanmışlardır. Dişlerin tek köklü ve tek kanallı olduğu radyografi ile kontrol edilmiştir. Diş köklerinin uzunluğu 12 mm olacak şekilde elmas diskler kullanarak dişleri kesmişlerdir. Çalışma boylarını 10 no'lu K-file eğe kullanarak göz ile eğenin apikalden çıktığını görüp eğeyi 1mm geri çekip lastik rondeli bu boya sabitleyerek belirlemişlerdir (343).

Souza ve ark insan dentini üzerinde CHX 'in etkilerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada kullandıkları dişler 20-35 yaş arası periodontal problem nedeniyle çekilmiş olan dişlerden seçmişler. Dişlerin köklerinin uzunluğu apikalden itibaren 15 mm olacak şekilde belirlemişler ve radyografi yardımıyla kontrol etmişlerdir. Çalışma boylarının belirlenmesinde 15 no'lu K-file kullanmışlardır (248).

Literatür araştırmaları sonucunda bu tez çalışmasında diş lerin boyları apikalden 14 mm olacak şekilde kesildi. Çalışma boyları 15 no'lu K- file eğe kullanılarak eğenin majör foramenden çıktığı görüldükten sonra kanal eğesi 1mm geri çekilerek koronaldeki lastik rondel sabitlenmesi ile tespit edildi.

Örneklerin boylarının tespiti için literatür incelendiğinde

Delgado ve ark dişleri mine-sement bileşim bölgesinin 2-3 mm altında apikal bölgeninde 3-5 mm olacak şekilde kesmişler diş boylarını 8 mm olarak ayarlamışlardır (339).

Ferrer luque ve ark (340) dişlerin boylarını 12 mm, Cachovan ve ark (341) ise 13 mm, Souza ve ark (248) 15 mm, Baca ve ark (343) 12 mm, Oliviera ve ark. (321) 14 mm olacak şekilde belirlemişlerdir.

Bu literatürler incelendiğinde dişlerin boylarının belirlenmesinde en önemli faktör kullanılan dişlerin büyüklükleri ve yapısı olduğu görülmüştür. Bu tez çalışmasında dişlerin boylarını 14 mm olacak şekilde ayarladık.

Dişlerin preperasyonu için literatürde çok çeşitli enstrümanlar ve yöntemler kullanılmıştır.

Souza ve ark (248), Ruff ve ark (342), Case ve ark (309) Rotary nikel titanyum K3 (SybronEndo, Glendora, CA) yardımıyla ana apikal eğe #45.02 olacak şekilde prepare etmişlerdir.

Zehnder ve ark, Oliviera ve ark. ProFile (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) eğeler yardımıyla Ana apikal eğe sırasıyla #45.04, #35.04 kanalları prepare etmişlerdir (246, 321).

Ercan ve ark konvansiyonel olarak el aletleri kullanarak Ana apikal eğe #50.02 olacak şekilde kanalları prepare etmişlerdir(339).

Cachovan ve ark Mtwo yardımıyla Ana apikal Eğe #40.04 olacak şekilde kanalları prepare etmişlerdir(342).

Siquera ve ark(5), George ve ark (308) kanalları Ana apikal eğe #50.02 olacak şekilde Kfile eğeler yardımıyla prepare etmişlerdir.

Oliviera ve ark ise kanalları genişletme de 4 numaralı Gates Glidden frezler kullanmışlardır (321).

Baca ve ark (277), Delgado ve ark (339), Ferrer luque ve ark (340), ProTaper eğeler yardımıyla Ana apikal eğe F4 olacak şekilde kanalları prepare etmişlerdir.

Souza ve arkınan dentini üzerinde CHX 'in etkilerinin belirlenmesi için yaptıkları çalışmada dişleri crown down yöntemi kullanarak Rotary nikel titanyum K3 (SybronEndo, Glendora, CA) yardımıyla ana apikal eğe #45.02 olacak şekilde prepare etmişlerdir (248).

Zehnder ve ark tarafından yapılan kök kanal tedavisi sırasındaki şelasyon etkinliğinin incelendiği çalışmada dişleri crown down yöntemi kullanarak ProFile (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) eğeler yardımıyla ana apikal eğe #45.04 olacak şekilde prepare etmişlerdir (246).

Delgado ve ark klorheksidin ve Ca(OH<sub>2</sub>) 'in *E. Faecalis* üzerine etkilerini incelediği çalışmada dişleri crown down yöntemi kullanarak ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) eğeler yardımıyla ana apikal eğe F4 olacak şekilde prepare etmişlerdir (339).

Bu tez çalışmasında kullandığımız dişleri crown down yöntemi kullanarak ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) eğeler yardımıyla ana apikal eğe F4 olacak şekilde preperasyonu tamamladık.

Literatürde yapılan çalışmalarda dişlerin sterilizasyonu için çeşitli yöntemler kullanılmıştır.

George ve ark (308), Case ve ark (309) yaptıkları çalışmalarda örnekler gamma radyasyon ile steril edilmiştir.

Oliveira ve ark (321), Vianna ve ark (144), Fegan ve ark (344), Lundstorm ve ark(71) yaptıkları çalışmalarda örnekler etilen oksitle steril edilmiştir.

Dametto ve ark (345), Mohammadi ve ark (333), Siqueira ve ark(5), Arias-moliz ve ark (2), Cachovan ve ark(342), Oliviera ve ark (321), Ferrer luque ve ark(341), Delgado ve ark (339), Ercan ve ark(339), Valera ve ark (306), Clegg ve ark(58), Dunavant ve ark (60) örnekleri steril etmek için otoklavda 121<sup>0</sup>C de 25 dakika bekletmişlerdir.

Dametto ve ark Klorheksidin jelin *E. faecalis* ile oluşturulan biyofilmler üzerine oluşturdukları antimikrobiyal etkiyi arttırmaya yönelik yaptıkları çalışmada kullandıkları dişleri steril etmek için 121<sup>0</sup>C de 20 dakika otklavlamışlardır (345).



Mohammadi ve ark klorheksidin ve MTAD'nin insan kök dentini üzerindeki rezidüel antibakteriyel etkilerini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada sterilizasyon amacıyla dişlerin herbirini 121<sup>0</sup> C 'de otoklavlamışlar. Sterilizasyon kontrolü için otoklavdan sonra 37<sup>0</sup>C'de 24 saat inkübatörde bekletilmiş ve kontrol sağlanmıştır (333).

Oliveira ve ark *E. faecalis*'e karşı endodontik irrigantların antibakteriyel etkinliklerinin incelediği çalışmalarında örneklerin sterilizasyonu için etilen oksit gazı kullanmıştır (321).

Bu tez çalışmasında dişlerin kemomekanik preperasyonu yapıldıktan sonra sterilizasyon için otoklav kullandık. Örnekler otoklavda 121<sup>0</sup>C de 25 dakikada steril edildi. Sterilizasyonun etkinliğini belirlemek için deney aşamasından önce pilot çalışma yapılmıştır. Pilot çalışmada dişler otoklavlamadan sonra 37<sup>0</sup>C de 24 saat inkübatörde bekletilmiş kontrol sağlanmıştır.

Literatürde bu tez çalışmasına benzer metodolojiye sahip çalışmalar incelendiğinde örneklerin sabitlemesi çeşitli yöntemlerle sağlanmıştır.

Valera ve ark dişleri 24 kuyucuğa sahip mikrokuyucuklara light-cure akrilik (Dencor; Artigos Odontológicos Clássico, São Paulo, SP, Brazil) rezin kullanarak sabitlemişlerdir (306).

Siqueira ve ark dişleri vertikal kuyucuklar içerisine silikon ölçü maddesi yardımıyla sabitlemişlerdir (319).

Delgado ve arkörnekleri steril petriker içerisine toplanmış ve tüm işlemler steril air-flow kabin içerisinde gerçekleştirilmiştir (339).

Arias-Moliz ve ark örnekler steril filtrelenmiş tüpler içerisine konulmuş ve tüm işlemler steril ortamda yapılmıştır (2).

Ferrer-Luque ve ark (340), Baca ve ark (343), Souza ve ark (248), Ercan ve ark (338), Zehnder ve ark (246) dişleri eppendorf tüpler içerisine koymuş bütün işlemler steril air flow kabin içerisinde yapılmıştır.

Bu tez çalışmasında literatür ışığında dişleri sabitleme yöntemini belirlemek için pilot çalışma yapıldı. Pilot çalışmanın sonucunda dişleri sabitlemek için ölçü silikonu, akrilik rezin vb. gibi hiçbir madde kullanılmamasına karar verdik. Dişleri

sabitlemek için herhangi bir madde kullanmamamızın nedeni ölçü silikonu veya akrilik rezin gibi maddeler dişlerin yüzeylerini kapattıkları için dişlerin tam olarak sterilizasyonuna izin vermemesidir.

Endodonti literatürü incelendiğinde, biyofilm oluşumu için tercih edilen inkübasyon süresinin 24 saatten 10 haftaya kadar değişebildiği belirlenmiştir (58,60,61,63,65,67,70,71,75,117,276,308-310,312,346).

Prabhakar ve ark (67), Ferrer-Luque ve ark(70), Arias-moliz ve ark (276), George ve ark (312) yaptıkları çalışmalarda biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 24 saat olarak belirlemişlerdir.

Dunavant ve ark (60), Giardino ve ark (61), Williamson ve ark( 63) yaptıkları çalışmalarda biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 48 saat olarak belirlemişlerdir.

Bryce ve ark, Case ve ark yaptıkları çalışmalarda biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 72 saat olarak belirlemişlerdir (65, 309).

Lundstorm ve ark yaptıkları çalışmada biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 96 saat olarak belirlemişlerdir(71).

Clegg ve ark ise biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 7 gün olarak belirlemişlerdir (58).

Noiri ve ark ise biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 14 gün olarak belirlemişlerdir (75).

George ve ark(308), Shen ve ark(310) ise biyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 21 gün olarak belirlemişlerdir.

Stojicic ve arkBiyofilm oluşumu için inkübasyon süresini 8 hafta olarak belirlemişlerdir (346).

Wang ve ark. farklı gelişim safhasındaki bakterilerin farklı duyarlılığa sahip olduğunu belirterek, 3 haftalık olgun biyofilmlerin 24 saatlik genç biyofilmlere kıyasla antimikrobiyal ajanlara daha fazla direnç gösterdiğini bildirmişlerdir (117). Stojicic ve ark. ise 1, 2, 3, 4 ve 8 haftalık biyofilmler üzerinde çeşitli antimikrobiyal ajanların etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada, 1 ve 2 haftalık biyofilmlerin antimikrobiyal

ajanlara daha duyarlı olduğunu, 3 haftalık ve daha olgun biyofilmlerin ise 1 ve 2 haftalık biyofilmlere göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antimikrobiyal ajanlara daha fazla direnç gösterdiğini belirtmişlerdir (346). Bu durumda olgun biyofilmlerin genç biyofilmlere oranla daha fazla direnç gösterme nedeni olarak ekstraselüler polimerik matris miktarının artışı ile birlikte antibakteriyel ajanların biyofilm içerisine daha az penetre olduğu düşünülebilir.

Bu tez çalışmasında *E. faecalis*, *C. albicans* ve *P. aeruginosa* mikroorganizmaları kök kanallarını enfekte etmek için kullanıldı ve biyofilm oluşumu için inkübasyon süresi 3 hafta olarak öngörüldü.

Kök kanallarına tatbik edilen yıkama işlemlerinden sonra kök kanallarından örnekler toplandı. Daha önce yapılmış çalışmalara bakıldığında kök kanallarından örnek toplamak için çeşitli metodlar kullanıldığını görmekteyiz. Bu metodlardan en fazla kullanılanları, enfekte kök kanallarından çeşitli enstrümanlarla (döner aletler, Gates-glidden, el eğeleri) alınan dentin talaşının besiyerine transferi, bir diğer yöntem kök kanalından steril kağıt konlarla alınan numunelerin besiyerine transferidir (347-352). Bazı araştırmacılar bu iki yöntemi kombine olarak kullanmışlardır. Bu tez çalışmasında kök kanalından örnek almak için kağıt kon modelini kullandık.

Örnekleri değerlendirmek için literatürde çeşitli yöntemler bulunmaktadır.

Delgado ve ark yaptıkları çalışmalarda biyofilm değerlendirmeler fluorescence mikroskop analizi yapmışlardır (339).

Duggan ve Sedgley yaptıkları çalışmada değerlendirme için kristal viyole analizi kullanılmıştır (353).

Arias moliz ve ark(2), Guerreiro- Tanomaru ve ark (279), Stojicic ve ark (354), Wang ve ark(117), George ve ark (308), Shen ve ark(310), biyofilm yoğunluğunun incelenmesinde CLSM kullanmışlardır.

Shabahang ve Torabinejad (355), Duggan ve Sedgley (353), George ve Kishen (356), Liu ve ark (68), Meire ve ark (79), Soares ve ark. (357), Oliviera ve ark (321), Ferrer-Luque ve ark (340), Cachovan ve ark(342), siqueira ve ark (149), Mohammadi ve ark (333), Sena ve ark (334), Case ve ark (309) yaptıkları çalışmalarda

Biyofilm oluşumunun değerlendirilmesi için SEM kullanmışlar, bakteri sayısındaki değişimlerin değerlendirilmesi için koloni sayım yöntemi kullanmışlardır.

Literatürde bu tez çalışmasındaki aynı metodolojiye sahip antimikrobiyal etkinin incelendiği çalışmaların çoğunda biyofilm eliminasyonu kültürel sayım yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilirken SEM ile kalitatif değerlendirme yapılmıştır

Shabahang ve Torabinejad tarafından yapılan MTAD'nin antimikrobiyal etkinliğinin in vitro değerlendirildiği çalışmada Çekilmiş insan dişleri 4 hafta boyunca *E. faecalis* ile enfekte edilmiş, değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmıştır (355).

Duggan ve Sedgley tarafından yapılan oral ve endodontik *E. faecalis*'in biyofilm oluşumunun incelendiği çalışmada Biyofilm oluşumu için 96 kuyucuklu plaklarda 24 saat inkübasyon yapılmış, değerlendirme için kristal viyole analizi kullanılmıştır (353).

George ve Kishen tarafından yapılan Farklı çözücülerde çözülmüş metilen mavisinin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin incelendiği çalışmada insan dişlerinde 4 günlük inkübasyon yapılmış, değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmıştır (356).

Liu ve ark tarafından Aç bırakılmış *E. faecalis* hücrelerinin biyofilm oluşturma becerisinin değerlendirilmesi amacıyla yapılan çalışmada insan dentini ve polistiren bloklar üzerinde biyofilm oluşturulmuş, değerlendirmede koloni sayım yöntemi ve SEM kullanılmıştır (68).

Meire ve ark tarafından Er:YAG lazer, Nd:YAG lazer, antimikrobiyal fotodinamik terapi ve NaOCl'nin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin incelendiği çalışmada Dentin diskleri üzerinde 24 saat inkübasyon yapılmış, değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmıştır (79).

Guerreiro- Tanomaru ve ark tarafından *E. faecalis*'in farklı yüzeylerde oluşturduğu biyofilmleri incelenmesi amacıyla yapılan çalışmada Sığır dentini, sığır kemiği, hidroksi apatit ve güta perka konları üzerinde 14 ve 21 günlük inkübasyon yapılmış, biyofilm yoğunluğunun incelenmesinde CLSM kullanılmıştır. (279).

Stojicic ve ark. tarafından yapılan Antimikrobiyal fotodinamik terapinin biyofilmler üzerindeki etkinliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada kollajen ile kaplanmış hidroksiapatit diskler üzerinde 3 haftalık biyofilmler oluşturulmuş, ölü ve canlı bakterileri oranlarının belirlenmesinde CLSM kullanılmıştır (354).

Soares ve ark. tarafından yapılan başka bir çalışmada ise farklı ajanların biyofilmler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi için insan dişleri üzerinde 21 günlük biyofilmler oluşturulmuş, değerlendirmede koloni sayım yöntemi ve SEM kullanılmıştır (357).

Bu tez çalışmasında biyofilm eliminasyonu kültürel sayım yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilirken SEM ile kalitatif değerlendirme yapılmıştır. Kültürel sayım yöntemi ile sayımı yapılacak bakteriyel süspansiyondan alınan temsili örnekler katı besi yerine ekilerek koloni gelişimi gözlenir ve sayım yapılır (358). Uygun inkübasyon periyodundan sonra koloniler Gram boyama şekilleri, koloni ve hücresel morfoloji, oksijen toleransı ve metabolik son ürün analizlerini içeren pek çok açıdan tanımlanır. Bu teknik ile bir örnek içerisinde pek çok tür tanımlanabilir. Ayrıca bakterilerin mikrobiyal duyarlılıklarının incelenmesine de olanak sağlar. Bakterinin üreyebileceği uygun besi yerinin tercih edilmesi ve süspansiyonun sayım yapılabilecek düzeye kadar seyreltilmesi gerekmektedir. Uygulaması zordur ve kontaminasyon riski vardır. Buna rağmen Endodonti de antimikrobiyal çalışmalarda en yaygın kullanılan yöntemdir (358).

PCR(polymerase chain reaction) gücünü seçiciliğinden alır buna göre bir örnekteki her türlü bakteri PCR ile tanımlanabilir. Beklenmedik türler tespit edilebilir. Bu yönüyle kültür yönteminde çok daha hızlı ve etkilidir. PCR doğrudan kltve edilemeyen veya zor kltve edilen bakteriyel patojenlerin tespitine izin verir (162). Ancak PCR yöntemi aşırı maliyetli ve teknik hassasiyet gerektirmektedir. Ayrıca her PCR türevinde bakteri sayımı yapılamamaktadır ve değerlendirme yaparken ölü bakterilerde sayılmaktadır. Ancak kültür yönteminde sadece canlı bakteriler belirlenmektedir. Bu tez çalışmasında PCR tercih etmiş olsaydık final irrigasyonu sonrası bekteri sayısında herhangi bir azalma gzlemleyemeyebilirdik.

Kullandığımız bakteri türleri yıllardan beri kullanılan fizksel özellikleri yapısal özellikleri tanımlanmış daha önce defalarca kltve edilmiş türler olduğu için ayrıca

irrigasyon solüsyonunun antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesinde ölü bakterilerin dahil edilmemesi gerektiğinden bu tez çalışmasında kültür yöntemini kullanmayı tercih ettik.

Bu çalışmada, köklerin içerisinde oluşturulan biyofilmlerin başlangıç mikroorganizma sayıları değerlendirildiğinde gruplar arası fark bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ). Bu durum standart biyofilmler oluştuğunun bir kanıtıdır ve deneyin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Antimikrobiyal ajan uygulandıktan sonra hayatta kalan bakteri sayısı ortalamasının ise antimikrobiyal ajanın konsantrasyonuna bağlı değişiklik gösterdiği belirlenmiştir ( $P < 0,01$ ).

Mikrobiyal biyofilmlerin antimikrobiyal kemoterapiye göstermiş olduğu direnç iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır (359,360). Birincisi, biyofilmin bir bariyer görevi görerek antimikrobiyal ajanın difüzyonuna engel olmasıdır. İkincisi ise biyofilm yapısına dahil olan mikroorganizmalar ile serbest dolaşan türdeşleri arasındaki fizyolojik farklılıklardır. Bu durumda, antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar üzerinde antimikrobiyal etki gösterebilmesi için ekstraselüler matrise penetre olabilmesi gerekir. Literatürde Etidronik asit ile yapılmış çalışmalarda Etidronik Asit 'in tek başına antibakteriyel etkisinin olmadığı ancak bununla ilgili yeterli çalışma bulunmadığı belirtilmiştir (2,246,361). Bizde Etidronik Asit'in antibakteriyel etkisinin olup olmadığını tespit etmek varsa hangi konsantrasyonlarda hangi mikroorganizmalara karşı olduğunu belirlemek için bu çalışmayı planladık. Bu tez çalışması sonuçları doğrultusunda Etidronik asidin final irrigasyon ajanı olarak kullanıldığında konsantrasyonu arttıkça etkinliğinin arttığını gördük. Aynı deney düzeneği kullanılarak Etidronik asidin NaOCI gibi ara irrigasyon solüsyonu olarak tek başına kullanıldığı antimikrobiyal etkinliğinin kanıtlanmasını sağlayacak çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

Etidronik Asit 'in %5, %7, %9, %18 konsantrasyonlarının *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* ile oluşturulan 21 günlük biyofilmler üzerindeki etkinliklerine bakıldı.

*E. faecalis* üzerinde %9 'luk ve %18'lik konsantrasyonun kontrol grubu ve diğer gruplara göre istatistiksel olarak ( $P < 0,01$ ) anlamlı derecede etkin olduğu görüldü. Bu durum sebebi *E. faecalis*'in salgıladığı serin proteaz, jelatinaz ve Ace enzimleri

bakterinin dentine bağlanmasını ve dentin tübüllerinin derinlerine penetre olabildiğini sağladığı için (106,107), *E. faecalis*'in mekanik preperasyondan ve irrigasyon ajanlarından daha az etkilenmesine neden olur (108).

*C. albicans* üzerinde ise sadece %18'lik konsantrasyonun kontrol grubu ve diğer konsantrasyonlara göre istatistiksel olarak ( $P < 0,01$ ) anlamlı derecede etkin olduğu görülmüştür. Bu sonuç *C. albicans*'ın dirençli bir mikroorganizma olmasına bağlanabilir.

*P. aeruginosa* üzerinde ise kontrol grubuna göre % 5'lik konsantrasyonun bile istatistiksel olarak ( $P < 0,01$ ) anlamlı derecede etkin olduğu görülmüştür. Ancak %5 ile %7 arasında anlamlı derecede fark yokken %9 ve %18 'lik konsantrasyonlarla diğer tüm gruplar arasında anlamlı derecede fark vardır ( $P < 0,01$ ). Bu sonuçlara göre Etidronik asit'in %5 lik konsantrasyonunun *P. aeruginosa* üzerinde etkin olmasının sebebi *P. aeruginosa*'nın *C. albicans* ve *E. faecalis*'e göre daha dirençsiz olmasından kaynaklanabilir.

NaOCI ile yeni bulunan irrigasyon ajanlarının kombine kullanımı ile ilgili literatür incelendiğinde

Baumgartner ve arkNaOCI ile MTAD kombinasyonunun antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek için yaptıkları çalışmada %1.3 'lük NaOCI/MTAD nin antimikrobiyal etkinliğinin %5,25 NaOCI ve %17'lik EDTA'nın kombine kullanımına göre daha kötü olduğunu bildirmişlerdir (362).

MTAD'nin kombine kullanımı ile ilgili Kho ve ark yaptığı çalışmada ise *E. faecalis* ile oluşturulan biyofilm üzerine %1.3 'lük NaOCI/MTAD ile %5,25NaOCI ve %15'lik EDTA'nın kombine kullanımı ile karşılaştırdıklarında iki kombinasyon arasında *E. faecalis* ile oluşturulan biyofilmleri uzaklaştırmada herhangi bir fark bulunamamıştır (363).

Basrani ve ark NaOCI ve CHX 'in kombine kullanımının antimikrobiyal özelliğini arttırdığını ancak bu kombinasyon sonucu parakloroanil denilen kahverengi bir çökelti oluştuğunu bildirmişlerdir (222).

Bu sonuçlara bakıldığında literatürde irrigasyon amacıyla kullanılan antimikrobiyal ajanlar NaOCI ile kombine edildiğinde oluşan yeni kombinasyonun

NaOCI'in antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı ancak kombinasyon sonucu çökelti veya renk değişikliği oluştuğu gözlemlendi. Literatürde NaOCI ile Etidronik asit'in kombine olarak kullanıldığında çökelti oluşmadığı bildirilmiştir. Ancak bu konu ile ilgili farklı metodoloji kullanarak farklı araştırmalar yapılmasına ihtiyaç bulunmaktadır.

Literatürde Etidronik Asit'in farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkinliği hakkında herhangi bir veri olmayışı bu tez çalışmasının sonuçlarını tartışmaya izin vermemektedir.

Etidronik Asit ile ilgili bu tez çalışması sonuçlarına bakıldığında klinikte kullanma potansiyelinin olduğu görülmektedir. Ancak klinik uygulamalarda rutin kullanılabilmesi için ara seanslarda kullanıldığında antimikrobiyal etkinliği, toksisitesi, dentin yüzeylerine etkisi, smear kaldırma etkinliği ve diğer antimikrobiyal ajanlarla kullanımı gibi alanlarda çalışmalar ortaya koyulması gerekmektedir.



## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırları dahilinde elde edilen sonuç, çıkarım ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

1. Bu çalışmaya başlamadan önce örneklerin sterilizasyon ve sabitleme yönteminin belirlenmesi için pilot çalışma yapıldı. Pilot çalışmanın sonucuna göre, bu tez çalışmasına benzer bir araştırma metodolojisi öngörülürse örneklerin sterilizasyon güvenliği için örneklerin sabitleme metodu herhangi bir ölçü maddesi kullanmadan sabitlenmeksizin örneklerin steril eppendorf tüplere konulması olmalıdır. Böylelikle örneklerin tüm yüzeylerinin daha etkin bir sterilizasyon aşamasından geçmesi sağlandı.
2. Bu tez çalışması dahilinde kullanılan Etidronik asidin %5 'lik konsantrasyonunun *P. aeruginosa*'yi elimine etmede anlamlı derecede etkin olduğu bulundu. Etidronik asidin *E. faecalis*'e göre daha düşük konsantrasyonda etkinlik göstermesi *P. aeruginosa*'nın direncinin kullanılan diğer mikroorganizmalardan daha düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu mikroorganizmayı dirençsiz mikroorganizmalara örnek olarak temel aldığımızda etidronik asidin dirençsiz mikroorganizmalar üzerinde etkin antimikrobiyal bir güce sahip olduğu söylenebilir.
3. Bu tez çalışması dahilinde kullanılan Etidronik asidin %9 'luk konsantrasyonunun *E. faecalis* elimine etmede anlamlı derecede etkin olduğu bulundu. *E. faecalis* gibi fakültatif anaeroblarda veya entrekoklar üzerinde etidronik asidin antimikrobiyal aktivitesinin azaldığı söylenebilir.
4. Bu tez çalışması dahilinde kullanılan Etidronik asidin %18 'lik konsantrasyonunun *C. albicans*'ı elimine etmede anlamlı derecede etkin olduğu bulundu. Etidronik asidin *C. albicans*'a göre daha yüksek konsantrasyonda etkinlik göstermesi *C. albicans* 'ın diğer mikroorganizmalardan daha dirençli bir yapı göstermesinden kaynaklanmaktadır. Etidronik asit %18 'lik konsantrasyonda her ne kadar toplam koloninin %56 sını elimine etsede tamamının elimine etmekten uzak bir antimikrobiyal etki gösterdi.

5. Her ne kadar literatürde Etidronik asidin antimikrobiyal aktivitesinin olmadığını yada araştırılması gerektiğini öneren makaleler var olsa da bu tez çalışması bilinen ilk antimikrobiyal etkisini değerlendiren çalışmadır. Bu tez çalışmasında final irrigasyon ajanı olarak kullanılan Etidronik asit'in şelasyon özelliği ile birlikte öngörülenin aksine antimikrobiyal özelliğinin de olduğu görüldü.
6. Bu tez çalışması dahilinde Etidronik asit konsantrasyonunun artması ile elimine edilen bakteri sayısında arttığı görülmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan test mikroorganizmalarının sonuçları ışığında etidronik asidin %9 luk konsantrasyonu klinik kullanıma daha uygun etkin bir antimikrobiyal etki gösterdi.
7. Etidronik Asit'in antimikrobiyal özelliğinin olması kök kanallarında rutin olarak kullanılan diğer antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin artmasına yardımcı olabilir.
8. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre Etidronik Aside en dirençli mikroorganizmanın *C. albicans* olduğu, en düşük etidronik asit konsantrasyonuna en dirençsiz mikroorganizmanın ise *P. aeruginosa* olduğu görülmektedir.
9. Bu tez çalışmasının sonuçlarına göre irrigasyon ajanı olan Etidronik Asit her bir mikroorganizma için farklı konsantrasyonlarda etkindir. Bu da mikroorganizmaların irrigasyon ajanına karşı dirençlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır.
10. Etidronik asidin antimikrobiyal etkisinin değerlendirildiği bu çalışmanın ışığında ileride yapılacak olan çalışmalarda Etidronik asidin farklı konsantrasyonlarda toksik etkisine bakılmalıdır.
11. Etidronik asidin NaOCI ile bileşik oluşturduğunda herhangi bir çökelti ve renk değişikliği oluşturmadığı bilinmektedir. Ancak CHX ile çökelti oluşturup oluşturmadığı renk değişikliği olup olmadığı konusunda yeterli bilgi bulunmamaktadır. İleride yapılacak olan çalışmalarda Etidronik asit ile CHX arasındaki ilişkiye bakılabilir.
12. Etidronik asit üzerine literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır. Bundan sonra yapılacak çalışmalarda en yaygın kullanılan şelasyon ajanı olan EDTA ile şelasyon etkinliği, smear kaldırma etkinliği, dentin tübülleri üzerine etkisi, yüzey gerilimine etkisi gibi konularda daha fazla karşılaştırmalı çalışmalar yapılabilir.

13. Bu tez çalışmasında Etidronik asidi final irrigasyon ajanı olarak kullanıp antimikrobiyal etkinliği değerlendirildi. Ancak Etidronik asid her eğe değişiminde kullanılırsa antimikrobiyal etkisi üzerine herhangi bir bulgu bulunmamaktadır. Bundan sonra Etidronik asit üzerine yapılacak çalışmalarda ara irrigasyonlardaki etkinliği mutlaka değerlendirilmelidir.



## ÖZET

### **Etidronik Asit (HEBP)'in Etkin Konsantrasyonunun Belirlenmesi ve Antimikrobiyal Etkinliğinin İncelenmesi**

Bu çalışmanın amacı, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* ile enfekte edilen kök kanallarının 21 gün sonunda biyofilm oluşturduğu belirlenen örnekler üzerine %5, %7, %9, %18 konsantrasyona sahip Etidronik asit (HEBP) ile final irrigasyonu yapıldığındaki etidronik asit (HEBP) konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesidir.

184 tane tek köklü ve tek kanallı çekilmiş insan dişleri toplandı. Dişlerin boyları apikalden 14 mm olacak şekilde kronları elmas diskler kullanarak kesildi. Köklerin boyları ayarlandıktan sonra Ana apikal eğe F4 olacak şekilde kemomekanik preperasyon tamamlandı. Dişlerin herbiri farklı eppendorf tüplere konularak otoklavda sterilizasyonu sağlandı. Steril edilen dişler *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* ile 21 gün boyunca inkübe edildi. Kullanılan mikroorganizma türüne göre 3 ana gruba ayrıldı. 21 gün sonunda her mikroorganizma grubundan 3 tane olmak üzere 9 dişte biyofilm oluşup oluşmadığı SEM ile değerlendirildi. Kalan gruplardaki dişler final irrigasyon solüsyonunun konsantrasyonuna (distile su, %5, %7, %9, %18) bağlı olarak 5 alt gruba ayrıldı. Bu konsantrasyonlara göre solüsyon uygulandı. Final irrigasyonu tamamlandıktan sonra herbir kökten 3 paperpointle örnek alındı ve kültür metodu kullanılarak koloni sayımı yapıldı.

*E. faecalis* üzerinde %9 ve %18'lik HEBP konsantrasyonu diğer konsantrasyonlardan daha etkin bulunurken ( $P < 0,01$ ), *C. albicans* üzerinde %18 'lik HEBP konsantrasyonu diğer konsantrasyonlardan daha etkin bulundu ( $P < 0,01$ ) *P. aeruginosa* üzerinde ise %5 'lik HEBP konsantrasyonu kontrol grubundan daha etkin bulunurken %9 ve %18 'lik konsantrasyonlarda diğer konsantrasyonlardan daha etkin bulunmuştur ( $P < 0,01$ ).

**Anahtar Kelimeler:** Biyofilm, Etidronik Asit, Sodyum Hipoklorit, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*

## ABSTRACT

### **Etidronic Acid (HEBP) Determination of Effective Concentration and Analysis of Antimicrobial Activities**

The purpose of this study, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa* infected with the root canal on the sample determined to create biofilm after 21 days, 5%, 7%, 9%, 18% concentration with etidronic acid (HEBP) with final irrigation when made etidronic acid (HEBP) determining the antimicrobial activity of concentration.

One hundred eighty four extracted single-rooted were collected. The teeth of size so that the apex 14 mm were cut using diamond saw. Chemomechanical preparation is completed by using ProTaper system to working length by using an F4 master apical file, following the manufacturer's instructions. Each of the teeth by placing the different Eppendorf tubes were autoclaved. The tooth were incubated for 21 days with *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*. It was divided into 3 main groups according to the type of using microorganism. After 21 days, and whether or not dental biofilm of total nine teeth, including three teeth from each groups of microorganisms were evaluated by SEM. The teeth were divided into five sub-groups (distiled water, %5, %7, %9, %18) depending on the concentration of the final irrigation solution. Each root of three sample with paperpoint after final irrigation was collected and colony counts were performed using the culture method.

HEBP concentration of 9% and 18% statistically more efficient than other concentrations found on *E. faecalis* ( $P < 0,01$ ). HEBP concentration of 18% statistically more efficient than other concentrations found on *C. albicans* ( $P < 0,01$ ). HEBP concentration of 5% statistically more efficient than control group found on *P. aeruginosa* ( $P < 0,01$ ) and HEBP concentration of 9% and 18% statistically more efficient than other concentrations found on *P. aeruginosa* ( $P < 0,01$ ).

**Keywords:** Biofilm, Etidronic Acid, Sodium Hypochlorite, *E. faecalis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*

## KAYNAKLAR

1. Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruíz-Linares M, García MEM, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *International journal of oral science* 2014; 6(1): 46-49.
2. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite/etidronic acid irrigant solution. *Journal of endodontics* 2014; 40(12): 1999-2002.
3. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in microbiology* 2001; 9(2): 50-52.
4. Costerton JW. *The biofilm primer*: Springer Science & Business Media, Heidelberg: 2007, p.53-56
5. Costerton J. Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology* 1995; 15(3): 137-140.
6. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* 1995; 49(1): 711-745.
7. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews Microbiology* 2004; 2(2): 95-108.
8. Costerton J, Lewandowski Z. The biofilm lifestyle. *Advances in Dental Research* 1997; 11(1): 192-195.
9. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg E. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-1322.
10. Van Houdt R, Michiels CW. Biofilm formation and the food industry, a focus on the bacterial outer surface. *Journal of applied microbiology* 2010; 109(4): 1117-1131.
11. Archibald LK, Gaynes RP. Hospital-acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. *Infectious disease clinics of North America* 1997; 11(2): 245-255.
12. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004; 9(1): 27-36.
13. Nair PR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of Endodontics* 1987; 13(1): 29-39.
14. Costerton B. Microbial ecology comes of age and joins the general ecology community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2004; 101(49): 16983-16984.
15. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003; 19(2): 139-150.
16. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagenen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology* 2004; 51(3): 659-674.

17. Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, Cosette P, Lindsay D, von Holy A, Brözel VS. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology* 2002; 68(6): 2770-2780.
18. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GD, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *Journal of bacteriology* 2002; 184(4): 1140-1154.
19. Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current opinion in microbiology* 1999; 2(6): 582-587.
20. Antunes LCM, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 2010; 156(8): 2271-2282.
21. Dunny GM, Leonard BA. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual Reviews in Microbiology* 1997; 51(1): 527-564.
22. Fux C, Costerton J, Stewart P, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology* 2005; 13(1): 34-40.
23. Davey ME, O'toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and molecular biology reviews* 2000; 64(4): 847-867.
24. de la Fuente-Núñez C, Reffuveille F, Fernández L, Hancock RE. Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current opinion in microbiology* 2013; 16(5): 580-589.
25. Jenkinson HF, Lappin-Scott HM. Biofilms adhere to stay. *TRENDS in Microbiology* 2001; 9(1): 9-10.
26. Bowden GH, Hamilton IR. Survival of oral bacteria. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1998; 9(1): 54-85.
27. Brex M, Theilade J, Attström R. An ultrastructural quantitative study of the significance of microbial multiplication during early dental plaque growth. *Journal of periodontal research* 1983; 18(2): 177-186.
28. Gilbert P, Evans D, Brown M. Formation and dispersal of bacterial biofilms in vivo and in situ. *Journal of Applied Bacteriology* 1993; 74(22): 234-238.
29. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infection and immunity* 1996; 64(3): 1035-1038.
30. Cowan M, Taylor K, Doyle R. Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Journal of bacteriology* 1987; 169(7): 2995-3000.
31. Steinberger R, Holden P. Extracellular DNA in single-and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71(9): 5404-5410.
32. Marsh P. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of clinical periodontology* 2005; 32(6): 7-15.

33. Baumgartner JC, Siqueira J, Sedgley CM, Kishen A. Microbiology of endodontic disease. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC Ingle's Endodontics 6th ed London: BC Decker Inc 2008: 221-308.
34. Brook I. Encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections. Microbiological reviews 1986; 50(4): 452.
35. Cheung G, Ho M. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. Oral microbiology and immunology 2001; 16(6): 332-337.
36. Busscher H, Van der Mei H. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Advances in dental research 1997; 11(1): 24-32.
37. Mah T-FC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. Trends in microbiology 2001; 9(1): 34-39.
38. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. The lancet 2001; 358(9276): 135-138.
39. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. FEMS microbiology letters 2004; 230(1): 13-18.
40. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. Journal of endodontics 2010; 36(8): 1277-1288.
41. Sen B, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Dental Traumatology 1995; 11(1): 6-9.
42. Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P. Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. International endodontic journal 2005; 38(11): 775-788.
43. Nair P, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology 2005; 99(2): 231-252.
44. Kishen A, George S, Kumar R. Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. Journal of Biomedical Materials Research Part A 2006; 77(2): 406-415.
45. Ricucci D, Siqueira JF. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. Journal of endodontics 2011; 37(8): 1171-1175.
46. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. Dental Traumatology 1990; 6(2): 73-77.
47. Ricucci D, Martorano M, Bate A, Pascon E. Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two cases. International endodontic journal 2005; 38(4): 262-271.



48. Harn WM, Chen YH, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Dental Traumatology* 1998; 14(5): 237-240.
49. Siqueira J, Lopes H. Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *International endodontic journal* 2001; 34(3): 216-220.
50. Lomcali G, Şen B, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Dental Traumatology* 1996; 12(2): 70-76.
51. Leonardo MR, Rossi MA, Bonifácio KC, Silva LABd, Assed S. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth. *Ultrastructural pathology* 2007; 31(4): 321-325.
52. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *Journal of endodontics* 2002; 28(10): 679-683.
53. Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. *Journal of endodontics* 2009; 35(9): 1303-1309.
54. Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Ford TRP. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of Endodontics* 2009; 35(4): 493-502.
55. Siqueira JF. Periapical actinomycosis and infection with *Propionibacterium propionicum*. *Endodontic Topics* 2003; 6(1): 78-95.
56. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics* 2002; 28(10): 689-693.
57. Spratt D, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *International Endodontic Journal* 2001; 34(4): 300-307.
58. Clegg M, Vertucci F, Walker C, Belanger M, Britto L. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of endodontics* 2006; 32(5): 434-437.
59. Özok AR, Wu M-K, Luppens SBI, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus (micromonas) micros*. *Journal of endodontics* 2007; 33(7): 819-822.
60. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of Endodontics* 2006; 32(6): 527-531.

61. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Endodontics* 2007; 33(7): 852-855.
62. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *Journal of endodontics* 2008; 34(5): 579-582.
63. Williamson AE, Cardon JW, Drake DR. Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2009; 35(1): 95-97.
64. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-García M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 2009; 35(5): 711-714.
65. Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng Y-l, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single-and dual-species biofilms. *Journal of Endodontics* 2009; 35(9): 1243-1248.
66. de Paz LEC, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *Journal of Endodontics* 2010; 36(1): 70-77.
67. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya M, Mahalakshmi K, Sehgal P, Sukumaran V. Evaluation of antimicrobial efficacy of herbal alternatives (Triphala and green tea polyphenols), MTAD, and 5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis* biofilm formed on tooth substrate: an in vitro study. *Journal of endodontics* 2010; 36(1): 83-86.
68. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *Journal of endodontics* 2010; 36(4): 630-635.
69. Shrestha A, Zhilong S, Gee NK, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of endodontics* 2010; 36(6): 1030-1035.
70. Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrime with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics* 2010; 36(10): 1673-1675.
71. Lundstrom JR, Williamson AE, Villhauer AL, Dawson DV, Drake DR. Bactericidal activity of stabilized chlorine dioxide as an endodontic irrigant in a polymicrobial biofilm tooth model system. *Journal of endodontics* 2010; 36(11): 1874-1878.
72. Bhuvu B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F. The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *International endodontic journal* 2010; 43(3): 241-250.

73. Ordinola-Zapata R, Bramante C, Cavenago B, Graeff M, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte M. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *International endodontic journal* 2012; 45(2): 162-168.
74. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics* 2014; 40(2): 285-290.
75. Noiri Y, Katsumoto T, Azakami H, Ebisu S. Effects of Er: YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens in vitro. *Journal of endodontics* 2008; 34(7): 826-829.
76. Soukos NS, Chen PS-Y, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics* 2006; 32(10): 979-984.
77. Hems R, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt D. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2005; 38(1): 22-29.
78. Kuştarci A, Sümer Z, Altunbaş D, Koşum S. Bactericidal effect of KTP laser irradiation against *Enterococcus faecalis* compared with gaseous ozone: an ex vivo study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2009; 107(5): 73-79.
79. Meire M, Coenye T, Nelis H, De Moor R. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *International Endodontic Journal* 2012; 45(5): 482-491.
80. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009; 14(7): 2535-2554.
81. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics* 2010; 22(1): 58-78.
82. Ricucci D, Bergenholtz G. Bacterial status in root-filled teeth exposed to the oral environment by loss of restoration and fracture or caries—a histobacteriological study of treated cases. *International Endodontic Journal* 2003; 36(11): 787-802.
83. Tawakoli P, Al-Ahmad A, Hoth-Hannig W, Hannig M, Hannig C. Comparison of different live/dead stainings for detection and quantification of adherent microorganisms in the initial oral biofilm. *Clinical oral investigations* 2013; 17(3): 841-850.
84. Bridier A, Meylheuc T, Briandet R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 2013; 48(2): 65-69.
85. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning-new york and baden baden then mahwah* 1997; 19(3): 324-336.

86. Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg B, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 1997; 63(11): 4543-4551.
87. Rôças I, Siqueira J. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(11): 3599-3606.
88. Fabricious L, Dahlen G, Öhman Ae, Möller Aj. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *European Journal of Oral Sciences* 1982; 90(2): 134-144.
89. Siqueira J, Rôças I. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research* 2009; 88(11): 969-981.
90. Sakamoto M, Rôças I, Siqueira J, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral microbiology and immunology* 2006; 21(2): 112-122.
91. Byström A, Sunvqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal* 1985; 18(1): 35-40.
92. Sakamoto M, Siqueira J, Rôças I, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral microbiology and immunology* 2007; 22(1): 19-23.
93. Siqueira JF, Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *Journal of Endodontics* 2007; 33(5): 541-547.
94. Schirrmeister JF, Liebenow A-L, Pelz K, Wittmer A, Serr A, Hellwig E, Al-Ahmad A. New bacterial compositions in root-filled teeth with periradicular lesions. *Journal of endodontics* 2009; 35(2): 169-174.
95. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics* 2004; 30(5): 315-320.
96. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 22(7): 822-830.
97. Tendolkar P, Baghdayan A, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 2003; 60(12): 262-263.
98. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of *Enterococcus faecalis* to endodontic medicaments. *Journal of Endodontics* 2005; 31(5): 380-386.
99. Facklam RR, Maria da Gloria SC, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci Washington. 2002, p.1-54

100. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of endodontics* 2006; 32(2): 93-98.
101. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology* 2003; 88(2): 105-122.
102. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *The American journal of medicine* 1997; 102(3): 284-293.
103. Franzen R, Gutknecht N, Falken S, Heussen N, Meister J. Bactericidal effect of a Nd: YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000  $\mu\text{m}$ . *Lasers in medical science* 2011; 26(1): 95-101.
104. Siren E, Haapasalo M, Ranta K, Salmi P, Kerosuo E. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal* 1997; 30(2): 91-95.
105. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta Odontologica Scandinavica* 1983; 41(1): 19-22.
106. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* 1987; 66(8): 1375-1379.
107. Siqueira JF, De Uzeda M, Fonseca MEF. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* 1996; 22(6): 308-310.
108. Siqueira JF, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *Journal of Endodontics* 1996; 22(12): 674-676.
109. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* 2002; 35(3): 221-228.
110. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology* 1985; 1(5): 170-175.
111. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 1998; 85(1): 86-93.
112. Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 2004; 15(5): 308-320.
113. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews* 1994; 7(4): 462-478.

114. Sedgley C, Lennan S, Appelbe O. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International endodontic journal* 2005; 38(10): 735-742.
115. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International dental journal* 2008; 58(6): 329-341.
116. del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, Bernardineli N, de Andrade FB, Ordinola-Zapata R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *Journal of endodontics* 2011; 37(8): 1134-1138.
117. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of endodontics* 2012; 38(10): 1376-1379.
118. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials: 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1973; 36(6): 856-871.
119. Marending M, Luder H, Brunner T, Knecht S, Stark W, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine—mechanical, chemical and structural evaluation. *International endodontic journal* 2007; 40(10): 786-793.
120. Hu X, Peng Y, Sum C-p, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteination: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. *Journal of endodontics* 2010; 36(12): 2008-2011.
121. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *Journal of endodontics* 2010; 36(9): 1558-1562.
122. Sobrinho APR, Barros MHM, Nicoli JR, Carvalho MAR, Farias LM, Bambirra EA, Bahia MGA, Vieira EC. Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *Journal of endodontics* 1998; 24(6): 405-408.
123. Brogden KA, Guthmiller JM, Jenkinson HF, Douglas LJ. Interactions between *Candida* Species and Bacteria in Mixed Infections. Washington: 2002, p.408-422.
124. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2004; 97(5): 632-641.
125. Suchitra U, Kundabala M. *Enterococcus Faecalis*-An Endodontic Pathogen. *Endodontology* 2006; 18(2): 11-13.
126. Waltimo TM, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics* 2004; 9(1): 66-78.
127. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1994; 78(4): 522-530.
128. Slack G. The resistance to antibiotics of microorganisms isolated from root canals. *Br Dent J* 1957; 18(3): 493-494.
129. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *Journal of endodontics* 2000; 26(12): 695-698.

130. Möller A. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontologisk tidskrift* 1966; 74(5): 323-325.
131. Siqueira J, Rôças I, Moraes S, Santos K. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. *International endodontic journal* 2002; 35(4): 345-351.
132. Siqueira JF, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2002; 93(2): 174-178.
133. Holmes A, Cannon R, Jenkinson H. Interactions of *Candida albicans* with bacteria and salivary molecules in oral biofilms. *Journal of industrial microbiology* 1995; 15(3): 208-213.
134. James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol* 1994; 17(6): 213-214.
135. Munson M, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade W. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *Journal of dental research* 2002; 81(11): 761-766.
136. Siqueira J. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International endodontic journal* 2001; 34(1): 1-10.
137. Nair PR, Sjögren U, Krey G, Kahnberg K-E, Sundqvist G. 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. *Journal of Endodontics* 1990; 16(12): 580-588.
138. Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2001; 91(5): 579-586.
139. Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Sousa E, Teixeira F, Souza-Filho F. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International endodontic journal* 2003; 36(1): 1-11.
140. Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *International endodontic journal* 2001; 34(6): 429-434.
141. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews* 1999; 12(1): 147-179.
142. Waltimo T, Ørstavik D, Meurman JH, Samaranayake L, Haapasalo M. In vitro susceptibility of *Candida albicans* isolates from apical and marginal periodontitis to common antifungal agents. *Oral microbiology and immunology* 2000; 15(4): 245-248.
143. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2004; 97(1): 79-84.

144. Şen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *Journal of Endodontics* 1999; 25(4): 235-238.
145. Ferguson J, Hatton J, Gillespie MJ. Effectiveness of intracanal irrigants and medications against the yeast *Candida albicans*. *Journal of endodontics* 2002; 28(2): 68-71.
146. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *International Endodontic Journal* 2003; 36(12): 810-830.
147. Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2000; 90(5): 651-655.
148. Siqueira JF, Rôças IN, Lopes HP, Magalhães FA, de Uzeda M. Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *Journal of Endodontics* 2003; 29(8): 501-504.
149. Waltimo T, Ørstavik D, Siren E, Haapasalo M. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *International Endodontic Journal* 1999; 32(6): 421-429.
150. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Dental Traumatology* 1990; 6(4): 142-149.
151. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Dental Traumatology* 1987; 3(2): 86-90.
152. Piccolomini R, D'Arcangelo C, D'Ercole S, Catamo G, Schiaffino G, De Fazio P. Bacteriologic evaluation of the effect of Nd: YAG laser irradiation in experimental infected root canals. *Journal of endodontics* 2002; 28(4): 276-278.
153. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic topics* 2005; 10(1): 77-102.
154. Leonardo MR, Da Silva LAB, Tanomaru Filho M, Bonifácio KC, Ito IY. In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *Journal of endodontics* 2000; 26(7): 391-394.
155. Çiçek E, Kaya BÜ. Kök Kanal Patojenlerinin Tespitinde Kullanılan Tanı Yöntemleri. *Atatürk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi* 2014; 8(8): 21-24.
156. Siqueira JF, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *Journal of dentistry* 2003; 31(5): 333-339.
157. Siqueira J, Rôças I. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 1—current molecular technologies for microbiological diagnosis. *Journal of endodontics* 2005; 31(6): 411-423.
158. Fredricks DN, Relman DA. Application of polymerase chain reaction to the diagnosis of infectious diseases. *Clinical infectious diseases* 1999; 475-486.
159. Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. *Oral microbiology and immunology* 1986; 1(1): 48-55.



160. Sundqvist G. Endodontic microbiology. *Experimental endodontics* 1990; 6(131-153).
161. Engelkirk P, Engelkirk J, Dowell V. Principles and practice of clinical anaerobic bacteriology: Star Publishing Company Belmont California, 1992; 6(3): 32-36.
162. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(4): 1407-1417.
163. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(11): 5721-5732.
164. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu W-H, Lakshmanan A, Wade WG. The human oral microbiome. *Journal of bacteriology* 2010; 192(19): 5002-5017.
165. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *science* 2005; 308(5728): 1635-1638.
166. Kumar PS, Griffen AL, Moeschberger ML, Leys EJ. Identification of candidate periodontal pathogens and beneficial species by quantitative 16S clonal analysis. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(8): 3944-3955.
167. Paster BJ, Boches SK, Galvin JL, Ericson RE, Lau CN, Levanos VA, Sahasrabudhe A, Dewhirst FE. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *Journal of bacteriology* 2001; 183(12): 3770-3783.
168. Preza D, Olsen I, Aas JA, Willumsen T, Grinde B, Paster BJ. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(6): 2015-2021.
169. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson GR, Collins MD, Doré J. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and environmental microbiology* 1999; 65(11): 4799-4807.
170. Green BD, Keller M. Capturing the uncultivated majority. *Current opinion in biotechnology* 2006; 17(3): 236-240.
171. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *Journal of clinical periodontology* 2004; 31(12): 1034-1047.
172. Sixou M. Diagnostic testing as a supportive measure of treatment strategy. *Oral diseases* 2003; 9(1): 54-62.
173. Loomer PM. Microbiological diagnostic testing in the treatment of periodontal diseases. *Periodontology* 2000 2004; 34(1): 49-56.

174. Shah H, Collins D. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteroides melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *International journal of systematic bacteriology* 1990; 40(2): 205-208.
175. Baumgartner JC, Falkler WA. Detection of immunoglobulins from explant cultures of periapical lesions. *Journal of endodontics* 1991; 17(3): 105-110.
176. Baumgartner JC. Microbiological and molecular analysis of endodontic infections. *Endodontic topics* 2004; 7(1): 35-51.
177. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 1997; 276(5313): 734-740.
178. Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y. Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiology and immunology* 2002; 46(8): 535-548.
179. Pei Z, Bini EJ, Yang L, Zhou M, Francois F, Blaser MJ. Bacterial biota in the human distal esophagus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2004; 101(12): 4250-4255.
180. Anderson B, Dawson J, Jones D, Wilson KH. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *Journal of Clinical Microbiology* 1991; 29(12): 2838-2842.
181. Relman DA. The search for unrecognized pathogens. *Science* 1999; 284(5418): 1308-1310.
182. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endodontic Topics* 2003; 6(1): 3-28.
183. Kakehashi S, Stanley H, Fitzgerald R. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1965; 20(3): 340-349.
184. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *European Journal of Oral Sciences* 1981; 89(4): 321-328.
185. Dictionary–Complete CE. Unabridged© HarperCollins Publishers 1991, 1994, 1998, 2000, 2003. Cited in related co-pending US Appl 2008; 12/519,118).
186. Hülsmann M, Rödiger T, Nordmeyer S. Complications during root canal irrigation. *Endodontic Topics* 2007; 16(1): 27-63.
187. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *Journal of Conservative Dentistry* 2010; 13(4): 256.
188. Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. *Journal of endodontics* 2012; 38(1): 37-40.
189. Gopikrishna V, Pare S, Kumar AP, Narayanan LL. Irrigation protocol among endodontic faculty and post-graduate students in dental colleges of India: A survey. *Journal of Conservative Dentistry* 2013; 16(5): 394.

190. Willershausen I, Wolf T, Schmidtman I, Berger C, Ehlers V, Willershausen B, Briseño B. Survey of root canal irrigating solutions used in dental practices within Germany. *International endodontic journal* 2015; 48(7): 654-660.
191. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *Journal of endodontics* 1998; 24(7): 472-476.
192. Leonardo M, Tanomaru Filho M, Silva L, Nelson Filho P, Bonifacio K, Ito I. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *Journal of Endodontics* 1999; 25(3): 167-171.
193. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic medicaments on selected anaerobic bacteria. *Journal of endodontics* 1993; 19(10): 498-500.
194. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal* 2002; 13(2): 113-117.
195. Grossman LI, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. *The Journal of the American Dental Association* 1941; 28(2): 223-225.
196. Estrela C, Ribeiro RG, Estrela CR, Pécora JD, Sousa-Neto MD. Antimicrobial effect of 2% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine tested by different methods. *Brazilian Dental Journal* 2003; 14(1): 58-62.
197. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dental Clinics of North America* 2010; 54(2): 291-312.
198. Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Apécio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2010; 36(3): 520-523.
199. Berber V, Gomes B, Sena N, Vianna M, Ferraz C, Zaia A, Souza-Filho F. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *International endodontic journal* 2006; 39(1): 10-17.
200. Currey J, Brear K, Zioupos P. Dependence of mechanical properties on fibre angle in narwhal tusk, a highly oriented biological composite. *Journal of biomechanics* 1994; 27(7): 891-897.
201. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *Journal of endodontics* 2004; 30(12): 880-882.
202. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *International endodontic journal* 2001; 34(2): 113-119.
203. Andersen M, Lund A, Andreasen J, Andreasen F. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Dental Traumatology* 1992; 8(3): 104-108.

204. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *Journal of Endodontics* 1988; 14(3): 125-127.
205. Fardai O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *The Journal of the American Dental Association* 1986; 112(6): 863-869.
206. Løe H. Does chlorhexidine have a place in the prophylaxis of dental diseases? *Journal of Periodontal Research* 1973; 8(12): 93-99.
207. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology* 1986; 57(6): 370-377.
208. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *Journal of Periodontal research* 1973; 8(12): 68-75.
209. Hugo W, Longworth A. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1966; 18(9): 569-578.
210. Hugo W, Longworth A. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1964; 16(10): 655-662.
211. Hennessey T. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research* 1973; 8(12): 61-67.
212. Basrani B. Chlorhexidine gluconate. *Australian Endodontic Journal* 2005; 31(2): 48-52.
213. Winrow M. Metabolic studies with radiolabelled chlorhexidine in animals and man. *Journal of Periodontal Research* 1973; 8(12): 45-48.
214. Magnusson B, Heyden G. Autoradiographic studies of <sup>14</sup>C-chlorhexidine given orally in mice. *Journal of Periodontal Research* 1973; 8(12): 49-54.
215. Rölla G, Løe H, Rindom Schiött C. The affinity of chlorhexidine for hydroxyapatite and salivary mucins. *Journal of periodontal research* 1970; 5(2): 90-95.
216. Turesky S, Warner V, Lin PS, Soloway B. Prolongation of Antibacterial Activity of Chlorhexidine Adsorbed to Teeth: Effect of Sulfates. *Journal of periodontology* 1977; 48(10): 646-649.
217. Hjeljord L, Rölla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *Journal of Periodontal Research* 1973; 8(12): 11-16.
218. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Australian Endodontic Journal* 2009; 35(3): 131-139.
219. Lin S, Zuckerman O, Weiss EI, Mazor Y, Fuss Z. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *Journal of endodontics* 2003; 29(6): 416-418.

220. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *Journal of Endodontics* 2000; 26(6): 315-317.
221. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Journal of endodontics* 2007; 33(8): 966-969.
222. Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2003; 96(5): 578-581.
223. Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *Journal of endodontics* 2004; 30(2): 84-87.
224. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Efficacy of chlorhexidine-and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2003; 96(5): 618-624.
225. Yamashita J, Tanomaru Filho M, Leonardo M, Rossi M, Silva L. Scanning electron microscopic study of the cleaning ability of chlorhexidine as a root-canal irrigant. *International Endodontic Journal* 2003; 36(6): 391-394.
226. Ringel AM, Patterson SS, Newton CW, Miller CH, Mulhern JM. In vivo evaluation of chlorhexidine gluconate solution and sodium hypochlorite solution as root canal irrigants. *Journal of Endodontics* 1982; 8(5): 200-204.
227. Krautheim A, Jermann T, Bircher A. Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact dermatitis* 2004; 50(3): 113-116.
228. Ebo DG, Stevens WJ, Bridts CH, Matthieu L. Contact allergic dermatitis and life-threatening anaphylaxis to chlorhexidine. *Journal of allergy and clinical immunology* 1998; 101(1): 128-129.
229. Snellman E, Rantanen T. Severe anaphylaxis after a chlorhexidine bath. *Journal of the American Academy of Dermatology* 1999; 40(5): 771-772.
230. Pham N, Weiner J, Reisner G, Baldo B. Anaphylaxis to chlorhexidine. Case report. Implication of immunoglobulin E antibodies and identification of an allergenic determinant. *Clinical and Experimental Allergy* 2000; 30(7): 1001-1007.
231. Zehnder M. Root canal irrigants. *Journal of endodontics* 2006; 32(5): 389-398.
232. Vivacqua-Gomes N, Ferraz C, Gomes B, Zaia A, Teixeira F, Souza-Filho F. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *International Endodontic Journal* 2002; 35(9): 791-795.
233. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *Journal of Endodontics* 2008; 34(2): 181-185.

234. Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of endodontics* 2010; 36(2): 315-317.
235. Nowicki JB, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of endodontics* 2011; 37(7): 983-988.
236. Mortenson D, Sadilek M, Flake N, Paranjpe A, Heling I, Johnson J, Cohenca N. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *International endodontic journal* 2012; 45(9): 878-882.
237. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Journal of Endodontics* 2010; 36(7): 1154-1157.
238. Berg MS, Jacobsen EL, BeGole EA, Remeikis NA. A comparison of five irrigating solutions: a scanning electron microscopic study. *Journal of Endodontics* 1986; 12(5): 192-197.
239. Rome WJ, Doran JE, Walker WA. The effectiveness of Gly-Oxide and sodium hypochlorite in preventing smear layer formation. *Journal of endodontics* 1985; 11(7): 281-288.
240. Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen H, Grady J. New method of irrigation during endodontic treatment. *Journal of endodontics* 1976; 2(9): 257-260.
241. Boessler C, Peters OA, Zehnder M. Impact of lubricant parameters on rotary instrument torque and force. *Journal of endodontics* 2007; 33(3): 280-283.
242. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *International Endodontic Journal* 2003; 36(6): 411-415.
243. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *Journal of Endodontics* 2008; 34(12): 1521-1523.
244. Patil CR, Uppin V. Effect of endodontic irrigating solutions on the microhardness and roughness of root canal dentin: an in vitro study. *Indian Journal of Dental Research* 2011; 22(1): 22.
245. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *Journal of Endodontics* 2005; 31(11): 817-820.
246. Tartari T, Guimarães B, Amoras L, Duarte M, Silva e Souza P, Bramante C. Etidronate causes minimal changes in the ability of sodium hypochlorite to dissolve organic matter. *International endodontic journal* 2015; 48(4): 399-404.
247. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, da Cunha Pereira C, Ferraz CCR, Figueiredo JAP. Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Journal of endodontics* 2012; 38(9): 1249-1252.

248. Siqueira J, Machado A, Silveira R, Lopes H, Uzeda Md. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *International Endodontic Journal* 1997; 30(4): 279-282.
249. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JAP, Estrela CRdA. A model system to study antimicrobial strategies in endodontic biofilms. *Journal of Applied Oral Science* 2009; 17(2): 87-91.
250. Sundqvist, Göran, et al. "Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* (1998); 85(1): 86-93.
251. Haapasalo M. The genus *Bacteroides* in human dental root canal infections. Taxonomic, ultrastructural, and clinical studies. *Proceedings of the Finnish Dental Society Suomen Hammaslääkäriseuran toimituksia* 1986; 82(1): 435-462.
252. Sundqvist G, Johansson E, Sjögren U. Prevalence of black-pigmented bacteroides species in root canal infections. *Journal of endodontics* 1989; 15(1): 13-19.
253. Bender I, Seltzer S. Combination of antibiotics and fungicides used in treatment of the infected pulpless tooth. *The Journal of the American Dental Association* 1952; 45(3): 293-300.
254. Grahnen H, Krasse B. The effect of instrumentation and flushing of non-vital teeth in endodontic therapy. *Odontol Rev* 1963; 14(1): 167-177.
255. Engström B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15(2): 87.
256. Goldman M, Pearson AH. Postdebridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1969; 28(6): 897-905.
257. Happonhn RP, Söderling E, Viander M, Linko-Kittunen L, Pelliniemi L. Immunocytochemical demonstration of *Actinomyces* species and *Arachnia propionica* in periapical infections. *Journal of Oral Pathology & Medicine* 1985; 14(5): 405-413.
258. Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Dental Traumatology* 1988; 4(6): 269-272.
259. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q, Yin W, Li J, Niu W. Relationship of biofilm formation and *gelE* gene expression in *Enterococcus faecalis* recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment. *Journal of endodontics* 2011; 37(5): 631-636.
260. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* 2009; 155(6): 1749-1757.
261. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *International endodontic journal* 2012; 45(4): 363-371.

262. Badr A, Omar N, Badria F. A laboratory evaluation of the antibacterial and cytotoxic effect of Liquorice when used as root canal medicament. *International endodontic journal* 2011; 44(1): 51-58.
263. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, Jiang LM, van der Sluis LW, Jacob M, Crielaard W. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of Endodontics* 2009; 35(9): 1249-1252.
264. Pappen F, Shen Y, Qian W, Leonardo M, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *International endodontic journal* 2010; 43(6): 528-535.
265. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology* 2007; 56(12): 1581-1588.
266. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Di Rosa R, Gherardi G, Dicuonzo G. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical microbiology and immunology* 2001; 190(3): 113-120.
267. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MaJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 2001; 67(10): 4538-4545.
268. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Infection and immunity* 2005; 73(10): 7075.
269. Dworniczek E, Wojciech L, Sobieszczanska B, Seniuk A. Virulence of enterococcus isolates collected in lower Silesia (Poland). *Scandinavian journal of infectious diseases* 2005; 37(9): 630-636.
270. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. *Journal of bacteriology* 2008; 190(16): 5690-5698.
271. Seno Y, Kariyama R, Mitsuhashi R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta Med Okayama* 2005; 59(3): 79-87.
272. Mohamed JA, Murray BE. Lack of correlation of gelatinase production and biofilm formation in a large collection of *Enterococcus faecalis* isolates. *Journal of clinical microbiology* 2005; 43(10): 5405-5407.
273. Qin Z, Ou Y, Yang L, Zhu Y, Tolker-Nielsen T, Molin S, Qu D. Role of autolysin-mediated DNA release in biofilm formation of *Staphylococcus epidermidis*. *Microbiology* 2007; 153(7): 2083-2092.
274. Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, Thurlow L, Tomich J, Hancock LE. A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular microbiology* 2009; 72(4): 1022-1036.



275. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *Journal of endodontics* 2010; 36(1): 87-90.
276. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *Journal of endodontics* 2011; 37(3): 363-366.
277. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *Journal of endodontics* 2012; 38(7): 927-930.
278. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Júnior NB, Duarte MAH, Ordinola-Zapata R, Graeff MSZ, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of endodontics* 2013; 39(3): 346-350.
279. Li W, Liu H, Xu Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. *Journal of endodontics* 2012; 38(7): 894-898.
280. Jackson F, Halder A. Incidence of yeasts in root canals during therapy. *Brit Dent J* 1963; 115(459-460).
281. Damm DD, Neville BW, Geissler RH, White DK, Drummond JF, Ferretti GA. Dentinal candidiasis in cancer patients. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1988; 65(1): 56-60.
282. Egan M, Spratt D, Ng YL, Lam J, Moles D, Gulabivala K. Prevalence of yeasts in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *International endodontic journal* 2002; 35(4): 321-329.
283. Tansey MR, Moore-Landecker E, Alexopoulos C, Mims C, Blackwell M. *Fundamentals of the Fungi Berli: 1998*, p.345-365
284. Brock T, Madigan M. *Biology of microorganisms. "6th Ed."*: NJ, Englewood Cliffs: Prentice-Hall: 1991, p.190-211
285. Soll DR. *Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta tropica* 2002; 81(2): 101-110.
286. Lucas VS. Association of psychotropic drugs, prevalence of denture-related stomatitis and oral candidosis. *Community dentistry and oral epidemiology* 1993; 21(5): 313-316.
287. Arendorf T, Walker D. The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. *Archives of Oral Biology* 1980; 25(1): 1-10.
288. Jacob LS, Flaitz CM, Nichols CM, Hicks MJ. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *The Journal of the American Dental Association* 1998; 129(2): 187-194.
289. Hodson J, Craig G. The incidence of *Candida albicans* in the plaques of teeth of children. *The Dental practitioner and dental record* 1972; 22(8): 296-301.
290. Lynch E, Beighton D. A comparison of primary root caries lesions classified according to colour. *Caries research* 1994; 28(4): 233-239.

291. Zambon JJ, Reynolds HS, Genco RJ. Studies of the subgingival microflora in patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of periodontology* 1990; 61(11): 699-704.
292. Waltimo T, Siren E, Torkko H, Olsen I, Haapasalo M. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *International Endodontic Journal* 1997; 30(2): 96-101.
293. Leavitt JM, Naidorf IJ, Shugaevsky P. The bacterial flora of root canals as disclosed by a culture medium for endodontics. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1958; 11(3): 302-308.
294. Kessler S. Endodontics 1973: a review. *The Journal of the Dental Association of South Africa= Die Tydskrif van die Tandheelkundige Vereniging van Suid-Afrika* 1975; 30(12): 917.
295. Scully C, Ei-Kabir M, Samaranayake LP. Candida and oral candidosis: a review. *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine* 1994; 5(2): 125-157.
296. Macdonald F, Odds F. Inducible proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. *Journal of Medical Microbiology* 1980; 13(3): 423-435.
297. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal* 1998; 31(1): 1-7.
298. Taschdjian CL, Burchall JJ, Kozinn PJ. Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes. *AMA journal of diseases of children* 1960; 99(2): 212-215.
299. Nguyen MH, Peacock JE, Morris AJ, Tanner DC, Nguyen ML, Snyderman DR, Wagener MM, Rinaldi MG, Victor LY. The changing face of candidemia: emergence of non-*Candida albicans* species and antifungal resistance. *The American journal of medicine* 1996; 100(6): 617-623.
300. Krause W, Matheis H, Wulf K. Fungaemia and funguria after oral administration of *Candida albicans*. *The Lancet* 1969; 293(75): 598-599.
301. Bohora A, Hegde V, Kokate S. Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extract and 2% sodium hypochlorite against *E. faecalis*, *C. albicans* and mixed culture-An in vitro study. *Endontology* 2010; 22(1): 8-12.
302. Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. *Archives of oral biology* 1988; 33(8): 617-619.
303. Shirtliff ME, Peters BM, Jabra-Rizk MA. Cross-kingdom interactions: *Candida albicans* and bacteria. *FEMS microbiology letters* 2009; 299(1): 1-8.
304. Radcliffe C, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker D. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *International Endodontic Journal* 2004; 37(7): 438-446.

305. Valera MC, Silva KCGd, Maekawa LE, Carvalho CAT, Koga-Ito CY, Camargo CHR. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *Journal of Applied Oral Science* 2009; 17(6): 555-559.
306. Koneman, Elmer W., et al. "Diagnostic microbiology." Koneman EW, Allen SD. *Mycobacteria*. Philadelphia: 1992, p.703-755.
307. George S, Kishen A, Song P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2005; 31(12): 867-872.
308. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of root canal biofilms of *Enterococcus faecalis* with ozone gas and passive ultrasound activation. *Journal of endodontics* 2012; 38(4): 523-526.
309. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *Journal of endodontics* 2009; 35(7): 981-985.
310. Jiang L-M, Hoogenkamp MA, van der Sluis LW, Wesselink PR, Crielaard W, Deng DM. Resazurin metabolism assay for root canal disinfectant evaluation on dual-species biofilms. *Journal of endodontics* 2011; 37(1): 31-35.
311. George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *Journal of endodontics* 2008; 34(9): 1119-1123.
312. Du T, Ma J, Yang P, Xiong Z, Lu X, Cao Y. Evaluation of antibacterial effects by atmospheric pressure nonequilibrium plasmas against *Enterococcus faecalis* biofilms in vitro. *Journal of endodontics* 2012; 38(4): 545-549.
313. Aubut V, Pommel L, Verhille B, Orsière T, Garcia S, About I, Camps J. Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2010; 109(2): 120-125.
314. De-Deus G, Namen F, Galan J, Zehnder M. Soft chelating irrigation protocol optimizes bonding quality of Resilon/Epiphany root fillings. *Journal of endodontics* 2008; 34(6): 703-705.
315. Paqué F, Rechenberg D-K, Zehnder M. Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *Journal of endodontics* 2012; 38(5): 692-695.
316. Zehnder M, Schicht O, Sener B, Schmidlin P. Reducing surface tension in endodontic chelator solutions has no effect on their ability to remove calcium from instrumented root canals. *Journal of endodontics* 2005; 31(8): 590-592.
317. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1983; 55(3): 307-312.

318. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* 2000; 26(6): 331-334.
319. Önçağ Ö, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *International endodontic journal* 2003; 36(6): 423-432.
320. Oliveira DP, Barbizam JV, Trope M, Teixeira FB. In vitro antibacterial efficacy of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2007; 103(5): 702-706.
321. Rizvi A, Zafar MS, Farid WM, Gazal G. Assessment of antimicrobial efficacy of MTAD, sodium hypochlorite, EDTA and chlorhexidine for endodontic applications: An in vitro study. *Middle-East Journal of Scientific Research* 2014; 21(2): 353-357.
322. Shih M, Marshall FJ, Rosen S. The bactericidal efficiency of sodium hypochlorite as an endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1970; 29(4): 613-619.
323. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi M, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. *International endodontic journal* 1999; 32(2): 99-102.
324. Gomes B, Ferraz C, ME V, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* 2001; 34(6): 424-428.
325. Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Australian Endodontic Journal* 2006; 32(3): 112-115.
326. Lester K, Boyde A. Scanning electron microscopy of instrumented, irrigated and filled root canals. *British dental journal* 1977; 143(11): 359-367.
327. Nygaard-Ostby B. Chelation in root canal therapy. *Odontol Tidskr* 1957; 65(1-11).
328. Loel DA. Use of acid cleanser in endodontic therapy. *The Journal of the American Dental Association* 1975; 90(1): 148-151.
329. Coons D, Dankowski M, Diehl M, Jakobi G, Kuzel P, Sung E, Trabitzsch U. Performance in detergents, cleaning agents and personal care products In: *Surfactants in consumer products*: Springer, 1987; 197-398.
330. Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* 1963; 16(1): 83-103.
331. Yoshida T, Shibata T, Shinohara T, Gomyo S, Sekine I. Clinical evaluation of the efficacy of EDTA solution as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics* 1995; 21(12): 592-593.

332. Mohammadi Z, Shahriari S. Residual antibacterial activity of chlorhexidine and MTAD in human root dentin in vitro. *Journal of Oral Science* 2008; 50(1): 63-67.
333. Sena N, Gomes B, Vianna M, Berber V, Zaia A, Ferraz C, Souza-Filho F. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *International endodontic journal* 2006; 39(11): 878-885.
334. Eddy RS, Joyce AP, Roberts S, Buxton TB, Liewehr F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on *E. faecalis* in bovine incisors. *Journal of endodontics* 2005; 31(9): 672-675.
335. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-u, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *Journal of endodontics* 2003; 29(5): 338-339.
336. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics* 2005; 31(1): 53-56.
337. Ercan E, Dalli M, Dülgergil ÇT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2006; 102(2): 27-31.
338. Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM, Campanelli AP, Bernardineli N. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2010; 36(8): 1389-1393.
339. Ferrer-Luque CM, Conde-Ortiz A, Arias-Moliz MT, Valderrama MJ, Baca P. Residual activity of chelating agents and their combinations with cetrimide on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2012; 38(6): 826-828.
340. Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S. Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems in vitro. *Journal of endodontics* 2013; 39(9): 1171-1175.
341. Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *Journal of Endodontics* 2006; 32(4): 331-333.
342. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual Effectiveness of Final Irrigation Regimens on *Enterococcus faecalis*-infected Root Canals. *Journal of endodontics* 2011; 37(8): 1121-1123.
343. Fegan SE, Steiman HR. Comparative evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd: YAG laser irradiation: an in vitro study. *Journal of Endodontics* 1995; 21(8): 415-417.

344. Dametto FR, Ferraz CCR, de Almeida Gomes BPF, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology* 2005; 99(6): 768-772.
345. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *Journal of endodontics* 2013; 39(4): 473-477.
346. Brito PR, Souza LC, de Oliveira JCM, Alves FR, De-Deus G, Lopes HP, Siqueira JF. Comparison of the effectiveness of three irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations: an in vitro study. *Journal of endodontics* 2009; 35(10): 1422-1427.
347. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *Journal of endodontics* 2001; 27(12): 765-767.
348. Heling I, Chandler N. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *International Endodontic Journal* 1998; 31(1): 8-14.
349. Pasqualini D, Cuffini AM, Scotti N, Mandras N, Scalas D, Pera F, Berutti E. Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *Journal of endodontics* 2010; 36(8): 1358-1360.
350. Sassone LM, Fidel RAS, Murad CF, Fidel SR, Hirata R. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. *Australian Endodontic Journal* 2008; 34(1): 19-24.
351. Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, Fekrazad R, Karamifar K, Eslami G, Dadresanfar B. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *Journal of oral science* 2011; 53(3): 355-360.
352. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2007; 33(7): 815-818.
353. Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *International endodontic journal* 2013; 46(7): 649-659.
354. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *Journal of Endodontics* 2003; 29(9): 576-579.
355. George S, Kishen A. Photophysical, photochemical, and photobiological characterization of methylene blue formulations for light-activated root canal disinfection. *Journal of Biomedical Optics* 2007; 12(3): 29-34.

356. Soares JA, de Carvalho MAR, Santos SMC, Mendonça RMC, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Júnior M, Magalhães PP, Santos MH, de Macêdo Farias L. Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics* 2010; 36(5): 894-898.
357. Bind J, Avoyne C, Delaval J. Critical analysis of isolation, counting and identification methods of *Listeria* in food industry. *Pathologie-biologie* 1996; 44(9): 757-768.
358. Brown M, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *Journal of Applied Bacteriology* 1993; 74(22): 14-23.
359. Costerton JW, Cheng K, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual Reviews in Microbiology* 1987; 41(1): 435-464.
360. Arias-Moliz, Maria Teresa, et al. "Effects of Dentin Debris on the Antimicrobial Properties of Sodium Hypochlorite and Etidronic Acid." *Journal of endodontics* 2016; 42(5): 771-775.
361. Baumgartner JC, Johal S, Marshall JG. Comparison of the antimicrobial efficacy of 1.3% NaOCl/BioPure MTAD to 5.25% NaOCl/15% EDTA for root canal irrigation. *Journal of Endodontics* 2007; 33(1): 48-51.
362. Kho P, Baumgartner JC. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2006; 32(7): 652-655.

## EKLER

### ÖZGEÇMİŞ

#### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Cevat Emre	<b>Soyadı :</b>	ERİK
<b>Doğ.Yeri</b>	Diyarbakır	<b>Doğ.Tar.</b>	19.06.1986
<b>Uyruğu</b>	TC	<b>Tel :</b>	05355760909
<b>Email :</b>	emreerik@gmail.com		

#### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Old. Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	SDÜ Sağlık bilimleri Enstitüsü Endodonti AD	2016
<b>Yüls.Lis.</b>	Atatürk Üniversitesi Diş hekimliği fakültesi	2010
<b>Lisans</b>	Atatürk Üniversitesi Diş hekimliği fakültesi	2010
<b>Lise</b>	Antalya Lisesi	2003

#### İş Deneyimi

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl - Yıl)</b>
		-
		-
		-

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>KPDS/ÜDS Puanı</b>	<b>(Diğer) Puanı</b>
İngilizce	65	4.5 (İELTS)



KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

Araştırmanın Açık Adı Araştırmanın Protokol Kodu	Etidronik Asit (HEBP)' in etkin konsantrasyonunun belirlenmesi ve antimikrobiyal etkinliğinin incelenmesi. (03.12.2014 tarih ve 204 sayılı karar)
---	---

<b>ETİK KURUL BİLGİLERİ</b>	ETİK KURULUN ADI	Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanlığı			
	AÇIK ADRESİ	S.D.Ü. Doğu Kampüsü Tıp Fakültesi Dekanlığı Binası – ISPARTA			
	TELEFON	246.2113704			
	FAKS	246.2371165			
	E-POSTA	tipetik@sdu.edu.tr			
<b>BAŞVURU BİLGİLERİ</b>	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Sorumlu : Doç. Dr. Gül ÇELİK ÜNAL Yardımcı : Arş. Gör. Dt. Cevat Emre ERİK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Endodonti			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Gül ÇELİK ÜNAL			
	DESTEKLEYİCİ	Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (BAP)			
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ ÜNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	Doç. Dr. Gül ÇELİK ÜNAL			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 : <input type="checkbox"/>	FAZ 2 : <input type="checkbox"/>	FAZ 3 : <input type="checkbox"/>	FAZ 4 : <input type="checkbox"/>
		Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>	
		Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>	
In vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz : Prospektif İnvitro Çalışma					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	
<b>DEĞERLENDİRİLEN BELGELER</b>	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/> İngilizce <input type="checkbox"/> Diğer <input type="checkbox"/>	
<b>DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER</b>	Belge Adı	Açıklama			
	SIGORTA	<input type="checkbox"/>			
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	S.D.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi		
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>			
	İLAN	<input type="checkbox"/>			
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>			
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>			
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>			
DİĞER	<input type="checkbox"/>				

Prof. Dr. Mustafa AKÇAM  
Etik Kurul Başkanı