

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



**DENTİN DİSKLERİ ÜZERİNDE OLUŞTURULAN  
*ENTEROCOCCUS FAECALIS* BİYOFİLM MODELİ  
KULLANILARAK SODYUM HİPOKLORİT, SETRİMİD VE  
*GLYCYRRHİZA GLABRA* L. EKSTRAKTININ  
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

**Hilmi Egemen GÜLDAŞ**

**DOKTORA TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ**

**Bu Tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri  
Koordinasyon Birimi tarafından 3168-D2-12 no'lu proje kapsamında  
desteklenmiştir.**

**Tez No: 102**

**2014-İSPARTA**

## KABUL VE ONAY

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

Tez Savunma Tarihi: 04.07.2014

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,  
Endodonti AD.

Üye : Prof. Dr. Raif ERİŞEN

İstanbul Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD.

Üye : Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ

Selçuk Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti AD.

Üye : Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN

Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji AD.

Üye : Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA

Süleyman Demirel Üniversitesi, Diş Hekimliği Fakültesi,  
Endodonti AD.

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

Doç. Dr. Nejdet ADANIR  
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 çalışmasıyla 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.

“Dentin Diskleri Üzerinde Oluşturulan *Enterococcus faecalis* Biyofilm Modeli Kullanılarak Sodyum Hipoklorit, Setrimid ve *Glycrrhiza glabra* L. Ekstraktının Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi” adlı Doktora tezi, Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi'ne uygun olarak hazırlanmıştır.

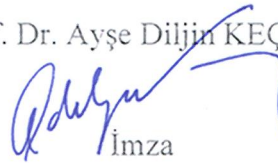
Tezi Hazırlayan

Hilmi Egemen GÜLDAŞ

  
İmza

Danışman

Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ

  
İmza

## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim süresince bilgi ve tecrübesini benimle paylaşan, beni cesaretlendirerek ufkumu genişleten, sabrını, hoşgörüsünü ve desteğini bu sürecin her aşamasında bana hissettiren değerli danışmanım Prof. Dr. Ayşe Diljin KEÇECİ'ye,

Doktora eğitimine başladığım ilk günden itibaren tüm bilgisi, hoşgörüsü ve tecrübesiyle her konuda bana yol gösteren, enerjisi ve tüm samimiyetiyle beni her zaman kardeşi gibi gören, aynı zamanda tez inceleme kurulumda da bulunan, Doç. Dr. Bulem ÜREYEN KAYA'ya,

Tez inceleme kurulundaki yönlendirmeleriyle beraber deney aşamaları sırasında kilit noktalarda çözüm önerileri sunan, değerli bilgilerini benden esirgemeyen, Doç. Dr. Emel SESLİ ÇETİN'e,

Doktora projemizi desteklediği için Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Gülyüzlü personeli ile doktora öğrenimimi kolaylaştırmaya çalışan Süleyman Demirel Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü'ne,

Deney aşamaları sırasında sonsuz anlayış ve sabırlarıyla tüm imkanlarını benimle paylaşan, adeta kendimi evimde hissettiren, başta Dr. Tuba ÖZTÜRK ve Dr. Esra ÇİFTÇİ olmak üzere tüm Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı çalışanlarına,

Tez çalışmamda kullanmış olduğum bitkisel ekstraktın hazırlanmasındaki yardımlarından ötürü, Prof. Dr. İsmail KARACA, Doç. Dr. Gülcan ÖZKAN ve Arş. Gör. Melis KARAPIRE'ye,

Tez çalışmamda kullanmış olduğum dentin disklerinin hazırlanmasındaki yardımlarından dolayı, Doç. Dr. Gül ÇELİK ÜNAL ve Maden Mühendisi Köksal ÇELİK'e,

Tez çalışmamın istatistiksel analizindeki yardımlarından ötürü, Yrd. Doç. Dr. Özgür KOŞKAN'a,

Hayata dair her türlü konuda tüm bilgi ve deneyimini hiçbir çıkar gözetmeden benimle paylaşan, umutsuzluğa kapıldığım dönemlerde bana destek olup yol gösteren, değerli ağabeyim ve hocam Dr. Ahmet SAVGAT'a,

Doktora ve lisans öğrenimim süresince bilgi ve tecrübeleri ile beni aydınlatan Endodonti Anabilim Dalı'ndaki hocalarıma,

Birlikte gülüp birlikte ağladığımız, aynı yolu paylaştığımız Endodonti Anabilim Dalı'nın bana kazandırdığı çok değerli asistan arkadaşlarıma,

Bilimin aydınlattığı yolda ilerlemeyi bana nasihat ederek, hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen, bugünlere gelmemdeki en büyük emeğin sahipleri, başta annem ve babam olmak üzere tüm aileme,

Onu tanıdığım ilk günden itibaren tüm pozitif enerjisi ile hayatıma neşe saçan, doktora eğitimimin her döneminde desteğini bana hissettiren İpek KÜRKLÜ'ye,

Tüm kalbimle sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

*Annem Selma GÜLDAŞ ve Babam Hasan Basri GÜLDAŞ'a ithaf ediyorum...*

*Saygılarımla...*

*Isparta, 2014*

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
<b>KABUL VE ONAY</b> .....	<b>ii</b>
<b>BEYAN</b> .....	<b>iii</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>iv</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>vii</b>
<b>SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ</b> .....	<b>x</b>
<b>TABLolar DİZİNİ</b> .....	<b>xii</b>
<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiii</b>
<b>RESİMLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>GRAFİKLER DİZİNİ</b> .....	<b>xvii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. GENEL BİLGİLER</b> .....	<b>2</b>
2.1. Endodonti Mikrobiyoloji İlişkisi .....	2
2.1.1. Enfekte Kök Kanallarında Bakterilerin Varlığını Saptayan İlk Çalışmalar	3
2.1.2. Enfeksiyonun Pulpaya Ulaşma Yolları.....	3
2.1.3. Kök Kanallarının Mikrobiyal Çeşitliliği.....	5
2.2. Enterokoklar ve <i>Enterococcus faecalis</i> .....	7
2.2.1. <i>E. faecalis</i> 'in Virülans Faktörleri .....	11
2.2.2. <i>E. faecalis</i> 'in Endodontik Açıdan Önemi .....	13
2.3. Biyofilm.....	15
2.3.1. Biyofilmin Yapısı .....	16
2.3.2. Biyofilm Oluşumu .....	17
2.3.3. Biyofilm Oluşturmanın Bakterilere Kazandırdığı Özellikler .....	19
2.3.4. Biyofilmlerin Görüntülenmesinde Kullanılan Mikroskobik Teknikler ....	21
2.3.5. Kök Kanallarında Biyofilmler .....	23
2.3.6. Kök Kanallarında Biyofilm Eliminasyonu .....	27
2.4. Kök Kanallarının Yıkınması.....	31
2.4.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) .....	33
2.4.2. Klorheksidin Glukonat (CHX) .....	34
2.4.3. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA) .....	35
2.4.4. Setrimid.....	36
2.4.5. <i>Glycrrhiza glabra</i> L. Ekstraktı .....	38
2.5. Endodontik Çalışmalarda Kullanılan Biyofilm Oluşturma Yöntemleri .....	38

2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri.....	44
2.6.1. Disk Diffüzyon Testi .....	44
2.6.2. Agar Dilüsyon Testi.....	44
2.6.3. Sıvı Mikrodilüsyon Testi .....	45
2.6.4. E-Test.....	45
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM.....</b>	<b>47</b>
3.1. Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması .....	47
3.1.1. <i>Glycrrhiza glabra</i> L. Ekstraktının Hazırlanması .....	47
3.1.2. Setrimid Çözeltisinin Hazırlanması .....	49
3.1.3. NaOCl Çözeltisinin Hazırlanması .....	49
3.2. Antimikrobiyal Ajanların <i>E. faecalis</i> Üzerindeki Duyarlılıklarının Belirlenmesi.....	49
3.2.1. Disk Diffüzyon Testi .....	49
3.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testi .....	50
3.3. Antimikrobiyal Ajanların Etkinliğinin Biyofilm Modelleri Üzerinde İncelenmesi.....	52
3.3.1. Dentin Disklerinin Hazırlanması .....	52
3.3.2. Biyofilm Modelinin Oluşturulması.....	56
3.3.3. Biyofilm Oluşumu .....	58
3.3.4. Biyofilm Eliminasyonu.....	61
3.3.5. Biyofilm Oluşumu ve Eliminasyonunun FESEM ile Görüntülenmesi.....	62
3.4. İstatistiksel Değerlendirme.....	63
<b>4. BULGULAR.....</b>	<b>64</b>
4.1. Antimikrobiyal Ajanların <i>E. faecalis</i> Üzerindeki Duyarlılıklarının Belirlenmesine Yönelik Bulgular.....	64
4.1.1. Disk Diffüzyon Testine Ait Bulgular .....	64
4.1.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testine Ait Bulgular .....	64
4.2. Antimikrobiyal Ajanların Etkinliğinin Biyofilm Modelleri Üzerinde İncelenmesine Yönelik Bulgular .....	66
4.2.1. Biyofilm Oluşumuyla İlgili Bulgular.....	66
4.2.2. Biyofilm Eliminasyonu İlgili Bulgular .....	66
4.2.3. Biyofilm Oluşumu ve Eliminasyonunun FESEM ile Görüntülenmesine İlişkin Bulgular .....	69
<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>79</b>
<b>6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....</b>	<b>93</b>
<b>ÖZET.....</b>	<b>95</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>96</b>



<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>97</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>117</b>
<b>EKLER.....</b>	<b>118</b>
<b>ETİK KURUL ONAYI.....</b>	<b>118</b>
<b>EK-1.....</b>	<b>119</b>
<b>EK-2.....</b>	<b>120</b>

## SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

<b>µl</b>	: Mikrolitre
<b>µm</b>	: Mikrometre
<b>°C</b>	: Derece santigrat
<b>ABD</b>	: Amerika Birleşik Devletleri
<b>Ace</b>	: Kollajene bağlanma proteini
<b>ATCC</b>	: Amerikan tip kültür koleksiyonu
<b>Bkz.</b>	: Bakınız
<b>CaOH<sub>2</sub></b>	: Kalsiyum hidroksit
<b>CFU</b>	: Koloni geliştiren birim
<b>CHX</b>	: Klorheksidin glukonat
<b>CLSM</b>	: Lazer taramalı konfokal mikroskopi
<b>ClO<sub>2</sub></b>	: Klorin dioksit
<b>dk.</b>	: Dakika
<b>DNA</b>	: Deoksiribonükleik asit
<b>EDTA</b>	: Etilen diamin tetraasetik asit
<b>EPS</b>	: Ekstraselüler polimerik madde
<b>Esp</b>	: Enterokokkal yüzey proteini
<b>FESEM</b>	: Alan emisyonlu taramalı elektron mikroskopi
<b>FTIR</b>	: Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
<b>geIE</b>	: Jelatinaz
<b>gr</b>	: Gram
<b>HOCl</b>	: Hipokloröz asit
<b>IL</b>	: İnterlökin
<b>L.</b>	: Linnaeus
<b>log<sub>10</sub></b>	: Logaritma 10 tabanı
<b>LTA</b>	: Lipoteikoik asit
<b>Ltd.</b>	: Limited
<b>MBK</b>	: Minimal bakterisidal konsantrasyon
<b>MHA</b>	: Muller-Hinton agar
<b>MHB</b>	: Muller-Hinton broth
<b>MİK</b>	: Minimum inhibisyon konsantrasyonu
<b>ml</b>	: Mililitre
<b>mm</b>	: Milimetre

<b>Na<sup>+</sup></b>	: Sodyum
<b>NaOCl</b>	: Sodyum hipoklorit
<b>NnG</b>	: Üreme görülmeyen örnek sayısı
<b>No</b>	: Numara
<b>OCl<sup>-</sup></b>	: Hipoklorit
<b>PBS</b>	: Fosfat tamponlu salin
<b>PCR</b>	: Polimerik zincir reaksiyonu
<b>pH</b>	: Hidrojen gücü (power of hydrogen)
<b>RNA</b>	: Ribonükleik asit
<b>RP-HPLC</b>	: Ters faz-yüksek performanslı sıvı kromografisi
<b>rpm</b>	: devir/dakika
<b>SEM</b>	: Taramalı elektron mikroskopu
<b>srpE</b>	: Serin proteaz
<b>SS</b>	: Standart sapma
<b>TEM</b>	: Geçirimli elektron mikroskopu
<b>TMR</b>	: Transversal mikroradyografi
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Tümör nekroz faktör alfa
<b>UV</b>	: Ultraviyole
<b>VBNC</b>	: Canlı fakat kültürize edilemeyen

## TABLÖLAR DİZİNİ

<b>Tablo 1.</b> Sekonder/inatçı enfeksiyon görülen dişlerden izole edilen <i>E. faecalis</i> oranları ve tanımlama yöntemleri. ....	7
<b>Tablo 2.</b> <i>E. faecalis</i> 'in taksonomik sınıflandırması. ....	8
<b>Tablo 3.</b> Farklı endodontik çalışmalarda tercih edilmiş biyofilm modelleri. ....	40
<b>Tablo 4.</b> Antimikrobiyal ajanların <i>E. faecalis</i> biyofilmleri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi için oluşturulan deney grupları. ....	57
<b>Tablo 5.</b> Her bir grup için uygulanacak işlemler listesi. ....	57
<b>Tablo 6.</b> <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) için disk diffüzyon testi ile elde edilen antimikrobiyal ajanlara ait inhibisyon zonlarının ölçüm değerleri. ....	64
<b>Tablo 7.</b> Antimikrobiyal ajanların <i>E. faecalis</i> (ATCC 29212) için MİK ve MBK değerleri. ....	66
<b>Tablo 8.</b> Farklı sürelerde antimikrobiyal ajan uygulandıktan sonra dentin diskleri üzerindeki ortalama bakteri sayısının değişimi ( $\log_{10}$ ). ....	66
<b>Tablo 9.</b> Antimikrobiyal ajan uygulaması öncesi dentin diskleri üzerindeki ortalama bakteri sayıları ve bu sayıların uygulama sonrası ortalama azalma miktarları ( $\log_{10}$ ). ....	67

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Elmas kaplı silindirik frezin şematik görüntüsü. .... 54

## RESİMLER DİZİNİ

<b>Resim 1.</b> <i>E. faecalis</i> 'in FESEM ile 30000 büyütme altında görüntülenmesi. ....	10
<b>Resim 2.</b> Koyun kanlı agar besi yerinde üretilen <i>E. faecalis</i> kolonisi. ....	10
<b>Resim 3.</b> Dentin tübülü içerisine penetre olan <i>E. faecalis</i> 'in FESEM ile 30000 büyütme altında görüntülenmesi. ....	14
<b>Resim 4.</b> Deneysel koşullarda dentin diskleri üzerinde oluşturulmuş <i>E. faecalis</i> biyofilminin FESEM ile 10000 büyütme altında görüntülenmesi. ....	15
<b>Resim 5.</b> <i>Glycyrrhiza glabra</i> L. (meyan kökü) bitkisinin toprak altı gövdesi ve kökleri. ....	48
<b>Resim 6.</b> Filtre kağıdı ve vakum pompası kullanılarak ekstraktın süzülmesi. ....	48
<b>Resim 7.</b> Rotary evaporatör kullanılarak ekstrakt içerisindeki metil alkol ve distile suyun uzaklaştırılması. ....	48
<b>Resim 8.</b> Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlar; sodyum hipoklorit (A), setrimid (B), <i>G. glabra</i> ekstraktı (C). ....	49
<b>Resim 9.</b> Densitometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteriyel süspansiyonun hazırlanması. ....	51
<b>Resim 10.</b> 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakları kullanılarak antimikrobiyal ajanların çift kat seri dilüsyonlarının oluşturulması ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi. ....	51
<b>Resim 11.</b> Çekilmiş dişlerin teflon kalıplar kullanılarak polyester rezin içerisine gömülmesi. ....	52
<b>Resim 12.</b> Hassas kesme cihazı ve elmas kesme diskleri kullanılarak 2 mm kalınlığındaki horizontal kesitlerin elde edilmesi. ....	53
<b>Resim 13.</b> Dentin disklerinin elde edilmesinde kullanılan özel yapım elmas kaplı silindirik frez. ....	53
<b>Resim 14.</b> 6 mm çapındaki dentin disklerinin elde edilmesi. ....	54
<b>Resim 15.</b> Dentin disklerinin elde edilmesi için oluşturulan standart düzenek. ....	55
<b>Resim 16.</b> Çekilmiş dişlerden elde edilen horizontal kesit ve dentin diski. ....	55

<b>Resim 17.</b> Polistiren plak kapaklarına tutturulan dentin diskleri ve karşılık gelen kuyucuklar.....	56
<b>Resim 18.</b> Dentin diskleri üzerindeki smear tabakasının kaldırılmasında kullanılan ultrasonik banyo.....	56
<b>Resim 19.</b> Dentin disklerine karşılık gelecek kuyucuklara bakteriyel süspansiyonun eklenmesi.....	58
<b>Resim 20.</b> Bakteriyel süspansiyon eklendikten sonra, hazırlanan plağın üç boyutlu çalkalayıcı tabla üzerinde 37°C’de inkübe edilmesi. ....	59
<b>Resim 21.</b> Dentin diskleri üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki bakteri sayısının hesaplanabilmesi için ultrasonik banyo içerisinde bekletilerek planktonik forma dönüştürülmesi. ....	60
<b>Resim 22.</b> Planktonik forma dönüştürülen bakterilerin sayılabilir değerler elde edilebilmesi için makrodilüsyon yöntemi ile seyreltilmesi.....	60
<b>Resim 23.</b> Seyreltilen bakterilerin MHA besi yerine ekilmesi (A) ve cam Drigalski spatülü kullanılarak besi yerine yayılması (B).....	61
<b>Resim 24.</b> MHA besi yerine ekimi ve yayımı yapılan bakterilerin inkübasyondan sonra koloni geliştirmiş görüntüsü. ....	61
<b>Resim 25.</b> Dentin diskleri üzerindeki biyofilm oluşumu ve eliminasyonunun görüntülenmesinde kullanılan FESEM cihazı.....	63
<b>Resim 27.</b> NaOCl ve steril salinin <i>E. faecalis</i> üzerindeki duyarlılığının disk diffüzyon testi ile belirlenmesi.....	65
<b>Resim 28.</b> Dentin diskleri üzerinde oluşturulan <i>E. faecalis</i> biyofilminin FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında incelenmesi. Biyofilm tabakasının homojen dağılım gösterdiği ve bakterilerin birbirine ve dentine tutunmasını sağlayan ekstraselüler matriks içerisinde gömülü olduğu görülmektedir. ....	69
<b>Resim 29.</b> Setrimid solüsyonun 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Dentin tübülleri çevresinde ekstraselüler matrisin bir kısmının parçalanmış olduğu, ancak bakterilerin tamamen elimine edilemediği belirlenmiştir. ....	70

- Resim 30.** Setrimid solüsyonunun 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Dentin tübülleri çevresinde ekstraselüler matrisin büyük oranda parçalanmış olduğu, ancak bakterilerin tamamen elimine edilemediği belirlenmiştir. .... 71
- Resim 31.** Setrimid solüsyonunun 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin büyük oranda elimine edildiği belirlenmiştir. ... 72
- Resim 32.** *G. glabra* ekstraktının 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matrisin bütünlüğünü koruduğu belirlenmiştir. .... 73
- Resim 33.** *G. glabra* ekstraktının 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. .... 74
- Resim 34.** *G. glabra* ekstraktının 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin sınırlı düzeyde elimine edilebildiği belirlenmiştir. .... 75
- Resim 35.** NaOCl solüsyonunun 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin sınırlı düzeyde elimine edilebildiği belirlenmiştir. .... 76
- Resim 36.** NaOCl solüsyonunun 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin büyük oranda elimine edildiği belirlenmiştir. ... 77
- Resim 37.** NaOCl solüsyonunun 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matrisin tamamen elimine olduğu, ancak bir miktar bakterinin canlılığını koruduğu belirlenmiştir. .... 78



## GRAFİKLER DİZİNİ

- Grafik 1.** Farklı antimikrobiyal ajan uygulamasını takiben biyofilm eliminasyonunun ( $\log_{10}$ ) uygulama süresine göre değişiminin sütun grafiği ile gösterilmesi..... 68
- Grafik 2.** Farklı antimikrobiyal ajan uygulamasını takiben biyofilm eliminasyonunun ( $\log_{10}$ ) uygulama süresine göre değişiminin çizgi grafiği ile gösterilmesi ..... 68

## 1. GİRİŞ

Kök kanal tedavisini takiben kanal içerisinde hayatta kalan mikroorganizmalar uygun şartlar oluştuğunda üremeye devam edip hastalık yapabilecek virülansa ulaşarak, endodontik tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olabilirler (1). Sekonder enfeksiyon olarak adlandırılan bu olgularda *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) en sık izole edilen türdür (2). *E. faecalis*'in sahip olduğu enzimler sayesinde dentine bağlandığı ve dentin tübüllerine penetre olarak kanal içi dezenfeksiyon prosedürlerine direnç gösterdiği bilinmektedir (3).

Son yıllarda endodontik tedaviye cevap vermeyen, inatçı enfeksiyona sahip olan dişlerin incelenmesiyle endodontide biyofilmler ve biyofilm eliminasyonunun önemi ortaya çıkmıştır (4-7). Sodyum hipoklorit (NaOCl) endodontide uzun yıllardır kullanılan ve biyofilmler üzerindeki etkinliği kanıtlanmış bir antimikrobiyal ajan olmasına rağmen (8, 9), periapikal dokular üzerinde toksik etkilere sahip olması (10) ve dentinin mekanik özelliklerini zayıflatması nedeniyle (11), endodontide alternatif irrigasyon solüsyonları arayışı sürmektedir.

Bu çalışmanın amacı NaOCl, setrimid ve *G. glabra* ekstraktının dentin disklerinde oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini minimal bakterisidal konsantrasyonları düzeyinde, üç farklı uygulama süresinde değerlendirmektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Endodonti Mikrobiyoloji İlişkisi

Sağlıklı bir dişte kök kanal sistemi sterildir ve ağız mikrobiyotasından mine ve sement aracılığı ile ayrılmıştır. Çeşitli nedenlerle kök kanal sisteminin enfekte olduğu durumlarda enflamasyon dişi çevreleyen sement, periodontal ligament ve kemiğe ilerleyerek bu bölgelerde patogeneze yol açıp, apikal periodontitis oluşumuna neden olabilir (12). Kimyasal ve fiziksel faktörlerin periradiküler enflamasyonu başlattığı bilinmesine rağmen, apikal periodontitisin farklı formlarının ilerlemesi ve devamlılığını sürdürebilmesi için birçok bilimsel dayanağa göre endodontik enfeksiyon oluşması gereklidir (13-16). Endodontik enfeksiyonlar çürük, travma, periodontal hastalıkların bir sekeli olarak ya da iatrojenik nedenlere bağlı olarak pulpa nekrozunu takiben veya kök kanal tedavisi için pulpanın uzaklaştırılması sonucu konak savunmasının ortadan kalktığı durumlarda ortaya çıkabilir (17).

Mantarlar, arkealar ve virüslerin de endodontik enfeksiyonlarla ilişkili olduğu bilinmesine rağmen (18-21), bakteriler apikal periodontitisin patogenezinde rol alan esas mikroorganizmalardır (17). Farklı tip endodontik enfeksiyonlarda 100 tür ve 9 filuma ait 460'tan fazla bakteri türü ve filotip saptanmıştır (22). Kök kanal sisteminde kolonize olan bakteriler, apikal ve lateral foramen veya kök perforasyonları aracılığıyla periradiküler dokulara giriş yaparlar. Bakteri ve konak savunmasının karşı karşıya gelmesi sonucu, periradiküler dokularda enflamatuvar ve immünolojik reaksiyonlar oluşur. Bu defans mekanizmaları, konak için koruyucu olmasına rağmen, aynı zamanda yıkıcı olarak apikal periodontitis gelişimine neden olabilmektedir.

Endodontik tedavinin esas hedefi; apikal periodontitis gelişimini önlemek veya periapikal doku iyileşmesini uyuracak uygun koşulların oluşmasını sağlamaktır. Bu amaçla, endodontik tedavi ile enfeksiyon odağının ortadan kaldırılması ve/veya mikroorganizmaların kök kanalında veya periapikal dokularda enfeksiyon ya da reenfeksiyon oluşumunun engellenmesi hedeflenir. Hastalık etiyojisi ve patogenezinin tamamen anlaşılması efektif bir tedavi uygulanabilmesi için şarttır. Bu

nedenle bilimsel dayanakları olan yüksek kalitede bir endodontik tedavi için apikal periodontitisin mikrobiyolojik yönünün iyi bilinmesi gerekmektedir.

### **2.1.1. Enfekte Kök Kanallarında Bakterilerin Varlığını Saptayan İlk Çalışmalar**

Kök kanallarında bakterilerin varlığı ilk kez 17. yüzyılda Antonie van Leeuwenhoek (23) tarafından gösterilmiştir. 1894'de Miller (24) apikal periodontitis gelişiminde bakterilerin varlığını göstermiş ve kök kanal örneklerini inceleyerek şimdiki adıyla kok, basil ve spiral (spiroket) olarak bilinen bakteri türlerini görüntülemiştir. Ayrıca kök kanalının koronal, orta ve apikal bölgelerinde farklı morfolojik özelliklere sahip türler tespit etmiştir. Kakehashi ve ark. (14) germ free sıçanlarla yaptıkları bir çalışmada, ağız ortamına ekspoz edilen dental pulpalarda pulpa nekrozu ve apikal periodontitis oluşabilmesi için ortamda mutlaka bakterilerin bulunması gerektiğini belirtmişlerdir.

Apikal periodontitis etiyojisinde bakterilerin önemli bir role sahip olduğu daha sonra Sundqvist tarafından da onaylanmıştır. Sundqvist (16) anaerob kültür tekniklerini geliştirerek, travma sonrası pulpa nekrozu görülen dişleri incelemiş ve apikal periodontitis gelişiminde bakterilerin rol oynadığını bir kez daha kanıtlamıştır. Moller ve ark. (15) maymun dişleri üzerinde yaptıkları çalışmada, devitalize edilen enfekte pulpalı dişlerde apikal periodontitis gelişirken, devitalize edilen enfekte olmamış pulpalı dişlerde ise periradiküler dokularda anlamlı düzeyde patolojik değişiklik oluşmadığını belirterek, apikal periodontitis gelişiminde bakterilerin rolünü bir kez daha vurgulamışlardır.

### **2.1.2. Enfeksiyonun Pulpaya Ulaşma Yolları**

Sağlıklı bir dişte pulpodentin kompleksi sterildir ve ağız mikroflorasından mine ve sement aracılığı ile ayrılmıştır. Ancak bu doğal katmanların bütünlüğü; çürük, travma sonrası oluşan çatlak ve kırıklar, restoratif prosedürler, periodontal tedaviler, atrizyon ve abrazyon gibi nedenlerle bozulmuşsa veya doğal olarak oluşmamışsa, pulpodentin kompleksi ağız ortamına açık hale gelir ve çürük, tükürük veya dental plak içerisindeki mikroorganizmaların saldırısına maruz kalır (17).

*Çürük:* Direkt pulpa ekspozuna neden olarak bakterilerin pulpaya ulaşmasındaki en önemli yoldur. Derin bir çürük lezyonu içerisindeki bakteriler, dentin tübüleri aracılığı ile pulpa ekspoz olmadan önce de pulpaya ulaşabilirler (25). Ancak pulpa vital olduğu müddetçe enfeksiyona karşı kendini savunur (26). Diğer taraftan, pulpanın vital bütünlüğü bozulmuşsa ve savunma mekanizması zayıflamışsa, enfeksiyonun başlayabilmesi için çok az miktarda bakteri varlığı yeterlidir. Çürük sürecine dahil olan birçok bakteri hareketsizdir, tekrarlayan hücre bölünmeleri ve çiğneme sırasında oluşan hidrostatik basınca bağlı olarak dentin tübüllerinin içerisinde hareket ederler (27).

*Yan kanallar:* Periodontal hastalıkla ilişkili subgingival biyofilmlerde bulunan mikroorganizmalar; servikal kök yüzeyindeki dentin tübüleri, lateral veya apikal foramen aracılığıyla kök kanalına ulaşabilirler.

*Dentin tübüleri:* Sağlıklı dentinin tübüler yapısı sayesinde geçirgen özellikte olması, dentinin açığa çıktığı durumlarda pulpanın enfekte olması riskini doğurur. Dentin tübüleri konik şekillidir ve tüm dentin boyunca çaprazlamasına uzanırlar. Tübüller pulpa yakınlarında en geniş çapa sahipken (ortalama 2,5  $\mu\text{m}$ ), mine ve sement yakınlarında daha dardır (ortalama 0,9  $\mu\text{m}$ ) (28). En dar tübül çapı bile ağız ortamında bulunan birçok bakteriyel türün hücre çapından daha geniştir (0,2  $\mu\text{m}$ -0,7  $\mu\text{m}$ ). Bu nedenle dentin tübülerine ulaşan bakteriler hiçbir engelle karşılaşmadan pulpaya ulaşabilirler (17). Non-vital dişlerde, vital olanlara göre bakteriyel invazyonun daha hızlı gerçekleştiği bildirilmiştir (29).

*Mine çatlakları:* sadece travmaya uğramış dişler değil birçok dişte makro ve mikro mine çatlakları bulunabilir ve bu çatlaklar mine dentin birleşimine uzanabilir (30). Tek bir çatlak, birçok dentin tübülünün ağız ortamına açık hale gelmesine neden olabilir ve bu çatlak bakteriler için giriş yolu oluşturur.

*Travma:* Direkt pulpa ekspozuna neden olan en önemli etkenlerden biridir. Eğer travma sonrası pulpa canlılığını koruyor ise, dentin sıvısı ve tübüler içerik bakterilerin tübüllere penetre olmasına karşı direnç gösterir ve pulpanın sağlığını korunur. Diğer taraftan travmanın bir sonucu olarak pulpa nekrotik hale dönüşmüşse tübüler içerik bakteriyel penetrasyon karşısında koruyucu rolünü kaybeder ve dentin kalınlığına bakılmaksızın dentin tübüleri bakterilerin pulpaya ulaşmasındaki esas

yola dönüşür (17). Direkt pulpa ekspozuna neden olan etkenlerden biri de iatrojenik restoratif prosedürlerdir. Pulpa ekspozu ile tüm kanalın enfeksiyonu arasında geçen süre önceden tahmin edilemez ancak bu süreç genellikle yavaş ilerlemektedir (31).

*Anakorezis:* Organizmanın herhangi bir yerinde kan veya lenf yoluyla sistemik dolaşıma geçen bakterilerin, hasarlı bölgelerde damar dışına çıkarak enfeksiyona neden olmasıdır (32). Bu teoriye göre pulpa nekrozunu takiben gelişen bakteriyemi sonucu bakterilerin pulpaya ulaşabildiği savunulmaktadır. Ancak bu sürecin, mikroorganizmaların kök kanalına ulaşma yollarından biri olduğuna dair kesin bir kanıt yoktur.

Bakteriler pulpaya her ne şekilde ulaşırsa ulaşsın primer endodontik enfeksiyon oluşabilmesi için ortamda nekrotik pulpa dokusu olması gereklidir. Pulpa vital olduğu müddetçe kendisini bakteriyel invazyon ve kolonizasyona karşı koruyabilir. Ancak, çürük, travma, operatif işlemler veya periodontal hastalık nedeniyle pulpa nekroze olmuşsa, nekrotik doku çabucak enfekte olmaktadır, çünkü nekrotik pulpa dokusunda konak savunması yetersiz kalır (33).

### **2.1.3. 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 (33).

Kök kanal enfeksiyonları dinamik bir süreçtir ve farklı evrelerde farklı türler baskın olurlar. Pulpal enfeksiyonun başlangıç aşamasında fakültatif bakteriler baskındır (34). 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 (22). Kök kanal sistemine kolonize olan bakteriler için temel besin kaynakları şunlardır (17);

- 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 (22).

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 *Veilonella* ve Gram-pozitif; *Porvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Olsenella*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* ve *Eubacterium* bakterilerinden oluşur (22, 35).

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 (36-38). 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 (36-44). 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 (45-61) (**Tablo 1**).

**Tablo 1.** Sekonder/inatçı enfeksiyon görülen dişlerden izole edilen *E. faecalis* oranları ve tanımlama yöntemleri.

<b>Araştırmacı</b>	<b>Araştırma Yılı</b>	<b>Tanımlama Yöntemi</b>	<b>İzolasyon Oranı</b>
Engstrom (45)	1964	Kültür	5/21 (%24)
Moller (46)	1966	Kültür	9/31 (%29)
Sundqvist ve ark. (47)	1998	Kültür	9/24 (%38)
Molander ve ark. (48)	1998	Kültür	32/68 (%47)
Peciuliene ve ark. (49)	2000	Kültür	14/20 (%70)
Peciuliene ve ark. (50)	2001	Kültür	21/33 (%64)
Hancock III ve ark. (51)	2001	Kültür	10/33 (%30)
Pinheiro ve ark. (52)	2003	Kültür	27/51 (%53)
Siqueira ve Rocas (53)	2004	PCR	17/22 (%77)
Rocas ve ark. (54)	2004	PCR	20/30 (%67)
Rocas ve ark. (55)	2004	PCR	9/14 (%64)
Zoletti ve ark. (56)	2006	PCR	18/23 (%78)
Sedgley ve ark. (57)	2006	Kültür	4/48 (%8)
Sedgley ve ark. (57)	2006	PCR	43/48 (%90)
Schirrmeister ve ark. (58)	2007	PCR	4/13 (%31)
Gomes ve ark. (59)	2008	PCR	35/45 (%78)
Rocas ve ark. (60)	2008	PCR	8/17 (%47)
Rocas ve ark. (60)	2008	Dama tahtası	4/17 (%23,5)
Schirrmeister ve ark. (61)	2009	Kültür/16S RNA sıralama	3/10 (%30)

## **2.2. Enterokoklar ve *Enterococcus faecalis***

Enterokoklar tek başlarına, çiftler veya kısa zincirler halinde bulunabilen küre veya ovoid şekilli, hareketsiz, gram-pozitif koklardır. Fakültatif anaerop oldukları için oksijen varlığında veya yokluğunda üreyebilirler (55). 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 (dışkının her gramında  $10^5$ - $10^8$  CFU) bulunurlar ve çoğunlukla konağa zarar vermezler. Ayrıca daha düşük miktarlarda, kadınların ürogenital bölgesinde ve oral kavitede de bulunurlar (62). Yüksek alkalın pH (9,6) ve tuz konsantrasyonları gibi zor çevre koşullarında bile hayatta kalabilirler. Safra tuzları, deterjanlar, ağır



metaller, etanol, azid ve kurutmaya direnç gösterirler. 10-45<sup>0</sup>C arasında üreyebilir ve 60<sup>0</sup>C sıcaklıkta 30 dakika hayatta kalabilirler (63).

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 (64) (**Tablo 2**).

**Tablo 2.** *E. faecalis*'in taksonomik sınıflandırması.

İkili Adlandırma	<i>Enterococcus faecalis</i>
Üst Alem (Domain)	<i>Bacteria</i>
Alem (Kingdom)	<i>Eubacteria</i>
Şube (Phylum)	<i>Firmicutes</i>
Sınıf (Class)	<i>Bacili</i>
Takım (Order)	<i>Lactobacillales</i>
Aile (Family)	<i>Enterococcaceae</i>
Cins (Genus)	<i>Enterococcus</i>
Tür (Species)	<i>faecalis</i>

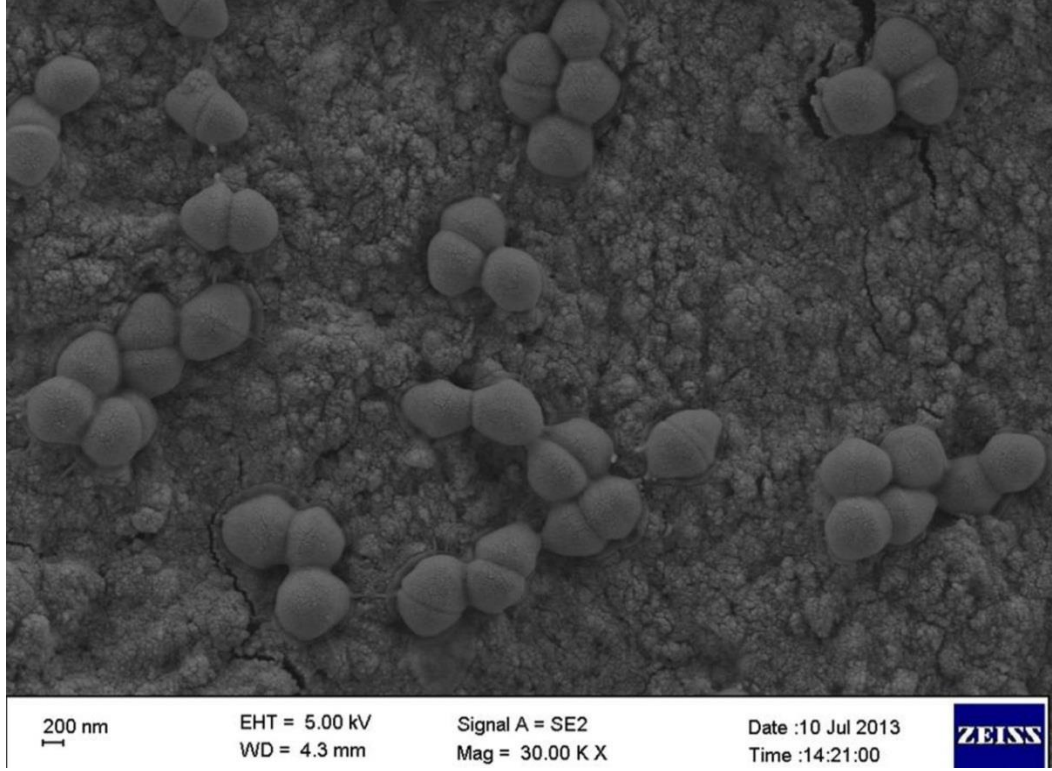
Enterokoklar içerisinde 23 adet tür tanımlanmıştır ve bu türler mannitol, sorboz ve arjininle etkileşimine bağlı olarak 5 grupta toplanmıştır. *E. faecalis*; *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* ve *E. gallinarum* ile birlikte aynı grubun üyesidir. Bu beş tür, mannitol besi yeri içerisinde asit oluşturup arjinini hidrolize ederken, sorboz besi yeri içerisinde asit oluşturamazlar (65). *E. faecalis* arabinoz negatiftir ve bu gruptaki diğer üyelerden farklı olarak, piruvatı kullanır ve tellüriti tolere eder (66).

Enterokokların subakut endokardit, bakteriyemi, bakteriyel menenjit ve üriner sistem enfeksiyonlarına yol açabildiği belirtilmiştir (67). 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 (68). Ampisilin ve vankomisin'e karşı duyarlı olmalarına rağmen, bu antibiyotiklerin uzun süre kullanımıyla direnç

geliştirebilirler (69). Direnç geliştirebilme özelliklerinden dolayı, enterokokkal 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 (70) (**Resim 1, 2**).

*E. faecalis*, oral kavitenin olağan sakinlerindendir. Hem primer endodontik enfeksiyonlar hem de sekonder/inatçı enfeksiyonlar gibi periradiküler hastalıkların farklı formlarıyla ilişkilendirilmiştir (55). Primer endodontik enfeksiyonlu dişlerde, baskın türler arasında zorunlu anaerop ve bazı fakültatif anaeropların 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 (55). Sekonder/inatçı enfeksiyonlarda bu oran artarak, %90'a ulaşmaktadır (45-61) (**Tablo 1**). Prevelanslarda görülen bu dalgalanmanın nedeni olarak, farklı tanımlama tekniklerinin kullanılması, coğrafik farklılıklar ve örnek sayılarının farklı olması gösterilmiştir.



**Resim 1.** *E. faecalis*'in FESEM ile 30000 büyütme altında görüntülenmesi.



**Resim 2.** Koyun kanlı agar besi yerinde üretilen *E. faecalis* kolonisi.

### 2.2.1. *E. faecalis*'in Virülans Faktörleri

Mikroorganizmaların hastalık oluşturabilme yeteneklerine patojenite denir. Virülans bir mikroorganizmanın patojenite derecesini belirtir ve virülans faktörleri patojeniteye destek olan mikrobiyal ürünler, yapısal bileşenler veya mikroorganizmanın izlediği stratejiyi içerir (17). Bakteriler konak dokularında direkt veya indirekt hasara neden olarak patojenitelerini ortaya koyarlar (71, 72). *E. faecalis*'in hayatta kalmasını, dirençli olmasını sağlayan birçok virülans faktörü vardır:

**Lipoteikoik asit (LTA)**, Gram-pozitif bakterilerin hücre yüzeyleri ile streptokok ve laktobasillerin sıvı kültürlerinde bulunan, poligliserolfosfat yapıdaki bir grup amfiyotik moleküldür. Lökositleri uyararak, TNF- $\alpha$ , interlökin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interlökin 6 (IL-6) ve interlökin 8 (IL-8) gibi enflamatuar medyatörlerin salınımını sağlar. Bakteri, hücre duvarına etki eden antibiyotikler veya deterjanlarla karşılaştığında, LTA'nın hücre duvarının otolizini inhibe ettiği bildirilmiştir. Ayrıca, *E. faecalis*'in olumsuz koşullarda kendisini savunmak için girdiği VBNC fazında LTA miktarının iki katına çıktığı belirtilmiştir. Bu nedenle LTA'nın bakterinin olumsuz koşullara direnç geliştirmesine neden olduğu ve özellikle kök kanal medikamentlerinin etkinliğini azalttığı düşünülmektedir (3, 73).

**Süperoksit anyonu**, oldukça reaktif bir oksijen radikalidir, enflamatuar hastalıklardaki hücre ve doku hasarından sorumludur. Süperoksit anyonu ve diğer oksijen radikalleri lipidler, proteinler ve nükleik asitler gibi çeşitli biyolojik bileşikler üzerinde yıkıcı etkilere sahiptirler. Esas olarak nötrofiller ve diğer fagositik hücreler tarafından salınan süperoksit anyonu, *E. faecalis* tarafından da salınarak enflamasyon bölgesinde doku hasarına ve kemik yıkımına neden olmaktadır (3).

**Enterokokkal yüzey proteini (Esp)**, yüksek molekül ağırlıklı bir yüzey proteindir (74). Bakteriyemi ve endokardit vakalarından sıklıkla izole edilirken, sağlıklı bireylerden daha nadir izole edilmektedir. *E. faecalis*'in canlı olmayan yüzeylere tutunmasına ve kolonizasyonuna yardımcı olduğu ve biyofilm oluşumunu uyardığı belirtilmiştir (75).

**Feromonlar**, kromozal olarak kodlanmış 7-8 amino asit uzunluğunda peptidlerdir. Antibiyotik direnci ve sitolizin üretimi gibi diğer virülans özelliklerinin

*E. faecalis* suşları arasında yayılmasını sağlayan işaretçi moleküllerdir. Öte yandan, kemotaktik etki göstererek, konak hücrelerinin süperoksit anyonu üretimini uyarırlar (76).

**Agregasyon maddeleri**, bakteriler arasında plazmid değişiminin olabilmesi için verici ve alıcı bakteriler arasındaki yüzey temasının sağlanmasından sorumludur. Ayrıca *E. faecalis*'in nötrofillere direnç göstermesini sağlarlar (77).

**Jelatinaz**, *E. faecalis*'in çinko içeren ekstraselüler metalloproteinazıdır. *E. faecalis*'in feromonlarıyla ilişkili peptidlerden jelatini, kollajeni, fibrinojeni, kazeini, hemoglobini, insülini ve diğer biyoaktif peptidleri hidrolize eden bir enzimdir (78). Matriks metalloproteinaz ailesinin bir üyesi olarak; fibroblastlar ve osteoklastlar gibi, konak hücrelerinin çoğu tarafından üretilebilir ve normal fizyolojik süreçte yer alır. Ancak kontrolsüz salımı durumunda kanser hücrelerinin invazyonu, artrit ve periodontitis gibi patolojik durumlarla ilişkili olduğu belirtilmiştir. *E. faecalis* tarafından salınan jelatinazın, kollajenin hidrolizine neden olarak periapikal enflamasyonun patogeneğinde önemli rol aldığı düşünülmektedir (3).

**Serin proteaz**, *E. faecalis* yüzeyinde bulunan adezinlerin bağlanan yüzeylerini açığa çıkararak veya adezinleri modifiye ederek *E. faecalis*'in dentine bağlanmasına yardımcı olmaktadır (79, 80).

**Hyaluronidaz**, bağ dokudaki hyaluronik asidi parçalayan ve doku hasarıyla yakından ilişkili indirgeyici bir enzimdir. Bağ dokusunun mukopolisakkarit kısmını depolimerize ederek, bakteriyel invazyonun artmasına neden olduğu gibi, aynı zamanda bakteriler için besin kaynağı olan çeşitli substratların açığa çıkmasını sağlar (81). Apikal periodontitis ile ilişkili enfekte kök kanallarındaki bakterilerin ürettiği hyaluronidaz, klinik semptomların derecesiyle (akut-subakut) yakından ilişkilidir. Hyaluronidaz bağ doku üzerindeki yıkıcı etkilerinin yanında, bağ doku içerisine bakteriyel invazyonu kolaylaştırarak, kök kanallarından periapikal lezyon içine bakterilerin göçünü sağlamaktadır (3).

**EfaA geni**, *E. faecalis*'in hücre yüzeyinde bulunan bir adezindir. Bakterinin manganez transportunda rol almaktadır. Birçok mikroorganizmanın büyüme ve hayatta kalabilmesi için manganeze ihtiyacı vardır. Serum ve dentin gibi manganez

iyonunun yeteri kadar bulunmadığı ortamlarda, sitoplazmik homeostazisinin düzenlenebilmesi için efaA geninin ekspresyonu artmaktadır (3).

**Kollajen bağlanma proteini (Ace)**, *E. faecalis*'in hücre yüzeyinde bulunan bir adezindir. Bakterinin dentine ve ekstraselüler matriks proteinlerine bağlanmasına yardımcı olmaktadır (79, 80).

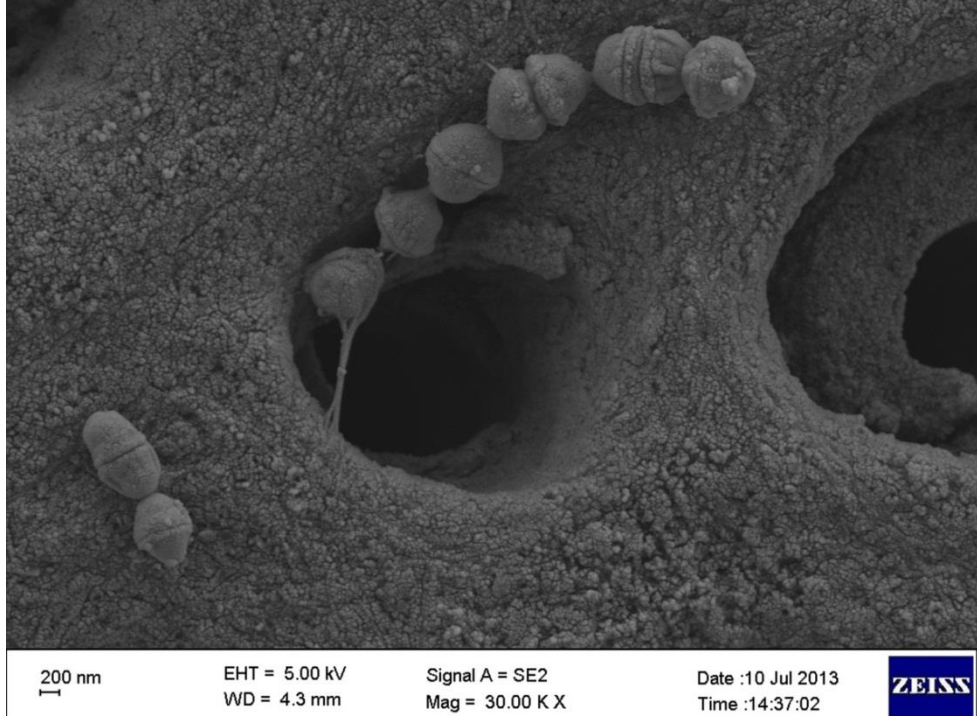
**Sitolizin**, plazmid veya kromozal olarak kodlanmış bir bakteriosindir. *E. faecalis* sahip olduğu bakteriosinler sayesinde diğer özellikle Gram-pozitif türlerle yarışarak mikrobiyotanın çeşitliliğini etkilemektedir (82).

### 2.2.2. *E. faecalis*'in Endodontik Açıdan Önemi

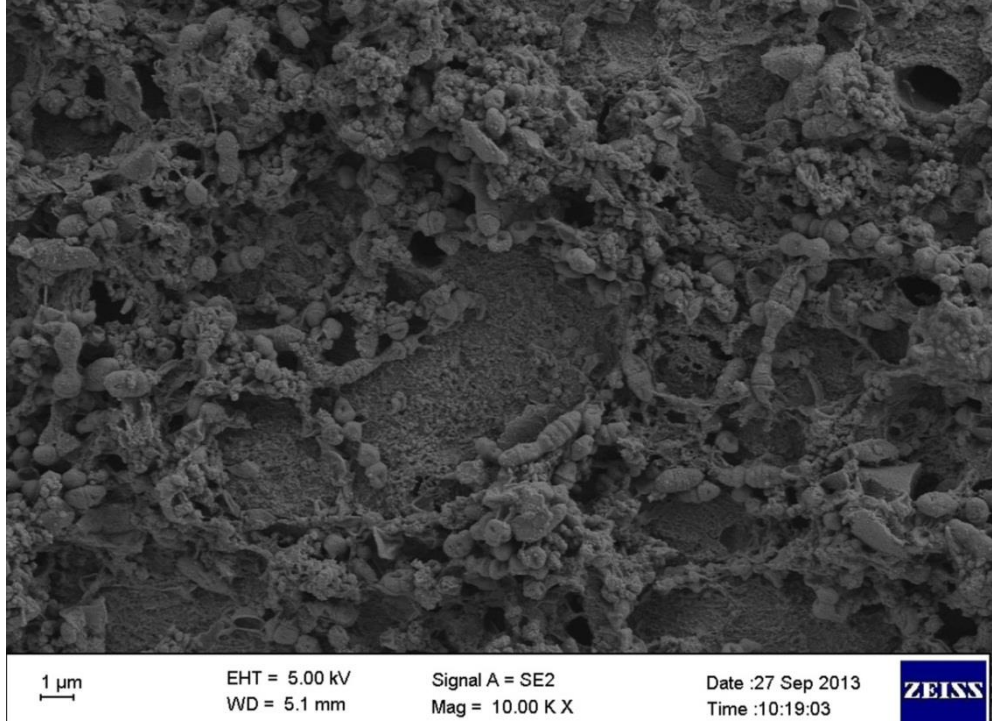
*E. faecalis* kök kanallarına tedavi sırasında, seanslar arasında ve tedavi tamamlandıktan sonra ulaşabilmektedir (55). Bu bakterinin endodontik tedavi görmüş dişlerde, primer endodontik enfeksiyonlu dişlere oranla yaklaşık 9 kat daha fazla oranda bulunduğu bildirilmiştir (55). Bu durum, primer enfeksiyonlarda 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 (83), bu türün kök kanalına sekonder invaze olarak kolonize olabildiğini, sekonder enfeksiyona neden olduğunu ve sonrasında enfeksiyonun inatçı hale geldiğini desteklemektedir (22, 84). 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. Sahip olduğu Ace ve Esp genleri ile salgıladığı jelatinaz ve serin proteaz gibi enzimler, *E. faecalis*'in dentine bağlanmasını ve dentin tübüllerinin derinlerine penetre olmasını sağlayarak (85, 86), bakterinin mekanik preperasyondan ve irrigasyon ajanlarından daha az etkilenmesine neden olur (85, 87) (**Resim 3**). Ek olarak *E. faecalis* biyofilm formuna dönüşmesi halinde, planktonik formlarına oranla konak savunmasına, antimikrobiyal ajanlara ve olumsuz çevresel koşullara daha da dirençli hale gelir (88) (**Resim 4**). *E. faecalis* bünyesinde bulunan proton pompası sayesinde yüksek pH'lara sitoplazmasını asitleştirerek karşı koyar (89), dolayısı ile ara seanslarda medikament olarak kullanılan kalsiyum hidroksit (CaOH<sub>2</sub>)'e karşı

dirençlidir (90). 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 (47), bu nedenle tedavi görmüş dişlerden tek başına izole edilebilir (3). Çevresel şartlar *E. faecalis*'in gen ekspresyonlarını düzenleyerek, çeşitli koşullara adaptasyon yeteneği kazandırır (91). 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 (91).



**Resim 3.** Dentin tübülü içerisine penetre olan *E. faecalis*'in FESEM ile 30000 büyütme altında görüntülenmesi.



**Resim 4.** Deneysel koşullarda dentin diskleri üzerinde oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilminin FESEM ile 10000 büyütme altında görüntülenmesi

*E. faecalis*'in besin kıtlığı yaşanan çevresel koşullarda hayatta kalabilme yeteneğine sahip olduğu ve tekrar besin kaynağına ulaştığında gelişimine devam ettiği belirtilmiştir (92). Ayrıca, besin sıkıntısı çekmesi durumunda serumu besin kaynağı olarak kullanabilmektedir (92). Doldurulmuş kök kanallarında uzun süreli açlık fazına karşı koyma yeteneğine sahiptir (93), 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 başarısız vakalardaki yüksek prevalansını açıklar niteliktedir.

### 2.3. 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 (94-97). Biyofilm oluşturma yeteneği bir virülans faktör olarak tanımlanmıştır ve biyofilm oluşumu için sıvı ortamda serbest halde bulunan planktonik mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması



gerekmektedir (98). Mikroorganizmalar tarafından üretilen ekstraselüler matris, mikroorganizmaların yalnızca bir yüzeye tutunmasını sağlamakla kalmaz ayrıca mikroorganizmaların birbirlerine tutunarak biyofilm yapısına katılmalarını da sağlar (99). Bu sürecin devamında yüzeye birçok farklı mikroorganizma tutunmaya devam eder. Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların kolonizasyonu ve konakta canlılıklarını sürdürebilmeleri adına oldukça önemlidir (100). Mikroorganizmaların biyofilm içerisinde bulunmalarının kazandırdığı en önemli avantaj planktonik türdeşlerine oranla dış etkenlere karşı daha korunaklı ve daha dirençli hale gelmeleridir (100). Gıda ve su endüstrisinde karşılaşılan en önemli problemlerden birinin biyofilm oluşumu olduğu bildirilmiştir (101). 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 (97, 102). Diş hekimliğinde en çok çalışılan biyofilm yapısı dental plakdır (103). Kök kanallarında biyofilm oluşumunu ilk kez ortaya koyan araştırmacı ise 1987 yılında Nair olmuştur (4).

### **2.3.1. Biyofilmin Yapısı**

Biyofilm bir yüzey üzerinde olgunlaşırken, bakteriler tarafından devamlı olarak ekstraselüler polisakkarit, protein ve nükleik asit sentezlenir ve oluşan ekstraselüler matriks biyofilmin hacimsel olarak %85'ini oluşturur (104). Mikroorganizmalar biyofilmin ancak %15'ini oluştururlar. Ekstraselüler matriks 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 (105). 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 (97). Su kanalları biyofilm içindeki birincil dolaşım sistemidir ve bu kanallardaki sıvı içerisinde substrat, bakteri metabolizması son ürünleri ve bakteriyel etkileşimden sorumlu sinyal molekülleri taşınır (105).

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 tırdeşlerine göre % 20-70 oranında daha fazla gen ekspersyonu gösterdiği belirtilmiştir (106,107). Bu durum biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların farklı bir fenotipe dönüşmesine neden olur (108).

Biyofilmler içinde gen ekspresyonlarını koordine etmek için hücrelerarası bir iletişim mekanizması olan “Quorum Sensing” kullanılır (109). “Quorum Sensing”, bir popülasyondaki gen ekspresyonlarının koordineli bir şekilde gerçekleşmesini ve kontrol edilmesini sağlayan bir iletişim mekanizmasıdır (110). 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, virölans özelliklerin paylaşılması, antibiyotik üretimi ve ekstraselüler enzimlerin salgılanması gibi bir takım avantajlar kazandırmaktadır (111). Biyofilm oluşumu sırasında görülen; yüzeye bağlanma, çoğalma, matris üretimi ve biyofilm yapısındaki parçalanmalar “Quorum Sensing” mekanizması ile kontrol edilmektedir (112).

### **2.3.2. Biyofilm Oluşumu**

Biofilm oluşumu için gerekli olan üç önemli komponent sırasıyla; mikroorganizmalar, katı bir yüzey ve sıvı akışıdır (97). Biyofilm oluşumunun ilk aşaması, organik ve inorganik moleküllerin katı bir yüzeye adsorbe olarak, koşullandırıcı bir tabaka oluşturmasıdır (113). Bakterilerin katı yüzeye bağlanmasını etkileyen çeşitli faktörler vardır. Bu faktörler; substratın yüzey enerjisi, sıcaklık, pH, sıvı ortamın akış hızı, bakterinin yüzey ile ilişkide olduğu sürenin uzunluğu, yüzeyin hidrofobikliği ve besin miktarıdır (114).

Biyofilm oluşumunun ikinci aşaması, daha önceden oluşmuş koşullandırıcı tabaka üzerine mikrobiyal hücrelerin adezyonudur (113). Başlangıçta mikroorganizma-yüzey ilişkisini düzenleyen fizikokimyasal özellikler yüzey enerjisi ve temas yoğunluğudur (100). Bu özelliklere ek olarak mikroorganizmaların bir yüzeye tutunmasına yardımcı olan fibria, pili, kamçı ve glikokaliks gibi yüzeysel yapıları da olabilir. Bakteriler bir yüzeye tutunduktan sonra, elektrostatik çekim kuvveti, kovalent ve hidrojen bağları, dipol etkileşimleri ve hidrofobik etkileşimlerin

bir kombinasyonu sonucu bağlanmaya devam ederler (100). Biyofilm oluşumunun üçüncü aşaması, bakteriyel büyüme ve biyofilmin genişlemesidir. Bu evrede, tek sıra halinde yüzeye tutunmuş olan mikroorganizmalar, ikincil kolonize olan bakteriler ile bağlantı kurar ve bu şekilde oluşan mikrokolonilerin sayısı artarak biyofilmin son yapısını oluşturur (100, 115). Oluşan biyofilmin üst tabakalarından mikroorganizmalar zamanla koparak biyofilmden ayrılır. Mikroorganizmaların yüzeyden düzenli olarak ayrılmaları biyofilmin gelişimi boyunca devam eden bir süreç olup, bu durum mikroorganizmaların başka alanlara dağılımı ve kolonize olmaları anlamına gelmektedir (116).

Biyofilm matrisinin önemli bir kısmını sadece DNA oluşturuyor olabilir. Steinberger ve Holden (117), doygunluğa ulaşmamış biyofilmlerde ekstraselüler DNA (eDNA) miktarının hücresel DNA'ya oranla %50'den daha fazla bulunabildiğini belirtmişlerdir. *Staphylococcus epidermidis* ve *Enterococcus faecalis* biyofilmlerinin incelendiği çalışmalarda, eDNA temin etmek üzere küçük alt birimlerde otolizin kaynaklı ölümlerin görüldüğü, mikroorganizmaların otolizine bağlı olarak parçalanması sonucu ortama salınan DNA'nın biyofilm matrisinin yapısına katıldığı belirtilmiştir (118, 119). eDNA'nın mikroorganizmaların otolizine bağlı olarak da temin edilebildiği ve *Staphylococcus aureus*'un vankomisin ile uyarılmış biyofilm formasyonuna önemli düzeyde katkıda bulunduğu bildirilmiştir (120). Biyofilmin logaritmik büyüme fazında görülen eDNA ise hücre ölümlerine bağlı olarak değil, çoğunlukla aktif salgılama mekanizmaları ile elde edilir. Büyümenin ileri evrelerinde (48 saat sonrası) elde edilen yüksek eDNA konsantrasyonu, hücrelerin lizisini sonucu DNA'nın ekstraselüler ortama pasif olarak salınmasına bağlı olabilir (118, 119, 121).

Biyofilm formasyonu sırasında hücre düzeyinde iki çeşit mikrobiyal etkileşim gerçekleşir. İlki, askıda duran hücre ve zemine daha önceden tutunan hücre arasındadır. Bu etkileşim ko-adezyon olarak adlandırılır. İkinci etkileşimde ise genetik olarak farklı hücrelerin birbirini tanıması ve yığın halinde yaşamasıdır. Bu etkileşim ko-agregasyon olarak adlandırılır (122, 123). Bu işbirlikleri yüksek seviyede özelleşmiş ve ko-agrege olan bakteriler arasında gerçekleşir. İlginç bir şekilde oral bakterilerin birçoğu birbirlerini ko-agregasyon için işbirlikçisi olarak

tanımaktadır. *F. nucleatum* Gram-negatif filamentöz anaerobik bir bakteri olup bütün oral bakteriler ile ko-agregasyon oluşturabilir. Non-agrege bakteriler arasında bile köprü görevi görerek birbirlerine bağlar (124, 125). Uzun filamentöz bakteri ve yüzeye tutunan küre şeklindeki kokların etkileşimi karakteristik “corncob” yapısını oluşturur (126).

### **2.3.3. Biyofilm Oluşturmanın Bakterilere Kazandırdığı Özellikler**

Bakteriyel bir topluluk olarak, biyofilmlerin kollektif bir fizyolojisi vardır ve çevresel değişikliklere birlikte cevap verirler (97). Birlikte hareket etmek sonucunda biyofilm oluşturmak mikroorganizmalara birtakım özellikler kazandırır (127):

**Üremek için daha kapsamlı yetiştirme ortamı:** Erken yerleşen kolonilerin metabolizması yerel çevrede değişiklik yaparak ikincil koloniciler için ataçman ve büyüme ortamı oluşturur. Bu durum, bazı besin kaynaklarının erişilebilirliğinin artışı, zararlı metabolik son ürünlerin ortamdaki uzaklaştırılması ve uygun fizikokimyasal şartların (azalmış oksijen gerilimi ve redoks potansiyeli) sağlanmasıyla oluşur (128).

**Metabolik çeşitlilik ve etkinlik artışı:** Birçok ekosistemde besin kaynakları sınırlıdır. Bu nedenle kaynaklarını işleyip paylaşabilen topluluklar gelişirler ve devamlı hale gelirler. Karma topluluklarda yaşayan mikroorganizmalar bir dizi besinsel bağlantılar kurarlar ve aralarında bir besin ağı geliştirirler. Az gelişmiş türler için gerekli olan kompleks yapıdaki konak kaynaklı substratlar parçalara ayrılarak besin ağları ile taşınırlar. Bu sayede bir türün metabolik son ürünleri, bir başka türün ana besin kaynağını oluşturabilir (128).

**Türler arası rekabet, konak savunması, antimikrobiyal ajanlar ve çevresel strese dayanma:** Farklı türlerin komşu hücreleri beta-laktamaz, katalaz ve proteinazlar gibi enzimler salgılayabilirler ve bu enzimler biyofilm matriksi içerisinde korunarak yeri geldiğinde diğer bakterileri antimikrobiyaller ve konak savunmasından korumak üzere hazırda bekletilir. Aynı şekilde bakteriyel metabolitler ve bakteriosinler birbiri ile yarışan türleri kısıtlayabilir. Biyofilm matriksi fagositoza karşı fiziksel bir bariyer görevi üstlenerek biyofilm içerisindeki bakterileri konak savunmasından korur (128).

**Gen değişimleri:** Hücreler arası ilişkiler ve biyofilmin fiziksel yapısı topluluk içerisinde horizontal gen aktarımını kolaylaştırır. Topluluk üyeleri arasındaki genetik alışverişin en önemli sonucu; virülans özellikler ve antibiyotik direnç genleri yayılarak, sahip olmayan diğer türler tarafından kazanılır (128).

**Gelişmiş Patojenite:** Mikroorganizmaların hastalığa neden olabilmesi için konak yüzeyine yapışması, konaktan besin sağlaması, çoğalması, dokuları istila etmesi, konak savunmasının üstesinden gelmesi ve doku hasarına neden olması gerekmektedir. Hastalık sürecindeki bu aşamaların gerçekleşebilmesi bir topluluk içerisindeki mikroorganizmaların çeşitli virülans özelliklere sahip olması, bu özelliklerin türler arasında aktarımı ve bu türlerin birlikte hareket etmesi ile olur (128).

**Antimikrobiyal Ajanlara Direnç:** Biyofilm formundaki mikroorganizmaları etkisizleştirmek için gereken antibiyotik konsantrasyonunun, planktonik türdeşleri için gerekli olandan 100-1000 kat daha fazla olduğu bildirilmiştir (100, 129). Biyofilmlerin antimikrobiyallere direnç göstermesinin çeşitli nedenleri vardır.

Antimikrobiyal ajanlar biyofilm yüzeyine tutunup bakterileri etkisiz hale getirebilir, ancak biyofilmin derinliklerinde bulunan hücreler bu ajanlardan etkilenmezler ve hayatta kalırlar. Öte yandan, biyofilm matrisi antimikrobiyal ajanları inaktive edebilecek konsantrasyonlarda nötralizan enzimleri bünyesinde barındırabilir (130).  $\beta$ -laktamaz gibi ekstraselüler enzimler biyofilm içerisinde depolanarak gerekli olduğu durumlarda  $\beta$ -laktam antibiyotikleri inaktive edebilirler. Bazı antimikrobiyaller biyofilm matrisi içerisine penetre olabilirler, ancak böyle bir durumda biyofilm içerisindeki bakteriler durağan faza geçerek antimikrobiyal ajanlardan korunurlar.

Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar quorum sensing mekanizmasını kullanarak haberleşme sağlarlar. Bu mekanizma sayesinde ortamdaki ihtiyaca göre biyofilme yararlı olacak türlerin daha çok üreyerek baskın hale gelmesi sağlanır (103).

Ortamda besin sıkıntısının başlaması veya atıkların birikmesi durumunda biyofilm içerisindeki hücreler birbirleri ile iletişim kurarlar ve metabolizmalarını yavaşlatıp hızlı bölünen hücrelere göre antimikrobiyallere daha az duyarlı hale

gelirler. Çünkü birçok antimikrobiyal ajan bakteriler üzerinde etkili olabilmek için bir miktar hücrel aktiviteye ihtiyaç duyar (103). Biyofilm içerisindeki mikroorganizmalar durağan faza geçmeleri durumunda eksopolisakkarit üreterek ortama salarlar ve ortamın kimyasal yapısını değiştirirler. Biyofilm çevresindeki oksijen miktarının azalması birçok antibiyotiği inhibe ederken, ortamda biriken asidik atıklar pH değişikliğine neden olarak bazı antibiyotikler üzerinde antagonist etki gösterirler. Tüm bu nedenlerle, biyofilm içerisinde bulunan durağan fazdaki bakteriler genel bir antibiyotik direnç mekanizması gösterirler (98).

Bazı biyofilmlerin antibiyotiklere karşı artmış tolerans göstermesi, biyofilm içerisinde “inatçı hücre” olarak bilinen özelleşmiş savaşçı hücre subpopülasyonunun varlığına bağlanmıştır (131).

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

Biyofilmi oluşturan yapıların ve bakterilerin incelenmesinde ışık mikroskopisi, floreson mikroskopisi, elektron mikroskopisi, atomik kuvvet mikroskopisi ve lazer taramalı konfokal mikroskopi gibi yöntemler kullanılabilir (132).

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 (133). 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 (134). Floresan mikroskopu floresan görselleştirme ile ışık mikroskopunun büyütme özelliklerini birleştiren bir araçtır. Bakteriler floresan boya ile boyanıp, UV ışınları altında floresan mikroskopta incelendiğinde, ışık saçan parlak cisimcikler halinde görülürler (135).

Bugüne kadar mikrobiyal biyofilmlerin yapısal özelliklerini görüntülemeye yönelik yapılan çalışmalarda en çok kullanılan yöntem taramalı elektron

mikroskopisi (SEM)'dir (133). SEM yüksek enerjili elektronların küçük bir alana odaklanması ve yüzeyin taranması prensibiyle çalışır. Işık mikroskobuna oranla geleneksel SEM kullanılarak 400 kat daha yüksek çözünürlüğe sahip görüntüler elde edilebilir. 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 (136, 137). FESEM ile konvansiyonel SEM'e göre daha büyük büyütme altında yüksek çözünürlüklü görüntüler elde etmek ve topografik inceleme yapmak mümkün olmuştur. Ancak elektron mikroskopisinin en önemli dezavantajı, biyofilmlerin iskeletini oluşturan ekstraselüler matriksin %70-90 oranında su içeriyor olması nedeniyle fiksasyon, dehidratasyon, kurutma ve kaplama aşamalarında örneğin 3 boyutlu yapısının zarar görmesidir (136). Elektron mikroskopisinin başka bir dezavantajı da büyütme altında inceleme yapıldığı için tek seferde örneğin tamamının incelenemiyor olmasıdır (133).

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 (133). 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 (133). Ancak ışık mikroskopisindeki kısıtlamalara bağlı olarak biyofilmleri oluşturan matriks ve hücrelerin yapısal özellikleri detaylı olarak incelenememektedir (136).

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 (138).

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 (139).

### 2.3.5. Kök Kanallarında Biyofilmler

Endodontide biyofilmler kanal içi, kanal dışı (sement) ve periapikal biyofilmler olarak 3 gruba ayrılabilir (114).

#### *Kanal İçi Biyofilmler*

Kök kanallarında biyofilm oluşumunu ilk kez ortaya koyan araştırmacı 1987 yılında Nair olmuştur (4). Çekilmiş periapikal lezyonlu dişlerin geçirimli elektron mikroskopu (TEM) 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. (140) 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.

George ve ark. (141) 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.

Nair ve ark. (142) 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 lezyon içerisinde kolonize olabildiğini bildirmişlerdir.

Kishen ve ark. (113) *E. faecalis* ve kök kanal dentini arasındaki ilişkiyi 2, 4 ve 6 haftalık aralıklarla X-ışını diffraksiyonu, FTIR, 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.

Ricucci ve Siqueira (143), 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.

### ***Eksternal Kök Yüzeyi Biyofilmleri***

Bu tip biyofilmlerin asemptomatik apikal periodontitis görülen dişler ve fistül yolu ile ilişkili kronik apikal apselli dişlerde görüldüğü belirtilmiştir (114). Tronstad ve ark. (5) 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. Ricucci ve ark. (144) sekonder apikal periodontitisli dişlerin kök uçlarını inceledikleri çalışmada kalsifiye oluşumların varlığını göstermişlerdir. Harn ve ark. (145)

geleneksel kök kanal tedavisine direnç gösteren periapikal lezyonlu dişlerin apikal kök yüzeylerinde kalsifiye biyofilm oluşumunu gözlemlemişlerdir.

Siqueira ve Lopes (146) geniş çürüğe sahip, periapikal lezyonlu, asemptomatik çekilmiş dişleri SEM ile inceledikleri çalışmada, kök kanalı içerisinde daha çok koklar ve çomakların görüldüğünü, kök kanalı dışında ise daha çok koklar ve filamentöz bakterilerin ko-agregasyonu sonucu oluşan mısır koçanı görüntüsünün görülebileceğini belirtmişlerdir.

Lomçalı ve ark. (147) 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.

Leonardo ve ark. (148) 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. Başka bir çalışmada, Leonardo ve ark. (149) kronik periapikal lezyon varlığında meydana gelen şiddetli değişiklikler sonucunda, apikal yapıdaki liflerin zarar gördüğünü ve çeşitli derecelerde sement rezorpsiyonuna bağlı olarak dentin yüzeyinde biyofilmlerin direnç oluşturmalarına neden olan laküner alanlar oluştuğunu belirtmişlerdir. Noiri ve ark. (150) inatçı apikal patolojiye sahip çekilmiş dişlerin kök uçlarını ve endodontik tedavi sırasında kök kanalından çıkarılan gütta perka konlarını SEM ile inceleyerek biyofilm oluşumunu inceledikleri çalışmada, apekten dışarıya çıkmış olan gütta perka konlarının tamamının glikokaliks benzeri bir yapı ile kaplandığını ve çekilmiş

dişlerin eksternal kök yüzeylerinde filamentöz bakteriler ve çomakları içeren biyofilm oluşumunu görüntülemişlerdir.

Carr ve ark. (6) 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 mikroskopu ile inceledikleri çalışmada, örneklerin tümünde kompleks yapıda çoklu tür içeren biyofilmlerin bulunduğunu belirtmişlerdir.

Ricucci ve ark. (151) 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.

Ricucci ve ark. (152) kök kanal tedavisine yanıt vermeyen inatçı semptomlara sahip benzer bir olguda ilgili dişin kök ucunu rezeksiyon işlemini takiben histopatolojik olarak inceledikleri çalışmada, esas kök kanalında bakteriyel oluşuma rastlanmamasına rağmen lateral kanalda görülen biyofilm oluşumunun endodontik tedavinin başarısızlığına neden olduğunu ve biyofilm içerisinde daha çok, kok, çomak ve filamentöz bakterilerin bulunduğunu bildirmişlerdir.

### ***Periapikal Biyofilmler***

Bu tip biyofilmler endodontik tedavi ile ilişkili dişlerin apikal bölgelerinden izole edilen biyofilmlerdir. Kök kanal enfeksiyonlarına bağımlı ya da bağımsız olabilirler (114). 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 (114). *Actinomyces* genusu üyeleri ve *Propionobacterium propionicum* türünün endodontik tedaviye direnç gösteren asemptomatik lezyonlardan izole edildiği belirtilmiştir (153).

### 2.3.6. Kök Kanallarında Biyofilm Eliminasyonu

Antimikrobiyal ajanlar tek tür mikroorganizmanın hızlı büyüyen, dağılık popülasyonları üzerinde genellikle daha etkilidirler (103). Ancak bilindiği üzere olgun biyofilmler içerisindeki mikrobiyal topluluklar antimikrobiyal ajanlara dirençlidirler ve eradike edilmeleri oldukça zordur. Biyofilm içerisindeki mikroorganizmaların planktonik türdeşlerine oranla antimikrobiyal ajanlara karşı 100-1000 kat daha fazla direnç gösterdiklerine dair sonuçlar paylaşılmıştır (88, 100).

Spratt ve ark. (154) 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.

Clegg ve ark. (8) 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.

Özok ve ark. (155) *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 biyofilmin NaOCl'ye gösterdiği direncin arttığını ve ikili biyofilmlerin tekli biyofilmlere göre daha fazla direnç gösterdiğini belirtmişlerdir.

Dunavant ve ark. (9) 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.

Giardino ve ark. (156) 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.

Distel ve ark. (88) *E. faecalis*'in CaOH<sub>2</sub> uygulanmış kök kanallarında biyofilm oluşturabildiğini belirtirken, Chai ve ark. (157) CaOH<sub>2</sub>'nin %100 biyofilm eliminasyonu sağlayabildiğini belirtmişlerdir.

Brandle ve ark. (158) *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.

Williamson ve ark. (159), NaOCl (%6'lık), CHX (%2), Chlor-Xtra (<%6'lık NaOCl ve yüzey düzenleyici kombinasyonu) ve CHX-Plus (%2'lik CHX ve yüzey düzenleyici kombinasyonu)'nın 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.

Arias-Moliz ve ark. (160) 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.

Bryce ve ark. (161) 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.

Chavez de Paz ve ark. (162) %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 eliminde edebildiğini bildirmişlerdir.

Prabhakar ve ark. (163) %5'lik NaOCl'nin dış yüzeyinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde en etkili ajan olduğunu, tripala, yeşil çay polifenollerini ve MTAD'nin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde antibakteriyel aktiviteye sahip olduğunu belirtmişlerdir.

Liu ve ark. (164) 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.

Shrestha ve ark. (165) kitosan ve çinko oksit nanopartiküllerinin biyofilmin yapısal bütünlüğünü bozduğunu ve biyofilmler üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduklarını belirtmişlerdir.

Ferrer-Luque ve ark. (166) 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.

Lundstrom ve ark. (167) 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.

Bhuva ve ark. (168) 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.

Ordinola-Zapata ve ark. (169) sığır dişlerinden elde ettikleri dentin bloklarını ortodontik apareylere 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.

Wu ve ark. (170) 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.

Noiri ve ark. (171) 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.

Soukos ve ark. (172) deneysel olarak enfekte edilmiş kök kanallarında oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde fotodinamik terapinin etkinliğini inceledikleri çalışmada, metilen mavisi çözeltilisinin (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 oluştuğunu bildirmişlerdir.

Hems ve ark. (173) ozon uygulamasının *E. faecalis*'in planktonik formları üzerinde antibakteriyel etkiye sahip olduğunu ancak, biyofilmler üzerinde NaOCl kadar etkili olmadığını belirtmişlerdir.

Kuştarıcı ve ark. (174) 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.

Meire ve ark. (175) 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.

Üreyen Kaya ve ark. (176) düşük sıcaklıklı atmosferik basınç plazma (LTAPP), ozon gazı, %2,5'lik NaOCl ve steril salin çözeltilerinin *E. faecalis* ile 3 hafta boyunca enfekte edilmiş kök kanallarındaki antimikrobiyal etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada, apikal üçlüde LTAPP ile NaOCl uygulamaları arasında istatistiksel olarak fark olmadığını ve her ikisinin de ozon gazı uygulamasından daha etkin eliminasyon sağlandığını belirtmişlerdir.

#### **2.4. Kök Kanallarının Yıkınması**

Kök kanal tedavisinin başarısı, doğru bir tanı konulduktan sonra kök kanallarının kemomekanik olarak preperasyonu, dezenfeksiyonu ve hiçbir sızıntıya olanak vermeyecek şekilde doldurulmasına bağlıdır (177). Kemomekanik preperasyon, mekanik şekillendirme ve yıkama işlemlerinden oluşmaktadır. Mekanik şekillendirmenin amacı; enfekte dentin ve pulpa dokusunun kök kanalından uzaklaştırılması, yıkama işlemi ve seanslar arası medikament uygulanabilmesi için yeterli boşluğun oluşturulması ve periapikal dokularda enfeksiyonun ilerleyişinin durdurulmasıdır (177). Mekanik şekillendirme ile enfekte kök kanalı içerisindeki mikroorganizmaların sayısı önemli ölçüde azaltılır ancak tamamen eliminasyon sağlanamaz. Mekanik şekillendirme sırasında oluşan debris ve smear tabakasının kök kanalından uzaklaştırılması için yıkama solüsyonlarının kullanılması gerekmektedir. Ayrıca, yıkama solüsyonlarının antimikrobiyal etkileri sonucu kanal içerisinde kalan enfekte dentin, organik ve inorganik artıklar uzaklaştırılarak mikroorganizmaların tamamen etkisizleştirilmesi hedeflenir (177).

Antimikrobiyal yıkama solüsyonları, nekrotik kök kanal sisteminden mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir. Yıkama solüsyonlarının mekanik şekillendirme sırasında kök kanal sisteminde enstrümante edilemeyen alanlara ulaşarak bu alanlardaki bakteriyel biyofilmleri uzaklaştırması beklenir.



Kök kanallarının dezenfeksiyonunu sağlayabilmek için, tedavi sırasında kullanılacak yıkama solüsyonu antimikrobiyal bir ajan olarak (178);

- a. Geniş antibakteriyel spektruma sahip olmalı, anaerobik ve fakültatif bakterilerin oluşturduğu biyofilmlere etki edebilmelidir.
- b. Endotoksinleri etkisiz hale getirebilmelidir.
- c. Nekrotik pulpa dokusu artıklarını ve debrisleri çözebilmelidir.
- d. Mekanik preparasyon sırasında smear tabakası oluşmasına engel olmalı ya da oluşan smear tabakasını ortadan kaldıracaktır.

Bu özelliklere ek olarak ideal bir yıkama solüsyonunda bulunması gereken özellikler de şu şekilde sıralanabilir (179);

- a. Düşük yüzey gerilimi göstermeli, dentin tübüllerine penetre olabilmelidir.
- b. Kanalda kolay nötralize olarak etkinliğini kaybetmemelidir.
- c. Lubrikasyon özelliği göstererek mekanik preparasyon sırasında kullanılan enstrümanların kanalda ilerlemelerini kolaylaştırmalıdır.
- d. Düşük toksisite göstererek periradiküler dokulara irritan olmamalıdır.
- e. Restoratif maddelerin pulpa odası ve kavite duvarlarına bağlanmalarını olumsuz etkilememelidir.
- f. Ucuz olmalıdır.

Bu özellikler dikkate alındığında, günümüzde endodontik tedavi pratiğinde kullanılan hiçbir yıkama solüsyonu bu özelliklerin hepsine birden tek başına sahip değildir (178-180). Dolayısıyla, güvenli ve etkili bir yıkama elde etmek için, iki veya daha fazla yıkama solüsyonunun belirli bir sırayla birlikte kullanılması gerekmektedir (179). Kök kanallarının yıkanması işleminde, mekanik şekillendirme sırasında oluşan debrisin kanalın koronalından dışarı çıkmasını sağlamak için serum fizyolojik yeterli bir solüsyondur. Ancak serum fizyolojinin antimikrobiyal özelliğinin olmamasından dolayı, yıkama işleminde antimikrobiyal özellik içeren yıkama solüsyonlarının kullanılması gerekmektedir. Özellikle nekrotik doku artıklarının varlığında, şekillendirmenin etkisini arttırmak amacıyla alkalin solüsyonlar, deterjanlar ya da proteolitik etkili yıkama solüsyonlarının kullanılması

önerilmektedir (181, 182). Ancak antimikrobiyal etkiye sahip ajanlar, mekanik şekillendirme sırasında oluşan smear tabakasına yeterli etkiyi gösterememektedir. Bu nedenle smear tabakayı uzaklaştırabilmek için şelasyon ajanları ya da organik asitlerin kullanılması önerilmektedir. Ayrıca tüm bu işlemler sırasında kullanılacak yıkama solüsyonlarının kabul edilebilir düzeyde sitotoksik etkiye sahip olması gerektiği unutulmamalıdır.

#### **2.4.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)**

NaOCl günümüzde %0,5-6 konsantrasyon aralığında endodontik yıkama solüsyonu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (178, 183). Kemomekanik şekillendirme sırasında organik artıklara karşı çözücü etki göstermesi, bakterilere, bakteriyofajlara, spora, mantarlara ve virüslere karşı etkili olması, düşük yüzey gerilimi ile dentin tübüllerine penetre olabilmesi, kolay elde edilebilmesi ve ucuz olması nedenleriyle çok fazla tercih edilen bir yıkama solüsyonudur (183). Sahip olduğu bu özellikler sayesinde 1920'lerin başından itibaren su ile seyreltilmiş NaOCl, endodontide esas yıkama solüsyonu olarak kullanılmaktadır (178).

NaOCl, suda sodyum ( $Na^+$ ) ve hipoklorit ( $OCl^-$ ) iyonlarına ayrışır, hipokloröz asit ( $HOCl$ ) oluşturarak denge sağlar. Asidik ve nötral pH'da klor, hipokloröz asit formunda iken, pH 9 ve üzerindeyken hipoklorit iyonu halindedir. Antibakteriyel etkiden hipokloröz asit sorumludur ve mikroorganizmaların hücre fonksiyonlarını bozarak hücre ölümüne neden olur (181). NaOCl'in pH'sı, tamponlanmadığı zaman yaklaşık 11-12'dir.

NaOCl kuvvetli bir antimikrobiyal ajan olup, direkt temas halinde birçok bakterinin ani ölümüne neden olur (181). Ayrıca, NaOCl nekrotik ve organik dokulara karşı çözücü etki gösterebilen tek irrigasyon solüsyonudur. NaOCl tek başına smear tabakayı uzaklaştıramasa bile smear tabakanın organik kısmını etkileyerek uzaklaştırılmasına katkıda bulunur (184).

Kronik enfeksiyonlarda biyofilm oluşumunun kanıtlanmasının ardından, endodontik yıkama solüsyonlarının biyofilm içerisindeki mikroorganizmalarla etkileşimi önem kazanmıştır. Birçok çalışmada NaOCl'nin biyofilmi çözebildiği ve

biyofilmler üzerinde de kuvvetli antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (8, 156, 160, 163, 168, 169, 175, 185).

Endodontik yıkama solüsyonlarının nekrotik dokuyu çözme özelliği kök kanal tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Kök kanal sisteminin karmaşık anatomik yapısı bu konunun önemini daha da artırmaktadır. Birçok çalışmaya göre, hangi şekillendirme tekniği kullanılırsa kullanılsın, şekillendirme sonrası kök kanal sisteminde hiç dokunulmamış alanların varlığı görülmektedir (186). Organik artıkların kimyasal olarak uzaklaştırılması bakteri gelişiminin önlenmesi açısından önemlidir. NaOCl, biyofilm dahil organik dokuları çözebilen en etkin irrigasyon solüsyonu olduğu için kök kanal tedavisinde önemli bir yere sahiptir (8, 9, 156, 161, 167, 185, 187). Yüksek konsantrasyonlu NaOCl solüsyonlarının antibakteriyel ve doku çözücü etkinliğinin düşük konsantrasyonlara göre daha yüksek olduğu bilinmesine rağmen, toksisitesi de artmaktadır (188). Üstelik yüksek konsantrasyonlarda NaOCl organik dentin matriksini parçalayarak dentinin mekanik özelliklerini zayıflatmaktadır (11, 189). Solüsyonun istenmeyen etkilerinin ortadan kaldırılması için düşük konsantrasyonlu solüsyonların daha bol miktarda kullanılması, kanal içerisindeki solüsyonun daha sık değiştirilmesi, solüsyonun sıcaklığının artırılması, solüsyona yüzey aktif ajanların ilave edilmesi, kök kanalı içerisindeki solüsyonun sonik veya ultrasoniklerle aktive edilmesi tavsiye edilmektedir (190, 191).

Smear tabakayı tek başına uzaklaştıramaması, periapikal dokulara taşırıldığı zaman toksik etki göstermesi, anaflaktik reaksiyonlara neden olması, kötü bir tada ve kokuya sahip olması ve *in vivo* koşullarda enflamatuvar eksuda, doku artıkları ve mikrobiyal kütle gibi organik dokuların varlığına bağlı olarak etkinliğinin azalması NaOCl'nin dezavantajlarıdır (183, 192-194). Bu nedenle NaOCl'ye alternatif ya da NaOCl ile kombine kullanılabilen yıkama solüsyonu arayışı devam etmektedir (176, 195-197).

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

Diş hekimliğinde yaygın olarak kullanılan sentetik bir katyonik bis-guaniddir. Antiseptik özelliği nedeniyle plak oluşumunun önlenmesi amacıyla periodontolojide %0,1-0,2 konsantrasyon aralığında kullanılmaktadır. Endodontik tedavide ise %2'lik

konsantrasyonunun yıkama solüsyonu olarak kullanılması tavsiye edilmektedir (198).

Klorheksidin, Gram-negatif bakteriler, Gram-pozitif bakteriler ve mantarlar üzerinde etkili, geniş spektruma sahip bir ajandır (199). Katyonik yapısı sayesinde bakterilerin negatif yüklü yüzeylerine elektrostatik olarak bağlanır (199) ve hücre duvarının dış katmanlarına zarar vererek geçirgenliğini artırır (200). Konsantrasyonuna bağlı olarak bakteriyostatik veya bakterisidal etki gösterebilir. Yüksek konsantrasyonlarda deterjan işlevi görerek, hücre zarını parçalar ve hücre içi organellerin yıkımına neden olmaktadır (201). Yine katyonik yapısı sayesinde anyonik yapıdaki oral mukoza ve dentine geri dönüşümlü olarak bağlanarak rezidüel antimikrobiyal etkinliğini uzun süre sürdürebilir (202). CHX'in Kök kanallarında rezidüel antimikrobiyal etkisini 48-72 saat süreyle koruyarak bakterilerin dentine bağlanmasına engel olduğu belirtilmiştir (203).

CHX'in bakterisidal etkinliğinin NaOCl kadar yüksek olduğu (167, 204), ancak biyofilmler üzerindeki etkinliğinin NaOCl'den daha düşük olduğu belirtilmiştir (8, 9, 205). Ayrıca tip I kollajen, ölü hücreler ve dentin gibi organik yapılar varlığında CHX'in antimikrobiyal etkinliğini kaybettiği (206) ve Gram-negatif bakterilere karşı Gram-pozitiflere olduğu kadar güçlü etki gösteremediği bildirilmiştir (207).

Biyofilmler üzerindeki yetersiz etkinliğinin yanı sıra, nekrotik doku artıklarını çözememesi ve kök kanal sistemini kimyasal olarak temizleyememesi CHX'in endodonti pratiğinde NaOCl'nin alternatifi olamayışının esas sebepleri arasında gösterilmektedir (179, 183).

#### **2.4.3. Etilen Diamin Tetraasetik Asit (EDTA)**

Kök kanallarının yıkanmasında kullanılan bir şelasyon ajanıdır. Mekanik preperasyon sırasında oluşan smear tabakasının inorganik içeriğini uzaklaştırmak amacıyla endodontik yıkama solüsyonları ile birlikte kullanılması önerilmektedir (208, 209). EDTA'nın etkinliğini artırmak için, öncesinde smear tabakasının organik içeriğini uzaklaştıracak proteolitik bir ajan (NaOCl) kullanılması gerektiği belirtilmiştir (210). Ancak son yıkama NaOCl yerine EDTA ile

tamamlandığında *E. faecalis* gibi birçok bakterinin duyarlı olduğu, dentin tübülleri çevresinde bulunan kollajenin açığa çıktığı belirtilmiştir (211). Bu nedenle EDTA uygulandıktan sonra son yıkama için başka bir ajana ihtiyaç duyulmuştur ve 10 ml %17'lik EDTA'nın ardından 10 ml %5,25'lik NaOCl kullanımının en etkili kombinasyon olduğu belirtilmiştir (212). Ancak EDTA'nın ardından NaOCl uygulamasının dentinde erozyona neden olduğu belirlenmiş (213) ve EDTA'nın organik çözücülüğünü ve antimikrobiyal etkinliğini arttırmak amacıyla içerisine çeşitli maddeler eklenerek, son yıkamada kullanılmak üzere EDTAC, SmearClear, QMIX gibi ürünler piyasaya sürülmüştür.

EDTA'nın sınırlı da olsa antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu belirtilmiştir (214). EDTA'nın Gram-negatif bakterilerin hücre duvarları dışındaki katyonlarına bağlanarak lipopolsakkaritlerin açığa çıkmasına ve bu nedenle hücre yapısının bozulmasına neden olduğu bildirilmiştir. Ancak aynı etkiyi Gram-pozitif bakterilere karşı gösterememektedir (214). Bununla birlikte EDTA'nın *C. albicans* üzerinde antifungal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (215). Smear tabakasını uzaklaştırarak, diğer yıkama solüsyonlarının dentinin derinliklerindeki etkinliğini artırması (85) ve biyofilm içinde bulunan bakterilerin birbirine tutunmasını sağlayan ağır metallere bağlanarak biyofilmi parçalaması ve sonrasında kullanılan ajanların etkinliğini artırması (162), EDTA'nın dolaylı yoldan antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

#### **2.4.4. Setrimid**

Toz ve likid formları bulunan setrimid katyonik bir sürfaktandır. Sürfaktanlar, bir hidrofilik bir de hidrofobik bölüm içeren moleküllerdir ve buldukları ortamın yüzey gerilimini düşürürler (216). Endodonti pratiğinde klorheksidin, EDTA ve NaOCl gibi yıkama solüsyonlarına setrimid eklenerek bu solüsyonların yüzey gerilimini düşürmesi ve böylece yıkama solüsyonlarının dentine penetrasyonunun ve antimikrobiyal etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir (159, 217-221).

Setrimidin pozitif yüklü hidrofilik kısımları, bakteri hücre zarının yapısında bulunan negatif yüklü fosfolipidler ile etkileşime girer. Bu sırada bileşiğin polar olmayan kısmı da hücre zarının hidrofobik olan kısımlarından içeri girerek ara yüzeydeki gerilimi düşürür. Böylece bakteri hücre zarının seçici geçirgenlik özelliği

bozular ve hücre zarının bütünlüğü ortadan kalkar (222). Setrimid hücre içine girdikten sonra hücre içerisindeki enzimler ve organelleri denatüre eder (223). *E. faecalis*'e ek olarak çeşitli Gram-pozitif ve Gram-negatif bakteriler ve *C.albicans* üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (224).

Setrimidin antimikrobiyal etkisinin kanıtlanmış olmasının yanında, biyofilmler üzerinde de etkili potansiyel bir ajan olduğu belirtilmiştir. Setrimidin biyofilmi oluşturan ekstraselüler matriks arasındaki elektrostatik bağları etkileyerek biyofilmin yapısal direncini düşürdüğü bildirilmiştir (225). Arias-Moliz ve ark. (226) polistiren yüzeylerde oluşturdukları 24 saatlik *E. faecalis* biyofilmlerini tamamen elimine etmek için %0,5, %0,0312 ve %0,0078 konsantrasyonlarındaki setrimidin sırasıyla 30 sn, 1 dk. ve 2 dk. uygulanmasının yeterli olduğunu, ancak klorheksidinin herhangi bir konsantrasyonda 2 dk. içerisinde tamamen eliminasyon sağlayamadığını belirtmişlerdir. Baca ve ark. (227) %2,5'lik NaOCl ve %0,2'lik setrimidin dentin blokları üzerinde oluşturulan 3 haftalık *E. faecalis* biyofilmlerini tamamen elimine ettiğini bildirmişlerdir. Wang ve ark. (228) %0,1'lik setrimidin *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğinin %2'lik NaOCl ile benzer olduğunu belirtmişlerdir. Guerreiro-Tanomaru ve ark. (197) sığır dentin blokları üzerinde oluşturdukları 14 günlük *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde %0,2'lik setrimidin 1 dk. uygulanmasının %2'lik klorheksidinden daha fazla eliminasyon sağladığı ancak %2,5'lik NaOCl kadar etkili olmadığını bildirmişlerdir.

Setrimidin biyofilmler üzerinde etkili olmasının yanı sıra bir önemli avantajı da rezidüel antimikrobiyal etkiye sahip olmasıdır. Baca ve ark. (227) çeşitli endodontik yıkama solüsyonlarının dentin blokları üzerindeki rezidüel antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, 24 saat içinde %0,2'lik setrimid ve %2'lik klorheksidin uygulanmış gruplarda biyofilm oluşmazken, %2,5'lik NaOCl uygulanmış grupta biyofilm oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Baca ve ark. (229) %2'lik klorheksidinin yaklaşık 50 gün rezidüel antimikrobiyal etkisinin sürdürürken, %0,2'lik setrimidin bu etkiyi ortalama 40 gün sürdürebildiğini belirtmişlerdir.

Setrimid solüsyonunun toksik etkilerinin doğrudan incelendiği bir çalışma bulunmamasına rağmen, %0,2'lik setrimid ve %0,2'lik klorheksidin içeren

Cetrexidin solüsyonunun 2 haftalık inceleme sonunda %5,25'lik NaOCl'ye oranla daha düşük düzeyde yangısal reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir (217).

#### **2.4.5. *Glycrrhiza glabra* L. Ekstraktı**

İdeal bir kök kanal yıkama solüsyonu antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra biyoyumlu olmalıdır çünkü bu solüsyonlar periapikal dokulara temas edebilirler (230). Son zamanlarda bitkisel özütler gibi birçok doğal ürün sentetik kimyasallara alternatif olarak sağlık alanında kullanılmaya başlanmıştır (230).

Halk arasında meyan kökü olarak bilinen *Glycrrhiza glabra* L. bitkisi dünyanın birçok yerinde yetişen ve geleneksel tıp alanında uzun yıllardır kullanılan bir bitkidir (231). *Glycrrhiza* türlerinin antienflamatuar, antikarsinojenik, antiviral ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğu belirtilmiştir (231).

Diş hekimliğinde yapılan çalışmalarda, Segal ve ark. (232), Badria & Zidan (232, 233) *G. glabra* ekstraktının karyojenik *Streptococcus mutans* üzerinde antimikrobiyal etki gösterdiğini belirtmişlerdir. Badr ve ark. (234) *G. glabra* ekstraktının, *E. faecalis*'in planktonik ve selüloz nitrat membran filtreler üzerinde oluşturulmuş biyofilm formları üzerinde eliminasyon sağladığını bildirmişlerdir.

*G. glabra* ekstraktının antimikrobiyal etkisi içerisindeki Glycyrrhizin ile ilişkilendirilmiştir (231, 234). Glycyrrhizin, tripertenik bir saponindir ve %2-15 konsantrasyon aralığında *G. glabra* ekstraktının esas bileşenini oluşturmaktadır (235). Saponinler hücre membranındaki lipitlerle etkileşime girerek membranın bütünlüğünü bozar, hücre içi organellerin hücre dışına çıkmasına neden olur (236). Ayrıca saponinler yüzey gerilimini düşürücü etkileri sayesinde de antimikrobiyal etki gösterirler (236). *G. glabra* ekstraktının antimikrobiyal aktivitesinden sorumlu bir diğer bileşen de flavonoidlerdir. Flavonoidler antimikrobiyal etkilerini hücre membranındaki elektron taşıma zincirini inhibe ederek gösterirler (237).

#### **2.5. Endodontik Çalışmalarda Kullanılan Biyofilm Oluşturma Yöntemleri**

Enfekte kök kanallarının incelenmesi ve kök kanallarındaki biyofilm oluşumunun görüntülenmesinin ardından (4, 140, 146, 238), *in vitro* çalışmaların

gerçeğe yakın olması amacıyla son zamanlarda antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirilmesinde biyofilm modelleri kullanılmaya başlanmıştır. Ancak bu çalışmalarda kullanılan biyofilm oluşturma yöntemleri arasında bir standardizasyon yoktur.

Bakterilerin biyofilm oluşturabilmeleri için ortamda tutunabilecekleri bir yüzey ve sıvı akışı olmalıdır. Endodontide biyofilm çalışmalarında bakterilerin tutunacağı yüzey olarak çekilmiş dişlerin kök kanalları (141, 163, 167, 239), çekilmiş dişlerden hazırlanan dentin örnekleri (8, 175, 227), hidroksiapatit diskler (171, 240, 241), polistiren yüzeyler (160, 162, 164, 166, 226, 242), cam yüzeyler (159, 241, 243, 244), seramik yüzeyler (9), ve sellüloz nitrat membran filtreler (154, 156, 161) kullanılmıştır.

*E. faecalis*'in birçok antimikrobiyal ajana karşı yüksek seviyede direnç gösterdiği (67) ve inatçı apikal periodontitis vakalarından sıklıkla izole edilen bir bakteri olduğu (57) bilinmektedir. Bu nedenle, antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda mikroorganizma olarak sıklıkla *E. faecalis* kullanılmıştır (9, 159, 164, 218, 226, 227).

Endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal enfeksiyonlar olduğu göz önünde bulundurularak bazı çalışmalarda birden çok mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilmler tercih edilirken (8, 161, 162, 167, 171, 242, 245, 246), bazı çalışmalarda ise tek mikroorganizmanın oluşturduğu biyofilmler tercih edilmiştir (141, 156, 166, 239, 243).

Mikroorganizma tercihinde fark yaratan bir unsur da kullanılan suşun tipidir. Bazı çalışmalarda standart suşlar tercih edilirken (141, 156, 245), bazı çalışmalarda klinik izolatlar tercih edilmiştir (8, 9, 159, 162).

Biyofilm oluşumunda standardizasyon sağlanamayan bir diğer konu da inkübasyon süresidir. Literatürde biyofilm oluşumu için 24 saatten 10 haftaya kadar değişen sürelerde inkübasyon yapıldığı ve sonrasında antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin değerlendirildiği belirtilmiştir (8, 9, 141, 156, 159, 161, 163, 166, 167, 171, 226, 239, 240, 243) (**Tablo 3**).



**Tablo 3.** Farklı endodontik çalışmalarda tercih edilmiş biyofilm modelleri

<b>Araştırmacılar</b>	<b>Kullanılan Modelin Tipi</b>	<b>Çalışmanın Amacı</b>	<b>Biyofilm oluşturmada ve değerlendirilmede kullanılan yöntem</b>
<b>Shabahang ve Torabinejad (247)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	MTAD'nin antimikrobiyal etkinliğinin <i>in vitro</i> değerlendirilmesi	Çekilmiş insan dişleri 4 hafta boyunca <i>E. faecalis</i> ile enfekte edilmiş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Duggan ve Sedgley (248)</b>	<i>In vitro</i> Kök kanalı, oral kavite ve ağız dışı kaynaklardan izole edilen <i>E. faecalis</i> suşları	Oral ve endodontik <i>E. faecalis</i> 'in biyofilm oluşumunun incelenmesi	Biyofilm oluşumu için 96 kuyucuklu plaklarda 24 saat inkübasyon yapılmış, Değerlendirme için kristal viyole analizi kullanılmış
<b>George ve Kishen (249)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i> ve <i>Actinomyces actinomycetem comitans</i>	Farklı çözücülerde çözülmüş metilen mavisinin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi	Çok kuyucuklu polistiren plaklarda 2 günlük inkübasyon, insan dişlerinde 4 günlük inkübasyon yapılmış Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Shen ve ark. (240)</b>	<i>In vitro</i> Birden çok tür	Klorheksidinin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin üç boyutlu kantitatif analiz edilmesi	Kollajen kaplanmış ve kaplanmamış hidroksiapatit diskler üzerinde inkübasyon yapılmış, Ölmüş ve canlı bakterilerin belirlenmesinde CLSM kullanılmış
<b>Williamson ve ark. (159)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i> klinik izolatu	Farklı antimikrobiyal ajanların <i>E. faecalis</i> üzerindeki etkinliğinin incelenmesi	Cam yüzeylerde biyofilm oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış

**Tablo 3.** Farklı endodontik çalışmalarda tercih edilmiş biyofilm modelleri (devam)

<b>Arias-Moliz ve ark. (160)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Farklı antimikrobiyal ajanların <i>E. faecalis</i> üzerindeki MBEK değerinin belirlenmesi	Biyofilm oluşumu için 96 kuyucuklu polistiren plaklarda 24 saat inkübasyon yapılmış, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Lim ve ark. (250)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin biyofilmler üzerindeki etkinliğinin incelenmesi	İnsan dişlerinde üzerinde 4 günlük (genç) ve 4 haftalık (olgun) biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Kishen ve ark. (251)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Antimikrobiyal fotodinamik terapi kullanılarak biyofilmlerin elimine edilmesi	Çok kuyucuklu polistiren plaklarda inkübasyon yapılmış Değerlendirmede koloni sayım yöntemi ve CLSM kullanılmış
<b>Hiarishi ve ark. (252)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	%3,8'lik gümüş diamin florürün antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi	Membran filtreleri üzerinde biyofilm oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Liu ve ark. (164)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Aç bırakılmış <i>E. faecalis</i> hücrelerinin biyofilm oluşturma becerisinin değerlendirilmesi	İnsan dentini ve polistiren bloklar üzerinde biyofilm oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi ve SEM kullanılmış
<b>Chavez de Paz ve ark. (162)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>S. anginosus</i> , <i>S. gordonii</i> klinik izolatları	Antimikrobiyal ajanların endodontik biyofilmler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi	Mini akım hücre sistemi üzerinde 24 saatlik biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede konfokal mikroskopisi ve görüntü analizi kullanılmış

**Tablo 3.** Farklı endodontik çalışmalarda tercih edilmiş biyofilm modelleri  
(devam)

<b>Soares ve ark. (253)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Farklı ajanların biyofilmler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi	İnsan dişleri üzerinde 21 günlük biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi ve SEM kullanılmış
<b>Shen ve ark. (254)</b>	<i>In vitro</i> Birden çok tür	Mekanik ajitasyonun iki farklı klorheksidin preperatının antimikrobiyal etkinliğine etkisinin değerlendirilmesi	Kollajen ile kaplanmış hidroksiapatit diskler üzerinde 3 haftalık biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede CLSM kullanılmış
<b>Pappen ve ark. (255)</b>	<i>In vitro</i> Birden çok tür	Farklı antimikrobiyal ajanların planktonik ve biyofilm formundaki bakteriler üzerindeki etkinliğinin değerlendirilmesi	Kollajen ile kaplanmış hidroksiapatit diskler üzerinde 2 haftalık biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede CLSM kullanılmış
<b>Shen ve ark. (256)</b>	<i>In vitro</i> Birden çok tür	Farklı büyüme fazlarında bulunan oral biyofilmler içerisindeki canlı bakteri sayısının belirlenmesi	Kollajen ile kaplanmış hidroksiapatit diskler üzerinde biyofilmler oluşturulmuş, Değerlendirmede CLSM ve koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Badr ve ark. (234)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Meyan kökü bitkisinin antibakteriyel ve sitotoksik etkilerinin belirlenmesi	Selüloz nitrat membran filtreler üzerinde biyofilm oluşturulmuş, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Ordinola-Zapata ve ark. (169)</b>	<i>In vivo</i> Birden çok tür	Farklı antimikrobiyal ajanların biyofilmler üzerindeki etkinliğini değerlendirmek	Sığır dentin blokları ortodontik apareylere sabitlenerek 48 saat ağız ortamında tutulmuş, daha sonra laboratuvarında 24 saat inkübe edilmiş Ölü ve canlı bakterileri oranlarının belirlenmesinde CLSM kullanılmış

**Tablo 3.** Farklı endodontik çalışmalarda tercih edilmiş biyofilm modelleri (devam)

<b>Baca ve ark. (227)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Farklı antimikrobiyal ajanların rezidüel etkilerinin biyofilm oluşumuna etkilerinin incelenmesi	Dentin blokları üzerinde 3 haftalık inkübasyon yapılmış, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Meire ve ark. (175)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Er:YAG lazer, Nd:YAG lazer, antimikrobiyal fotodinamik terapi ve NaOCl'nin biyofilmler üzerindeki etkinliğini incelemek	Dentin diskleri üzerinde 24 saat inkübasyon yapılmış, Değerlendirmede koloni sayım yöntemi kullanılmış
<b>Stojicic ve ark. (257)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i> klinik izolatları	Antimikrobiyal fotodinamik terapinin biyofilmler üzerindeki etkinliğini değerlendirmek	Kollajen ile kaplanmış hidroksiapatit diskler üzerinde 3 haftalık biyofilmler oluşturulmuş, Ölü ve canlı bakterileri oranlarının belirlenmesinde CLSM kullanılmış
<b>Wang ve ark. (187)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i> klinik izolatu	Endodontik dezenfeksiyon solüsyonlarının genç ve olgun biyofilmler üzerindeki etkinliğini değerlendirmek	Dentin blokları üzerinde 24 saatlik ve 3 haftalık inkübasyon yapılmış, Ölmüş ve canlı bakterilerin belirlenmesinde CLSM kullanılmış
<b>Guerreiro-Tanomaru ve ark. (258)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	<i>E. faecalis</i> 'in farklı yüzeylerde oluşturduğu biyofilmleri incelemek	14 ve 21 günlük inkübasyon yapılmış, Biyofilm yoğunluğunun incelenmesinde CLSM kullanılmış
<b>Guerreiro-Tanomaru ve ark. (259)</b>	<i>In vitro</i> <i>E. faecalis</i>	Antimikrobiyal ajanlara setrimid ilave edilmesinin antimikrobiyal etkinliğe etkilerinin incelenmesi	Sığır dentin blokları 14 gün inkübe edilerek biyofilm oluşturulmuş, Biyofilm yoğunluğunun incelenmesinde CLSM kullanılmış

## **2.6. Antimikrobiyal Duyarlılık Testleri**

Antimikrobiyal duyarlılık testleri, bir antimikrobiyal ajanın belli bir bakteri türüne karşı *in vitro* etkinliğini saptamak amacıyla uygulanan testlerdir (260). Klinikte antimikrobiyal tedavinin, duyarlılık testlerinin sonuçlarına göre belirlenmesi esastır. Duyarlılık testleri ile patojenin antimikrobiyal ajanlara direnç düzeyinin belirlenmesi ve patojen üzerinde etkili olan antimikrobiyalin tedavide kullanılması hedeflenmektedir (260).

### **2.6.1. Disk Diffüzyon Testi**

Mikrobiyoloji laboratuvarlarında antibiyotik duyarlılığının saptanması amacıyla en sık kullanılan yöntemdir. En kolay, en ucuz, en iyi standardize edilmiş ve en güvenilir test olarak kabul edilmektedir. Bu test, kâğıt disklere emdirilen antimikrobiyalin, duyarlılığı araştırılan mikroorganizmanın inoküle edildiği besiyerine difüze olması esasına dayanmaktadır. Belirli miktarda antimikrobiyal emdirilmiş kâğıt diskler, duyarlılığı test edilecek mikroorganizmanın yoğun bir şekilde inoküle edildiği katı besiyerine yerleştirilir. Diskler bir süre sonra çözünüp katı besiyeri üzerinde difüze olurken, inoküle edilen mikroorganizma da çoğalmaya başlar. Belirli bir inkübasyon süresinden kâğıt disklerin etrafında oluşan üreme görülmeyen alanlar değerlendirilir. Mikroorganizma test edilen antimikrobiyale ne kadar duyarlı ise, diskin etrafında oluşan inhibisyon zonu da o kadar geniş olacaktır. İnhibisyon zonunun çapı mm cinsinde ölçülerek, standart zon tablolarına göre değerlendirmeler yapılır ve mikroorganizmanın kullanılan antimikrobiyal ajana karşı duyarlılık durumu “duyarlı, orta derecede duyarlı veya dirençli” olarak belirlenir (260).

Disk difüzyon yönteminin dezavantajları yavaş çoğalan bakterilerin duyarlılıklarını araştırmak için uygun olmaması ve değerlendirme sonunda kantitatif bir değer ortaya koyamamasıdır (261).

### **2.6.2. Agar Dilüsyon Testi**

Agar dilüsyon metodu test edilecek antimikrobiyallerin ikişer kat seri dilüsyonlarını içeren agar plakları (Müller-Hinton agar) üzerine duyarlılık durumu

test edilecek bakteri süspansiyonlarının damlatılarak inoküle edilmesiyle gerçekleştirilmektedir. Bu testin yapılışı oldukça zahmetlidir, bu nedenle çok sık tercih edilen bir test değildir. Testin sağladığı en önemli avantaj belli bir antibiyotik konsantrasyonu için, aynı test plağında birden fazla suşun duyarlılığının araştırılmasına olanak sağlamasıdır (262).

### **2.6.3. Sıvı Mikrodilüsyon Testi**

Duyarlılık durumu araştırılan bakterilere karşı çeşitli antimikrobiyallerin minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değerlerini saptamak amacıyla kullanılan bir testtir. Çok küçük hacimlerle çalışılması ve pratikliği bu yöntemin en önemli avantajlarıdır. 96 kuyucuklu standart mikropaklar üzerinde aynı anda 12 antimikrobiyal ajanın 8 dilüsyonu test edilebilmektedir (260).

Mikropaklar üzerinde test edilecek antimikrobiyallerin ikişer kat azalan seri dilüsyonları hazırlanır. Daha sonra bu kuyucuklara standart bakteriyel süspansiyon ( $5 \times 10^5$  CFU/ml) eklenir ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır, sonrasında kuyucuklarda bulanıklık olup olmadığı gözle incelenir. Kuyucuklarda gözle görülebilir bulanıklığın olmadığı en küçük konsantrasyon belli bir bakteri suşuna karşı etkinliği araştırılan antimikrobiyalın MİK değeri olarak belirlenir (260). Saptanan MİK değerleri sınır değerlerle karşılaştırılarak bakteri suşunun test edilen antimikrobiyale karşı duyarlılık durumu belirlenmektedir. Bu yöntemle antimikrobiyal ajanların minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) da belirlenebilmektedir.

### **2.6.4. E-Test**

Katı besi yerinde difüzyon yoluyla test edilen antimikrobiyal ajanın MİK değerinin belirlenmesine olanak sağlayan bir yöntemdir. Yavaş üreyen bakterilerin ve anaerobların duyarlılıklarının belirlenmesinde de en güvenilir yöntem olarak kabul edilmektedir (262).

Standardize bir bakteri süspansiyonu MHA plağına yayılır. Dereceli konsantrasyonları emdirilmiş E-test şeritleri agar yüzeyine yerleştirilir ve 37°C'de 24 saat inkübasyona bırakılır. Inkübasyon sonrası antimikrobiyalın üremeyi inhibe

etmesiyle şerit etrafında elips şeklinde bir inhibisyon zonu oluşur. Üremenin bittiği yerdeki kesişme noktasından MİK değeri okunur (262).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma; Süleyman Demirel Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Laboratuvarı, Tıp Fakültesi Bakteriyoloji Laboratuvarı ve Deneysel ve Gözlemsel Öğrenci Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne ait laboratuvarlarda gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumu ve eliminasyonunun FESEM ile görüntülenmesi amacıyla Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezine ait SEM Laboratuvarı kullanılmıştır. Bu çalışma için Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Çalışma Projeleri Danışma ve Koordinasyon Kurulu'nun 27.12.2011/27-8 tarih/sayılı kararı ile etik kurul izni alınmıştır.

#### 3.1. Antimikrobiyal Ajanların Hazırlanması

##### 3.1.1. *Glycyrrhiza glabra* L. Ekstraktının Hazırlanması

*Glycyrrhiza glabra* L. bitkisinin toprak altı gövdesi ve kökleri (**Resim 5**) oda sıcaklığında kurutuldu, mekanik öğütücü yardımı ile toz haline getirildi ve 30 gr'lık gruplar oluşturuldu. Her bir 30 gr'lık grup, 100 ml %80'lik etil alkol içerisinde 37°C'de ısıtıcı manyetik karıştırıcı üzerinde 24 saat bekletilerek ekstraksiyon yapıldı. Elde edilen ekstrakt Whatman no:1 sahip filtre kâğıdı (Whatman, Camlab Ltd., Cambridge, Birleşik Krallık) kullanılarak vakum pompası yardımıyla süzüldü (**Resim 6**). Ekstrakt içerisindeki metil alkol ve distile suyun uzaklaştırılması için karışım rotary evaporatöre yerleştirildi, 60 devir/dakika rotasyon hızında 40°C'de etil alkol ve distile suyun buharlaşması sağlandı (263) (**Resim 7**). Elde edilen saf ekstrakt 0,22µm gözenek genişliğine sahip membran filtre kullanılarak steril edildi, çalışmada kullanılabilecek kadar -18°C'de muhafaza edildi. Çalışmada kullanılmadan önce elde edilen saf ekstrakt içerisindeki Glycyrrhizinin teşhisi ve miktarının belirlenmesi için ters faz-yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) analizi uygulandı. Analiz için SCL-10 Avp sistem kontrolörü (Shimadzu, Tokyo, Japonya), SIL-10AD vp örnekleyici, LC-10AD vp pompa, DGU-14a degazör, CTO-10 A vp kolon ısıtıcı kullanıldı, diode dedektörü 278 nm'ye ayarlandı ve XDB C-18 kolonu (250 × 4,6 mm, 5 µm) kullanıldı. Akış hızı 0,8 ml/dk. olacak şekilde 10 µl örnek çözeltilerden eklendi ve kolon sıcaklığı 30°C'ye ayarlandı. Elde edilen veriler Shimadzu Class-VP



Chromatography Laboratory Automated Software System (Tokyo, Japonya) analiz programı kullanılarak incelendi ve ekstrakt %2 Glycyrrhizin içerecek şekilde dimetil sülfoksit ile seyreltildi (264).



**Resim 5.** *Glycyrrhiza glabra* L. (meyan kökü) bitkisinin toprak altı gövdesi ve kökleri.



**Resim 6.** Filtre kağıdı ve vakum pompası kullanılarak ekstraktın süzülmesi.



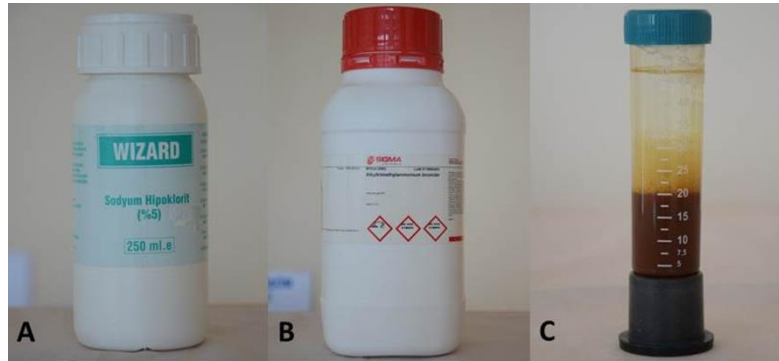
**Resim 7.** Rotary evaporatör kullanılarak ekstrakt içerisindeki metil alkol ve distile suyun uzaklaştırılması.

### 3.1.2. Setrimid Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak ajanlardan biri olan setrimid (Alkyltriethylammonium bromide, Sigma Chemical, Almanya) toz halinde temin edildi, kullanılmadan önce distile su ile ağırlıkça %2'lik çözeltisi hazırlanarak kullanıldı.

### 3.1.3. NaOCl Çözeltisinin Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak ajanlardan bir diğeri olan NaOCl, %5'lik hazır solüsyon (Wizard, Rehber Kimya, İstanbul, Türkiye) olarak temin edildi, kullanılmadan önce distile su ile hacimce %2'lik çözeltisi hazırlanarak kullanıldı (**Resim 8**). Çalışmada negatif kontrol grubunda kullanılan steril salin solüsyonu (Polifarma, Çorlu, Türkiye) ise hazır olarak temin edildi.



**Resim 8.** Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanlar; sodyum hipoklorit (A), setrimid (B), *G. glabra* ekstraktı (C).

## 3.2. Antimikrobiyal Ajanların *E. faecalis* Üzerindeki Duyarlılıklarının Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan antimikrobiyal ajanların *E. faecalis* üzerindeki duyarlılığı öncelikle disk diffüzyon testi ile değerlendirildi. Daha sonra *E. faecalis* için MİK ve MBK değerlerinin belirlenmesi amacıyla sıvı mikrodilüsyon testi uygulandı.

### 3.2.1. Disk Diffüzyon Testi

Çalışmanın 48 saat öncesinde, *E. faecalis* ATCC 29212 suşu muhafaza edildiği -80°C'den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra %5 koyun

kanlı agar besiyerine pasajlandı ve 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Üreyen kolonilerin yine %5 koyun kanlı agar besiyerine ikinci kez taze pasajı yapıldı, 37°C’de 24 saat inkübe edildi ve elde edilen saf koloniler kullanılarak, densitometre cihazı (BD Phoenix Spec Nephelometer, Limhamn, İsveç) ile 3 ml steril salin içerisinde 0,5 McFarland ( $10^8$  CFU/ml) bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı. Muller-Hinton Agar (MHA) plakları üzerine hazırlanan bakteriyel süspansiyondan 100 µl yayım yapıldıktan sonra, test edilecek antimikrobiyal ajanlardan 6 mm çapındaki steril kağıt disklerle 5’er µl emdirilip, önceden enfekte edilmiş agar plaklarına yerleştirildi ve plaklar 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Bu test her ajan için iki kez tekrarlandı. 24 saat sonunda kağıt diskler etrafında oluşan inhibisyon alanlarının çapı milimetrik olarak ölçüldü ve fotoğraflandı.

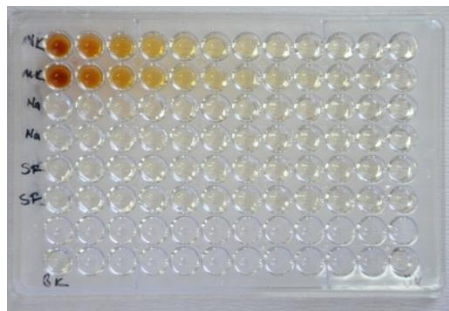
### 3.2.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testi

Çalışmada, sıvı mikrodilüsyon testi kullanılarak *E. faecalis* (ATCC 29212) için test edilen antimikrobiyal ajanların MİK ve MBK değerleri belirlendi. Bu amaçla 96 kuyucuklu steril U tabanlı plakların her antimikrobiyal için 1’den 12’ye kadar olan satırı kullanıldı. Kullanılan kuyucukların hepsine 50µl steril Muller-Hinton broth (MHB) eklendi. Her antimikrobiyal için kullanılan 12 kuyucuğun ilkine test edilecek ajanın başlangıç konsantrasyonunu (%2’lik setrimid, %2’lik NaOCl ve %2 Glycyrrhizin içeren *G. glabra* ekstraktı) içeren çözeltiden 50 µl eklendi. En yüksek antimikrobiyal ajan konsantrasyonunun eklendiği ilk kuyucuktan 50 µl alınıp 2. kuyucuğa aktarım ve pipetaj, 2. kuyucuktan 50 µl alınıp 3. kuyucuğa aktarım ve pipetaj şeklinde son kuyucuğa kadar (12. kuyucuk) antimikrobiyal ajanların çift kat seri dilüsyonları yapıldı ve son kuyucuktan 50 µl alınıp dışarı atıldı. Plak üzerindeki 1H kuyucuğu besiyeri kontrolü (BK) için kullanıldı ve bu kuyucuğa 100 µl steril MHB besiyeri eklendi, 12 H kuyucuğu ise üreme kontrolü olarak kullanıldı ve buraya da 50 µl steril MHB besiyeri eklendi. Bu iki kuyucuğa antimikrobiyal ajan pipetlenmedi. Daha sonra çalışmanın 48 saat öncesinde, muhafaza edildiği -80°C’den çıkarılıp oda sıcaklığına gelmesi beklendikten sonra iki kez pasajlanarak elde edilen saf koloniler kullanılarak, densitometre cihazı (BD Phoenix Spec Nephelometer, Limhamn, İsveç) ile 3 ml steril MHB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteri süspansiyonu hazırlandı (**Resim 9**). Bu süspansiyon 1/100

oranında yine steril MHB ile sulandırılarak, son bakteri inokulum konsantrasyonu  $5 \times 10^5$  CFU/ml olacak şekilde üreme kontrol kuyucuğu da dahil olmak üzere her bir kuyucuğa 50 µl eklendi. Besiyeri kontrol kuyucuğuna bakteri süspansiyonu pipetlenmedi. Daha sonra plağın üstü kapatılarak 37°C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra plak etüvden çıkarıldı, kuyucuklar gözle değerlendirildi ve üremenin görülmediği en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu o ajanın çalışılan mikroorganizma için MİK değeri olarak belirlendi (**Resim 10**). MBK değerinin belirlenmesi için, üremenin durduğu en düşük konsantrasyondan en yükseğe doğru örnekler alınarak koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıldı, 37°C’de 24 saat inkübe edildi. Koloni gelişiminin görülmediği en düşük antimikrobiyal konsantrasyonu o ajanın çalışılan mikroorganizma için MBK değeri olarak belirlendi.



**Resim 9.** Densitometre cihazı kullanılarak 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde bakteriyel süspansiyonun hazırlanması.



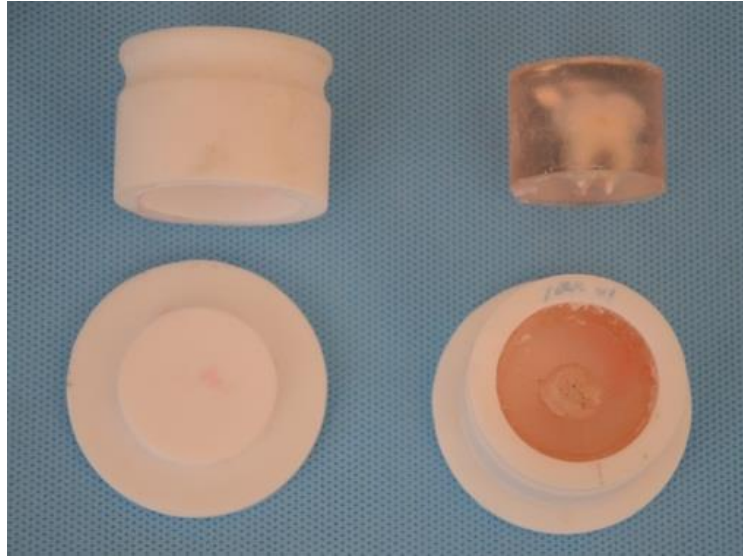
**Resim 10.** 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakları kullanılarak antimikrobiyal ajanların çift kat seri dilüsyonlarının oluşturulması ve minimum inhibisyon konsantrasyonunun belirlenmesi.

### 3.3. Antimikrobiyal Ajanların Etkinliğinin Biyofilm Modelleri Üzerinde İncelenmesi

Calgary biyofilm modeli (265) modifiye edilerek dentin disklerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde antimikrobiyal ajanların etkinlikleri değerlendirildi.

#### 3.3.1. Dentin Disklerinin Hazırlanması

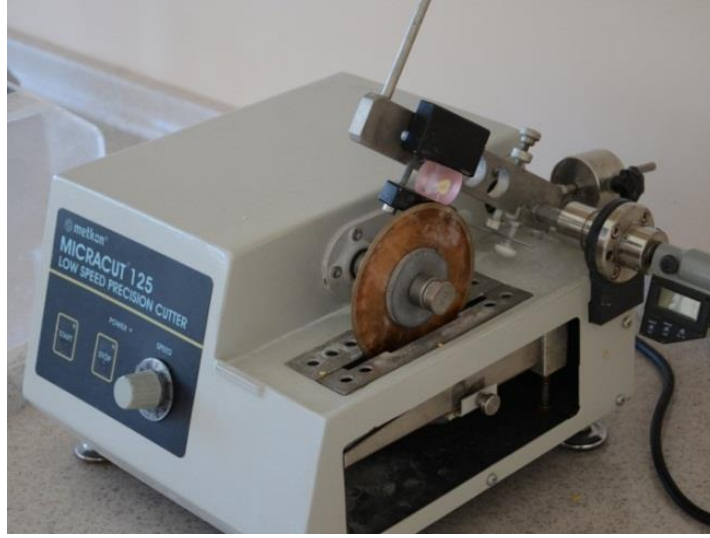
Çalışmada, üzerinde biyofilm oluşturulacak substrat olarak standart dentin disklerinin kullanılmasına karar verildi. Dentin disklerinin hazırlanmasında kullanılmak üzere, Süleyman Demirel Üniversitesi Ağız Diş Çene Hastalıkları ve Cerrahisi Kliniği'nde ortodontik nedenlerle çekilmiş 228 adet gömülü molar diş toplandı ve kullanılıncaya kadar %0,1'lik timol içerisinde 4°C'de bekletildi. Kullanılmadan hemen önce dişler ultrasonik uçlarla ve kretuar yardımıyla temizlenip teflon kalıplara yerleştirilerek polyester rezin (Özunal Boya Sanayi Ticaret Ltd. Şirketi, Isparta, Türkiye) içerisine gömüldü (**Resim 11**).



**Resim 11.** Çekilmiş dişlerin teflon kalıplar kullanılarak polyester rezin içerisine gömülmesi.

Polyester rezin fazlalıkları alçı motoruyla temizlendikten sonra her bir diş hassas kesit cihazına (Micracut 125, Metkon, Bursa, Türkiye) sabitlenerek koronal dentinin pulpaya bakan yüzeylerinden elmas kaplı kesme diskleri (Buehler, Lake

Bluff, IL, ABD) kullanılarak 2 mm kalınlığında bir adet horizontal kesit elde edildi (**Resim 12**).

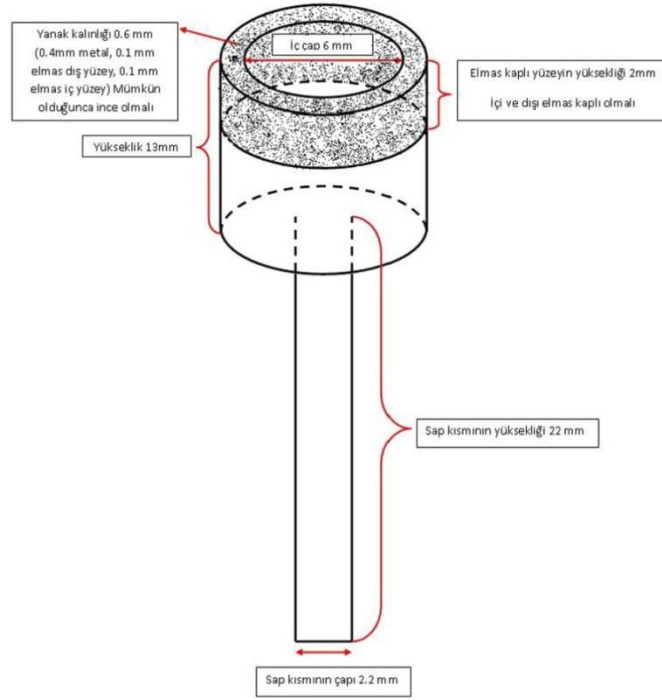


**Resim 12.** Hassas kesme cihazı ve elmas kesme diskleri kullanılarak 2 mm kalınlığındaki horizontal kesitlerin elde edilmesi.

Elde edilen dentin kesitlerinden standart dentin disklerinin oluşturulabilmesi için iç çapı 6 mm, et kalınlığı 0,6 mm ve yanaklarının iç ve dış yüzeyi 220 grid elmasla kaplı olan özel bir frez yaptırıldı (**Şekil 1, Resim 13**).



**Resim 13.** Dentin disklerinin elde edilmesinde kullanılan özel yapım elmas kaplı silindirik frez.



**Şekil 1. Elmas kaplı silindirik frezin şematik görüntüsü.**

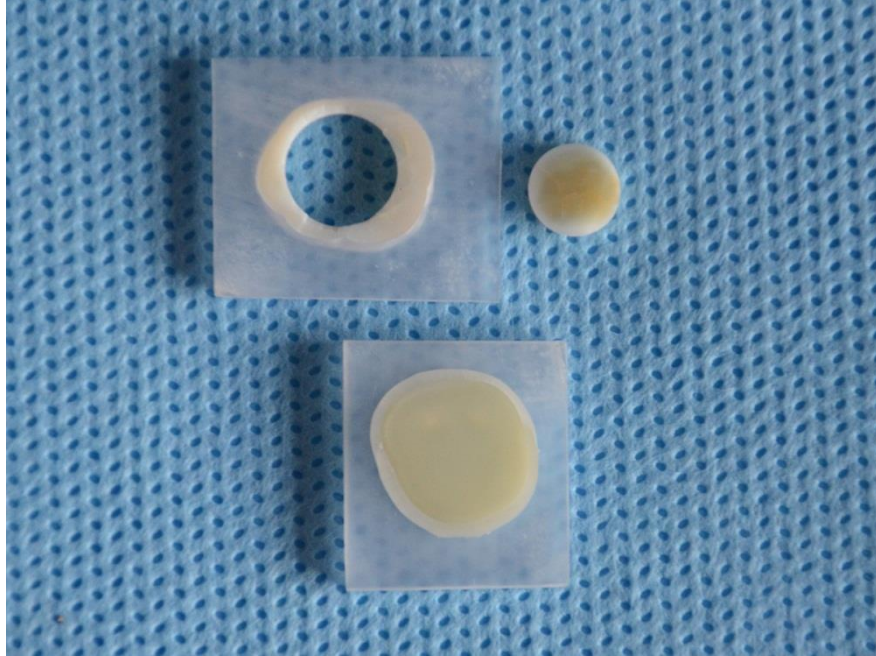
Elmas kaplı silindirik frez, bir elektrik motorunun (200 series, Dremel, ABD) ucuna yerleştirilip dikey yönde hareket edebilen bir delme sehпасına (Workstation 220, Dremel, ABD) sabitlenerek bir düzenek oluşturuldu (**Resim 15**). Bu düzenek 35000 devir/dk. dönme hızında çalıştırılıp dikey yönde kuvvet uygulanarak, su soğutması altında dentin diskleri hazırlandı (**Resim 14 ve 16**). Hazırlanan dentin diskleri kullanılıncaya kadar fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde +4°C’de muhafaza edildi.



**Resim 14. 6 mm çapındaki dentin disklerinin elde edilmesi.**



**Resim 15.** Dentin disklerinin elde edilmesi için oluşturulan standart düzenek.

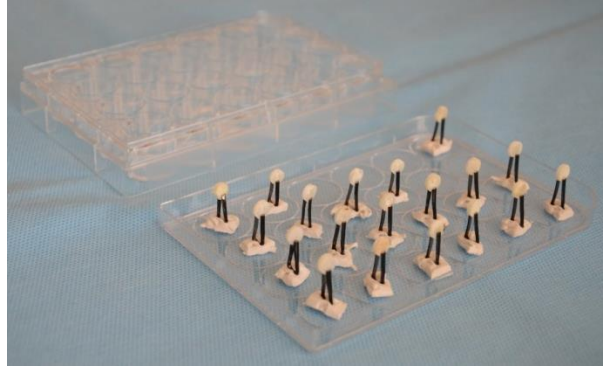


**Resim 16.** Çekilmiş dişlerden elde edilen horizontal kesit ve dentin diski.



### 3.3.2. Biyofilm Modelinin Oluşturulması

Dentin diskleri üzerinde biyofilm oluşturulması için 24 kuyucuklu, düztabanlı polistiren plaklar ve kapakları kullanıldı. Plakların kapağına kuyucukların ortasına gelecek şekilde hamur yapıştırıcı (Multifix, Pritt, İstanbul, Türkiye) yardımıyla paslanmaz çelik kısaçlar sabitlendi, daha sonra kapak kapatıldığında plak tabanına dokunmayacak şekilde paslanmaz çelik kısaçlara dentin diskleri dikey yönde tutturuldu (**Resim 17**).



**Resim 17.** Polistiren plak kapaklarına tutturulan dentin diskleri ve karşılık gelen kuyucuklar.

Dentin diskleri üzerinde kesit alma işlemi sırasında oluşan smear tabakasının kaldırılması için plak üzerinde dentin disklerine karşılık gelen kuyucuklara 2ml %17'lik EDTA solüsyonu (Calasept EDTA, Nordiska Dental, İsveç) ilave edildi ve kapak kapatılarak ultrasonik banyoda (WiseClean, Daihan Scientific Co., Seoul, Kore) 3 dk. bekletildi (**Resim 18**).



**Resim 18.** Dentin diskleri üzerindeki smear tabakasının kaldırılmasında kullanılan ultrasonik banyo.

Daha sonra her örnek 10 ml PBS ile 1dk. yıkandı. Smear tabakası kaldırıldıktan sonra plaklar paketlenerek etilen oksit ile steril edildi. Biyofilm modeli hazırlandıktan sonra oluşturan deney grupları **Tablo 4**'te gösterilmiştir. Her grupta 1 örnek dentin disklerinin sterilizasyonunun kontrolü için, 1 örnek biyofilm oluşumunun FESEM ile görüntülenmesi için, 4 örnek dentin diskleri üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki bakteri sayısının hesaplanması için, 12 örnek biyofilm eliminasyonunun değerlendirilmesi için, 1 örnek ise antimikrobiyal ajanların biyofilm üzerindeki etkinliğinin FESEM ile incelenmesi için kullanıldı (**Tablo 5**).

**Tablo 4.** Antimikrobiyal ajanların *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi için oluşturulan deney grupları.

Grup	Antimikrobiyal Ajan	Konsantrasyon	Uygulama Süresi	Örnek Sayısı
1	NaOCl	%0,5	1 dk.	19
2	NaOCl	%0,5	3 dk.	19
3	NaOCl	%0,5	5 dk.	19
4	Setrimid	%0,015	1 dk.	19
5	Setrimid	%0,015	3 dk.	19
6	Setrimid	%0,015	5 dk.	19
7	<i>G.glabra</i> ekstraktı*	%0,25	1 dk.	19
8	<i>G.glabra</i> ekstraktı*	%0,25	3 dk.	19
9	<i>G.glabra</i> ekstraktı*	%0,25	5 dk.	19
10	Steril salin (negatif kontrol)	%0,9	1 dk.	19
11	Steril salin (negatif kontrol)	%0,9	3 dk.	19
12	Steril salin (negatif kontrol)	%0,9	5 dk.	19

\* *G.glabra* ekstraktı içerisindeki Glycyrrhizin oranına göre standardize edildi.

**Tablo 5.** Her bir grup için uygulanacak işlemler listesi.

Uygulanacak İşlem	Örnek Sayısı
Dentin disklerinin sterilizasyonunun kontrolü	1
Biyofilm oluşumunun FESEM ile görüntülenmesi	1
Dentin diskleri üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki bakteri sayısının hesaplanması	4
Biyofilm eliminasyonunun değerlendirilmesi	12
Antimikrobiyal ajanların biyofilm üzerindeki etkinliğinin FESEM ile incelenmesi	1
<b>Toplam</b>	<b>19</b>

### 3.3.3. Biyofilm Oluşumu

Densitometre cihazı (BD Phoenix Spec Nephelometer, Limhamn, İsveç) ile 3 ml steril MHB içerisinde 0,5 McFarland bulanıklığa eşit olacak şekilde *E. faecalis* (ATCC 29212) süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon 1/10 oranında steril MHB ile seyreltilerek, son bakteri inokulum konsantrasyonu  $10^7$  CFU/ml olacak şekilde sterilizasyon kontrol kuyucuğu hariç olmak üzere, dentin disklerine karşılık gelen tüm kuyucuklara 1ml eklendi. Sterilizasyon kontrol kuyucuğuna yalnızca 1ml steril MHB eklendi (**Resim 19**). Daha sonra plağın kapağı kapatılarak çalkalayıcı tabla (3D sunflower mini-shaker, Biosan, Riga, Letonya) üzerine yerleştirildi ve dakikada 30 çalkalama yapacak şekilde 24 saat  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi (**Resim 20**). İnkübasyondan sonra plak etüvden çıkarıldı, sterilizasyon kontrol kuyucuğuna karşılık gelen dentin diski plaktan ayrıldı ve sterilizasyon kontrol kuyucuğundan 100  $\mu\text{l}$  örnek alınarak koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıp koloni gelişimi olup olmadığı kontrol edildi. Sterilizasyon kontrol kuyucuğunda üreme gözlenmesi durumunda deney tekrarlandı. Dentin diskleri üzerindeki planktonik bakterilerin uzaklaştırılması için dentin diskleri 1 ml %0.9'luk salin ile yıkandı.



**Resim 19.** Dentin disklerine karşılık gelecek kuyucuklara bakteriyel süspansiyonun eklenmesi.



**Resim 20.** Bakteriyel süspansiyon eklendikten sonra, hazırlanan plağın üç boyutlu çalkalayıcı tabla üzerinde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edilmesi.

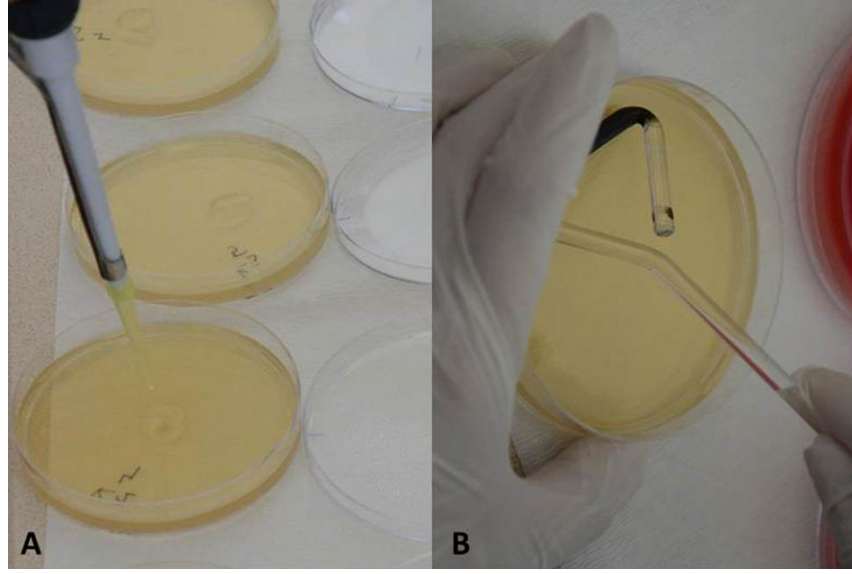
Bu aşamada biyofilm oluşumunun görüntülenebilmesi için bir örnek plaktan ayrılarak fiksasyon ve dehidratasyon sürecinden sonra FESEM'de incelendi (bkz. **3.3.5**). Dentin diskleri üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki bakteri sayısının hesaplanması için 4 örnek 1 ml %0.9'luk salin içeren kuyucuklara yerleştirildi ve biyofilm içerisindeki bakterilerin planktonik forma dönüşmeleri için ultrasonik banyoda 5 dk. bekletildi (**Resim 21**). Bakteriler planktonik forma dönüştükten sonra kuyucuklardan alınan 100  $\mu\text{l}$ 'lik örneklerin makrodilüsyon yöntemiyle 6 kez 10 katlı dilüsyonları elde edildi ( $1/10$ ,  $1/10^2$ ,  $1/10^3$ ,  $1/10^4$ ,  $1/10^5$ ,  $1/10^6$ ) (**Resim 22**). Bu dilüsyonlardan 10  $\mu\text{l}$  alınıp MHA besiyerine ekilip (**Resim 23**),  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 24 saat inkübe edildikten sonra koloni oluşturan birimler (CFU) sayılarak biyofilm içerisindeki bakteri sayıları belirlendi (**Resim 24**). Kuyucuklardan alınan örnek hacmi, kuyucuk hacminin  $1/10$ 'u kadar olduğu için, koloni sayıları 10 ile çarpılarak gerçek bakteri sayıları hesaplandı.



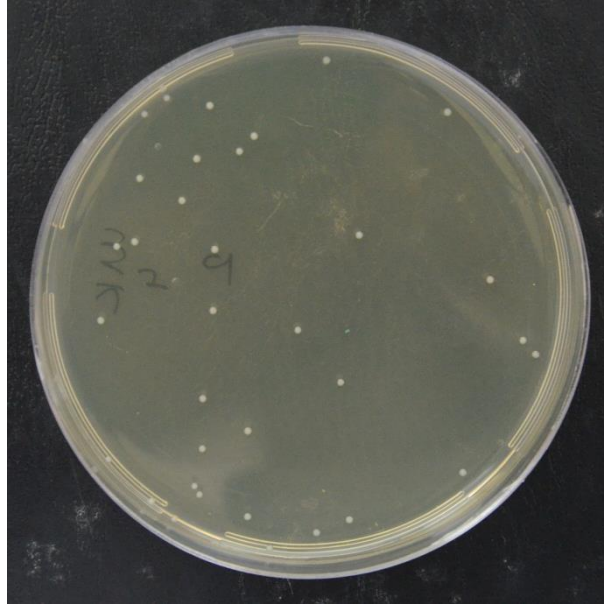
**Resim 21.** Dentin diskleri üzerinde oluşan biyofilm içerisindeki bakteri sayısının hesaplanabilmesi için ultrasonik banyo içerisinde bekletilerek planktonik forma dönüştürülmesi.



**Resim 22.** Planktonik forma dönüştürülen bakterilerin sayılabilir değerler elde edilebilmesi için makrodilüsyon yöntemi ile seyreltilmesi.



**Resim 23.** Seyreltilen bakterilerin MHA besi yerine ekilmesi (A) ve cam Drigalski spatülü kullanılarak besi yerine yayılması (B).



**Resim 24.** MHA besi yerine ekimi ve yayımı yapılan bakterilerin inkübasyondan sonra koloni geliştirmiş görüntüsü.

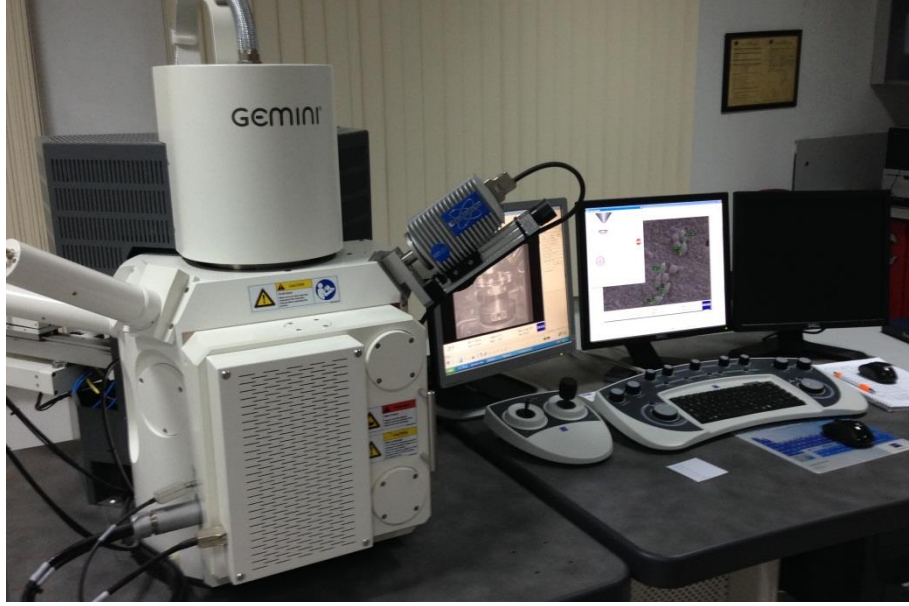
### 3.3.4. Biyofilm Eliminasyonu

Biyofilm oluşumu tamamlandıktan sonra, başka bir plağın dentin disklerine karşılık gelen kuyucuklarına, daha önceden belirlenen MBK'da test edilecek antimikrobiyal ajandan 1'er ml eklenip, dentin diskleri yerleştirilerek test süresi kadar beklendi. Daha sonra dentin diskleri içerisinde 1 ml %0.9'luk steril salin

bulunan başka bir plağa aktarılarak antimikrobiyal ajanlar nötralize edildi. Bu aşamada, uygulanan antimikrobiyal ajanın etkinliğinin görüntülenmesi amacıyla 1 örnek plaktan ayrılarak FESEM’de incelendi (bkz. 3.3.5). Sonrasında, dentin diskleri üzerinde kalan bakteri sayısının belirlenmesi için, başka bir plağın dentin disklerine karşılık gelen kuyucuklarına 1 ml steril salin solüsyonu eklendi ve plak ultrasonik banyoda 5 dakika bekletilerek biyofilm içerisindeki bakterilerin planktonik forma dönüşmesi sağlandı. Bakteriler planktonik forma dönüştükten sonra kuyucuklardan alınan 100 µl’lik örnekler makrodilüsyon yöntemiyle seyreltildi, MHA besiyerine ekim yapılarak 24 saat sonra koloni oluşturan birimler sayıldı. Kuyucuklardan alınan örnek hacmi, kuyucuk hacminin 1/10’u kadar olduğu için, koloni sayıları 10 ile çarpılarak gerçek bakteri sayıları hesaplandı. Elde edilen canlı mikroorganizma sayıları istatistiksel analiz öncesinde log<sub>10</sub> tabanına dönüştürüldü.

### **3.3.5. Biyofilm Oluşumu ve Eliminasyonunun FESEM ile Görüntülenmesi**

Bütün deney gruplarında, 1’er örnek biyofilm oluşup oluşmadığının kontrolü için, 1’er örnek de antimikrobiyal ajanlarının etkinliğini değerlendirmek için olmak üzere, toplam 24 örnek FESEM’de incelendi. Her örnek, 0,1 M sodyum kakodilat ile tamponlanmış %2,5’lik gluteraldehit içerisinde (pH=7,4) +4°C’de 2 saat fikse edildi. Sonrasında 1 saat 0,2 M sodyum kakodilat tamponunda bekletilerek gluteraldehit etkisizleştirildi. Daha sonra örnekler sırasıyla %30’luk etanolde 10 dk., %50’lik etanolde 10 dk., %70’lik etanolde 10 dk., %95’lik etanolde 5+5 dk., %100’lük etanolde 5+5+5 dk. bekletilerek dehidrate edildi. Dehidratasyondan sonra örnekler kritik nokta kurutucusu (K 850, Emitech, Montigny-le-Bretonneux, Fransa) ile kurutulup, 10 nm kalınlığında platin ile kaplandı (Q150R, Quorum Technologies, East Sussex, Birleşik Krallık) ve FESEM (Supra 55, Zeiss, Jena, Almanya) ile incelendi (266) (**Resim 25**).



**Resim 25.** Dentin diskleri üzerindeki biyofilm oluşumu ve eliminasyonunun görüntülenmesinde kullanılan FESEM cihazı.

### **3.4. İstatistiksel Değerlendirme**

Dentin disklerinde oluşturulan biyofilmlere antimikrobiyal ajan uygulanmadan önce ve uygulandıktan sonra elde edilen koloni sayıları  $\log_{10}$  tabanına dönüştürüldükten sonra faktöriyel düzeyde varyans analizi (ANOVA) tekniği ile analiz edildi. Grup ortalamaları arasındaki farkların belirlenmesinde çoklu karşılaştırma yöntemlerinden Tukey testi kullanıldı ( $P < 0,05$ ).



## 4. BULGULAR

### 4.1. Antimikrobiyal Ajanların *E. faecalis* Üzerindeki Duyarlılıklarının Belirlenmesine Yönelik Bulgular

#### 4.1.1. Disk Diffüzyon Testine Ait Bulgular

*E. faecalis* (ATCC 29212) için disk diffüzyon testi ile elde edilen antimikrobiyal ajanlara ait inhibisyon zonlarının sıralaması **Tablo 6**'da gösterilmektedir. Setrimid'in etrafında 26 mm çapında inhibisyon alanı olduğu ve test edilen ajanlar içerisinde *E. faecalis* için en duyarlı ajan olduğu belirlenmiştir. *G. glabra* ekstraktı ve NaOCl etrafında 9 mm çapında inhibisyon alanı oluşurken, negatif kontrol grubu etrafında inhibisyon oluşmadığı (**Resim 26 ve 27**).

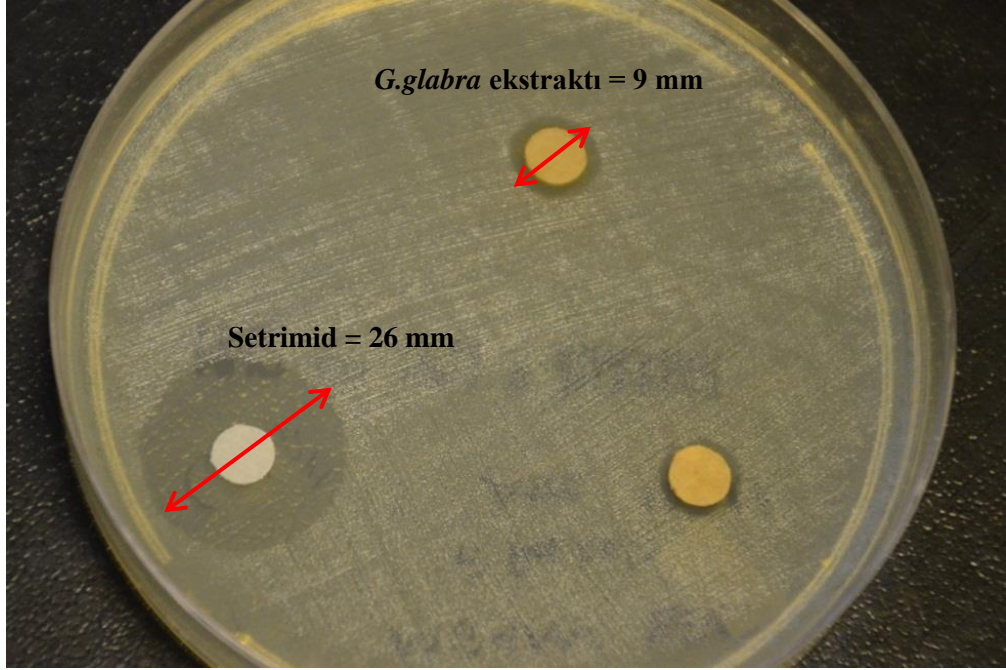
**Tablo 6.** *E. faecalis* (ATCC 29212) için disk diffüzyon testi ile elde edilen antimikrobiyal ajanlara ait inhibisyon zonlarının ölçüm değerleri.

Antimikrobiyal Ajan	İnhibisyon Zonu (mm)
Setrimid (%2'lik)	26
<i>G. glabra</i> ekstraktı (%2'lik)*	9
NaOCl (%2'lik)	9
Steril Salin (Kontrol)	6

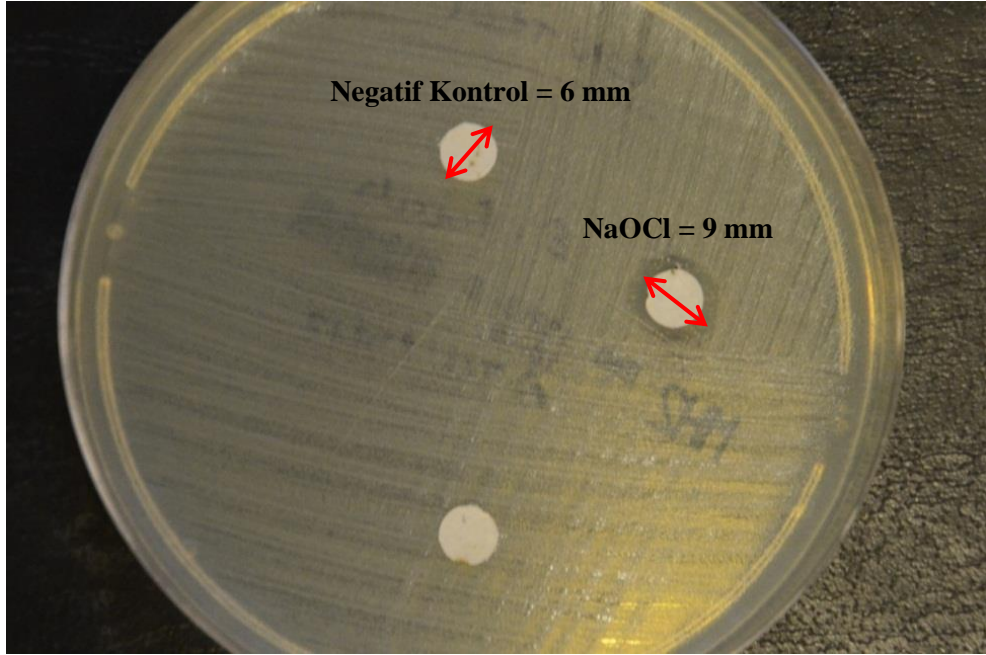
\* *G. glabra* ekstraktı içerisindeki Glycyrrhizin oranına göre standardize edildi.

#### 4.1.2. Sıvı Mikrodilüsyon Testine Ait Bulgular

*E. faecalis* (ATCC 29212) için sıvı mikrodilüsyon testi ile elde edilen antimikrobiyal ajanlara ait MİK ve MBK değerleri **Tablo 7**'da gösterilmektedir. Setrimid, *G. glabra* ekstraktı ve NaOCl solüsyonlarının MİK ve MBK değerleri sırasıyla %0,00195, %0,015; %0,062 , %0,25 ve %0,125, %0,5'tir.



**Resim 26.** Setrimid ve *G. glabra* ekstraktının *E. faecalis* üzerindeki duyarlılığının disk diffüzyon testi ile belirlenmesi.



**Resim 27.** NaOCl ve steril salinin *E. faecalis* üzerindeki duyarlılığının disk diffüzyon testi ile belirlenmesi.

**Tablo 7.** Antimikrobiyal ajanların *E. faecalis* (ATCC 29212) için MİK ve MBK değerleri.

Antimikrobiyal Ajan	MİK (%)	MBK (%)
<b>Setrimid</b>	0,00195	0,015
<b><i>G. glabra</i> ekstraktı</b>	0,062	0,25
<b>NaOCl</b>	0,125	0,5
<b>Steril Salin (Negatif Kontrol)</b>	Ø	Ø

Ø: Antimikrobiyal etkinlik belirlenemedi

## 4.2. Antimikrobiyal Ajanların Etkinliğinin Biyofilm Modelleri Üzerinde İncelenmesine Yönelik Bulgular

### 4.2.1. Biyofilm Oluşumuyla İlgili Bulgular

Dentin diskleri üzerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra oluşan biyofilmlerde ortalama  $6,6 \pm 0,2 \log_{10}$  CFU bakteri bulunduğu belirlenmiştir (**Tablo 8 ve 9**). Grupların başlangıç bakteri sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır ( $P > 0,05$ ).

### 4.2.2. Biyofilm Eliminasyonu İlgili Bulgular

Dentin diskleri üzerinde hayatta kalan bakteri ortalamaları karşılaştırıldığında, antimikrobiyal ajan ve uygulama süresine göre gruplar arasında anlamlı farklılık olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,01$ ) (**Tablo 8 ve 9**) (**Grafik 1 ve 2**).

**Tablo 8.** Farklı sürelerde antimikrobiyal ajan uygulandıktan sonra dentin diskleri üzerindeki ortalama bakteri sayısının değişimi ( $\log_{10}$ ).

Antimikrobia Ajan	İşlem Öncesi	1 dakika	3 dakika	5 dakika
<b>Setrimid</b>	$6,7 \pm 0,1^{Aa}$	$5,4 \pm 0,3^{Cb}$	$4,2 \pm 0,2^{Cc}$	$3,2 \pm 0,2^{Cd}$
<b><i>G. glabra</i> ekstraktı</b>	$6,6 \pm 0,3^{Aa}$	$6,1 \pm 0,1^{Bb}$	$5,5 \pm 0,2^{Bc}$	$5,0 \pm 0,1^{Bd}$
<b>NaOCl</b>	$6,6 \pm 0,2^{Aa}$	$5,4 \pm 0,2^{Cb}$	$4,0 \pm 0,2^{Dc}$	$2,6 \pm 0,3^{Dd}$
<b>Steril salin</b>	$6,7 \pm 0,2^{Aa}$	$6,6 \pm 0,2^{Aa}$	$6,6 \pm 0,2^{Aa}$	$6,6 \pm 0,2^{Aa}$

\* Büyük harfler farklı uygulama sürelerinde antimikrobiyaller arası farklılığı, küçük harfler ise her bir antimikrobiyalde uygulama süreleri arası farklılığı göstermektedir ( $p < 0,05$ ).

**Tablo 9.** Antimikrobiyal ajan uygulaması öncesi dentin diskleri üzerindeki ortalama bakteri sayıları ve bu sayıların uygulama sonrası ortalama azalma miktarları ( $\log_{10}$ ).

Zaman	Antimikrobiyal Ajan	n	Ortalama bakteri sayısı $\pm$ SS	Ortalama azalma miktarı	NnG (%)
<b>0</b>	Setrimid	12	$6,7 \pm 0,1^a$	-	-
	<i>G. glabra</i> ekstraktı	12	$6,6 \pm 0,3^a$	-	-
	NaOCl	12	$6,6 \pm 0,2^a$	-	-
	Steril salin	12	$6,6 \pm 0,2^a$	-	-
<b>1 dakika</b>	Setrimid	12	$5,4 \pm 0,3^z$	1,3	0 (0)
	<i>G. glabra</i> ekstraktı	12	$6,1 \pm 0,1^y$	0,5	0 (0)
	NaOCl	12	$5,4 \pm 0,2^z$	1,2	0 (0)
	Steril salin	12	$6,6 \pm 0,2^{ax}$	0,1	0 (0)
<b>3 dakika</b>	Setrimid	12	$4,2 \pm 0,2^y$	2,5	0 (0)
	<i>G. glabra</i> ekstraktı	12	$5,5 \pm 0,2^b$	1,1	0 (0)
	NaOCl	12	$4,0 \pm 0,2^d$	2,6	0 (0)
	Steril salin	12	$6,6 \pm 0,2^{ax}$	0,0	0 (0)
<b>5 dakika</b>	Setrimid	12	$3,2 \pm 0,2^v$	3,5	1 (8,3)
	<i>G. glabra</i> ekstraktı	12	$5,0 \pm 0,1^u$	1,6	0 (0)
	NaOCl	12	$2,6 \pm 0,3^s$	4,0	3 (25)
	Steril salin	12	$6,6 \pm 0,2^{al}$	0,0	0 (0)

*n*, her gruptaki örnek sayısı; *SS*, standart sapma; *NnG*, üreme görülmeyen örnek sayısı. Üst karakter farklı simgeler gruplar arasındaki farklılığı belirtmektedir ( $P < 0,05$ )

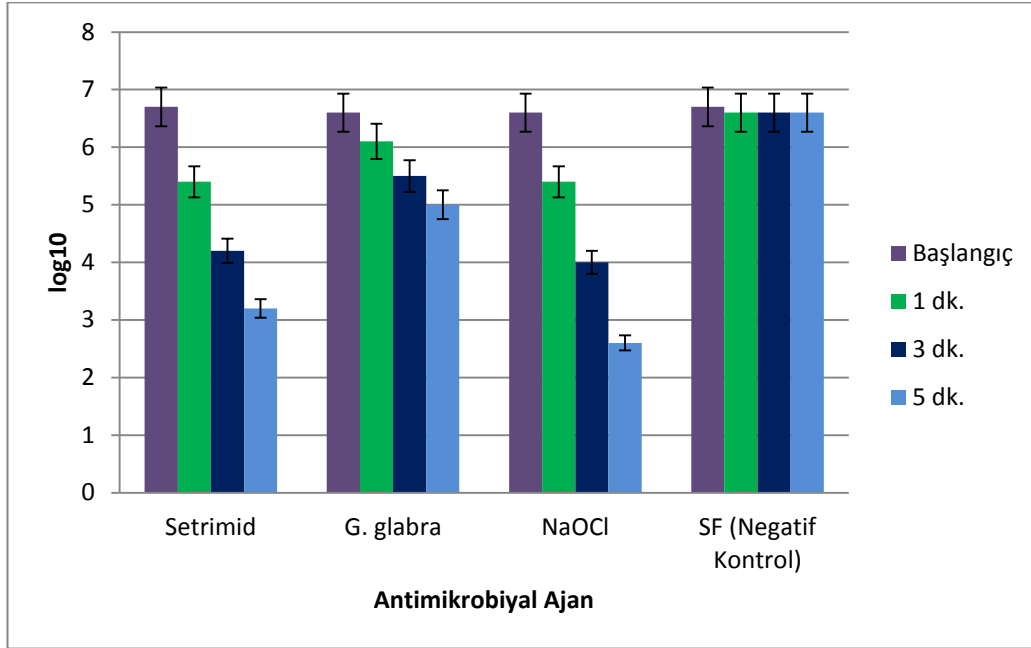
Negatif kontrol grubunun 1, 3 ve 5 dakika uygulanmasının biyofilmler üzerinde herhangi bir etkisinin olmadığı belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Antimikrobiyal ajanların 1 dakika sonundaki etkinlikleri karşılaştırıldığında setrimid ve NaOCl arasında anlamlı fark bulunamazken ( $P > 0,05$ ), 3 ve 5 dakika sonunda NaOCl'nin en etkili ajan olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

NaOCl'nin 5 dk. uygulanması ortalama  $4 \log_{10}$  CFU eliminasyon sağlamıştır ( $P < 0,001$ ). NaOCl'nin 1 ve 3 dk. uygulanması hiçbir örnekte biyofilm eradikasyonu sağlayamazken, 5 dk. sonunda 12 örnekten 3'ünde (% 25) eradikasyon görülmüştür.

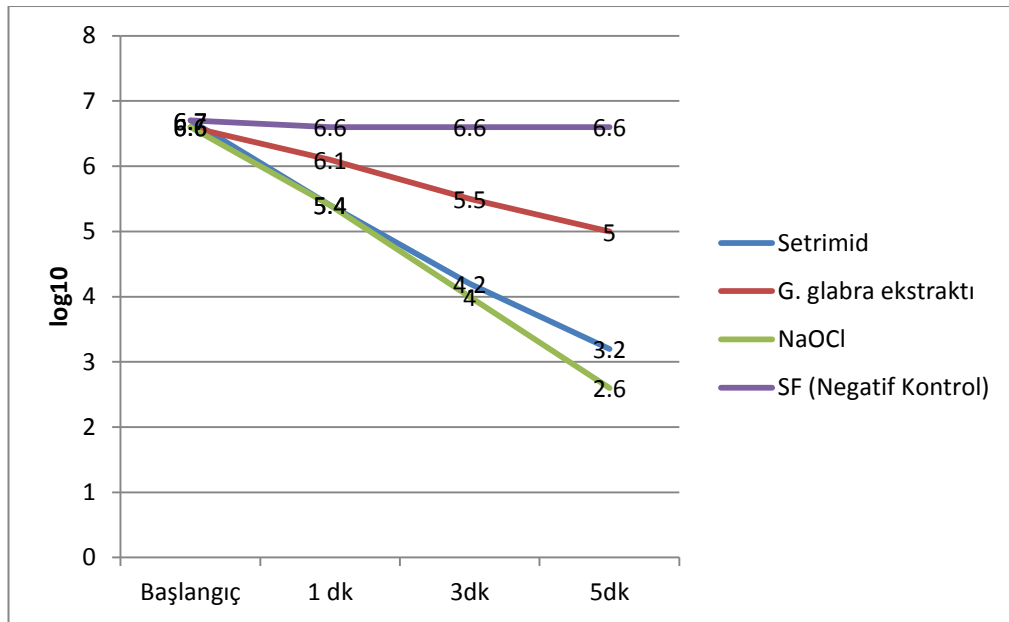
Setrimid solüsyonunun 5 dk. uygulanması ortalama  $3,5 \log_{10}$  CFU eliminasyon sağlarken ( $P < 0,001$ ), bu grupta yalnızca 1 örnekte (%8,3) biyofilm eradikasyonu görülmüştür.

*G. glabra* ekstraktı tüm uygulama sürelerinde negatif kontrol grubuna göre daha etkili biyofilm eliminasyonu sağlarken ( $P < 0,05$ ), 5 dk. sonunda ancak  $1,6 \log_{10}$

bakteriyel redüksiyon oluşturmuştur ( $P<0,05$ ) ve hiçbir örnekte eradikasyon oluşturamamıştır.



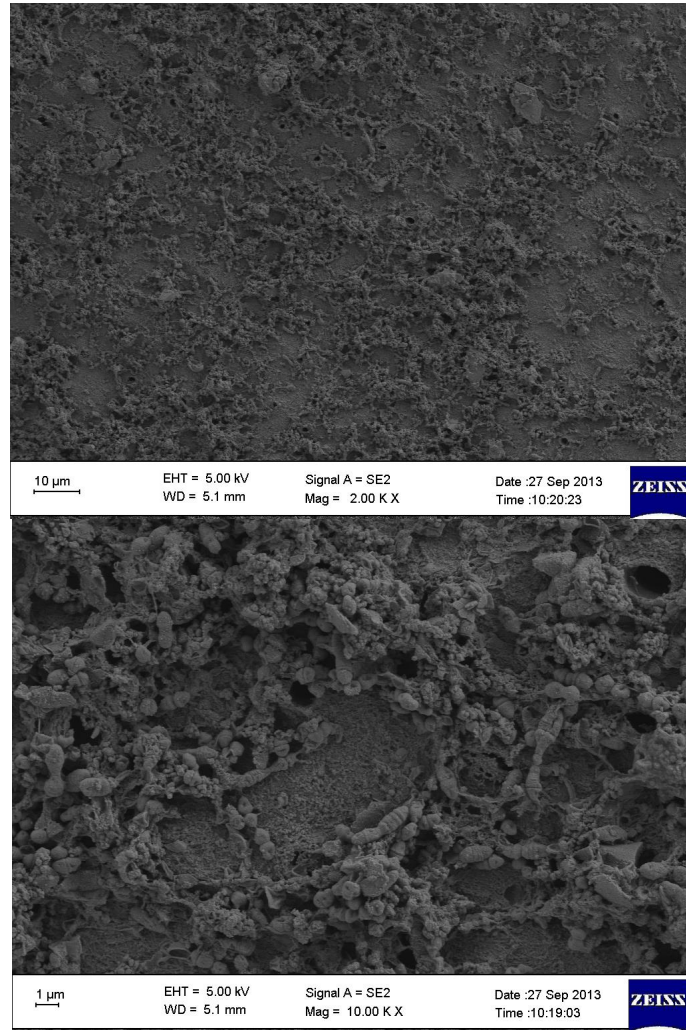
**Grafik 1.** Farklı antimikrobiyal ajan uygulamasını takiben biyofilm eliminasyonunun ( $\log_{10}$ ) uygulama süresine göre değişiminin sütun grafiği ile gösterilmesi.



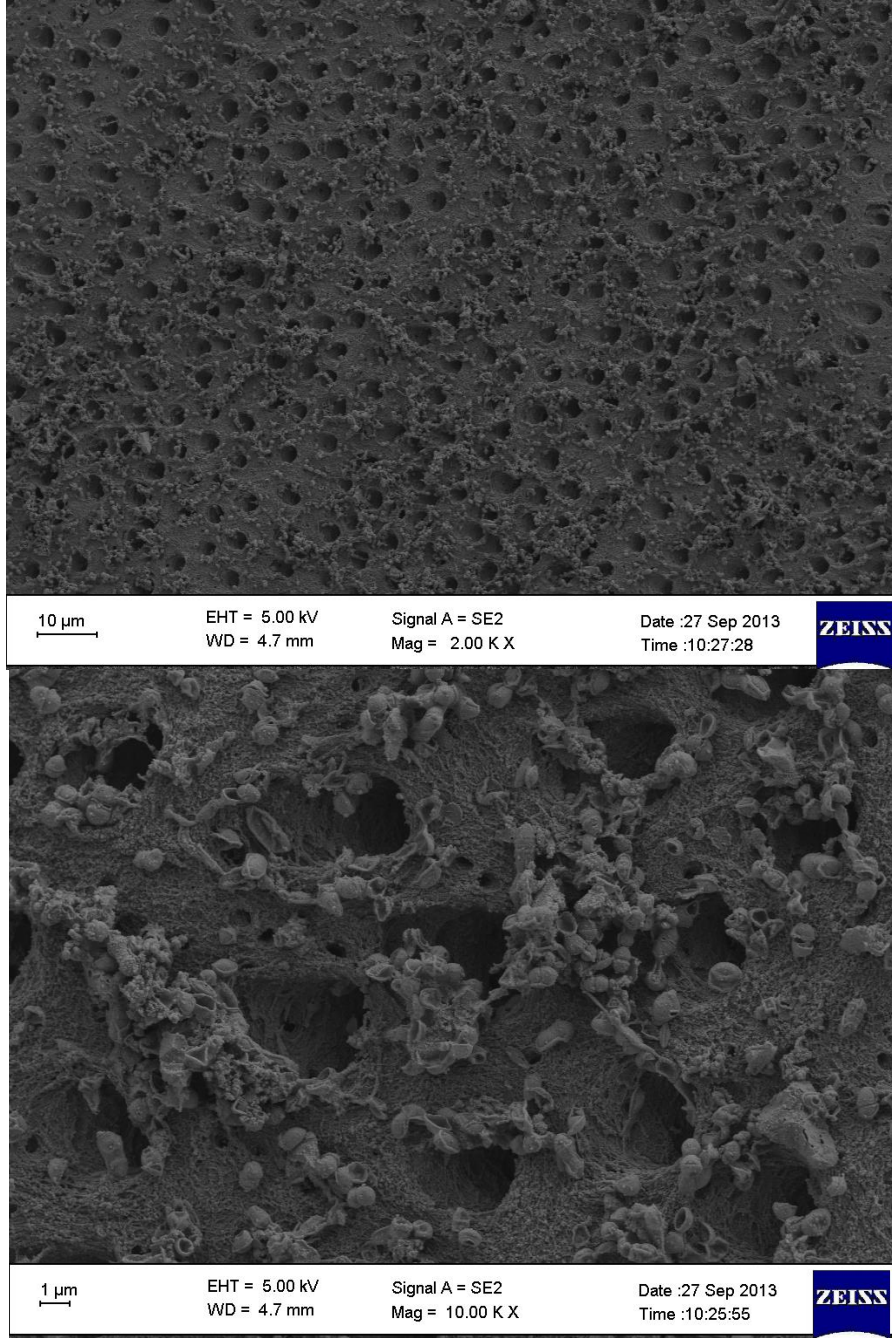
**Grafik 2.** Farklı antimikrobiyal ajan uygulamasını takiben biyofilm eliminasyonunun ( $\log_{10}$ ) uygulama süresine göre değişiminin çizgi grafiği ile gösterilmesi

#### 4.2.3. Biyofilm Oluşumu ve Eliminasyonunun FESEM ile Görüntülenmesine İlişkin Bulgular

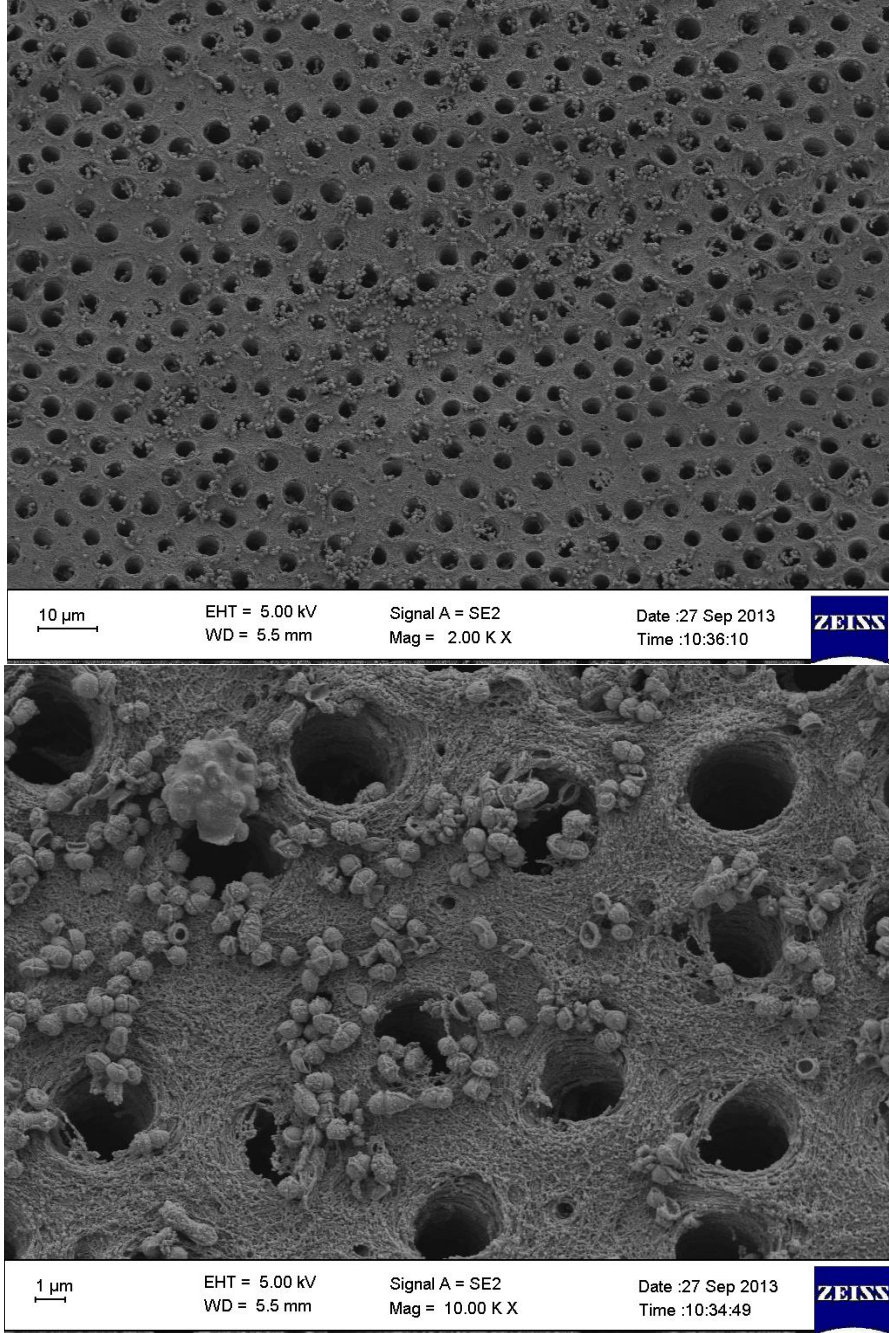
Tüm gruplarda FESEM görüntüleri ile biyofilm oluşumu doğrulanmıştır. FESEM görüntülerinde dentin disklerinin yüzeyini kaplayan yoğun bakteri toplulukları ve bu bakterilerin dentin yüzeyine ve birbirlerine bağlanmasını sağlayan ekstraselüler matriks oluşumu görülmüştür (**Resim 28**). **Resim 29-37**'de Antimikrobiyal ajanların zamana bağlı olarak biyofilm tabakasını üzerine etkileri görülmektedir.



**Resim 28.** Dentin diskleri üzerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilminin FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında incelenmesi. Biyofilm tabakasının homojen dağılım gösterdiği ve bakterilerin birbirine ve dentine tutunmasını sağlayan ekstraselüler matriks içerisinde gömülü olduğu görülmektedir.

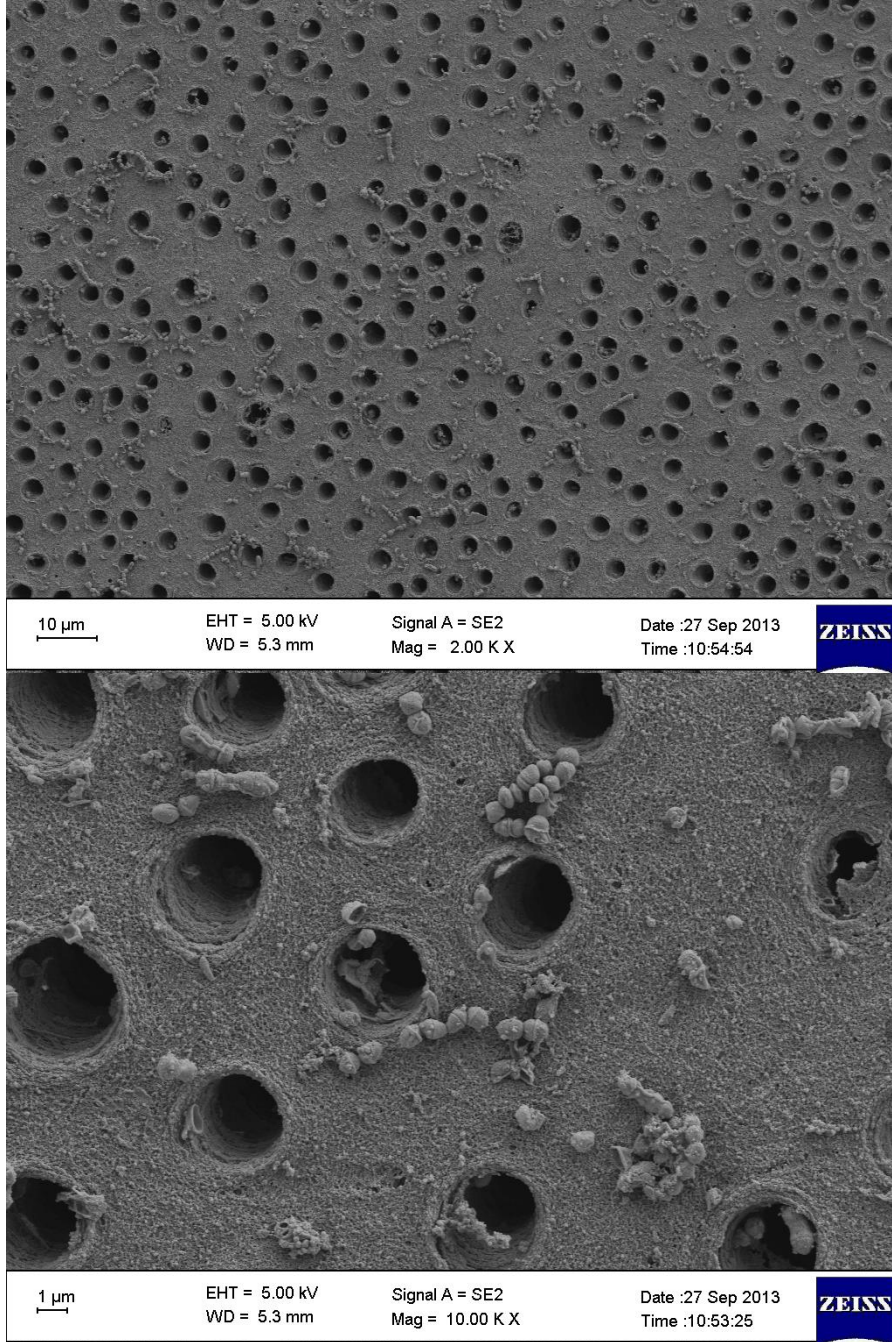


**Resim 29.** Setrimid solüsyonunun 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Dentin tübülleri çevresinde ekstraselüler matrisin bir kısmının parçalanmış olduğu, ancak bakterilerin tamamen elimine edilemediği belirlenmiştir.

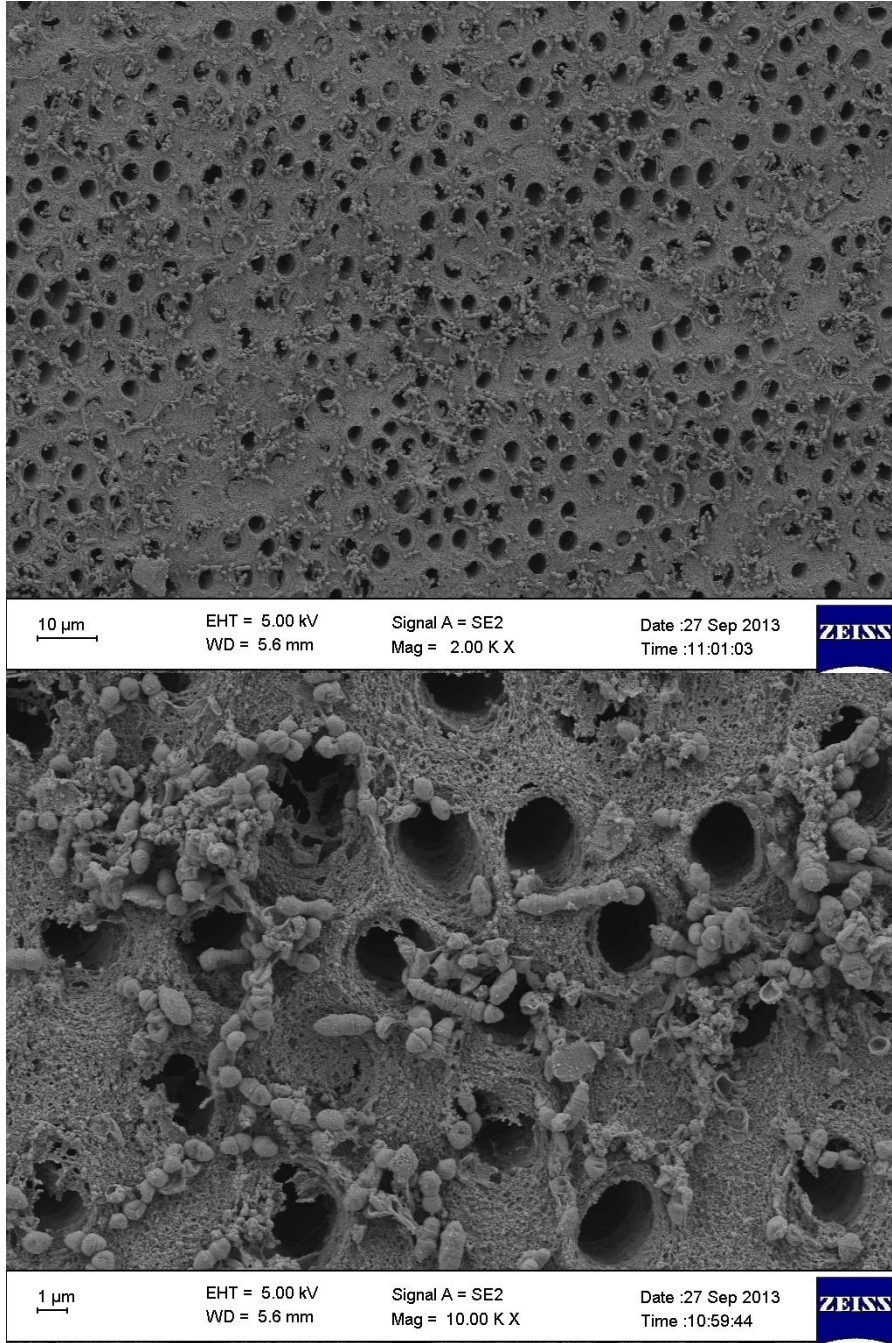


**Resim 30.** Setrimid solüsyonun 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Dentin tübülleri çevresinde ekstraselüler matrisin büyük oranda parçalanmış olduğu, ancak bakterilerin tamamen elimine edilemediği belirlenmiştir.



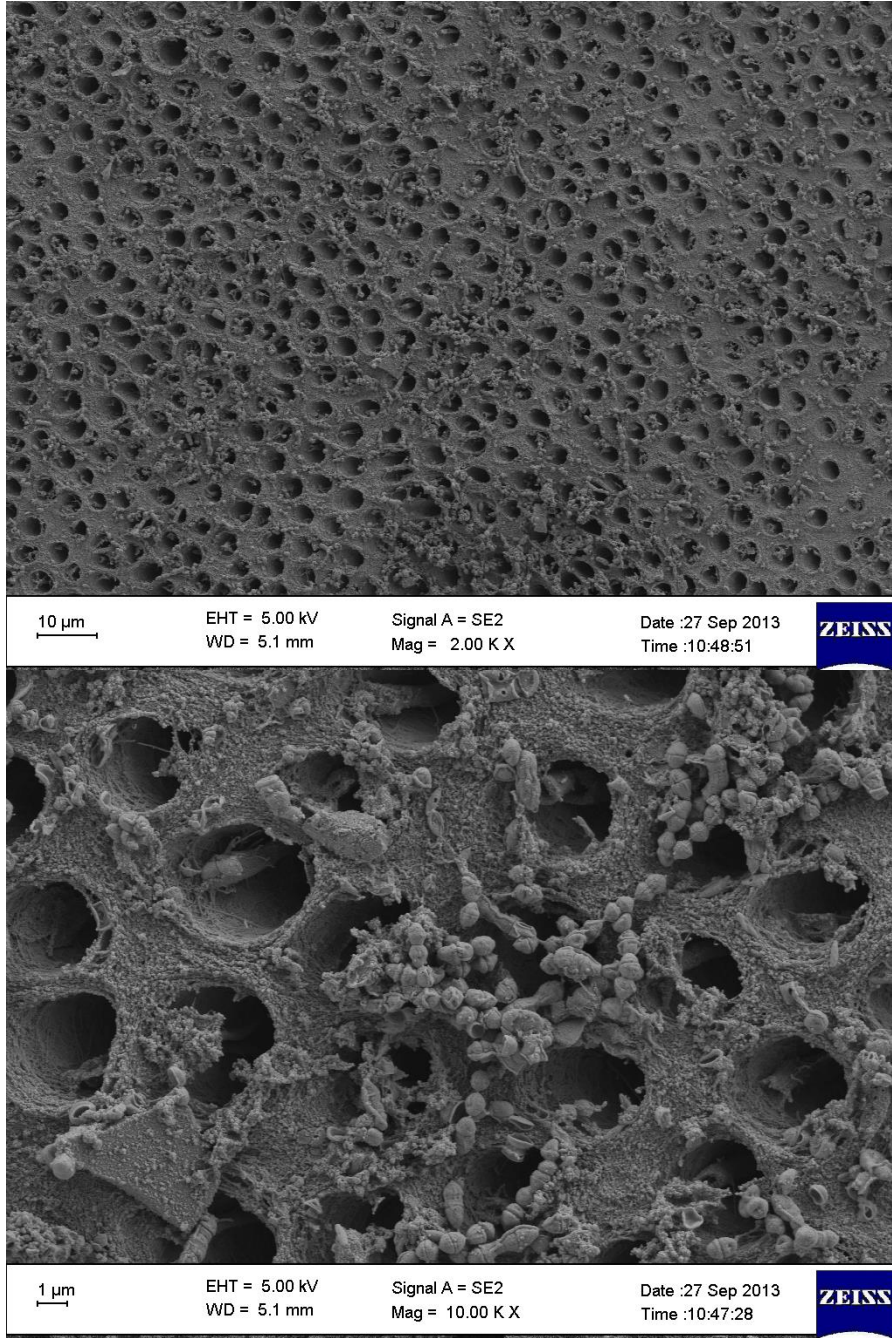


**Resim 31.** Setrimid solüsyonun 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin büyük oranda elimine edildiği belirlenmiştir.

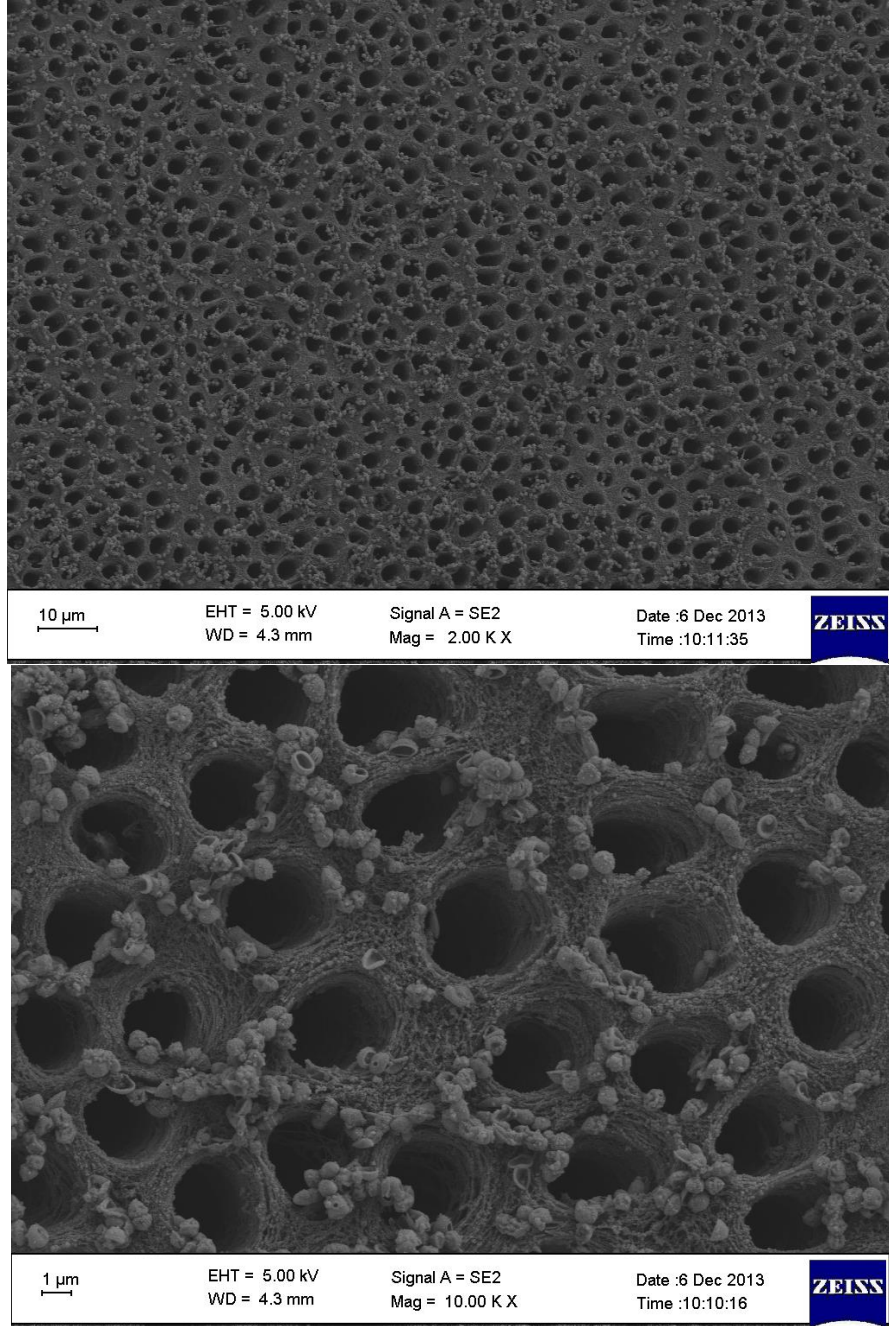


**Resim 32.** *G. glabra* ekstraktının 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi.

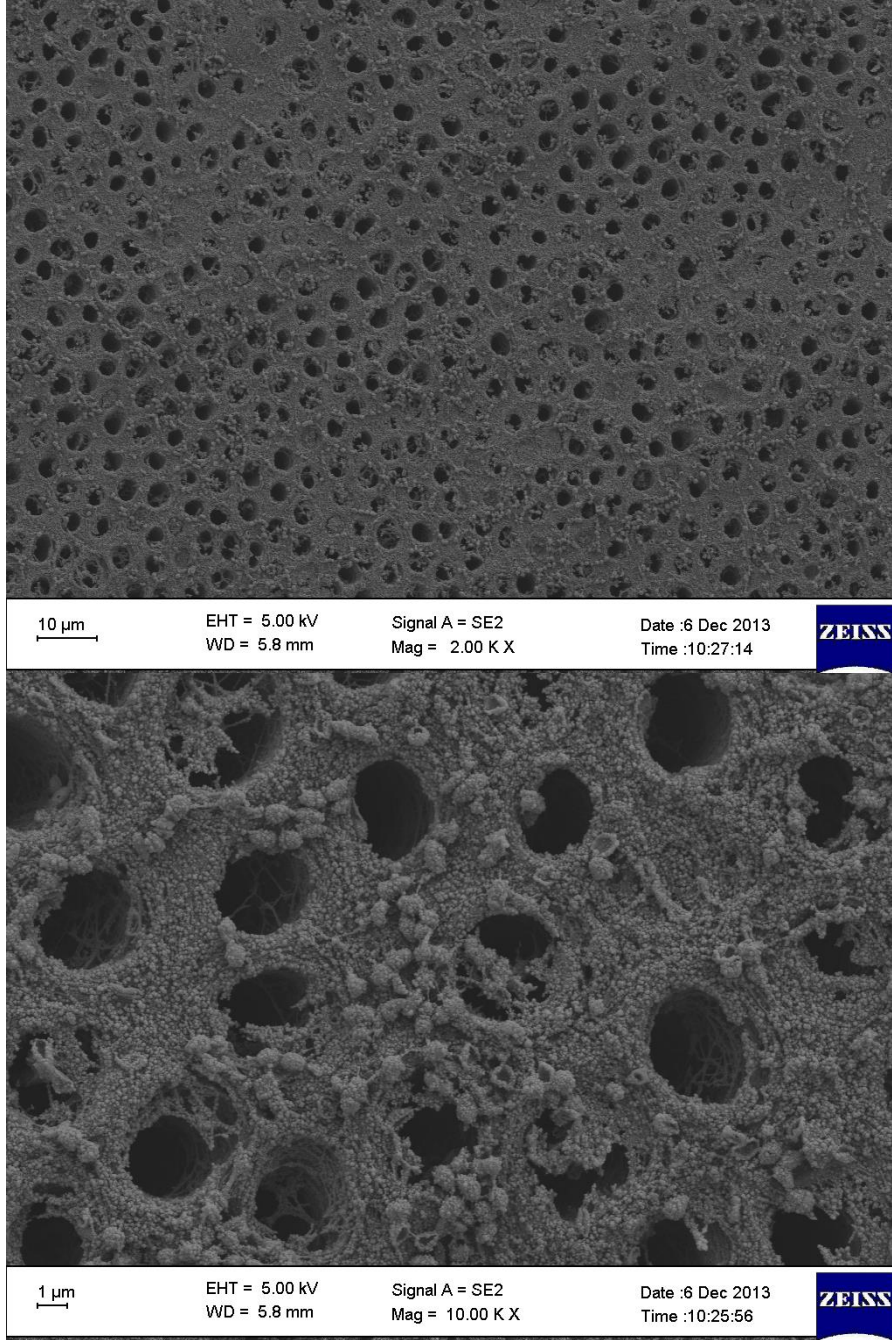
Ekstraselüler matrisin bütünlüğünü koruduğu belirlenmiştir.



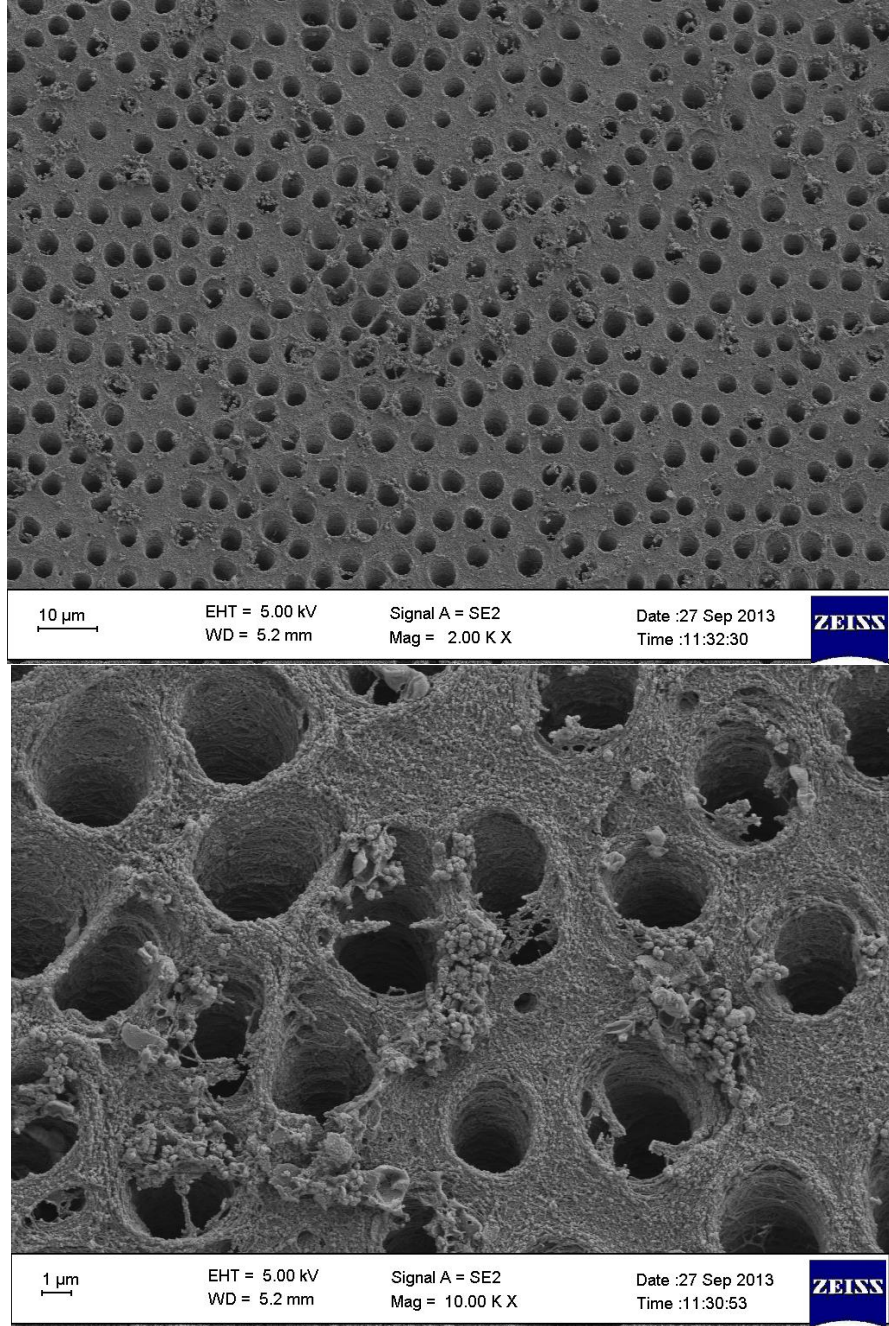
**Resim 33.** *G. glabra* ekstraktının 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi.



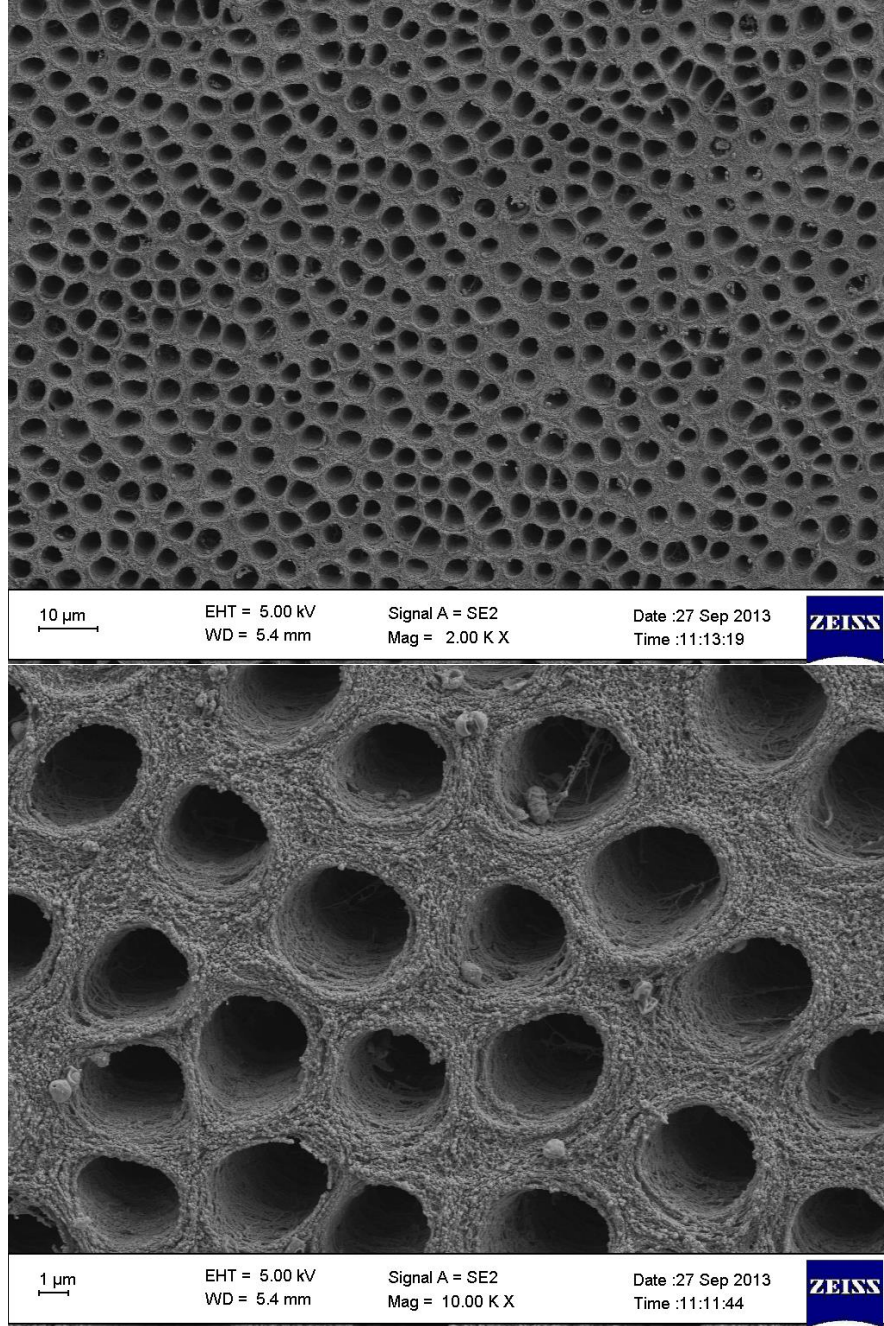
**Resim 34.** *G. glabra* ekstraktının 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin sınırlı düzeyde elimine edilebildiği belirlenmiştir.



**Resim 35.** NaOCl solüsyonunun 1 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin sınırlı düzeyde elimine edilebildiği belirlenmiştir.



**Resim 36.** NaOCl solüsyonunun 3 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matris ve bakterilerin büyük oranda elimine edildiği belirlenmiştir.



**Resim 37.** NaOCl solüsyonunun 5 dakika uygulanmasının oluşturduğu biyofilm eliminasyonunun FESEM ile 2000 ve 10000 büyütme altında görüntülenmesi. Ekstraselüler matrisin tamamen elimine olduğu, ancak bir miktar bakterinin canlılığını koruduğu belirlenmiştir.

## 5. TARTIŞMA

Biyofilm oluşumu, mikroorganizmaların kolonizasyonu ve konakta canlılıklarını sürdürebilmeleri adına oldukça önemli bir virülans faktördür (100, 129). Biyofilm içerisinde bulunmanın mikroorganizmalara kazandırdığı en önemli avantaj, planktonik türdeşlerine oranla dış etkenlere karşı daha korunaklı ve daha dirençli hale gelmeleridir (100, 129). Sekonder/inatçı endodontik enfeksiyonlu dişlerin incelendiği çalışmalarda, mikroorganizmaların biyofilm oluşturarak tedavi prosedürlerine direnç gösterdiği belirlenmiş (4-6, 143, 151, 152) ve ideal bir irrigasyon ajanının biyofilmler üzerinde de antimikrobiyal etkinliğe sahip olması gerektiği bildirilmiştir (178-180, 230).

### *Çalışmada kullanılan mikroorganizmanın seçimi*

*E. faecalis* başarısız kanal tedavileri ile ilişkilendirilmiş dirençli bir bakteridir ve tek başına enfeksiyona neden olabilecek düzeyde virülansa sahiptir (3, 91-93). Kök kanal duvarlarına bağlanabilmesi ve kolonize olup biyofilm oluşturabilmesi sayesinde olumsuz çevresel koşullara rağmen hayatta kalabilir (3, 73). Aynı zamanda, konak hücrelerine bağlanabilir ve konak savunmasını etkisizleştirebilir (3, 73). Sekonder/inatçı enfeksiyonlarda *E. faecalis*'in kök kanalından %90'a varan bir oranda izole edildiği bildirilmiştir (46-62). 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* ATCC 29212 suşu seçilmiştir.

Antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda, klinik koşulları daha iyi yansıttığı düşünülerek sekonder/inatçı enfeksiyonlu dişlerden izole edilmiş suşlar kullanılabilir (187, 205, 234, 241, 255). Ancak klinik izolatların çevresel faktörlere bağlı olarak zamanla genetik değişimlere uğraması sonucu, sahip oldukları bazı genler aktifleşirken, bazı genler işlevini yitirir. Bu nedenle normalde biyofilm oluşturabilen bir bakteri zamanla bu özelliğini kaybedebilir (267, 268). Baldassarri ve ark. (268) klinik enfeksiyonlardan izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının %80 oranında biyofilm oluşturabildiğini belirtmişlerdir. Toledo-Arana ve ark. (75) 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 belirtilmiştir (3, 267). Toledo-Arana ve ark. (75) *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 (75). Jelatinaz (*gelE*) ve serin proteaz (*sprE*) da *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmasından sorumlu tutulan enzimlerdir. *GelE* ve *SprE* hücrenin otolizini düzenleyerek eDNA salımını uyarmaktadır (271, 272). Özellikle *esp*-negatif izolatların biyofilm oluşturabilmesinde *GelE* enziminin büyük rol oynadığı belirtilmiştir (273, 274). *fsr* geninin jelatinaz enziminin salımını uyararak, durağan fazdaki *E. faecalis* hücrelerinin biyofilm oluşturmasını uyardığı belirtilmiştir (269, 274). *atn* geninin *E. faecalis* hücrelerini otolize uğratarak biyofilm oluşumunun erken dönemlerinde, ekstraselüler matris oluşumu için ihtiyaç duyulan ekstraselüler DNA'nın ortama salınmasını sağladığı bildirilmiştir (118, 119). Wang ve ark. (272) 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 belirtmişlerdir. 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. Bu nedenle çalışmamızda sekonder/inatçı enfeksiyonlardan izole edilen bir suş yerine genetik özellikleri bilinen, biyofilm oluşturabilen ve birçok çalışmada kullanılmış olan ATCC 29212 suşu tercih edilmiştir (160, 226, 227, 229, 258, 275).

Antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda klinik izolatların kullanılmasının neden olduğu bir diğer dezavantaj da klinik izolatların aynı antimikrobiyal ajan için farklı duyarlılıklara sahip olabilmeleridir. *E. faecalis*,

farklı çevresel koşullarda hayatta kalabilme yeteneğine sahip bir bakteridir (3, 73). Farklı ekolojik nişlerden izole edilen *E. faecalis* suşlarının fenotip ve genotipi birbirinden farklı olabileceği gibi, prevalansları da birbirinden farklı olabilir ve bu durum *E. faecalis*'in antimikrobiyal ajanlara duyarlılığını etkileyebilir (276, 277). Zhu ve ark. (276), üç farklı hastanın oral kaviteleri ve kök kanallarından izole edilen *E. faecalis* izolatlarının fenotipleri arasında fark olmadığını, ancak oral kavitelere izole edilen suşların kök kanallarından izole edilen suşlara oranla daha yüksek gentamisin direncine sahip olduğunu belirtmişler ve bu durumu oral kavitenin kök kanalına oranla daha çok sayıda türü barındırması ve bu türler arasındaki virülans özelliklerinin paylaşılmasına bağlamışlardır. Tong ve ark. (277) altı farklı hastanın anterior ve molar dişlerinden izole edilen 10 farklı *E. faecalis* suşunun antimikrobiyal duyarlılıklarını karşılaştırmışlar, aynı hastanın anterior ve molar dişlerinden elde edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları arasında fark olmadığını ancak farklı hastalardan elde edilen izolatların antimikrobiyal duyarlılıkları arasında anlamlı fark olduğunu belirtmişlerdir.

Birçok *in vitro* çalışmada, endodontik enfeksiyonların polimikrobiyal enfeksiyonlar olduğu göz önünde bulundurularak antimikrobiyal ajanların etkinliği birden çok tür içeren biyofilmler üzerinde değerlendirilmiş-tir (8, 161, 162, 167, 171, 242, 245, 246). Ancak, primer enfeksiyonlarda bulunan birçok patojenin aksine, *E. faecalis* diğer bakterilerle simbiyotik bir ilişkiye gereksinim duymadan tek başına enfeksiyon oluşturabilecek kapasitededir (47, 73) ve sekonder/inatçı enfeksiyona sahip dişlerden tek başına izole edilebilmektedir (3, 276). Bu nedenle çalışmamızda antimikrobiyal ajanların etkinliği sadece *E. faecalis*'in oluşturduğu biyofilmler üzerinde değerlendirilmiştir.

#### *Antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesinde kullanılan yöntemlerin seçimi*

Bu çalışmada test edilen ajanların *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkileri disk difüzyon, sıvı mikrodilüsyon ve biyofilm duyarlılık testleri kullanılarak değerlendirilmiştir. NaOCl, uzun yıllardır endodontik tedavide %0,5-6 konsantrasyon aralığında standart kök kanal yıkama solüsyonu olarak kullanılmaktadır (178, 183). Ancak çalışmamızda incelenen diğer ajanlar; setrimid ve *G. glabra* ekstraktının klinikte kullanılan konsantrasyon aralığının belirlenmesine

yönelik yeterli çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, test edilen ajanların *E. faecalis* üzerindeki etkinliği konusunda ön değerlendirme yapmak için öncelikle disk diffüzyon testi uygulanmıştır. Daha sonra sıvı mikrodilüsyon testi ile planktonik formdaki *E. faecalis* hücreleri için test edilen ajanların MBK değerleri belirlenmiştir. Son olarak, biyofilm duyarlılık testi ile dentin disklerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde ajanların eliminasyon düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Disk diffüzyon testi uygulaması kolay ve standardize edilmiş bir yöntemdir. Ancak, antimikrobiyal ajanların test edilen mikroorganizma üzerindeki duyarlılığını kalitatif verilerle ortaya koymaktadır (261, 278). Bu testin sonucuna göre antimikrobiyal ajanların çalışılan mikroorganizma üzerinde duyarlı, yarı duyarlı veya dirençli olduğu belirlenebilir, ancak MİK veya MBK gibi kantitatif bir değer belirlenemez (261, 278). Yavaş üreyen mikroorganizmaların duyarlılıklarının araştırılması için uygun bir yöntem olmaması da bu testin bir diğer dezavantajıdır (260, 278). Sıvı mikrodilüsyon testi ise duyarlılık durumu araştırılan mikroorganizmalara karşı antimikrobiallerin MİK ve MBK değerini saptamak amacıyla sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Küçük hacimlerde çalışılması ve pratik bir yöntem olmasının yanı sıra kantitatif veriler ortaya koyması bu metodun avantajlarıdır (260,278).

#### *Kullanılan biyofilm modelinin değerlendirilmesi*

Endodontik çalışmalarda kullanılmış olan biyofilm modelleri arasında bir standardizasyon yoktur. Bu çalışmalarda substrat olarak kullanılan yüzeyin tipi, tercih edilen suşun türü ve tipi, kullanılan besi yeri ve inkübasyon süresi standardizasyonu etkileyen faktörlerdir. Çalışmamızda kullanılan yöntem, Calgary biyofilm modelinin bir modifikasyonudur. Bu modelde standart boyuttaki polistiren yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturulmaktadır (265). Standart biyofilmler oluşması ve tekrarlanabilirlik bu modelin en büyük avantajları, dentin yerine pürüzsüz yüzeyler üzerinde biyofilm oluşumu ise önemli bir dezavantajıdır. Çünkü bakteriler sahip oldukları yüzey adezinlerini kullanarak dentin yapısında bulunan kollajene bağlanabilirler ve bu bağlantı biyofilm oluşumuna katkıda bulunur (79, 279, 280). Çalışmada kullanılan *E. faecalis*'in sahip olduğu *esp* ve *ace* genleri ile jelatinaz ve serin proteaz gibi enzimler sayesinde dentinin yapısında bulunan tip I kollajene

bağlanabildiği ve bu bağlantının biyofilm oluşumunu olumlu yönde etkilediği belirtilmiştir (75, 281). Ancak aynı etki polistiren, seramik veya cam yüzeyler kullanıldığında sağlanamayabilir. Ayrıca biyofilm oluşumu için kullanılan yüzey tipinin antimikrobiyal ajanların test edilen mikroorganizma üzerindeki duyarlılığını etkilediği bildirilmiştir (218, 282, 283). Haapasalo ve ark. (283), kalsiyum hidroksit çözeltisi, %1'lik NaOCl, %0,5 ve 0,05'lik klorheksidin asetat ve iyodin potasyum iyodidin *E. faecalis* üzerindeki duyarlılığını inceledikleri çalışmada, antimikrobiyal ajanlara dentin tozu ilave edilmesi durumunda bütün ajanların antimikrobiyal etkilerinin zayıfladığını, kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisinin tamamen ortadan kalktığını belirtmişlerdir. Portenier ve ark. (218), *E. faecalis*'in dentin ve sığır serum albümini varlığı veya yokluğunda klorheksidine duyarlılığını inceledikleri çalışmada, hem dentin hem de sığır serum albümini varlığında klorheksidinin antimikrobiyal etkinliğinin anlamlı düzeyde azaldığını bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızda biyofilm oluşumunda *in vivo* koşullardaki bakteri-yüzey ilişkisinin sağlanabilmesi ve antimikrobiyal ajanların *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliğin klinik koşullara daha uygun bir ortamda değerlendirilebilmesi için Calgary biyofilm modelinde kullanılan polistiren yüzeyler yerine çekilmiş insan dişlerinden elde edilen dentin diskleri kullanılmıştır.

Çekilmiş insan dişlerinin kullanıldığı *in vitro* ve *ex vivo* çalışmalarda karşılaşılan en büyük sorunlardan biri örneklerin standardizasyonunun sağlanamamasıdır. Dişlerin fizyolojik yaşı, anatomik varyasyonlar, diş çekimi sonrası örnek hazırlanana kadar geçen süre ve örneklerin bu süreçte saklandığı koşullar standardizasyonu etkileyen faktörlerdir. Artan fizyolojik yaşla birlikte, dentinin mineral içeriğindeki artışa bağlı olarak dentin tübüllerinin daralmaya başladığı ve zamanla tıkanıdığı bilinmektedir (30). Bu nedenle çalışmamızda oklüzal strese maruz kalmamış, fizyolojik olarak genç, gömülü 20 yaş dişleri kullanılmıştır. Dişlerin koronal kısımlarından elde edilen 2 mm kalınlığındaki horizontal kesitlerden, özel bir frez yardımıyla 6 mm çapında dentin diskleri oluşturulmuş, dijital kumpas kullanılarak bu boyutlar teyit edilmiştir.

Bu çalışmada biyofilm oluşumunda dentin disklerinin kullanılmış olmasının neden olduğu en önemli kısıtlamalardan biri kullanılan antimikrobiyal ajanların dentin diskleri üzerinde oluşturulan biyofilme doğrudan temas etmesidir. *In vivo*

koşullarda kök kanallarındaki anatomik varyasyonlar, apikal dallanmalar, yan kanallar ve kök kanalının apikale doğru daralan anatomik yapıya sahip olması nedeniyle antimikrobiyal ajanları apikal bölgeye ulaştırmak mümkün olmayabilir (178, 191). Bu açıdan, çalışmamız bu noktada *in vivo* koşulları tam olarak taklit edememiştir.

Bu çalışmada kullanılan biyofilm düzeneğinin sterilizasyonunda etilen oksit gazı kullanılmıştır. Biyofilm modelinin bir parçası olan polistiren mikrotitrasyon plaklarının otoklav ile sterilizasyondan zarar göreceği düşünülerek etilen oksit gazı tercih edilmiştir. Etilen oksit gazının tercih edilmesinin bir başka nedeni de otoklav ile sterilizasyonun dentinin mineral içeriğini ve kollajenin yapısını değiştirerek mikroorganizmaların dentine adezyonunu olumsuz etkilemesidir (284). Chivatxaranukul ve ark. (285), otoklav ile steril edilen dişlerde gama ışınları ile steril edilenlere oranla daha az bakteriyel adezyon gerçekleştiğini belirtmişlerdir. White ve ark. (284), çeşitli sterilizasyon yöntemleri uygulanmış dentin yüzeylerini Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) ile inceledikleri çalışmada etilen oksit sterilizasyonunun dentin yapısındaki fosfat oranını azalttığını belirtmişlerdir. Öte yandan, Thomas ve ark. (286), etilen oksit sterilizasyonunun mine ve dentin örnekleri üzerindeki demineralize edici etkilerini Transversal Mikroradyografi (TMR) yöntemi ile inceledikleri çalışmada bu yöntemin istatistiksel olarak önemsiz düzeyde demineralizasyona neden olduğunu bildirmişlerdir. Bununla birlikte, dentin örneklerinin etilen oksit ile sterilize edildiği birçok çalışmada mikroorganizmaların dentine bağlanabildiği belirtilmiştir (287-290).

Antimikrobiyal ajanların uygulandıkları örneklerde yüksek dozda atık halde bulunmaları ve antimikrobiyal etkinliklerini uygulandıktan sonra da sürdürmelerine rezidüel etki denilmektedir. Setrimidin rezidüel etkiye sahip olduğu bilinmesine rağmen (227, 229), klinik koşulları daha iyi yansıtabilmek için çalışmamızda test edilen antimikrobiyal ajanların rezidüel etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla herhangi bir inaktivasyon ajanı kullanılmamıştır. Arias-Moliz ve ark. (226) NaOCl için önerilen %0,6'lık sodyum tiyosülfat ve CHX için önerilen %3'lük Tween 80 veya %0,3'lük lösitin gibi inaktivasyon ajanlarının kullanılması durumunda ilave antimikrobiyal etki oluşabileceğini ve çalışmanın sonuçlarının yanıltıcı olabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca literatürde setrimid ve *G. glabra* ekstraktını etkisizleştirmek

için hangi inaktivasyon ajanının kullanılması gerektiğine dair bir sonuç bulunamamıştır. Bu nedenlerle, çalışmamızda dentin disklerinde oluşturulan biyofilmler antimikrobiyal ajanlara maruz bırakıldıktan sonra yalnızca %0,9'luk steril salin ile yıkama yapılmıştır.

Endodontik çalışmalar incelendiğinde, biyofilm oluşumu için tercih edilen inkübasyon süresinin 24 saatten 10 haftaya kadar değişebildiği belirlenmiştir (8, 9, 141, 156, 159, 161, 163, 166, 167, 171, 187, 226, 239, 240, 243, 291). Kristich ve ark. (292), *E. faecalis*'in biyofilm oluşumunda ilk 6-8 saat içerisinde hücre sel doygunluğa ulaştığını ve daha sonra biyofilm içerisindeki hücre sayısında anlamlı bir değişim olmadığını belirtmişlerdir. Meire ve ark. (175) ise, dentin diskleri üzerinde oluşturdukları 24, 48 ve 72 saatlik *E. faecalis* biyofilmlerinin hücre sayıları arasında anlamlı bir farklılık olmadığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte, Wang ve ark. (187) 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. Stojicic ve ark. (291) 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. Bu durumda, ekstraselüler polimerik matris miktarının artışı ile birlikte antibakteriyel ajanların biyofilm içerisine daha az penetre olması sonucu olgun biyofilmlerin genç biyofilmlere oranla antimikrobiyal ajanlara daha fazla direnç gösterdiği düşünülebilir. Stewart (293), antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisine difüzyonunu etkileyen faktörleri incelediği çalışmada, bu faktörleri; antimikrobiyal ajanın difüzyon katsayısı, yığın sıvısının antibiyotik konsantrasyonu, soğurma oranı kinetik katsayısı, biyofilm kalınlığı, biyofilm içerisindeki ekstraselüler matriks hacmi, biyofilm içerisindeki başlangıç hücre yoğunluğu olarak tanımlamış ve formüle etmiştir. *In vivo* koşullarda oluşan biyofilmlerin olgun biyofilmler olduğu düşünüldüğünde *in vitro* çalışmalarda inkübasyon süresinin uzatılması klinik koşulları daha iyi yansıtacaktır. Bu açıdan bakıldığında çalışmamız *in vivo* koşulları tam olarak taklit edememiştir.

### *Biyofilm oluşumu ve eliminasyonunun değerlendirilmesi*

Çalışmamızda biyofilm oluşumu ve eliminasyonu yayma kültürel sayım yöntemi ile kantitatif olarak değerlendirilirken FESEM ile kalitatif değerlendirilmiştir. Yayma kültürel sayım yöntemi ile sayımı yapılacak bakteriyel süspansiyondan alınan temsili örnekler katı besi yerine ekilerek koloni gelişimi gözlenir ve sayım yapılır (294). Bakterinin üreyebileceği uygun besi yerinin tercih edilmesi ve süspansiyonun sayım yapılabilecek düzeyde seyreltilmesi gerekmektedir. Uygulaması zordur, zaman alıcı bir yöntemdir ve yayma işlemi sırasında kontaminasyon riski vardır. Buna rağmen gıda mikrobiyolojisi alanında en çok tercih edilen sayım yöntemidir (294).

Gelişimi için uygun olmayan çevresel koşullarda *E. faecalis*'in, canlı ancak kültürize edilemeyen (VBNC) faza geçiş yapabildiği gösterilmiştir (91, 295). VBNC fazındaki bakteriler kültürize edilemedikleri için negatif bulgulara sebep olabilirler (296, 297). Bu kısıtlamadan dolayı çalışmamızda kültürel sayım yöntemine ek olarak FESEM görüntüleri ile biyofilm oluşumu ve eliminasyonu desteklenmiştir.

Elektron mikroskopisi biyofilmlerin görüntülenmesinde sıklıkla tercih edilen bir yöntemdir (160, 168, 175, 227, 298). Elektron mikroskopisinin en önemli dezavantajı, biyofilmlerin iskeletini oluşturan ekstraselüler polimerik matriksin %70-90 oranında su içeriyor olması nedeniyle fiksasyon ve dehidratasyon aşamalarında örneğin 3 boyutlu yapısının zarar görmesi ve örneğin ancak 2 boyutlu topografik analizinin yapılabilmesi olmasıdır (136, 146). Bu kısıtlamadan ötürü, son zamanlarda mikrobiyal örneklerin incelenmesinde CLSM kullanılması önerilmektedir (299). CLSM ile hem biyofilmlerin 3 boyutlu görüntüleri elde edilebilmekte hem de floresan boyaları yardımı ile biyofilm içerisindeki canlı veya ölü hücrelerin kantitatif değerlendirilmesi yapılabilmektedir (133, 136). CLSM'nin bir diğer avantajı da VBNC fazındaki bakterilerin görüntülenebiliyor oluşudur (256). Ancak ışık mikroskopisindeki kısıtlamalara bağlı olarak, CLSM ile biyofilmleri oluşturan matris ve hücrelerin yapısal özellikleri detaylı olarak incelenememektedir (136).

### *Elde edilen bulguların diğer çalışmaların bulguları ile karşılaştırılması*

Disk diffüzyon testinde elde edilen bulgulara göre, *E. faecalis*'in diğer ajanlara göre setrimid solüsyonuna daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. Bu durum setrimid solüsyonunun yüksek antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra, diğer ajanlara göre daha düşük yüzey gerilimine sahip olması nedeniyle agar plakları üzerinde daha geniş alana yayılım göstermesi ile ilişkili olabilir. *E. faecalis*'in antimikrobiyal etkinliği kanıtlanmış olan NaOCl solüsyonuna orta düzeyde duyarlılık göstermesi ise OCl<sup>-</sup> iyonlarının agar ile etkileşime girmesinden kaynaklanmış olabilir.

Bu çalışmada, dentin diskleri üzerinde 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 dentin diskleri üzerinde hayatta kalan bakteri sayısının ise, antimikrobiyal ajanın tipine ve uygulama süresine bağlı olarak değişiklik gösterdiği belirlenmiştir ( $P < 0,01$ ).

Antimikrobiyal ajanların MBK'da 1 dakika uygulanması sonucu setrimid ve NaOCl grupları arasında biyofilm eliminasyonu yönünden anlamlı fark bulunamazken ( $P > 0,05$ ), bu iki ajanın *G. glabra* ekstraktına göre biyofilm eliminasyonunda daha başarılı olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Antimikrobiyal ajanların 3 ve 5 dakika uygulamaları sonucu oluşan biyofilm eliminasyonu sıralamasının ise NaOCl > setrimid > *G. glabra* ekstraktı olduğu belirlenmiştir. ( $P < 0,05$ ). NaOCl biyofilmler üzerindeki antimikrobiyal etkinliği bilinen bir ajandır. Meire ve ark. (175) dentin disklerinde 24 saatlik inkübasyon sonucu oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilmlerini eradike edebilmek için %2,5'lik NaOCl'nin 5 dk. ve daha uzun sürelerde uygulanması gerektiğini, %0,5'lik konsantrasyon kullanıldığında ise eradikasyon için en az 30 dk. NaOCl uygulanması gerektiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise, %0,5'lik NaOCl'nin 5 dk. uygulanması sonucu, dentin disklerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde yaklaşık 4 log<sub>10</sub> eliminasyon sağlandığı ve bunun son derece önemli olduğu ( $P < 0,001$ ), 12 örneğin 3'ünde (%25) ise eradikasyon olduğu belirlenmiştir. Hope ve ark. (300) membran filtre modellerinde oluşturdukları *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde çeşitli konsantrasyonlardaki NaOCl'nin etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada, çalışmamızın bulgularına benzer



şekilde %0,5'lik NaOCl'nin 5 dakika uygulanmasının yaklaşık 4 log<sub>10</sub> eliminasyon oluşturduğunu ve eradikasyon için %1'lik NaOCl'nin 5 dakika uygulanması gerektiğini belirtmişlerdir.

Arias-Moliz ve ark. (160) %0,00625'lik NaOCl'nin 1 dakikalık temas sonunda, polistiren yüzeylerde oluşturulmuş 24 saatlik *E. faecalis* biyofilmlerini tamamen elimine ettiğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda ise daha yüksek bir konsantrasyonda (%0,5) NaOCl kullanılmış olmasına rağmen 1 dakikalık uygulama sonunda hiçbir örnekte eradikasyon sağlanamadığı, 5 dakika sonunda ise 12 örneğin yalnızca 3'ünde eradikasyon olduğu belirlenmiştir. Bu iki çalışmanın bulgularının örtüşmemesinin nedeni, biyofilm oluşumunda kullanılan yüzeylerin farklılığından kaynaklanmaktadır. Çalışmamızda klinik koşulların daha iyi yansıtılması için biyofilm oluşturulacak yüzey olarak antimikrobiyal ajanların etkinliği azalttığı bilinen dentin diskleri tercih edilmiştir (218, 282, 283).

Bu çalışmada, setrimid solüsyonunun *E. faecalis* için MBK değeri %0,015 olarak belirlenmiş ve dentin disklerinde oluşturulan biyofilmlere %0,015'lik setrimidin 5 dakika uygulanması sonucu yalnızca 1 örnekte (%8,3) biyofilm eradikasyonu görülmüştür. Ancak ortalama 3,5 log<sub>10</sub> biyofilm eliminasyonu sağlanması ve bunun istatistiksel olarak anlamlı düzeyde olması (P<0,001) dikkat çekicidir.

Baca ve ark. (227) %0,2'lik setrimid solüsyonunun 1 dakikalık uygulanmasının, %2,5'lik NaOCl ile benzer etki göstererek, dentin blokları üzerindeki 3 haftalık *E. faecalis* biyofilmlerini eradike ettiğini belirtmişlerdir. Wang ve ark. (228) dentin örnekleri üzerinde *E. faecalis* klinik izolatu (VP3-181) kullanarak oluşturdukları 24 saatlik biyofilmler üzerinde, %0,1'lik setrimid, %2'lik NaOCl ve %2'lik CHX'in 1 dakika uygulanması arasında eliminasyon açısından fark olmadığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda elde edilen sonuçlarda da 1 dakikalık uygulama sonunda setrimid ile NaOCl solüsyonlarının antimikrobiyal etkinlikleri arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bu durum, Baca ve ark. (227) ile Wang ve ark. (228)'in sonuçlarını destekler niteliktedir. Ancak, çalışmamızda bu çalışmalardan farklı olarak 1 dakikalık uygulama sonunda setrimid solüsyonu biyofilm eradikasyonu sağlayamamıştır. Bu farklılık, kullandığımız setrimid

konsantrasyonun Baca ve ark. (227) ile Wang ve ark.(228)'ın kullandığı konsantrasyondan daha düşük olması ile ilişkilidir.

Arias-Moliz ve ark. (226) polisitren yüzeylerde oluşturulmuş 24 saatlik *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde %0,0312'lik setrimid solüsyonunun 1 dakika uygulanması sonucu eradikasyon oluştuğunu belirtmişlerdir. Çalışmamızın bulgularına göre %0,015'lik setrimidin 1 dakika uygulanması dentin disklerinde oluşturulan biyofilmlerin eradikasyonu için yeterli değildir. Sonuçlar arasındaki farklılık, çalışmalarda biyofilm oluşumunda tercih edilen yüzeylerin ve kullanılan setrimid konsantrasyonlarının farklı olmasından kaynaklanmaktadır.

Guerreiro-Tanomaru ve ark. (259) sığır dentin blokları üzerinde oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde çeşitli antimikrobiyal ajanların antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmada, 1 dakikalık uygulama sonunda %2,5'lik NaOCl'nin %0,2'lik setrimidden daha etkili eliminasyon sağladığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda, bu çalışmanın bulgularına benzer şekilde 3 ve 5 dakikalık uygulama sonunda NaOCl'nin setrimidden üstün olduğu gözlenmiştir. Bu durumda MBK düzeyinde kullanıldığı zaman NaOCl'nin biyofilm eliminasyonunda setrimide göre daha başarılı olduğu düşünülebilir.

Bu çalışmada, dentin disklerinde oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilmlerine *G. glabra* ekstraktının 1, 3 veya 5 dakika uygulanması sonucu eradikasyon sağlanamadığı, 5 dakika sonunda ancak 1,6 log<sub>10</sub> biyofilm eliminasyonu olduğu görülmüştür. Badr ve ark. (234) selüloz nitrat membran filtrelerinde oluşan *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde %7,5'lik Glycyrrhizin içeren *G. glabra* ekstraktının tekbaşına ve Ca(OH)<sub>2</sub> ile karıştırılarak kullanımının 48 saatlik temas sonunda biyofilm eradikasyonu oluşturduğunu belirtmişlerdir. Sonuçlar arasındaki farklılığın biyofilm oluşumunda kullanılan yüzeylerin, Glycyrrhizin konsantrasyonlarının ve temas sürelerinin farklı oluşuna bağlı olduğu düşünülebilir.

*Etki mekanizmaları yönünden antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirilmesi*

Mikrobiyal biyofilmlerin antimikrobiyal kemoterapiye göstermiş olduğu direnç iki temel mekanizma ile açıklanmaktadır (301, 302). Birincisi, biyofilmin bir bariyer görevi görerek antibiyotik 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 ya da biyofilm içerisindeki bağları koparabilmesi gereklidir. NaOCl güçlü antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra, organik doku çözücülüğü kanıtlanmış bir ajandır. Çalışmamızın sonuçlarına göre NaOCl'nin setrimid ve *G. glabra* ekstraktına göre biyofilmler üzerinde daha yüksek antimikrobiyal etki göstermiş olmasının nedeni, organik doku çözücülüğü sayesinde biyofilmi çevreleyen ekstraselüler matrisin yapısında bulunan nükleik asitler ve proteinleri parçalayarak biyofilmin derinlerine difüze olmasıdır.

Setrimid solüsyonu katyonik bir sürfaktandır. Sürfaktanlar, bir hidrofilik bir de hidrofobik bölüm içeren moleküllerdir ve buldukları ortamın yüzey gerilimini düşürürler (216, 303). Endodonti pratiğinde klorheksidin, EDTA ve NaOCl gibi yıkama solüsyonlarına setrimid eklenerek bu solüsyonların yüzey gerilimini düşürmesi ve böylece yıkama solüsyonlarının dentine penetrasyonunun ve antimikrobiyal etkinliğinin artırılması hedeflenmiştir (159, 217-221). Önçağ ve ark. (217) %0,2'lik klorheksidin ve %0,2'lik setrimid içeren Cetrexidin solüsyonunun *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin %2'lik klorheksidinden daha yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Portenier ve ark. (218) klorheksidin çözeltisi içerisine %0,1'lik veya %0,01'lik setrimid eklenmesinin, çözeltinin *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini arttırdığını ve etki süresini kısalttığını belirtmişlerdir. Lui ve ark. (219) %17'lik EDTA ve %17'lik EDTA ile setrimid kombinasyonundan oluşan SmearClear solüsyonlarının smear tabakası üzerindeki etkilerini karşılaştırmışlar ve %17'lik EDTA ile SmearClear'ın eşit düzeyde smear tabakası uzaklaştırabildiğini belirtmişlerdir. Benzer bir araştırmada, da Silva ve ark. (220) %17'lik EDTA ve SmearClear solüsyonlarının smear tabakası kaldırma etkileri arasında fark bulamamışlardır. Williamson ve ark. (159) %2'lik klorheksidin ve %6'lık NaOCl'ye yüzey düzenleyici ajan ilave ederek antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırmışlar, yüzey düzenleyici ajan ilave edilmesi durumunda %2'lik klorheksidin antimikrobiyal etkinliğinin arttığını, buna karşın %6'lık NaOCl'nin antimikrobiyal etkinliğin değişmediğini belirtmişlerdir. Ferrer-Luque ve ark. (221) %17'lik EDTA, %7'lik maleik asit, %10'luk laktik asit ve bu ajanların

%0,2'lik setrimid ile kombinasyonlarının 4 haftalık *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkinliklerini karşılaştırmışlar ve şelasyon ajanlarına setrimid eklenmesinin antimikrobiyal etkinliği anlamlı düzeyde artırdığını belirtmişlerdir.

Setrimidin antimikrobiyal etkinliği, pozitif yüklü hidrofilik kısımlarının, bakteri hücre zarının yapısında bulunan negatif yüklü fosfolipidler ile etkileşime girerek bakteri hücre zarının seçici geçirgenlik özelliğini bozmasına ve hücre zarının bütünlüğünü ortadan kaldırmasına bağlıdır (222, 304). Antimikrobiyal etkinliğinin yanı sıra, setrimidin biyofilm yapısındaki koheziv bağları zayıflatarak ekstraselüler polimerik matriksin bütünlüğünü bozduğu ve böylece biyofilmlerin mekanik bütünlüğüne zarar verdiği belirtilmiştir (225, 305).

Katyonik yapısından dolayı setrimid de klorheksidin gibi rezidüel etkiye sahip bir ajandır (227, 229, 306, 307). Baca ve ark. (227) çeşitli endodontik yıkama solüsyonlarının dentin blokları üzerindeki rezidüel antibakteriyel etkilerini değerlendirdikleri çalışmada, 24 saat içinde %0,2'lik setrimid ve %2'lik klorheksidin uygulanmış gruplarda biyofilm oluşmazken, %2,5'lik NaOCl uygulanmış grupta biyofilm oluştuğunu gözlemlemişlerdir. Başka bir çalışmada, Baca ve ark. (229) %2'lik klorheksidinin yaklaşık 50 gün rezidüel antimikrobiyal etkisinin sürdürürken, %0,2'lik setrimidin bu etkiyi ortalama 40 gün sürdürebildiğini belirtmişlerdir.

Ancak, klorheksidinden farklı olarak setrimid NaOCl ile çökelti oluşturmaz ve bu durum kombine kullanım açısından önemli bir üstünlüktür. Literatürde doğrudan setrimid solüsyonunun toksik etkilerinin incelendiği bir çalışma bulunmamasına rağmen, %0,2'lik setrimid ve %0,2'lik klorheksidin içeren Cetrexidin solüsyonunun 2 haftalık inceleme sonunda %5,25'lik NaOCl'ye oranla daha düşük düzeyde yangısal reaksiyona neden olduğu bildirilmiştir (217). Ayrıca literatürde setrimid solüsyonunun organik dokular ve smear tabakası üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği bir çalışma da bulunamamıştır. İleri çalışmalarla literatür desteğinin artması durumunda, setrimid gelecekte klorheksidinin yerini alabilecek potansiyele sahip bir ajandır.

*G. glabra* ekstraktının antimikrobiyal etkinliği içeriğindeki Glycyrrhizin ile ilişkilendirilmiştir (231, 235). Bu nedenle çalışmamızda kullanılan *G. glabra* ekstraktı HPLC yöntemi ile analiz edilerek Glycyrrhizin içeriğine göre

değerlendirilmiştir. Glycyrrhizin, tripertenik bir saponindir ve saponinlerin antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra yüzey gerilimini düşürücü etkilerinin de olduğu bildirilmiştir (234, 236). Çalışmamızda uygulanan disk difüzyon testinde, *E. faecalis*'in *G.glabra* ekstraktına duyarlı olduğu belirlenmiştir. Ancak, %0,25'lik Glycyrrhizin içeren *G.glabra* ekstraktının yeterli biyofilm eliminasyonu oluşturamadığı görülmüştür. Bu durumda *G. glabra* ekstraktı içeriğinde bulunan saponin miktarının biyofilmlerin yapısındaki ekstraselüler matriksin bütünlüğünü bozacak yeterlikte olmadığı düşünülebilir.

Badr ve ark. (234) *G. glabra* ekstraktı, Ca(OH)<sub>2</sub> ve *G. glabra* ekstraktı ile Ca(OH)<sub>2</sub> karışımının periodontal ligament fibroblastları üzerindeki sitotoksik etkilerini 48 saat boyunca gözlemlemişler ve bu süre sonunda %60'luk Ca(OH)<sub>2</sub> uygulanan grupta hiç canlı hücre kalmadığını, %7,5'lik Glycyrrhizin içeren *G. glabra* ekstraktı uygulanan grupta %87 hücre canlılığı olduğunu, *G. glabra* ekstraktı ve Ca(OH)<sub>2</sub> karışımının uygulandığı grupta ise %58 hücre canlılığı olduğunu belirtmişlerdir. *G. glabra* ekstraktının kabul edilebilir düzeyde sitotoksik etkilere sahip olması klinik kullanım açısından bir avantaj olabilir ancak bu solüsyonun antimikrobiyal etkinliğinin artırılması konusunda ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

1. Bu çalışmada, dentin diskleri üzerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmlerine antimikrobiyal ajanların MBK düzeyinde 1 dakika uygulanması sonucu, setrimid ve NaOCl grupları arasında biyofilm eliminasyonu yönünden fark bulunamazken ( $P > 0,05$ ), bu iki ajanın *G. glabra* ekstraktına göre daha etkili olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

2. Antimikrobiyal ajanların 3 ve 5 dakika uygulanmaları sonucu oluşan biyofilm eliminasyonu incelendiğinde ise NaOCl'nin setrimid'den, setrimid'in ise *G. glabra* ekstraktı'ndan daha etkin olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

3. NaOCl'nin minimal bakterisidal konsantrasyon düzeyinde diğer ajanlara göre daha etkin biyofilm eliminasyonu oluşturması organik çözücülüğüne bağlı olarak biyofilm matrisini parçalaması ve biyofilmin derinlerine penetre olması ile ilişkilendirilmiştir.

4. Bu çalışmada test edilen ajanların antimikrobiyal etkinliğinin uygulama süresinin artışıyla birlikte arttığı gözlemlenmiştir. Endodontide kullanılan antimikrobiyal ajanların periapikal dokulardaki toksik etkileri ve diş sert dokularının mekanik özellikleri üzerindeki olumsuz etkileri göz önünde bulundurularak yüksek konsantrasyonlu ajanlar yerine, daha düşük konsantrasyonlu ajanlarla daha uzun süre ve daha bol miktarlarda yıkama yapılması tavsiye edilebilir.

5. Bu çalışmada test edilen ajanların antimikrobiyal etkinliği, *E. faecalis*'in hem planktonik formları hem de biyofilmleri üzerinde değerlendirilmiş ve planktonik formları etkisizleştirmek için yeterli olan konsantrasyonun biyofilmleri eradike edebilmek için yeterli olmadığı belirlenmiştir. Sekonder/inatçı enfeksiyonlarda mikroorganizmaların biyofilm formunda olduğu düşünüldüğünde, antimikrobiyal ajanların etkinliğinin değerlendirildiği çalışmalarda mikroorganizmaların biyofilm formlarının kullanılması, çalışmanın klinik koşulları yansıtması bakımından daha doğru sonuçlar verecektir.

6. Bu çalışmada calgary biyofilm modeli modifiye edilerek standart dentin diskleri üzerinde biyofilm oluşturulmuştur. Oluşturulan biyofilmlerdeki mikroorganizma sayıları değerlendirildiğinde gruplar arası anlamlı fark bulunamaması ( $P > 0,05$ ), standart biyofilmler oluştuğunun bir kanıtıdır ve deneyin tekrarlanabilirliğini göstermektedir. Bu nedenle antimikrobiyal etkinliğin değerlendirildiği çalışmalarda bu çalışmada oluşturduğumuz modifiye calgary biyofilm modeli tercih edilebilir.

7. Bu çalışmada MBK'sı %0,015 olarak belirlenen setrimid solüsyonunun 5 dakika uygulanması sonucu  $\log_{10}$  tabanına göre 3,5 birim biyofilm eliminasyonu oluşması oldukça dikkat çekicidir. Setrimid solüsyonun dış sert dokularına bağlanarak rezidüel antimikrobiyal etki gösterebilmesi ve NaOCl gibi yıkama solüsyonları ile çökelti oluşturmaması önemli bir üstünlüktür. Bu nedenle setrimid solüsyonunun ilerleyen yıllarda endodonti pratiğinde klorheksidinin yerini alabileceğini düşünüyoruz. Ancak, setrimid solüsyonunun klinik kullanımının yaygınlaşması için, sitotoksik özellikleri, smear tabakası üzerindeki etkileri ve organik dokular üzerindeki etkilerinin değerlendirileceği ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

8. Endodonti pratiğinde kullanılan antimikrobiyal ajanların periapikal dokularda toksik etkilere sebep olması nedeniyle son zamanlarda daha zararsız olduğu düşünülen bitkisel ürünlerin kullanılabilmesine yönelik *in vitro* çalışmalar rapor edilmektedir. Bu çalışmada *G. glabra* ekstraktının *E. faecalis*'in planktonik ve biyofilm formları üzerinde antimikrobiyal etkiye sahip olduğu ancak bu etkinin NaOCl ve setrimide göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. *G. glabra* ekstraktının klinikte kullanılabilmesi için efektif konsantrasyon aralığı ve uygulama süresinin belirlenmesine yönelik ileri çalışmalara ihtiyaç vardır.

## ÖZET

### **Dentin diskleri üzerinde oluşturulan *Enterococcus faecalis* biyofilm modeli kullanılarak sodyum hipoklorit, setrimid ve *Glycyrrhiza glabra* L. ekstraktının antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi**

Bu çalışmanın amacı dentin disklerinde oluşturulmuş *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde, NaOCl, setrimid ve *G. glabra* ekstraktının minimal bakterisidal konsantrasyonları (MBK) düzeyindeki antimikrobiyal etkinliklerini, üç farklı uygulama süresinde değerlendirmektir.

*G. glabra* ekstraktının *E. faecalis* (ATCC 29212)'in planktonik formları üzerindeki potansiyel antimikrobiyal etkinliğinin belirlenmesi amacıyla disk diffüzyon testi uygulandı. Daha sonra test edilen antimikrobiyal ajanların minimum inhibisyon konsantrasyonları (MİK) ve MBK değerleri sıvı mikrodilüsyon testi ile belirlendi. Bu ajanların diskleri üzerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi amacıyla biyofilm duyarlılık testi uygulandı. Biyofilm oluşumu için dentin diskleri mikrotitrasyon plaklarında 24 saat inkübe edildi ve sonrasında %0,5'lik NaOCl, %0,015'lik setrimid ve %0,25'lik *G. glabra* ekstraktı 1, 3 ve 5 dk. uygulandı. Hayatta kalan bakteri ortalamaları hesaplandı ve log<sub>10</sub> tabanına dönüştürülerek istatistiksel analiz yapıldı.

Disk diffüzyon testinde setrimid 26 mm ile en geniş inhibisyon alanını oluştururken, *G. glabra* ekstraktı ve NaOCl ise 9 mm'lik inhibisyon oluşturmuştur. Setrimid, *G. glabra* ekstraktı ve NaOCl solüsyonlarının MBK değerleri sırasıyla %0,015, %0,25 ve %0,5 olarak belirlenmiştir. Biyofilm duyarlılık testinde antimikrobiyal ajanların 1 dakika sonundaki etkinlikleri karşılaştırıldığında setrimid ve NaOCl arasında anlamlı fark bulunamazken ( $P > 0,05$ ), 3 ve 5 dakika sonunda NaOCl'nin en etkili ajan olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ). Tüm uygulama süreleri göz önüne alındığında *G. glabra* ekstraktının biyofilm eliminasyonunda NaOCl ve setrimide göre daha düşük etkiye sahip olduğu belirlenmiştir ( $P < 0,05$ ).

Setrimid solüsyonunun (%0,015) 3 ve 5 dakika uygulanması anlamlı bir biyofilm eliminasyonu oluştururken, NaOCl'nin etkinliğine ulaşamadığı belirlenmiştir.

**Anahtar Sözcükler:** Biyofilm, dentin diskleri, *Enterococcus faecalis*, setrimid, *Glycyrrhiza glabra*, sodyum hipoklorit



## ABSTRACT

### **Evaluation of the antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, cetrимide and *Glycyrrhiza glabra* L. extract on *Enterococcus faecalis* biofilms formed on dentine disks**

The aim of this study was to determine the antimicrobial efficacy of NaOCl, cetrимide, and *Glycyrrhiza glabra* L. extract against *Enterococcus faecalis* biofilms on dentine disks.

The disk diffusion method was used to investigate the potential antimicrobial activity of *G. glabra* extract on *E. faecalis* (ATCC 29212). Then, the broth microdilution method was used to determine the minimal inhibitory concentrations (MICs) and minimal bactericidal concentrations (MBCs) of the test solutions. A biofilm susceptibility assay was performed using *E. faecalis* (ATCC 29212) biofilms grown on dentine disks. NaOCl (0.5%), cetrимide (0.015%), and *G. glabra* extract (0.25%) were applied for 1, 3, and 5 min, and the mean viable cell counts were recorded and statistically analyzed.

In the disk diffusion assay, cetrимide had the widest inhibition zone (26 mm), followed by *G. glabra* extract and NaOCl, with inhibition zones of 9 mm. The MBCs of cetrимide, *G. glabra* extract, and NaOCl were 0.015%, 0.25%, and 0.5%, respectively. In the biofilm susceptibility assay, there was no significant difference between cetrимide and NaOCl at 1 min ( $P > 0.05$ ). NaOCl was the most effective agent at 3 and 5 min ( $P < 0.05$ ). *G. glabra* extract was less effective over biofilms than the other tested agents were at all application durations ( $P < 0.05$ ). Three and 5 min applications of cetrимide provided remarkable reductions of viable counts, whereas it could not reach the efficacy of NaOCl.

**Key words:** Biofilm, dentine disks, *Enterococcus faecalis*, cetrимide, *Glycyrrhiza glabra*, sodium hypochlorite

## KAYNAKLAR

1. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2002; 94(3): 281-293.
2. Siqueira JFJ, Rocas IN. Microbiology and Treatment of Endodontic Infections In: Cohen's Pathways of the Pulp. Hargreaves KM, Cohen S, eds. 10 Ed.: Mosby, 2010; 559-600.
3. Kayaoglu G, Orstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Critical reviews in oral biology and medicine* : an official publication of the American Association of Oral Biologists 2004; 15(5): 308-320.
4. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *Journal of endodontics* 1987; 13(1): 29-39.
5. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endodontics & dental traumatology* 1990; 6(2): 73-77.
6. 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.
7. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of endodontics* 2007; 33(6): 652-662.
8. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of endodontics* 2006; 32(5): 434-437.
9. 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.
10. Gernhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *International endodontic journal* 2004; 37(4): 272-280.
11. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *Journal of endodontics* 2004; 30(11): 792-795.
12. Siqueira JF, Jr. Microbiology of apical periodontitis. In: *Essential Endodontology*. Orstavik D, Pitt Ford, T., ed. Oxford, UK: Blackwell Munksgaard Ltd, 2008; 135-196.
13. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontologisk revy* 1974; 25(4): 347-358.
14. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1965; 20(340-349).
15. Moller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scandinavian journal of dental research* 1981; 89(6): 475-484.

16. Sundqvist. G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. University of Umea, Umea, Sweden, 1976.
17. Siqueira JF, Jr. Treatment of Endodontic Infections., Berlin, Germany: Quintessence Publishing Co. Ltd., 2011; 403.
18. Saboia-Dantas CJ, Coutrin de Toledo LF, Sampaio-Filho HR, Siqueira JF, Jr. Herpesviruses in asymptomatic apical periodontitis lesions: an immunohistochemical approach. *Oral microbiology and immunology* 2007; 22(5): 320-325.
19. Siqueira JF, Jr., Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2004; 97(5): 632-641.
20. Slots J, Sabeti M, Simon JH. Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship? *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2003; 96(3): 327-331.
21. Vianna ME, Conrads G, Gomes BP, Horz HP. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. *Journal of clinical microbiology* 2006; 44(4): 1274-1282.
22. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *Journal of dental research* 2009; 88(11): 969-981.
23. Dobell C. Antony van Leeuwenhoek and his "little animals.", London: Staples Press Limited, 1932.
24. Miller WD. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dental Cosmos* 1894; 36(505-528).
25. Hoshino E, Ando N, Sato M, Kota K. Bacterial invasion of non-exposed dental pulp. *International endodontic journal* 1992; 25(1): 2-5.
26. Pashley DH. Clinical considerations of microleakage. *Journal of endodontics* 1990; 16(2): 70-77.
27. Michelich VJ, Schuster GS, Pashley DH. Bacterial penetration of human dentin in vitro. *Journal of dental research* 1980; 59(8): 1398-1403.
28. Garberoglio R, Brannstrom M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Archives of oral biology* 1976; 21(6): 355-362.
29. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *Journal of endodontics* 1995; 21(2): 70-73.
30. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 2002; 13(2): 171-183.
31. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. *Journal of endodontics* 1982; 8(9): 391-397.
32. Gier RE, Mitchell DF. Anachoretic effect of pulpitis. *Journal of dental research* 1968; 47(4): 564-570.
33. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *Journal of clinical microbiology* 2008; 46(11): 3599-3606.
34. Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Moller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Scandinavian journal of dental research* 1982; 90(2): 134-144.

35. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral microbiology and immunology* 2006; 21(2): 112-122.
36. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International endodontic journal* 1985; 18(1): 35-40.
37. Gomes BP, Lilley JD, Drucker DB. Variations in the susceptibilities of components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. *International endodontic journal* 1996; 29(4): 235-241.
38. Sakamoto M, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral microbiology and immunology* 2007; 22(1): 19-23.
39. Chavez de Paz L, Svensater G, Dahlen G, Bergenholtz G. Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2005; 100(2): 232-241.
40. Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *International endodontic journal* 2003; 36(7): 500-508.
41. Chavez de Paz LE, Molander A, Dahlen G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. *International endodontic journal* 2004; 37(9): 579-587.
42. Chu FC, Leung WK, Tsang PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *Journal of endodontics* 2006; 32(1): 17-23.
43. Siqueira JF, Jr., Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. *Journal of endodontics* 2007; 33(6): 667-672.
44. Siqueira JF, Jr., Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *Journal of endodontics* 2007; 33(5): 541-547.
45. Engstrom B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontologisk revy* 1964; 35(221-228).
46. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontologisk tidskrift* 1966; 74(5): Suppl:1-380.
47. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 1998; 85(1): 86-93.
48. 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.
49. Peciuliene V, Balciuniene I, Eriksen HM, Haapasalo M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. *Journal of endodontics* 2000; 26(10): 593-595.

50. Peciuliene V, Reynaud AH, 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.
51. Hancock HH, 3rd, 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 endodontics* 2001; 91(5): 579-586.
52. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *International endodontic journal* 2003; 36(1): 1-11.
53. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2004; 97(1): 85-94.
54. Rocas IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF, Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *Journal of endodontics* 2004; 30(7): 504-508.
55. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics* 2004; 30(5): 315-320.
56. Zoletti GO, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and-independent approaches. *Journal of endodontics* 2006; 32(8): 722-726.
57. Sedgley C, Nagel A, Dahlen G, Reit C, Molander A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *Journal of endodontics* 2006; 32(3): 173-177.
58. Schirrmeister JF, Liebenow AL, Braun G, Wittmer A, Hellwig E, Al-Ahmad A. Detection and eradication of microorganisms in root-filled teeth associated with periradicular lesions: an in vivo study. *Journal of endodontics* 2007; 33(5): 536-540.
59. Gomes BP, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *Journal of endodontics* 2008; 34(5): 537-540.
60. Rocas IN, Hulsmann M, Siqueira JF, Jr. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *Journal of endodontics* 2008; 34(8): 926-931.
61. Schirrmeister JF, Liebenow AL, 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.
62. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. *Vaccine* 2004; 22(7): 822-830.
63. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2003; 60(12): 2622-2636.
64. Portenier I, Waltimo T, Orstavik 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.

65. Teixeira LM, Facklam RR. Enterococcus In: Manual of Clinic Microbiology. Murray PR, ed. 8th Ed. Washington: ASM Press, 2003; 422-433.
66. Facklam RR, Carvalho MGS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of Enterococci In: The Enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Gilmore MS, ed. Washington: ASM Press, 2002; 1-54.
67. 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.
68. Franz CM, Stiles ME, Schleifer KH, Holzapfel WH. Enterococci in foods: a conundrum for food safety. *International journal of food microbiology* 2003; 88(105-122).
69. Murray BE. Vancomycin-resistant enterococci. *The American journal of medicine* 1997; 102(3): 284-293.
70. 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 µm. *Lasers in medical science* 2011; 26(1): 95-101.
71. Henderson B, Poole S, Wilson M. Bacterial modulins: a novel class of virulence factors which cause host tissue pathology by inducing cytokine synthesis. *Microbiological reviews* 1996; 60(2): 316-341.
72. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Brazilian dental journal* 2007; 18(4): 267-280.
73. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology* 2009; 155(Pt 6): 1749-1757.
74. Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived Enterococcus faecalis strains are enriched in esp, a gene encoding a novel surface protein. *Infection and immunity* 1999; 67(1): 193-200.
75. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penades JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in Enterococcus faecalis biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 2001; 67(10): 4538-4545.
76. Ember JA, Hugli TE. Characterization of the human neutrophil response to sex pheromones from Streptococcus faecalis. *The American journal of pathology* 1989; 134(4): 797-805.
77. Schlievert PM, Gahr PJ, Assimacopoulos AP, Dinges MM, Stoehr JA, Harmala JW, Hirt H, Dunny GM. Aggregation and binding substances enhance pathogenicity in rabbit models of Enterococcus faecalis endocarditis. *Infection and immunity* 1998; 66(1): 218-223.
78. Makinen PL, Clewell DB, An F, Makinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase ("gelatinase") from Streptococcus faecalis (strain 0G1-10). *The Journal of biological chemistry* 1989; 264(6): 3325-3334.
79. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of Enterococcus faecalis proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral microbiology and immunology* 2003; 18(2): 121-126.

80. Kowalski WJ, Kasper EL, Hatton JF, Murray BE, Nallapareddy SR, Gillespie MJ. Enterococcus faecalis adhesin, Ace, mediates attachment to particulate dentin. *Journal of endodontics* 2006; 32(7): 634-637.
81. Hynes WL, Walton SL. Hyaluronidases of Gram-positive bacteria. *FEMS microbiology letters* 2000; 183(2): 201-207.
82. Riley MA, Wertz JE. Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annual review of microbiology* 2002; 56(117-137).
83. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International endodontic journal* 1997; 30(2): 91-95.
84. Haapasalo M, Ranta H, Ranta KT. Facultative gram-negative enteric rods in persistent periapical infections. *Acta odontologica Scandinavica* 1983; 41(1): 19-22.
85. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of dental research* 1987; 66(8): 1375-1379.
86. Siqueira JF, Jr., De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *Journal of endodontics* 1996; 22(6): 308-310.
87. Siqueira JF, Jr., 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.
88. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of endodontics* 2002; 28(10): 689-693.
89. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International endodontic journal* 2002; 35(3): 221-228.
90. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics & dental traumatology* 1985; 1(5): 170-175.
91. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clinical microbiology reviews* 1994; 7(4): 462-478.
92. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral microbiology and immunology* 2003; 18(4): 234-239.
93. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International endodontic journal* 2005; 38(10): 735-742.
94. Costerton JW. Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in microbiology* 2001; 9(2): 50-52.
95. Costerton JW. *The biofilm primer*, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
96. Costerton JW. Overview of microbial biofilms. *Journal of industrial microbiology* 1995; 15(3): 137-140.
97. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. *Annual review of microbiology* 1995; 49(711-745).

98. Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature reviews Microbiology* 2004; 2(2): 95-108.
99. Costerton JW, Lewandowski, Z. The biofilm lifestyle. *Adv Dent Res* 1997; 11(2): 192-195.
100. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284(5418): 1318-1322.
101. 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.
102. 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.
103. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9(27-36).
104. 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.
105. Allison DG. The biofilm matrix. *Biofouling* 2003; 19(2): 139-150.
106. Beloin C, Valle J, Latour-Lambert P, Faure P, Kzreminski M, Balestrino D, Haagensen JA, Molin S, Prensier G, Arbeille B, Ghigo JM. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology* 2004; 51(3): 659-674.
107. Oosthuizen MC, Steyn B, Theron J, Cosette P, Lindsay D, Von Holy A, Brozel VS. Proteomic analysis reveals differential protein expression by *Bacillus cereus* during biofilm formation. *Applied and environmental microbiology* 2002; 68(6): 2770-2780.
108. 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.
109. Bassler BL. How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Current opinion in microbiology* 1999; 2(6): 582-587.
110. Antunes LC, Ferreira RB, Buckner MM, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiology* 2010; 156(Pt 8): 2271-2282.
111. Dunny GM, Leonard BA. Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology* 1997; 51(527-564).
112. Fux CA, Costerton JW, Stewart PS, Stoodley P. Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in microbiology* 2005; 13(1): 34-40.
113. 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.
114. Baumgartner JC, Siqueira JFJ, Sedgley CM, Kishen A. Microbiology of Endodontic Disease In: Ingle's Endodontics. Ingle IJ, Bakland LK, Baumgartner JC, eds. USA: PMPH, 2007; 221-308.
115. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Energetics of the initial phase of adhesion of *Streptococcus sanguis* to hydroxylapatite. *Journal of bacteriology* 1987; 169(7): 2995-3000.



116. 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.
117. Steinberger RE, Holden PA. Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Applied and environmental microbiology* 2005; 71(9): 5404-5410.
118. 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(Pt 7): 2083-2092.
119. 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.
120. Hsu CY, Lin MH, Chen CC, Chien SC, Cheng YH, Su IN, Shu JC. Vancomycin promotes the bacterial autolysis, release of extracellular DNA, and biofilm formation in vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus*. *FEMS immunology and medical microbiology* 2011; 63(2): 236-247.
121. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 2002; 295(5559): 1487.
122. Busscher HJ, van der Mei HC. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* 1997; 11(1): 24-32.
123. Rickard AH, Gilbert P, High NJ, Kolenbrander PE, Handley PS. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. *Trends in microbiology* 2003; 11(2): 94-100.
124. Busscher HJ, Bos R, van der Mei HC. Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS microbiology letters* 1995; 128(3): 229-234.
125. Kolenbrander PE, Andersen RN, Moore LV. Coaggregation of *Fusobacterium nucleatum*, *Selenomonas flueggei*, *Selenomonas infelix*, *Selenomonas noxia*, and *Selenomonas sputigena* with strains from 11 genera of oral bacteria. *Infection and immunity* 1989; 57(10): 3194-3203.
126. Kolenbrander PE, Parrish KD, Andersen RN, Greenberg EP. Intergeneric coaggregation of oral *Treponema* spp. with *Fusobacterium* spp. and intrageneric coaggregation among *Fusobacterium* spp. *Infection and immunity* 1995; 63(12): 4584-4588.
127. Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. *Journal of clinical periodontology* 2005; 32 Suppl 6(7-15).
128. Siqueira JR, Jr. *Microbiology and Treatment of Endodontic Infections*. In: Cohen's *Pathways of the Pulp*. Hargreaves KM, Berman, L. H., ed. 10 Ed.: Mosby International, 2010.
129. Mah TF, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends in microbiology* 2001; 9(1): 34-39.
130. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001; 358(9276): 135-138.
131. Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS microbiology letters* 2004; 230(1): 13-18.

132. Vu B, Chen M, Crawford RJ, Ivanova EP. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. *Molecules* 2009; 14(7): 2535-2554.
133. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endodontic Topics* 2012; 22(58-78).
134. 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.
135. Tawakoli PN, 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.
136. Bridier A, Meylheuc T, Briandet R. Realistic representation of *Bacillus subtilis* biofilms architecture using combined microscopy (CLSM, ESEM and FESEM). *Micron* 2013; 48(65-69).
137. Pawley J. The development of field-emission scanning electron microscopy for imaging biological surfaces. *Scanning* 1997; 19(5): 324-336.
138. 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.
139. Bloemberg GV, O'Toole GA, Lugtenberg BJ, Kolter R. Green fluorescent protein as a marker for *Pseudomonas* spp. *Applied and environmental microbiology* 1997; 63(11): 4543-4551.
140. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endodontics & dental traumatology* 1995; 11(1): 6-9.
141. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2005; 31(12): 867-872.
142. Nair PN, 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 endodontics* 2005; 99(2): 231-252.
143. Ricucci D, Siqueira JF, Jr. Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *Journal of endodontics* 2011; 37(8): 1171-1175.
144. Ricucci D, Martorano M, Bate AL, Pascon EA. 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.
145. Harn WM, Chen YH, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Endodontics & dental traumatology* 1998; 14(5): 237-240.
146. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. 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.
147. Lomcali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endodontics & dental traumatology* 1996; 12(2): 70-76.

148. Leonardo MR, Rossi MA, Silva LA, Ito IY, Bonifacio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *Journal of endodontics* 2002; 28(12): 815-818.
149. Leonardo MR, Rossi MA, Bonifacio KC, da Silva LA, Assed S. Scanning electron microscopy of the apical structure of human teeth. *Ultrastructural pathology* 2007; 31(4): 321-325.
150. 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.
151. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Bate AL, Pitt Ford TR. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *Journal of endodontics* 2009; 35(4): 493-502.
152. Ricucci D, Loghin S, Siqueira JF, Jr. Exuberant Biofilm infection in a lateral canal as the cause of short-term endodontic treatment failure: report of a case. *Journal of endodontics* 2013; 39(5): 712-718.
153. Siqueira JF, Jr. Periapical actinomycosis and infection with *Propionibacterium propionicum* *Endod Topics* 2003; 6(78-95).
154. Spratt DA, 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.
155. Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR. Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus* (micromonas) micros. *Journal of endodontics* 2007; 33(7): 819-822.
156. 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.
157. Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *Journal of oral science* 2007; 49(2): 161-166.
158. Brandle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stress. *Journal of endodontics* 2008; 34(5): 579-582.
159. 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.
160. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Espigares-Garcia M, Baca P. *Enterococcus faecalis* biofilms eradication by root canal irrigants. *Journal of endodontics* 2009; 35(5): 711-714.
161. Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, 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.
162. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *Journal of endodontics* 2010; 36(1): 70-77.
163. Prabhakar J, Senthilkumar M, Priya MS, Mahalakshmi K, Sehgal PK, Sukumaran VG. 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.

164. 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.

165. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *Journal of endodontics* 2010; 36(6): 1030-1035.

166. Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Baca P. Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of endodontics* 2010; 36(10): 1673-1675.

167. 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.

168. 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.

169. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MS, Gomes de Moraes I, Marciano M, Duarte MA. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. *International endodontic journal* 2012; 45(2): 162-168.

170. 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.

171. 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.

172. Soukos NS, Chen PS, Morris JT, Ruggiero K, Abernethy AD, Som S, Foschi F, Doucette S, Bammann LL, Fontana CR, Doukas AG, Stashenko PP. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of endodontics* 2006; 32(10): 979-984.

173. Hems RS, Gulabivala K, Ng YL, Ready D, Spratt DA. An in vitro evaluation of the ability of ozone to kill a strain of *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* 2005; 38(1): 22-29.

174. Kustarci A, Sumer Z, Altunbas D, Kosum 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 endodontics* 2009; 107(5): e73-79.

175. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJ. 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.

176. Ureyen Kaya B, Kececi AD, Guldaz HE, Cetin ES, Ozturk T, Oksuz L, Bozduman F. Efficacy of endodontic applications of ozone and low-temperature

atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Letters in applied microbiology* 2014; 58(1): 8-15.

177. Hulsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endodontic Topics* 2005; 10(1): 30-76.

178. Zehnder M. Root canal irrigants. *Journal of endodontics* 2006; 32(5): 389-398.

179. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dental clinics of North America* 2010; 54(2): 291-312.

180. Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *Journal of endodontics* 2009; 35(6): 791-804.

181. Siqueira JF, Jr., Rocas 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.

182. Siqueira JF, Jr., Lima KC, Magalhaes FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *Journal of endodontics* 1999; 25(5): 332-335.

183. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *International dental journal* 2008; 58(6): 329-341.

184. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2002; 94(6): 658-666.

185. 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.

186. Peters OA, Schonenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *International endodontic journal* 2001; 34(3): 221-230.

187. 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.

188. Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* 1973; 36(6): 856-871.

189. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *International endodontic journal* 2007; 40(10): 786-793.

190. Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteinization: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. *Journal of endodontics* 2010; 36(12): 2008-2011.

191. 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.

192. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *Journal of endodontics* 1985; 11(12): 525-528.
193. Hulsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation-- literature review and case reports. *International endodontic journal* 2000; 33(3): 186-193.
194. Linn JL, Messer HH. Hypochlorite injury to the lip following injection via a labial perforation. Case report. *Australian dental journal* 1993; 38(4): 280-282.
195. Eldeniz AU, Guneser MB, Akbulut MB. Comparative antifungal efficacy of light-activated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants. *Lasers in medical science* 2013.
196. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellini E, Conte G, Cianconi L. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *Journal of endodontics* 2013; 39(11): 1456-1460.
197. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MSZ, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigation solutions associated with cetrimide. *Confocal laser scanning microscopy. International endodontic journal* 2014: 1-6.
198. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2003; 96(5): 578-581.
199. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *Journal of periodontal research Supplement* 1973; 12(68-75).
200. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1966; 18(9): 569-578.
201. Basrani B, Lemonie C. Chlorhexidine gluconate. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc* 2005; 31(2): 48-52.
202. 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.
203. Yang SE, Cha JH, Kim ES, Kum KY, Lee CY, Jung IY. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of *Enterococcus faecalis* to bovine dentin. *Journal of endodontics* 2006; 32(7): 663-667.
204. Rocas IN, Siqueira JF, Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *Journal of endodontics* 2011; 37(2): 143-150.
205. 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.
206. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *Journal of endodontics* 2002; 28(9): 634-637.

207. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Australian dental journal* 2007; 52(1 Suppl): S64-82.
208. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *Journal of endodontics* 1987; 13(4): 147-157.
209. Aktener BO, Bilkay U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *Journal of endodontics* 1993; 19(5): 228-231.
210. 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.
211. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal* 2001; 34(5): 399-405.
212. Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. *Journal of endodontics* 1982; 8(11): 487-492.
213. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *Journal of endodontics* 2011; 37(10): 1437-1441.
214. Heling I, Irani E, Karni S, Steinberg D. In vitro antimicrobial effect of RC-Prep within dental tubules. *Journal of endodontics* 1999; 25(12): 782-785.
215. Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2000; 90(5): 651-655.
216. Holmberg K, Nyden M, Lee LT, Malmsten M, Jha BK. Interactions between a lipase and charged surfactants--a comparison between bulk and interfaces. *Advances in colloid and interface science* 2000; 88(1-2): 223-241.
217. Oncag O, Hosgor M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *International endodontic journal* 2003; 36(6): 423-432.
218. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *Journal of endodontics* 2006; 32(2): 138-141.
219. Lui JN, Kuah HG, Chen NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. *Journal of endodontics* 2007; 33(4): 472-475.
220. da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. *Journal of endodontics* 2008; 34(12): 1541-1544.
221. 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.
222. Noyanalpan N. *Farmasötik ve Medisinal Kimya Ders Kitabı*, Ankara: Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 1976.

223. Arda M. Temel Mikrobiyoloji. 2 Ed., Ankara: Medisan Yayın Serisi, 2000.
224. D'Arcangelo C, Varvara G, De Fazio P. An evaluation of the action of different root canal irrigants on facultative aerobic-anaerobic, obligate anaerobic, and microaerophilic bacteria. *Journal of endodontics* 1999; 25(5): 351-353.
225. Simoes M, Pereira MO, Vieira MJ. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water research* 2005; 39(20): 5142-5152.
226. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *Journal of endodontics* 2010; 36(1): 87-90.
227. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez 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.
228. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *Journal of endodontics* 2012; 38(7): 948-953.
229. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodriguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *Journal of endodontics* 2012; 38(7): 927-930.
230. Basrani B, Haapasalo H. Update on endodontic irrigating solutions. *Endodontic Topics* 2012; 27(74-102).
231. Asl MN, Hosseinzadeh H. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza* sp. and its bioactive compounds. *Phytotherapy research : PTR* 2008; 22(6): 709-724.
232. Segal R, Pisanty S, Wormser R, Azaz E, Sela MN. Anticariogenic activity of licorice and glycyrrhizine I: Inhibition of *in vitro* plaque formation by *Streptococcus mutans*. *Journal of pharmaceutical sciences* 1985; 74(1): 79-81.
233. Badria FA, Zidan OA. Natural products for dental caries prevention. *Journal of medicinal food* 2004; 7(3): 381-384.
234. Badr AE, Omar N, Badria FA. 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.
235. Fenwick GR, Lutomski J, Nieman C. Liquorice, *Glycyrrhiza glabra* L.- Composition, Uses and Analysis. *Food Chem* 1990; 38(119-143).
236. Killeen G, Madigan C, Connolly C, Walsh G, Clark C, Hynes M, Timmins B, James P, Headon D, Power R. Antimicrobial saponins of *Yucca schidigera* and the implications of their *in vitro* properties for their *in vivo* impact. *Journal of agricultural and food chemistry* 1998; 46(3178-3186).
237. Haraguchi H, Tanimoto K, Tamura Y, Mizutani K, Kinoshita T. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry* 1998; 48(1): 125-129.
238. Molven O, Olsen I, Kerekes K. Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endodontics & dental traumatology* 1991; 7(5): 226-229.
239. 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.



240. 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.
241. Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate RA, Jiang LM, van der Sluis LW, Ten Cate JM, Crielaard W. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Journal of endodontics* 2009; 35(9): 1249-1252.
242. Jiang LM, 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.
243. 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.
244. 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.
245. George S, Kishen A. Effect of tissue fluids on hydrophobicity and adherence of *Enterococcus faecalis* to dentin. *Journal of endodontics* 2007; 33(12): 1421-1425.
246. Xie Q, Johnson BR, Wenckus CS, Fayad MI, Wu CD. Efficacy of berberine, an antimicrobial plant alkaloid, as an endodontic irrigant against a mixed-culture biofilm in an in vitro tooth model. *Journal of endodontics* 2012; 38(8): 1114-1117.
247. 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.
248. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm formation of oral and endodontic *Enterococcus faecalis*. *Journal of endodontics* 2007; 33(7): 815-818.
249. 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): 034029.
250. Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, Kishen A. Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Australian dental journal* 2009; 54(2): 108-114.
251. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photochemistry and photobiology* 2010; 86(6): 1343-1349.
252. Hiraishi N, Yiu CK, King NM, Tagami J, Tay FR. Antimicrobial efficacy of 3.8% silver diamine fluoride and its effect on root dentin. *Journal of endodontics* 2010; 36(6): 1026-1029.
253. Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM, Mendonca RM, Ribeiro-Sobrinho AP, Brito-Junior M, Magalhaes PP, Santos MH, de Macedo 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.
254. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria. *Journal of endodontics* 2010; 36(1): 100-104.

255. Pappen FG, Shen Y, Qian W, Leonardo MR, Giardino L, Haapasalo M. In vitro antibacterial action of Tetraclean, MTAD and five experimental irrigation solutions. *International endodontic journal* 2010; 43(6): 528-535.
256. Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *Journal of endodontics* 2010; 36(11): 1820-1823.
257. 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.
258. Guerreiro-Tanomaru JM, de Faria-Junior NB, Duarte MA, Ordinola-Zapata R, Graeff MS, Tanomaru-Filho M. Comparative analysis of *Enterococcus faecalis* biofilm formation on different substrates. *Journal of endodontics* 2013; 39(3): 346-350.
259. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. *Confocal laser scanning microscopy. International endodontic journal* 2014.
260. Jorgensen JH, Ferraro MJ. Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 2009; 49(11): 1749-1755.
261. Jorgensen JH, Turnidge JD. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: *Manual of clinical microbiology*. Murray PR, Baron EJ, Jorgensen HJ, Landry LM, Pfaller MA, eds. 9th Ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 2007; 1152–1172.
262. Ge B, Wang F, Sjolund-Karlsson M, McDermott PF. Antimicrobial resistance in campylobacter: susceptibility testing methods and resistance trends. *Journal of microbiological methods* 2013; 95(1): 57-67.
263. More G, Tshikalange TE, Lall N, Botha F, Meyer JJ. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. *Journal of ethnopharmacology* 2008; 119(3): 473-477.
264. Ozkan G, Baydar H, Erbas S. The influence of harvest time on essential oil composition, phenolic constituents and antioxidant properties of Turkish oregano (*Origanum onites* L.). *Journal of the science of food and agriculture* 2010; 90(2): 205-209.
265. Ceri H, Olson ME, Stremick C, Read RR, Morck D, Buret A. The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology* 1999; 37(6): 1771-1776.
266. Brunk U, Collins VP, Arro E. The fixation, dehydration, drying and coating of cultured cells of SEM. *Journal of microscopy* 1981; 123(Pt 2): 121-131.
267. Mohamed JA, Huang DB. Biofilm formation by enterococci. *Journal of medical microbiology* 2007; 56(Pt 12): 1581-1588.
268. Baldassarri L, Cecchini R, Bertuccini L, Ammendolia MG, Iosi F, Arciola CR, Montanaro L, Di Rosa R, Gherardi G, Dicuonzo G, Orefici G, Creti R. *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Medical microbiology and immunology* 2001; 190(3): 113-120.

269. 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* 2004; 72(6): 3658-3663.
270. 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.
271. 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.
272. 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.
273. Seno Y, Kariyama R, Mitsuata R, Monden K, Kumon H. Clinical implications of biofilm formation by *Enterococcus faecalis* in the urinary tract. *Acta medica Okayama* 2005; 59(3): 79-87.
274. 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.
275. 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.
276. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of *Enterococcus faecalis* isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. *Journal of endodontics* 2010; 36(12): 1950-1955.
277. Tong Z, Ling J, Lin Z, Li X, Mu Y. The effect of MTADN on 10 *Enterococcus faecalis* isolates and biofilm: an in vitro study. *Journal of endodontics* 2013; 39(5): 674-678.
278. Pierce-Hendry SA, Dennis J. Bacterial culture and antibiotic susceptibility testing. *Compend Contin Educ Vet* 2010; 32(7): E1-5; quiz E6.
279. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *Journal of endodontics* 2007; 33(8): 917-925.
280. Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. *Oral microbiology and immunology* 2008; 23(6): 449-454.
281. Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Hook M, Murray BE. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infection and immunity* 2000; 68(9): 5218-5224.
282. Deng DM, Buijs MJ, ten Cate JM. The effects of substratum on the pH response of *Streptococcus mutans* biofilms and on the susceptibility to 0.2% chlorhexidine. *European journal of oral sciences* 2004; 112(1): 42-47.

283. Haapasalo HK, Siren EK, Waltimo TM, Orstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *International endodontic journal* 2000; 33(2): 126-131.
284. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterilization of teeth by gamma radiation. *Journal of dental research* 1994; 73(9): 1560-1567.
285. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. *International endodontic journal* 2008; 41(10): 873-882.
286. Thomas RZ, Ruben JL, ten Bosch JJ, Huysmans MC. Effect of ethylene oxide sterilization on enamel and dentin demineralization in vitro. *Journal of dentistry* 2007; 35(7): 547-551.
287. Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *Prevotella nigrescens* to the dentin of prepared root canals. *Journal of endodontics* 2002; 28(6): 433-437.
288. Turk BT, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *C. albicans*. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics* 2008; 106(3): 457-462.
289. 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.
290. Baumgartner G, Zehnder M, Paque F. *Enterococcus faecalis* type strain leakage through root canals filled with Gutta-Percha/AH plus or Resilon/Epiphany. *Journal of endodontics* 2007; 33(1): 45-47.
291. 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.
292. Kristich CJ, Li YH, Cvitkovitch DG, Dunny GM. Esp-independent biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. *Journal of bacteriology* 2004; 186(1): 154-163.
293. Stewart PS. Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1996; 40(11): 2517-2522.
294. Bind JL, Avoyne C, Delaval J. [Critical analysis of isolation, counting and identification methods of *Listeria* in food industry]. *Pathologie-biologie* 1996; 44(9): 757-768.
295. Heim S, Lleo M, Bonato B, Guzman CA, Canepari P. The viable but nonculturable state and starvation are different stress responses of *Enterococcus faecalis*, as determined by proteome analysis. *Journal of bacteriology* 2002; 184(23): 6739-6745.
296. Oliver JD. The viable but nonculturable state in bacteria. *J Microbiol* 2005; 43 Spec No(93-100).
297. Yamamoto H. Viable but nonculturable state as a general phenomenon of non-spore-forming bacteria, and its modeling. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2000; 6(2): 112-114.

298. Chen X, Li P, Wang X, Gu M, Zhao C, Sloan AJ, Lv H, Yu Q. Ex vivo antimicrobial efficacy of strong acid electrolytic water against *Enterococcus faecalis* biofilm. *International endodontic journal* 2013; 46(10): 938-946.
299. Neu TR, Manz B, Volke F, Dynes JJ, Hitchcock AP, Lawrence JR. Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS microbiology ecology* 2010; 72(1): 1-21.
300. Hope CK, Garton SG, Wang Q, Burnside G, Farrelly PJ. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using *Enterococcus faecalis*. *Archives of microbiology* 2010; 192(9): 775-781.
301. Brown MR, Gilbert P. Sensitivity of biofilms to antimicrobial agents. *The Journal of applied bacteriology* 1993; 74 Suppl(87S-97S).
302. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ. Bacterial biofilms in nature and disease. *Annual review of microbiology* 1987; 41(435-464).
303. Attwood D, Elworthy PH, Lawrence MJ. Effect of structural variations of non-ionic surfactants on micellar properties and solubilization: surfactants with semi-polar hydrophobes. *The Journal of pharmacy and pharmacology* 1989; 41(9): 585-589.
304. Wang X, Du Y, Yang J, Tang Y, Luo J. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of quaternized chitosan/organic montmorillonite nanocomposites. *Journal of biomedical materials research Part A* 2008; 84(2): 384-390.
305. Simoes M, Simoes LC, Vieira MJ. Species association increases biofilm resistance to chemical and mechanical treatments. *Water research* 2009; 43(1): 229-237.
306. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Journal of endodontics* 2011; 37(8): 1121-1123.
307. Maria Ferrer-Luque C, Teresa Arias-Moliz M, Ruiz-Linares M, Elena Martinez Garcia M, Baca P. Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *International journal of oral science* 2014; 6(1): 46-49.

## ÖZGEÇMİŞ

### Kişisel Bilgiler

<b>Adı</b>	Hilmi Egemen	<b>Soyadı</b>	Gültaş
<b>Doğum Yeri</b>	Sivas	<b>Doğum Tarihi</b>	10/08/1984
<b>Uyruğu</b>	T.C.	<b>Tel</b>	05052611584
<b>E mail</b>	egemenguldas@hotmail.com		

### Eğitim Düzeyi

	<b>Mezun Olduğu Kurum</b>	<b>Mezuniyet Yılı</b>
<b>Doktora</b>	SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Endodonti AD.	2014
<b>Yüksek Lisans</b>	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2008
<b>Lisans</b>	SDÜ Diş Hekimliği Fakültesi	2008
<b>Lise</b>	Antalya Metin-Nuran Çakallıklı Anadolu Lisesi	2002

### İş Deneyimleri

<b>Görevi</b>	<b>Kurum</b>	<b>Süre (Yıl-Yıl)</b>
<b>Araştırma Görevlisi</b>	SDÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü-Endodonti AD.	2008-2014

<b>Yabancı Dilleri</b>	<b>KPDS/ÜDS Puanı</b>	<b>Diğer (Puanı)</b>
İngilizce	77,5	Orta

**EKLER**

**ETİK KURUL ONAYI**

**T.C**  
**SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP Fakültesi**  
**BİLİMSEL ÇALIŞMA PROJELERİ DANIŞMA KOORDİNASYON KURULU**


**SAYI** : B.30.2.SDU.0.20.05.07-5.07-50 / 68  
**KONU** : Projeniz.

04 Ocak 2012

**Sayın;** Doç.Dr.Ayşe Diljin KEÇECİ  
SDÜ Dişhekimliği Fakültesi Endodonti  
Anabilim Dalı Öğretim Üyesi

Kurulumuza değerlendirilmek üzere gönderdiğiniz “**Farklı antimikrobiyal ajanların E.faecalis üzerindeki etkinliklerinin ex vivobiyofilm modelleri üzerinde incelenmesi**” isimli projenizle ilgili 27.12.2011 tarih ve 27/8 sayılı kurul karar sureti ilişikte gönderilmiştir.

Bilgilerinizi rica ederim.

  
**Prof.Dr.Hüseyin YORGANCIGİL**  
Dekan

**EKİ:** 1 Adet Karar Sureti (27/8)

## EK-1

T.C.  
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ  
Tıp Fakültesi Dekanlığı

Bilimsel Çalışma Projeleri Danışma Koordinasyon Kurulu Kararları

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	TOPLAM KARAR SAYISI
27.12.2011	27	8

8-SDU Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Ayşe Diljin KEÇECİ'nin araştırma yürütücüsü, Arş.Gör.Dt.Hilmi Egemen GÜLDAŞ'ın araştırma yardımcısı olduğu "Farklı antimikrobiyal ajanların E.faecalis üzerindeki etkinliklerinin ex vivobiyofilm modelleri üzerinde incelenmesi" adlı araştırma çalışması

SDU Dişhekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Ayşe Diljin KEÇECİ'nin araştırma yürütücüsü, Arş.Gör.Dt.Hilmi Egemen GÜLDAŞ'ın araştırma yardımcısı olduğu "Farklı antimikrobiyal ajanların E.faecalis üzerindeki etkinliklerinin ex vivobiyofilm modelleri üzerinde incelenmesi" adlı araştırma çalışmasının, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmeliğin 4. maddesinin birinci fıkrası aa bendince uygunluğuna,

Mevcutun oybirliği ile karar verildi.  
(Bu bir etik kurul kararı değildir.)

Prof.Dr.M.Fehmi ÖZGÜNER Prof.Dr. Fatih GÜLTEKİN Prof.Dr.Hüseyin OKUTAN  
BAŞKAN ÜYE ÜYE  
(İMZA) (İMZA) (İMZA)

Prof.Dr.Mustafa TÜZ Prof.Dr.Abdullah DOĞAN Doç.Dr.Mekin SEZİK  
ÜYE ÜYE ÜYE  
(İMZA) (KATILMADI) (KATILMADI)

Doç.Dr.Mustafa AKÇAM Doç.Dr.Doğan ERDOĞAN Yrd.Doç.Dr.Zeynep Dilek AYDIN  
ÜYE ÜYE ÜYE  
(İMZA) (İMZA) (İMZA)

ASLI GİBİDİR  
28.12.2011

Prof.Dr.M.Fehmi ÖZGÜNER  
BAPDAK Başkanı



## EK-2

### S.D.Ü. SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ YÖNETİM KURULU KARARLARI

TOPLANTI TARİHİ	TOPLANTI SAYISI	KARAR NO
02.05.2014	13	01

**01- Enstitümüz Endodonti Anabilim Dalı doktora öğrencisi Hilmi Egemen GÜLDAŞ'ın tez konusu değişikliği ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığının 18.04.2014 tarih ve 37247725/302.14/31 sayılı yazısı ve ekinin görüşülmesi.**

Enstitümüz Endodonti Anabilim Dalı doktora öğrencisi Hilmi Egemen GÜLDAŞ'ın tez konusu değişikliği ile ilgili Anabilim Dalı Başkanlığının 18.04.2014 tarih ve 37247725/302.14/31 sayılı yazısı ve eki görüşüldü.

Adı geçen öğrencinin hazırlamakta olduğu doktora tezinin, danışmanının önerisi üzerine "Dentin Diskleri Üzerinde Oluşturulan *Enterococcus Faecalis* Biyofilm Modeli Kullanılarak Sodyum Hipoklorit, Setrimid ve *Glycrrhiza glabra* L. Ekstraktının Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi" şeklinde değiştirilmesi teklif edilmiş olup, belirtilen şekilde değişikliğin uygunluğuna,

Oy birliği ile karar verildi.

(GÖREVLİ) (İMZA) (İMZA)  
Doç.Dr.Nejdet ADANIR Yrd.Doç.Dr. Feyza ÖZDEMİR KISACIK Yrd.Doç.Dr. Mustafa SAYGIN  
Enstitü Müdür Enstitü Müdür Yardımcısı Enstitü Müdür Yardımcısı

(İMZA) (GÖREVLİ) (İMZA)  
Prof.Dr.A.Nesimi KİŞİOĞLU Doç.Dr.Elçin ESENLİK Doç.Dr.Ferdi BAŞKURT  
Üye Üye Üye

(KATILMADI)  
Hasan Basri SAVAŞ  
Öğrenci Temsilcisi

(İMZA)  
Raportör  
Mevlüt TUFAN  
Enstitü Sekreteri

ASLININ AYNI DİR  
Mevlüt TUFAN  
Enstitü Sekreteri

