

TC
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİM DALI



**FARKLI İRRİGASYON SOLÜSYONLARININ ve IŞIKLA AKTİVE OLAN
DEZENFEKSİYON SİSTEMLERİNİN *Enterococcus faecalis* BİYOFİLMİ
ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN
in vitro OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Saadet ÜNVER

Danışman: Prof. Dr. Mete ÜNGÖR

Ankara, 2011

TC
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI ve TEDAVİSİ ANABİLİM DALI



**FARKLI İRRİGASYON SOLÜSYONLARININ ve IŞIKLA AKTİVE OLAN
DEZENFEKSİYON SİSTEMLERİNİN *Enterococcus faecalis* BİYOFİLMİ
ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİKLERİNİN
invitro OLARAK İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Saadet ÜNVER

Danışman: Prof. Dr. Mete ÜNGÖR

Ankara, 2011

Proje No: D-DA 10/08

T.C
BAŞKENT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Diş Hastalıkları ve Tedavisi Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 29/07/2011


“Farklı İrrigasyon Solüsyonlarının ve Işıkla Aktive Olan Dezenfeksiyon Sistemlerinin Enterococcus Faccalis Biyofilmi Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliklerin İn Vitro Olarak İncelenmesi”

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR



TEZ JÜRİSİ ÜYELERİ

ONAY:Bu tez Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun 05/09/2011 tarih ve 105 sayılı kararıyla kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Rengin Erdal
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ JÜRİ ÜYELERİ

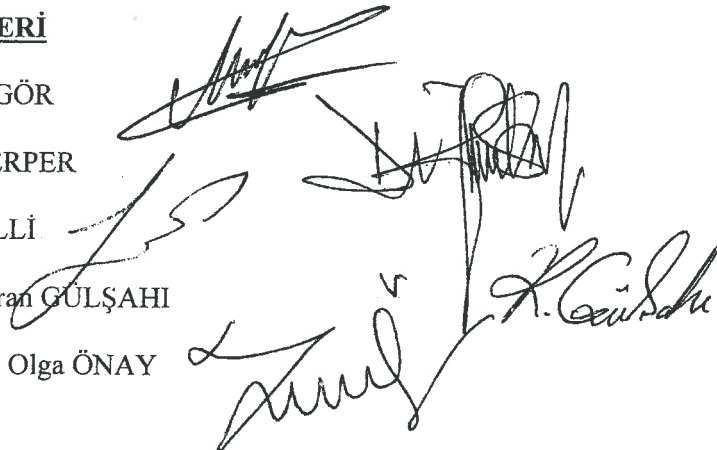
Prof. Dr. Mete ÜNGÖR

Prof. Dr. Ahmet SERPER

Prof. Dr. Sema BELLİ

Yrd. Doç. Dr. Kamran GÜLŞAHI

Yrd. Doç. Dr. Emel Olga ÖNAY



TEŞEKKÜRLER

Tez çalışmamı doktora eğitimi boyunca bana her konuda destek olan, emgin bilgi ve tecrübelerinin benimle devamlı paylaşımında değerli hocam Prof. Dr. Mete ÜNGÖR'e,

Doktora eğitimi boyunca bilgiden deneyimlerinibenden esirgemeyen Yrd.Doç.Dr. Emel Olga ÖNAY ve Yrd.Doç. Dr. Kamran GÜLŞAHI'ya,

Tezimin mikrobiyoloji çalışmalarısındaki yardımları için Doç. Dr. Müge Demirebilek ve Dr. Ebru Bostanoğlu'na,

Doktora hayatı boyunca yanımda olan asistan arkadaşlarıma,

Tez çalışmam sırasında destek ve yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen değerli arkadaşım Özlem ACAR'a,

Hayatı boyunca sonsuz sevgilerinin ve desteklerinin sürekli arkamda hissettiğim sevgili aileme,

Sabri, sınırsız sevgisi ve desteği ile her zaman yanımda olan sevgili eşim Bilal ÜNVER'e en içten duygularımı teşekkür ederim.

ÖZET

Bu çalışmanın amacı; % 5,25'lik Sodyum hipoklorit, % 2'lik Klorheksidinyolünat, % 100'lük Oktenidin hidroklorit ve iki farklı ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin (Fotosan ve metilen mavisi & diyot lazer), *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin bakteri kültür yöntemi ve lazer taramalı konfokal mikroskop ile değerlendirilmesidir.

Çalışmada 9,7 mm çapında, 1,5 mm kalınlığında standart hidroksiapatit diskleri üzerinde 4 hafta boyunca *E. faecalis* biyofilmi oluşturuldu. 4 haftasonunda, yüzeyi *E. faecalis* biyofilmi ile kaplanmış diskler, test edilen irrigasyon solüsyonları içerisinde 1 dk ve 5 dk bekletildi. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinden Fotosan grubunda diskler fotosensitizer ajanı içerisinde daldırılarak üretici firmanın talimatları doğrultusunda 30 sn LED ışık cihazı ile ışınlandı. Diğer grupta ise diskler metilen mavisi içerisinde daldırılarak 30 sn diyot lazer ile ışınlandı. Disklerin fotosensitizer ajanları içerisinde bekletme süreleri, her iki grupta da ışınlanma süresi dahil olacak şekilde toplam 1 dk ve 5 dk olarak ayarlandı. Kültür yönteminde diskler antimikrobiyal işlemlerinden sonra, üzerlerindeki kalıplaşmış bakterilerin sökme için 1 dk ultrasonik subanyonda bekletildi. Disklerin yüzeyinden sökülen bakterilerin oluşturduğu süspansiyondan TSA'ya ekim yapıldı ve 37 °C'de 24 saat bekletildikten sonra besiyeri üzerinde üreyen koloniler sayılarak canlı bakterisi sayışı hesaplandı. Lazer taramalı konfokal mikroskop analizi için diskler floresan boyalarla boyanarak üzerlerindeki ölü (kırmızı) ve canlı (yeşil) bakteriler tespit edildi. Ölü hücre/total hücre oranı hesaplandı.

Elde edilen verilere göre her iki yöntem ve uygulaması üzerinde de kontrol grubu SF hariç test edilen irrigasyon solüsyonlarının hepsi ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinden daha etkili bulundu. % 5,25'lik NaOCl ile % 100'lük Oktenidin hidroklorit arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. % 2'lik CHX, % 5,25'lik NaOCl'den daha az etkili bulunurken, % 100'lük Oktenidin hidroklorit ile arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Her

iki yöntem ve uygulaması arasında de test edilen ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemleri arasında fark bulunmadı. Kültür yönteminde ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan ile SF arasında istatistiksel olarak fark saptanmadı. Lazertaramalı konfokal mikroskop analiz sonuçlarına göre ise 1 dk uygulama süresinde Fotosan grubu, 5 dk uygulama süresinde ise diyet lazer grubu ile kontrol grubu SF arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı. Kültür yönteminde Fotosan grubu hariç diğer tüm gruplarda 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Fotosan grubunda 5 dk uygulama süresi 1 dk'ya göre istatistiksel olarak daha etkili bulundu. Lazertaramalı konfokal mikroskop analiz sonuçlarına göre ise tüm gruplarda uygulama süreleri arasında istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Elde edilen veriler göre iki yöntem arasındaki korelasyon tespit edildi.

Anahtar kelimeler: Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi, lazertaramalı konfokal mikroskop (LSCM), biyofilm, *E. faecalis*

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effectiveness of % 5,25 Sodium hypochloride, % 2 Chlorhexidine gluconate, % 100 Octenidine hydrochloride and two different light activated disinfection systems (Fotosan and methylene blue & diode laser) on *E. faecalis* biofilm, by using the bacterial culture method and laser scanning confocal microscope.

In this study, *E. faecalis* biofilm was grown on the standard hydroxyapatite discs, which have a 9.7 mm diameter and 1.5 mm width, for 4 weeks. At the end of the 4 weeks, the discs whose surfaces were covered by *E. faecalis* biofilm were kept in their irrigation solutions for 1 and 5 minutes. Discs in the Fotosan group, a light activated disinfection system, immersed in the photosensitizer agent, and activated by LED light for 30 seconds according to the manufacturer's instructions. In the other group, discs were immersed in methylene blue, and activated by diode laser for 30 seconds. In the culture method, following antimicrobial exposure, discs were kept in ultrasonic water bath for 1 minute in order to remove remaining adherent bacteria from the discs. Aliquots from the bacterial suspension were added on TSA, and incubated for 24 hours at 37 °C. After incubation, bacteria colonies grown on the culture were counted. Dead (red) and live (green) bacteria on the discs were identified by coloring the discs with fluorescence dyes in order to make an evaluation in the laser scanning confocal microscope. Dead cells/total cells ratio was calculated.

According to the data achieved, in both of the methods and application times, all of the tested irrigation solutions were found more effective than light activated disinfection system except the control group Saline. No statistical difference was observed between % 5,25 NaOCl and %100 Octenidine hydrochloride. %2 CHX being found less effective than %5,25 NaOCl, any statistical

difference was observed between %2 CHX and %100 Octenidine hydrochloride. In both of the methods and application times, no difference was found between the tested light activated disinfection systems. In the culture method, no difference was found between Fotosan and Saline statistically. Within the results of the laser scanning confocal microscope analysis no statistical difference was found between Fotosan group and Saline group in application time of 1 minute. No statistical difference was found between Diode laser group and Saline group in application time of 5 minute. In the culture method, no statistical difference was observed between application times of 1 and 5 minutes in all of the other groups except Fotosan. In the Fotosan group, 5 minute was found more effective than 1 minute statistically. In the conclusions of the laser scanning confocal microscope analysis no statistical difference was observed in application times in all of the groups. According to the data achieved, a correlation was observed between two methods.

Key words: Light activated disinfection system, laser scanning confocal microscope (LSCM), biofilm, *E. faecalis*.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
TABLolar DİZİNİ	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyofilm	3
2.1.1 Biyofilm Oluşumunun Aşamaları.....	4
2.1.2 Biyofilm Bakterilerinde Farklı Fenotip Gelişimi.....	5
2.1.3 Biyofilmin Antimikrobiyallere Karşı Direnci	6
2.1.4 Kök Kanalında Biyofilm Oluşumu	7
2.2 <i>Enterococcus Faecalis</i>	9
2.3 Endodontide İrrigasyon	12
2.3.1 Sodyum Hipoklorit (NaOCl)	14
2.3.2 Klorheksidin Glukonat (CHX).....	16
2.3.3 Oktenidin Hidroklorit	16
2.4 Işıkla Aktive Olan Dezenfeksiyon Sistemi	17
2.4.1 Işığa Duyarlı (Fotosensitizer) Ajanlar.....	20
2.4.2 Fotosan Sistemi.....	21
2.5 Biyofilm Analiz Yöntemleri.....	22
2.5.1 Direkt Analiz Yöntemleri	22
2.5.1.1 Işık Mikroskobu	22
2.5.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	22

2.5.1.3 Floresan mikroskopu.....	23
2.5.1.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LSCM)	23
2.5.2 İndirekt Analiz Yöntemleri.....	24
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	25
3.1 Bakteri Kültür Metodu ile Değerlendirme.....	25
3.1.1 Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması.....	26
3.1.2. Biyofilm Oluşumu.....	26
3.1.3 Antimikrobiyal Testlerin Uygulanması.....	28
3.1.4 Antimikrobiyal Etkinlik ve Canlı Bakteri Sayısının Değerlendirilmesi	32
3.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LSCM) ile Değerlendirme	33
3.3 İstatistiksel Değerlendirme	35
4. BULGULAR	36
4.1 Bakteri Kültür Metoduna Ait Bulgular	36
4.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LSCM) Analizine Ait Bulgular.....	42
5. TARTIŞMA	58
6. SONUÇ	69
7. KAYNAKLAR.....	71

KISALTMALAR DİZİNİ

°C	Santigrat derece
ark.	Arkadaşları
µg	Mikrogram
nm	Nanometre
mm	Milimetre
ml	Mililitre
dk	Dakika
sn	Saniye
cfu/ml	Colonyformingunit (Koloni oluşturan birim)/ mililitre
NaOCl	SodyomHipoklorit
CHX	Klorheksidinglukonat
TSB	Triptik Soy Broth
TSA	Triptik Soy Agar
BHIB	Brain HeartInfusionBroth
SEM	ScanningElectronMicroscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)
LSCM	LaserScanningConfocalMicroscope(Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop)
LAD	LightActivatedDisinfection (Işıklıla Aktive Olan Dezenfeksiyon)

ŞEKİLLERDİZİNİ

Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun aşamaları.....	5
Şekil 2.2 Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin etki mekanizması.....	19
Şekil 3.1 Standart hidroksiapatit diskler ve hücre kültür şişesi.....	25
Şekil 3.2 E. faecalis (ATCC 29212) kültürü	26
Şekil 3.3 McFarland cihazı.....	26
Şekil 3.4 Besiyerinin örnekleri örtecek şekilde dağıtılması.....	27
Şekil 3.5 Disklerin antimikrobiyal solüsyon içinde bekletilmesi.....	29
Şekil 3.6 Fotosan sistemi	30
Şekil 3.7 Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan'ın uygulanması	30
Şekil 3.8 Diyot lazerin uygulanması	31
Şekil 3.9 Ultrasonik su banyosu	32
Şekil 3.10 TSA'daki E. faecalis kolonileri	33
Şekil 3.11 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LSCM) (ZEISS LSM 510 META).....	34
Şekil 4.1 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı mikroorganizma sayılarının dağılımı.....	41
Şekil 4.2 Gruplarda uygulama süresine bağlı canlı mikroorganizma sayısındaki değişim	41
Şekil 4.3 Gruplara ve uygulama sürelerine göre ölü/total hücre oranlarının dağılımı. ...	46
Şekil 4.4 Gruplarda uygulama süresine göre değişen ölü hücre/total hücre oranı	46
Şekil 4.5 a)1 dk uygulama süresine sahip örnekler içerisinde canlı mikroorganizma sayısı ile ölü hücre/total hücre oranı arasında deneklerin saçılımı b)5 dk uygulama süresine sahip örnekler içerisinde canlı mikroorganizma sayısı ile ölü hücre/total hücre oranı arasında deneklerin saçılımı.....	48
Şekil 4.6 Hidroksiapatit disk üzerinde oluşturulan E. faecalis biyofilminin 20000X büyütmedeki SEM görüntüsü.....	50

Şekil 4.7 %5,25'lik NaOCl içinde 5 dk bekletilmiş bir örneğe ait 20000X büyütmede SEM görüntüsü.....	50
Şekil 4.8 %100'lük Octenisept solüsyonu içinde 1 dk bekletilmiş bir örneğe ait a) 20000X büyütmedeki SEM görüntüsü b) 40000X büyütmedeki SEM görüntüsü.....	51
Şekil 4.9 Hidroksi apatit disk üzerinde oluşturulan E. faecalis biyofilminin 3 boyutlu LSCM görüntüleri.....	52
Şekil 4.10 Serum Fizyolojik içinde 5 dk bekletilen bir örneğe ait CLSM görüntüsü.....	53
Şekil 4.11 % 5,25'lik NaOCl içinde 5 dk bekletilen bir örneğe ait CLSM görüntüsü	53
Şekil 4.12 %100'lük Octenisept solüsyonu içinde 1 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü a) SYTO 9 ile boyanan ölü+ canlı bakteri hücreleri b) Propidium İodide ile boyanan ölü bakteri hücreleri c) Ölü ve canlı bakteri hücrelerinin karışık görüntüsü	54
Şekil 4.13 Metilen mavisi ve Diyet lazer ile 5 dk muamele edilen bir örneğe ait CLSM görüntüsü.....	55
Şekil 4.14 Fotosan sistemi ile 1 dk muamele edilmiş bir örneğe ait CLSM görüntüsü ..	56
Şekil 4.15 %2'lik CHX solüsyonu içinde 5 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü.....	57

TABLolar DİZİNİ

Tablo 4.1 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı bakteri sayılarına (cfu/ml) ait tanımlayıcı istatistikler.....	36
Tablo 4.2 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı bakteri sayılarının (cfu/ml) dağılımı.....	40
Tablo 4.3 Gruplara ve uygulama sürelerine göre volümetrik olarak ölü bakteri hücrelerinin total bakteri hücrelerine oranlarına ait tanımlayıcı istatistikler	42
Tablo 4.4 Gruplara ve uygulama sürelerine göre volümetrik olarak ölü bakteri hücrelerinin toplam bakteri hücrelerine oranlarının dağılımı	45

1. GİRİŞ

Mikroorganizmalar, apikal periodontitisin patogeneğinde rol alan önemli etyolojik faktörlerdir.¹ Bu nedenle, endodontik tedavinin temel amaçlarından biri, apikal periodontitisin etkeni olan mikroorganizmaların nekrotik kök kanal sisteminden elimine edilmesidir.

Mikroorganizmaların doğada çoğunlukla bir yüzeye tutunarak ve biyofilm adı verilen yapılar oluşturarak hayatlarını devam ettirdikleri bilinmektedir.² Kök kanal sisteminde de duvarlara yapışık biyofilm yapısı içinde yer alan mikroorganizma topluluklarının varlığı, çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir.³⁻⁷ Biyofilm içindeki bakteriler planktonik koşullarda gelişmiş bakterilerle karşılaştırıldığı zaman antimikrobiyal ajanlara karşı karakteristik olarak artmış bir dirence sahiptirler.⁸

Enterococcus faecalis endodontik tedavi sonrası görülen inatçı periradiküler enfeksiyonların etyolojisinde sıklıkla rol alan bir mikroorganizmadır. *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma potansiyeli ve değişen çevre koşullarına adaptasyon yeteneği vardır.⁹

Antimikrobiyal irrigasyon solüsyonları, nekrotik kök kanal sisteminden mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir. Kök kanal sistemi el ve döner sistemlerle şekillendirilirken, irrigasyon ile inflamme ve nekrotik dokular, mikroorganizmalar, biyofilmler ve debrisler uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır. Ancak kök kanal sisteminin kompleks yapısı nedeni ile en yüksek teknik standartlar kullanılsa bile kemomekanik preparasyon sonrası kök kanalının mikroorganizmalardan tamamen temizlenemediği görülmüştür.¹⁰ Bu nedenle endodontide yeni antimikrobiyal stratejilerin geliştirilmesi çabaları devam etmektedir.

Fotodinamik terapi diğer adıyla ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi, ışığa duyarlı maddenin oksijen varlığında, ışıkla aktive edilmesi esasına dayanan bir medikal tedavi şeklidir.¹¹ Fotodinamik terapi uygulamaları dişhekimliğinde de hızla gelişmektedir.

Çeşitli antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin *in vitro* olarak değerlendirilmesi, *in vivo* çalışmalara öncülük etmesi açısından oldukça önemlidir. Bu çalışmanın amacı da, farklı irrigasyon solüsyonlarının ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin, *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin bakteri kültür yöntemi ve lazer taramalı konfokal mikroskop ile *in vitro* olarak değerlendirilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Biyofilm

Biyofilm, geri dönüşümsüz olarak katı bir yüzeye tutunan, belirli bir yapısal bütünlük içerisinde kendi ürettikleri ekstrasellüler polimerik maddelerden oluşan bir matriks içinde gömülü olarak yaşayan, büyüme hızları ve gen transkripsiyonları açısından serbest dolaşan türdeşleri ile aralarında farklılıklar bulunan mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu bir topluluktur.¹²

Mikroorganizmalar doğal bir ortam içerisinde nadiren serbest hareket halinde bulunurlar. Aksine yüzeylere tutunarak yapışık mikrobiyal topluluklar oluşturmak için kuvvetli eğilimleri vardır. Bu nedenle doğal sıvılarla temasta olan herhangi bir sistem içindeki canlı veya cansız yüzeylerde biyofilm formasyonu meydana gelebilir.²

Biyofimler, sadece yüzeye yapışmış durumda bulunan ve içerisinde mikroorganizmaların bulunduğu homojen bir tabakadan ibaret olmayıp, belirli bir yapıya sahip, koordinasyon yeteneği bulunan mikrobiyal toplulukların oluşturduğu biyolojik sistemlerdir.¹³ Biyofilmlerin, ekzopolisakkarit matriks içinde yaşamlarını sürdüren hücrelere esansiyel besinlerin ve oksijenin taşınmasını sağlayan su kanallarına sahip, çok tabakalı heterojen bir yapıları vardır. Biyofilm içinde yaşayan mikroorganizmalar tarafından sentezlenen polisakkaritler, biyofilmin ana ekstrasellüler komponentini oluşturur.⁸

Bir yüzeye tutunarak koloniler halinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturdukları her tabaka biyofilm yapısının özelliklerini taşımamaktadır. Gerçek biyofilm yapısında olmayan topluluklar, buldukları yüzeylerde planktonik hücre davranışı sergilemeye devam etmektedirler ve biyofilm içerisindeki bakterilerde gözlenen direnç ve geri dönüşümsüz yapışma gibi özelliklere sahip değildirler. Bununla beraber, biyofilm içerisindeki bakterilerin de zamanla matriksten koparak ayrıldıkları ve dolaşıma geçtikleri bilinmektedir. Bu ayrılan bakterilerin planktonik forma geçseler de, ayrıldıkları topluluğun tüm direnç karakterlerini taşıdıkları bildirilmiştir.⁸

2.1.1 Biyofilm Oluşumunun Aşamaları

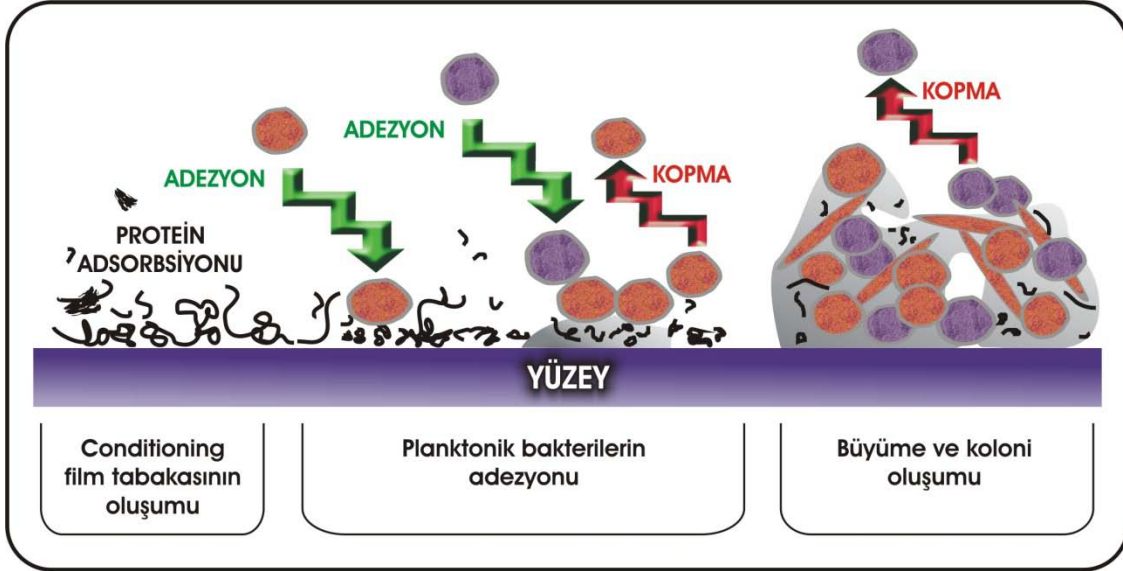
Biyofilm oluşumu temelde 4 aşamada gerçekleşmektedir¹⁴ (Şekil 2.1).

1. Conditioning film tabakasının oluşması
2. Planktonik mikroorganizmaların adezyonu
3. Mikroorganizmaların polimerik matriks içinde kolonizasyonu
4. Mikroorganizmaların biyofilmin üst tabakasından koparak ayrılması

Planktonik yani sıvı bir ortam içinde diğer bakterilerden bağımsız olarak serbestçe yüzen bakteriler, biyofilm oluşumu için bir ön şarttır. Bakterilerin biyofilm oluşturmaları için öncelikle katı bir yüzeye tutunmaları gerekmektedir. Conditioning film tabakasının oluşumunu takiben bakteriler yüzeye geri dönüşür özellikte tutunurlar. Conditioning film tabakası protein, glikoprotein ve bazı sekrete edilmiş mikrobiyal ürünleri içeren organik bir tabakadır. Conditioning film tabakası her zaman mikroorganizmaların bölgeye gelişinden önce oluşur ve belirli mikroorganizmaların selektif olarak adezyonunu indükleyerek biyofilmin mikrobiyal içeriğini etkiler.¹⁵ İkinci aşama mikroorganizmaların adezyonunu içerir. Erken kolonileşen mikroorganizmalar diğer mikroorganizmaların adezyonu için kritiktir. Örneğin streptokok türleri erken kolonileşenler arasındadır ve hem gram (+) hem de gram (-) bakterilerin adezyonu için önemli bir rol oynamaktadırlar.¹⁶ Üçüncü aşama tutunan mikroorganizmaların çoğalmasını ve metabolizmasını içerir ki bu durum yapısal olarak organize olmuş biyofilmin en küçük birimi olan mikrokolonilerin oluşumu ile sonuçlanır. Mikroorganizmaların kendine özgü karakteristikleri ve çevresel faktörler, biyofilm içindeki gelişimlerini ve dizilimlerini etkiler. Oluşan biyofilmin üst tabakasından mikroorganizmalar koparak ayrılır. Mikroorganizmaların yüzeyden ayrılmaları gelişim sırasında sürekli devam eden bir süreçtir. Mikroorganizmaların yüzeyden düzenli olarak ayrılmaları, başka alanlara yayılmaları ve kolonize olmaları anlamını taşır.¹⁷

Lazer taramalı konfokal mikroskop ile elde edilen görüntüler olgun biyofilmlerin, ekzopolisakkarit matriks içine gömülmüş çeşitli yüksekliklerde mantar şeklinde yapılara

sahip mikrokolonilerden oluştuğunu göstermektedir. Mikrokolonilerin arasında içinde su akışı olan açık su kanalları bulunmaktadır. Su kanalları, biyofilm yapısı içinde besinlerin dağılımını ve metabolik son ürünlerin uzaklaştırılmasını sağlar.¹⁸



Şekil 2.1 Biyofilm oluşumunun aşamaları

2.1.2 Biyofilm Bakterilerinde Farklı Fenotip Gelişimi

Bakterilerin planktonik durumdan biyofilm durumuna geçişinde, bakteriyel fonksiyonların modifikasyonu dikkat çekmektedir. Biyofilm oluşumu planktonik bakterilerin bir yüzeye tutunmaları ile başlayan dinamik bir olaydır. Mikroorganizmaların bir yüzeye adezyonu, çok sayıda genin değişmiş ekspresyonunu tetiklemekte, dolayısıyla bakterilerin fenotipi değişmektedir. Bu tip yüzeyin indüklediği değişikliklerin karakteri hem mikroorganizmalara hem de yüzeyin tabiatına bağlıdır. Ayrıca adezyona protein sentez değişikliklerinin yanında sadece yapışık hücrelerde tanımlanan yeni proteinlerin sentezi de eşlik etmektedir. Dolayısıyla bir yüzeye tutunma biyofilmlerde kendiliğinden yeni fenotiplerin oluşumuna yol açmaktadır.¹⁴ Bununla beraber biyofilm içindeki lokal çevresel koşullardan kaynaklanan değişmiş gen ekspresyonları, protein sentezleri ve dolayısıyla yeni fenotipler ortaya çıkabilir. Örneğin *Streptococcus mutans*'ta ekstrasellüler polimerlerin sentezi ile ilişkili genlerin ekspresyonu matür

biyofilmlerde başlangıçtakine göre farklı bulunmuştur. Bu durum ortamın pH'ına ve biyofilm içindeki karbonhidrat miktarına bağlanmıştır.¹⁹

Mikroorganizmalar değişen çevresel koşullara yanıt verme ve adapte olma kapasitesine sahiptir.²⁰ Özelliği olan mikroorganizmalar çevredeki kimyasal bilgileri algılar, işler ve fenotipik özelliklerini düzenlerler. Quorum-sensing, yoğun bakteri kümelenmelerinin varlığında hücrel fonksiyonları kontrol eden, hücreler arası bakteriyel iletişim mekanizmasıdır. Uygun konsantrasyonlardaki difüze olabilen moleküllerle kontrol edilen bu haberleşme sistemi, komşu mikroorganizmalarda gen ekspresyonunu değiştirmeye yarar. Biyofilm oluşturma yeteneği ve virülans gibi çeşitli mikrobiyal özelliklerin düzenlenmesine katılan quorum-sensing haberleşmesi ekstrasellüler DNA'yı içine alır ve çevresel strese karşı koyar.²¹ *S. gordonii*, *S. mitis*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* ve *P. intermedia* gibi kök kanallarında bulunan oral bakterilerin çoğu quorum-sensing yoluyla iletişim yeteneğine sahip olup, uyarı molekülleri kök kanallarındaki biyofilm bakterilerinin fenotipik özelliklerini optimize etmek için gen ekspresyonlarını değiştiren çevresel faktörler olarak görev yapmaktadır.¹⁴

2.1.3 Biyofilmin Antimikrobiyallere Karşı Direnci

Biyofilm içindeki bakterilerin fizyolojik özellikleri sıvı kültür içindeki yani planktonik formdaki türdeşlerinin fizyolojik özelliklerinden farklıdır. Belirli bakteri türlerinin biyofilm içinde geliştikleri zaman yeni ve daha virülan tipler sergiledikleri bulunmuştur. Biyofilm içindeki bakteriler planktonik koşullarda gelişmiş bakterilerle karşılaştırıldığı zaman antimikrobiyal ajanlara karşı karakteristik olarak artmış bir dirence sahiptirler.⁸ Biyofilm içinde gelişen mikroorganizmaların antimikrobiyal ajanlara karşı planktonik formdakilerden 100-1000 kat daha dirençli olduğunu gösteren raporlar bulunmaktadır.²² Biyofilmin yapısına bağlı olarak gelişen bu direnç şu mekanizmalarla açıklanmaktadır.²³⁻²⁵

- Ekstrasellüler polimerik matriks antimikrobiyal ajanın geçişi için bariyer oluşturur.

- Biyofilmin polianyonik yapısı katyonların derin difüzyonuna karşı direnç gösterir, antikorları engeller ve antibiyotikleri nötralize eden - laktamaz gibi enzimlerin konsantrasyonunu artırır.
- Bakterilerin yakın ilişkisi sonucu meydana gelen DNA değişimi antibiyotik direncini hızlı şekilde transfer edebilir.
- Biyofilmin yapısı bakterileri immün sistem elemanlarından korur.
- Biyofilm gelişimi sırasında meydana gelen fizyolojik değişiklikler ve mikroorganizmaların üreme hızlarının değişmesi sonucu antimikrobiyal ajanlar daha yavaş hücre içine girer.

2.1.4 Kök Kanalında Biyofilm Oluşumu

Enfekte kök kanallarındaki biyofilm yapıları ilk kez Nair tarafından tespit edilmiştir. Nair,⁴ transmission elektron mikroskobu (TEM) kullanarak koronal çürükleri olan ve periapikal inflamasyon nedeniyle çekilen 31 dişin kök kanal içeriğini incelemiştir. Mikroorganizmaların büyük bölümünün kokların, rodların, filamentlerin ve spiroketlerin gevşek toplulukları halinde bulunduğunu belirtmiştir. Kanal duvarlarına yapışık, inceden kalına doğru tabakalar oluşturan yoğun bakteri kümelenmeleri de gözlemlemiştir. Ayrıca amorf materyallerin bakteriler arası boşlukları doldurduğu belirtilmiş ve bu yapı bakterilerin ekstrasellüler matriksi olarak yorumlanmıştır.

Nair ve ark.,³ başka bir çalışmalarında, kanal tedavili apikal periodontitisli mandibular molar dişlerde biyofilm oluşumlarını gözlemlemiştir. Kök kanal tedavileri tek seansta yapılmış olan bu dişlerde biyofilmler sıklıkla kök kanal sisteminin ulaşılamayan bölgelerinde tespit edilmiştir.

Molven ve ark.,⁵ benzer şekilde çekilmiş diş gruplarını kullanarak enfekte kök kanallarının apikal 2 mm'lerini SEM ile görüntülemişler ve içerisinde spiroketlerin de yer aldığı kokların, rodların ve/veya filamentlerin oluşturdukları mikrokolonilerin varlığını göstermişlerdir.

Şen ve ark.,⁶ tedavi edilmeden çekilmiş apikal periodontitisli dişleri SEM ile incelemiş ve kök kanallarının yoğun olarak enfekte olduğunu, tüm bölgelerinde mikroorganizmaların bulunduğunu gözlemlemişlerdir. Kokların ve rodların floraya hakim olarak kök kanal duvarlarında koloniler oluşturduklarını ve değişen derecelerde dentin tübüllerine penetre olduklarını belirtmişlerdir.

Lomcali ve ark.,²⁶ asemptomatik apikal periodontitis lezyonları ile etkilenmiş dişlerin kök uçlarının dış yüzeylerini incelemek için SEM kullanmışlardır. Rezorbsiyon lakünlerinde, apikal foramenin yakınında ve tam çıkış noktasında yoğun bakteri zincirleri ve ekstrasellüler matriks içine gömülmüş çok tabakalı bakterileri gözlemlemişlerdir.

Tronstad ve ark.,²⁷ inatçı endodontik vakalar olarak adlandırılan tedaviye dirençli vakalarla ilgili bir çalışmada cerrahi müdahale sırasında uzaklaştırılan kök uçlarının yüzeylerini SEM ile incelemişlerdir. Apikal foramene komşu olan köklerin uç kısmının devamlı, düzgün ve çeşitli bakteri formlarını içeren bir tabaka ile kaplı olduğunu belirtmişlerdir. Yüzey düzensizliklerinde, girinti ve boşluklarda gözlemledikleri, ekstrasellüler madde ile bir arada tutulan organizmaları koklar, rodlar ve bazı fibriler formlar olarak tanımlamışlardır.

Siqueira ve Lopes,⁷ asemptomatik periapikal lezyonlu 26 çekilmiş dişi gözlemlemişlerdir. Tüm dişlerde geniş çürükler, radyolüsent alanlar ve ilişkili periapikal doku lezyonlarının bulunduğunu belirtmişlerdir. SEM'de kök kanalında sınırlı koklar ve rodlar görmüşlerdir. Sadece bir dişte apikal foramenin ötesinde, bir vakada da apikal foramenin yakınında yoğun bakteriyel kümelenmeler tespit etmişlerdir. Bakterilerin apikal foramende ya da dışında bulunmasının daha çok diş çekimi sırasında bakteri kolonilerinin ekstrüzyonu sonucu olabileceğine ve gerçek durumu yansıtmayabileceğine dikkat çekmişlerdir.

Leonardo ve ark.,²⁸ vital pulpa, apikal lezyonsuz nekrotik pulpa ve apikal lezyonlu nekrotik pulpa gibi çeşitli pulpal koşullara sahip çekilmiş dişlerin kök uçlarını karşılaştırmak için SEM'i kullanmışlardır. Biyofilm formasyonunu sadece apikal periododotitisli dişlerde tanımlamışlar ve biyofilmlerin kok, basil, filament gibi farklı bakteriyel monotiplerden oluştuğunu belirtmişlerdir.

Detaylı bir şekilde tanımlanmamış olmasına rağmen yapılan araştırmalarda enfekte kök kanal duvarlarında bakteriyel birikimlerin gözlenmesi, biyofilm formasyonuna ilişkin mekanizmaların kök kanal boşluğu içinde de meydana gelebileceğini göstermektedir. Literatürdeki mevcut vakalara dayanarak, kök kanallarının çürük sonrası uzun süreli ağız ortamına açık kalması, yetersiz tedavi edilmiş kök kanalları, fistül yolu varlığı gibi etkenler kök kanal sisteminde biyofilm oluşumu için önemli birer ön şart olabilirler.¹⁴

Kök kanal sistemi içinde biyofilm oluşumu için gerekli ön koşullar pulpanın yıkım nedenine bağlıdır. Pulpal nekroza neden olan travma kaynaklı iskemik yaralanmaların pulpanın çürükle ekspozuna kıyasla kolonizasyon fazı için tamamen farklı ön koşullar sağlaması muhtemeldir. Pulpanın çürükle ekspozunda inflamatuvar lezyon apeksine doğru uzanır ve işgalci planktonik mikroorganizmaların çoğalmasını ve kök kanal duvarlarına tutunmasını sağlayacak sıvı akışını temin eder.¹⁴

Primer enfekte kök kanalının başlangıç enstrümantasyonunu takiben taşkın enstrümantasyona bağlı gelişen periapikal doku hasarı inflamatuvar eksudaların kök kanalı içine girişine izin verir ve endodontik tedavi sürecini uzatan proteolitik bakterilerin gelişimine neden olur. Benzer şekilde tedavi edilmiş kök kanallarında kanal dolgusu tarafından hapsedilmiş bakterilerde sıklıkla görülen besinsizlik durumu tekrarlayan tedavi vakalarında taşkın enstrümantasyon ile ortadan kaldırılabılır. Eğer kanal sistemi retreatment girişimi ile tekrar açılırsa foraminal yapıların dikkatsiz genişletilmesi besin kaynağını önemli ölçüde artırabilir ve işlemin sonucunu olumsuz şekilde etkileyebilir. Lokal kök kanal ortamında potansiyel değişime neden olan bir diğer durum koronal restorasyonlar kaybedildiği ve ağız ortamına direkt geçiş yolu olduğu zaman meydana gelir. Bu geçiş yolu sadece kök kanal sisteminde doldurulmamış boşluklardaki faaliyet göstermeyen mikroorganizmalara can veren besin elementlerini değil ayrıca yeni mikroorganizmaları da taşır.¹⁴

2.2 *Enterococcus Faecalis*

Enterokoklar gram (+) fakültatif anaerob olup, tipik olarak mikroskopta çiftler veya zincirler oluşturmuş biçimde görülürler. Enterokoklar insan vücudunda

gastrointestinal sistem, oral kavite ve vajinada kommensalist olarak yaşarlar. Bununla birlikte idrar yollarını, safra yollarını, dolaşım sistemini, endokardiumu, yanık yaralarını ve kateterler gibi yabancı cisimleri enfekte ederek ciddi hastalıklara yol açabilmektedirler.²⁹ Enterokokların insanlarda neden olduğu enfeksiyonların % 90'ından *E. faecalis* sorumludur.²⁹

E. faecalis diğer enterokok türlerinde olduğu gibi, elverişsiz koşullara kolaylıkla adapte olabilir. Sodyum dodesil sülfat, safra tuzları, hiperosmolarite, ısı, etanol, hidrojen peroksit, asidite ve alkalinitenin normal öldürücü düzeylerine diğer mikroorganizma türlerinden daha az hassastır.³⁰⁻³³

E. faecalis, tedavi edilmemiş nekrotik pulpalı dişlerin mikrobiyal florasının küçük bir kısmını oluştururken, kronik apikal periodontitis bulgusu veren başarısız endodontik tedavili dişlerin % 30-70'inde *E. faecalis*'in pozitif kültürünün elde edildiği ve sıklıkla da saf kültür halinde bulunduğu gösterilmiştir.³⁴

E. faecalis'in primer endodontik enfeksiyonlarda görülme sıklığı % 4-40 olarak bildirilirken, inatçı periradiküler lezyonlarda bulunma sıklığının çok daha fazla olduğu belirtilmiştir.³⁵ Ayrıca *E. faecalis*'in başarısız kök kanal tedavili dişlerde bulunma sıklığının primer endodontik enfeksiyonlardan 9 kat daha fazla olduğu da bildirilmiştir.³⁵ Moleküler teknikler, başarısız endodontik tedavili dişlerde yüksek düzeyde *E. faecalis* olduğunu onaylamış ve bu başarısız vakaların % 60-90'ında türe ait gen parçaları saptanmıştır.³⁵⁻³⁸

E. faecalis; litik enzimler, sitolizin, feromonlar ve lipoteikoik asit gibi belirli virulans faktörlere sahiptir.³⁵ *E. faecalis*'in konak hücrelere bağlanabildiği ve konak cevabını değiştirebildiği belirtilmiştir.^{35,39} *E. faecalis*, lenfositlerin etkilerini bastırmak suretiyle de endodontik başarısızlığa neden olabilmektedir.⁴⁰ Bu mikroorganizmanın çok çeşitli genetik polimorfizimler sergilediği görülmekte⁴¹ ve serine proteaz, jelatinaz ve dentine bağlanmayı kolaylaştıran kollojen bağlayan protein (Ace) gibi enzimlere sahip olduğu bilinmektedir.⁴² Dentine bağlanabilme özelliği de gösteren *E. faecalis*, dentin tübüllerine 400-1000 µm ilerleyebilecek kadaüçük boyutlu olup dentin tübülleri içerisinde yaşayabilmektedir.^{39,43}

Enterokoklar zor çevresel şartlara iyi dayanıklılık gösterirler. 10-45°C arasında, % 6,5 NaCl besiyerinde çoğalabilmekte, pH 9,6'nın üzerindeyken ve 60°C'de 30 dakika yaşayabilmektedirler.⁴⁴ Kök kanal sistemi mikroorganizmaların çoğalmaları için besinden zengin bir ortam olmamakla birlikte, *E. faecalis*'in apikal foramenden sızan serumu kullanarak çoğalabileceği, diğer taraftan virülans faktörlerinden hyalüronidaz aracılığıyla dentinde bulunan hyalüronattan veya organik kısımca zengin olduğu bilinen smear tabakasından çoğalmak için gerekli enerjiyi elde edebileceği düşünülmektedir. *E. faecalis* uzun süre açlığa dayanabilme kapasitesine ve uygun besin ortamı oluşunca normal hallerine dönebilme kabiliyetine de sahiptir.⁴⁵ Yapılan bir araştırmada *E. faecalis*'in kök kanalında ek besin olmadan 12 ay boyunca canlılığını sürdürebildiği de gösterilmiştir.⁴⁶

E. faecalis'in biyofilm oluşturarak 1000 kat daha dirençli hale geldiği belirtilmiştir.⁹ *In vitro* çalışmalarda *E. faecalis*'in dentin tübüllerini 24 saat gibi çok kısa sayılabilecek bir sürede istila ettiği de gösterilmiştir.^{39,43,47-49} *E. faecalis* monoenfeksiyon oluşturma yeteneğine de sahiptir. Sobrinho ve ark.⁵⁰ tarafından rat dişleri üzerinde yapılan bir çalışmada, kök kanallarına çeşitli bakteriler ayrı ayrı ve birlikte ekilmiş ve *E. faecalis*'in diğerler bakterilerden farklı olarak, pek çok vakada kök kanalında diğer bakterilerin desteği olmadan tek başına kolonize olabildiği bulunmuştur.

E. faecalis'in kanal içi antiseptik materyal olarak sıklıkla kullanılan ve güçlü bir alkalın dezenfektan olan kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisine karşı dirençli olduğu da pek çok çalışmada gösterilmiştir.^{9,43,47,51-53}

E. faecalis yukarıda belirtilen özellikleri dolayısıyla endodontide, inatçı bir patojen olarak kabul edilmektedir. Endodontik tedavide başarıyı artırma yolundaki çalışmalarda *E. faecalis*'in tam eliminasyonunun sağlanması önemli bir aşama olarak görülmektedir.

2.3 Endodontide İrrigasyon

Endodontik tedavinin temel amacı apikal periodontitisin etkeni olan mikroorganizmaların kök kanal sisteminden yok edilmesi ve enfeksiyonun yeniden oluşmasının önlenmesidir. Bu amaçla, kök kanal sistemi el ve döner sistemlerle şekillendirilirken, irrigasyon ile inflame ve nekrotik dokular, mikroorganizmalar, biyofilmler ve debrisler uzaklaştırılmaya çalışılmaktadır.^{10,54}

Antimikrobiyal irrigasyon solüsyonları, nekrotik kök kanal sisteminden mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında önemli bir role sahiptir. İrrigasyon solüsyonları antimikrobiyal etkileri ile mikroorganizmaların ölümüne neden olurken, kök kanal sisteminde enstrümante edilemeyen alanlara ulaşarak bu alanlardan bakteriyel biyofilmlerin uzaklaştırılmasına olanak sağlayabilmelidir.

Kök kanal tedavisinde irrigasyon işleminin sağladığı yararlar şu şekilde sıralanabilir:⁵⁵

1. Enfekte materyal, yumuşak ve sert doku artıkları fiziksel ve kimyasal olarak uzaklaştırılır. İrriganlar organik debrisleri uzaklaştırarak mikroorganizmaların beslenmelerini güçleştirmekte ve böylece sayı ve türlerini azaltmaktadır.

2. Kök kanal sistemindeki artık organik materyal çözünmektedir. Kök kanallarının mekanik preparasyonlarında ulaşılamayan kanal ayrıntıları seçilen materyal ve yönteme bağlı olarak bir ölçüde temizlenebilmektedir.

3. Kanal aletlerinin lubrikasyonla çalışmaları kolaylaştırılmaktadır ve oluşabilecek işlemsel hatalar azalmaktadır.

4. Bazı solüsyonlar antimikrobiyal etki göstererek mikroorganizmaları öldürmektedir.

5. Bazı sıvılar smear tabakasını uzaklaştırabilmekte, böylece dezenfektanların dentin kanalcıkları içerisine yayılmaları kolaylaşmaktadır.

6. Kanallardaki işlemler irriganla dolu bir ortamda gerçekleştirildiğinde dentin talaşları pulpa odasına doğru yükselir. Talaşların apikal bölümde birikmesi ve tıkanma oluşturması olasılığı azalır.

7. Irriganların dişleri ağartma özellikleri vardır. Bu özellik kanal tedavisinden sonra dişlerin doğal renklerini yitirmelerini önemli ölçüde engeller.

İdeal bir irrigasyon solüsyonunda bulunması gereken özellikler de şu şekilde sıralanabilir:^{55,56}

1. Doku ve debrisleri eritebilmelidir. Enstrümanların ulaşamadıkları bölgelerde irrigan yumuşak doku veya sert doku artıklarını eritmeli ve uzaklaştırılmalarını kolaylaştırmalıdır.

2. Smear tabakayı kaldırabilmelidir. Smear tabakayı uzaklaştırırken kanal duvarlarındaki dentin yapısını olumsuz etkilememelidir.

3. Düşük yüzey gerilimi göstermelidir. Bu sayede girilemeyen alanlara akışı artırmalıdır.

4. Lubrikasyon özelliği göstererek enstrümanların kanalda ilerlemelerini kolaylaştırmalıdır.

5. Dezenfektan özellik taşımalıdır. Biyofilm içindeki anaerobik ve fakültatif mikroorganizmalara karşı yüksek düzeyde etkili olmalı ve güçlü antimikrobik etkisi olmalıdır. Kullanım sonrası dezenfektan etkisini sürdürebilmelidir.

6. Düşük toksisite göstererek periradiküler dokulara irritan olmamalıdır.

7. Restoratif maddelerin pulpa odası ve kavite duvarlarına bağlanmalarını olumsuz etkilememelidir.

8. Kullanıcıya zarar vermemelidir.

9. Raf ömrü uzun olmalıdır.

10. Saklama kolaylığı olmalıdır.
11. Kanalda kolay nötrale olarak etkinliğini kaybetmemelidir.
12. Tadı ve kokusu kabul edilebilir olmalıdır.
13. Maliyeti düşük olmalıdır.

Bugüne kadar kullanılan irrigasyon solusyonları arasında asitler, şelasyon ajanları, proteolitik enzimler, alkale solüsyonlar, oksitleyici ajanlar gibi kimyasal maddeler sayılabilir. Sodyum hipoklorit (NaOCl) ve klorheksidin glukonat (CHX) günümüzde en sık kullanılan irrigasyon solüsyonları arasındadır. Oktenidin hidroklorit de endodotik irrigasyon solüsyonu olarak kullanımı önerilmiş güçlü bir antimikrobiyal ajandır.

2.3.1 Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

NaOCl endodontide kullanımı ilk defa 1936 yılında Walker tarafından önerilmiştir. NaOCl günümüzde irrigasyon solüsyonu olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Kemomekanik preparasyon esnasında organik artıklara karşı çözücü etki göstermesi, antiseptik olması, düşük yüzey gerilimi ile dentin duvarlarına kolayca diffüze olabilmesi, kolay elde edilebilmesi ve ucuz olması nedenleriyle çok fazla tercih edilen bir irrigasyon solüsyonudur.⁵⁵ NaOCl, suda sodyum (Na⁺) ve hipoklorit (OCl⁻) iyonlarına ayrışır, hipoklorik asit (HOCl) oluşturarak denge sağlar. Asidik ve nötral pH'da klor, hipoklorik asit (HOCl) formunda iken, pH 9 ve üzerindeyken hipoklorit iyonu (OCl⁻) halindedir. Antibakteriyel etkiden hipoklorik asit sorumludur ve mikroorganizmaların hücre fonksiyonlarını bozarak hücre ölümüne neden olur.^{57,58} NaOCl'in pH'sı, tamponlanmadığı zaman yaklaşık 11-12'dir.

NaOCl çoğunlukla % 0,5 ve % 5,25 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır.⁵⁹ Kuvvetli bir antimikrobiyal ajan olup direkt temas halinde çoğu bakterinin ani ölümüne neden olur. Etkili organik doku çözücü özelliği vardır. 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. NaOCl geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır. Bakterilere, sporlara, bakteriofajlara, mantarlara ve virüslere karşı etkili olduğu bilinmektedir. Bazı in vitro çalışmalarda NaOCl'in çok düşük konsantrasyonlarda bile saniyeler içerisinde mikroorganizmaları öldürebildiği gösterilirken, bazılarında ise aynı mikroorganizmaların öldürülmesi için daha uzun zaman gerektiği bildirilmiştir.^{58,60-62} Sonuçlar arasındaki farklılıkların deney koşullarından kaynaklandığı düşünülmektedir.⁶³

Smear tabakasını tek başına uzaklaştıramaması, periapikal dokulara taşırıldığı zaman toksik etki göstermesi, kötü bir tada ve kokuya sahip olması NaOCl'nin dezavantajlarıdır.⁶⁴ Ayrıca in vivo koşullarda inflamatuvar eksuda, doku artıkları ve mikrobiyal kütle gibi organik dokuların varlığı nedeniyle NaOCl'nin etkinliği azalmaktadır. NaOCl'nin klinik koşullarda yüzey teması sınırlıdır ve kök kanal sisteminin tüm ayrıntılarına ulaşamamaktadır. Bu durum da NaOCl'nin antimikrobiyal etkinliğini sınırlamaktadır.⁶⁵ İrriganın uygulama süresi ve konsantrasyonu bakterilerin elimine edebilmesinde anlamlı bir rol oynamakla birlikte, NaOCl'nin yüksek konsantrasyonlarda uzun süre kullanılması dentinin elastisitesini olumsuz etkilemektedir.^{66,67}

Endodontik irriganların nekrotik dokuyu çözme özelliği kök kanal tedavisinde büyük önem taşımaktadır. Kök kanal sistemindeki karmaşık anatomik yapısı bu konunun önemini artırmaktadır. Birçok çalışma genişletmede yararlanılan yöntem hangisi olursa olsun, kök kanal sisteminde preparasyon sonrası hiç dokunulmamış alanların varlığını göstermektedir.⁶⁸ Organik artıkların kimyasal olarak uzaklaştırılması bakteri gelişiminin önlenmesi açısından önemlidir. NaOCl, biyofilm dahil organik dokuları çözebilen tek irrigasyon solüsyonu olduğu için kök kanal tedavisinde vazgeçilmezdir.

Birçok in vitro çalışmada NaOCl'nin mikroorganizmaların biyofilm formlarını elimine etmede en etkili irrigasyon solüsyonu olduğu tespit edilmiştir.⁶⁹⁻⁷⁵

2.3.2 Klorheksidin Glukonat (CHX)

CHX, 2 tane simetrik 4-klorofenil halkası ve 2 tane biguanid grubunun ortada heksametilen zinciri ile bağlanmasıyla oluşan, sentetik katyonik bis-guanittir.

CHX pozitif yüklü hidrofobik ve lipofilik bir madde olup bakterilerin hücre zarındaki fosfolipid ve lipopolisakkaritlerle etkileşerek aktif veya pasif transport mekanizmaları ile hücre içine girer. Pozitif yüklü klorheksidin glukonat molekülü ile mikroorganizmaların hücre duvarındaki negatif yüklü fosfat gruplarının etkileşimi sonucu hücrelerin ozmotik dengesi değişir.⁷⁶

CHX geniş antimikrobiyal spektruma sahiptir. Düşük konsantrasyonlarda bakteristatik, yüksek konsantrasyonlarda bakterisid etki gösterir.⁷⁶ En önemli özelliği substantivitesinin olması yani sert dokulara bağlanarak antimikrobiyal etkisini uzun süre devam ettirmesidir.⁷⁷ Bu özelliği nedeniyle kemomekanik preparasyonu takiben son yıkamanın CHX ile yapılması önerilmektedir.⁷⁸ Ancak diğer irrigasyon solüsyonlarında olduğu gibi etkinliği pH'sına bağlıdır ve organik maddelerin varlığında azalır.⁷⁹ En büyük dezavantajı organik doku çözücü etkisinin olmamasıdır.

Planktonik mikroorganizmalar üzerinde yapılan çalışmaların bir kısmında NaOCl ile CHX arasında antimikrobiyal etkinlik açısından belirgin bir fark gözlenmezken, bir kısmında ise CHX, NaOCl'den daha etkili bulunmuştur.^{58,80-82} Ancak CHX, mikroorganizmaların biyofilm formlarının eliminasyonunda NaOCl'e göre daha az etkili bulunmuştur.^{69,71,83}

2.3.3 Oktenidin Hidroklorit

Oktenidin hidroklorit, (N,N'-(1,10-decanediyl-di-1(4H)-pyrindinyl-4-ylidene)bis-[1-octanamine] dihydrochloride) bir bispirimidin antimikrobiyal bileşiktir.

Oktenidin hidroklorit kuvvetli bir antimikrobiyal ve antiplak ajan olup ağız gargaralarının formülasyonlarında kullanılmak üzere geliştirilmiştir.⁸⁴ Oktenidin hidroklorit ayrıca yanıklarda ve yara iyileşmesini hızlandırmak için de kullanılmaktadır.^{85,86}

Yapılan testlerde oktenidin hidroklorit'in 1,6-12,2 arası pH'da stabilitesini koruduğu, ışığa duyarlı olmadığı ve 130°C de bütünlüğünü ve etkinliğini bozmadan steril olabildiği, yani değişen fiziksel ve kimyasal koşullarda stabil olduğu görülmüştür.⁸⁷ Ayrıca düşük toksisite gösterdiği ve dokularla uyumlu olduğu bildirilmiştir.^{88,89}

Geniş spektrumlu antibakteriyel, ayrıca patojenik mantar ve mayalara karşı aktif bir ajandır.^{84,90,91} Antibakteriyel ve antimikotik etkinliğini klorheksidin glukonat'a benzer şekilde gösterdiği, yani negatif yüklü hücre duvarının yapısal bütünlüğünü bozup vital fonksiyonlarını etkileyerek etkisini gösterdiği bildirilmiştir.⁹¹ Oktenidin hidroklorit'in antimikrobiyal etkinliği ve düşük toksisitesi nedeniyle irrigasyon solüsyonu olarak kullanımı önerilmektedir.

Tandjung ve ark.,⁹² Oktenidin hidroklorit'in kanal içi medikament olarak *E. faecalis*'e karşı 1 dk, 10 dk ve 7 gündeki etkinliğini değerlendirdikleri *in vitro* çalışmalarında, Oktenidin hidroklorit'in kök kanallarında 10 dk ve 7 gün bekletildiğinde etkili olduğunu bildirmişlerdir.

Tirali ve ark.,⁹³ Oktenidin hidroklorit ve NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının *E. faecalis*, *C. albicans* ve *S. aureus* üzerinde farklı sürelerdeki etkinliklerini *in vitro* olarak incelemişlerdir. Oktenidin hidroklorit'in incelenilen tüm sürelerde ve konsantrasyonlarda NaOCl'den daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Farklı özelliklerde ancak aynı amaçlar için kullanılan irrigasyon solüsyonlarının hiçbiri tek başına ideal bir irrigasyon solüsyonundan beklenen tüm özellikleri sağlayamadığı için bir yandan ideal solüsyona ulaşma çabaları devam ederken bir yandan da yeni antimikrobiyal stratejiler geliştirilmeye çalışılmaktadır.

2.4 Işıqla Aktive Olan Dezenfeksiyon Sistemi

Işıqla aktive olan dezenfeksiyon sistemi (LAD), diğere adıyla fotodinamik terapi (PDT) ya da fotodinamik antimikrobiyal kemoterapi (PACT), ışığa duyarlı maddenin yani fotosensitizer ajanın oksijen varlığında ışıklarla aktive edilmesi esasına dayanan bir medikal tedavi şeklidir. Fotosensitizer ajanın ışığa maruz bırakılması, lokal hasara ve

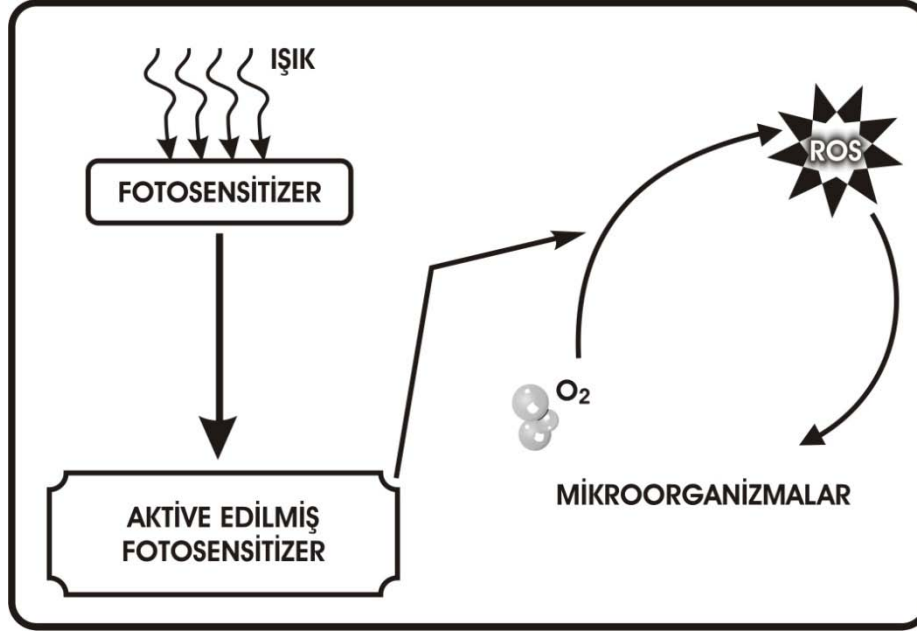
hücre ölümüne neden olan oksijen parçacıklarının ve serbest radikallerin açığa çıkması ile sonuçlanır. Klinik olarak bu olay sitotoksik ve vaskulotoksiktir.¹¹

Fotodinamik terapi çoğunlukla kanser tedavisinde kullanılmakla beraber çeşitli çalışmalarla bu tedavi yönteminin antimikrobiyal etkinliği de gösterilmektedir.⁹⁴⁻⁹⁶ Oral kanserlerin tedavisinde, ağız içi bakteriyel ve fungal enfeksiyonların tedavisinde kullanılan fotodinamik terapi uygulamaları dişhekimliğinde de hızla gelişmektedir.⁹⁷

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin, antimikrobiyal ajanlara dirençli olan mikroorganizmalara karşı alternatif bir tedavi seçeneği olabileceği düşünülmektedir. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi bakteriler, mantarlar, virüsler ve protozoalar üzerinde etkilidir. Serbest oksijen radikalleri mikrobiyal hücrelerde çeşitli hücre yapılarıyla ve farklı metabolik yollarla etkileşimde buldukları için ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemine karşı direnç gelişimi olası değildir. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi antibiyotiğe dirençli ve antibiyotiğe duyarlı bakterilere karşı eşit etkinliğe sahiptir ve tekrarlayan uygulamalar dirençli suşların gelişmesine neden olmamaktadır. Bakterilerin serbest oksijen parçacıklarının neden olduğu sitotoksik etkiye karşı direnç geliştirmeleri olası değildir.¹¹

Biyofilm içerisindeki bakteriler antibiyotiklere, antimikrobiyal ajanlara, çevresel streslere ve konak savunma mekanizmalarına karşı artmış bir dirence sahiptirler. Fotosensitizer ajanların antimikrobiyal aktiviteleri serbest oksijen molekülü aracılığı ile gerçekleşmektedir. Ayrıca serbest oksijen, yüksek kimyasal reaktivitesinden dolayı ekstrasellüler moleküller üzerinde direkt etki göstermektedir. Dolayısıyla bakteriyel biyofilmlerin ekzopolisakkarit matrikslerinde bulunan polisakkaritler de bu tedaviye duyarlıdır. Antibiyotiklerde bulunmayan bu çift yönlü etki ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin önemli bir avantajıdır. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi özellikle lokalize ağız içi enfeksiyonların tedavisinde alternatif bir tedavi olma potansiyeline sahiptir.¹¹

Fotodinamik reaksiyon; ışık kaynağı, fotosensitizer ajan ve oksijen varlığında gerçekleşmektedir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin etki mekanizması

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminde, fotosensitizer ajanı aktive etmek için spesifik dalga boyunda, düşük kuvvette ve görülebilir ışık üreten bir ışık kaynağı gereklidir. İnsan dokuları kırmızı ışığı etkili bir şekilde geçirmektedir. Fotosensitizer ajanın aktivasyonunda daha uzun dalga boyu, daha derin ışık penetrasyonu sağlamaktadır. Bu nedenle fotosensitizer ajanların çoğu 630-700 nm arasında dalga boyuna sahip kırmızı ışıkla aktive edilmektedir. 630 nm dalga boyu 0.5 cm, 700 nm dalga boyu yaklaşık 1,5 cm derinliğinde ışık penetrasyonu sağlar.^{98,99} Bu durum nekroz ve apoptozis gelişimini sınırlar ve terapötik etki oluşmasını sağlar. Geçmişte aktivasyon için kullanılan argon, KTP, Nd/YAG lazerler gibi çeşitli ışık kaynakları kompleks ve pahalı olduğundan şu anda kullanılması kolay, taşınabilir ve ucuz olan diyot lazer sistemleri tercih edilmektedir.⁹⁹ Ayrıca son zamanlarda ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinde ışık yayan diyot (light-emitting diode (LED)) ya gibi lazer olmayan ışık kaynakları kullanılmaktadır. Bu ışık kaynakları daha ucuz, daha küçük, hafif ve oldukça esnekler.

2.4.1 Işığa Duyarlı (Fotosensitizer) Ajanlar

Binlerce doğal ve sentetik fotoaktif bileşik ışığa duyarlı hale getirme potansiyeline sahiptir. İdeal bir fotosensitizer ajan toksik olmamalı, ışıkla aktive edildikten sonra sadece lokal toksisite göstermelidir. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminde kullanılan fotosensitizer ajanlar şunlardır:¹⁰⁰

1. Fenotiazin türevi boyalar [Metilen mavisi (MB) and Toluidin mavisi O (TBO; tolonium chloride)]
2. Fitalosiyanimler [aluminum disulphonated phthalocyanine ve katyonik Zn(II)-phthalocyanine]
3. Klorinler [chlorin e6, Sn (IV) chlorin e6, chlorin e6-2.5 Nmethyl-d-glucamine (BLC1010)]
4. Porfirinler (hematoporphyrin HCl, Photofrin®, ve ALA)
5. Xanthene (erythrosin)
6. Monoterpene (azulene)

Bakterilerin ışığa karşı duyarlılığının fotosensitizer ajanın yük durumuna bağlı olduğu görülmektedir. Genelde nötral veya anyonik fotosensitizerler, gram (+) bakterilere etkin bir şekilde bağlanıp inaktive ederlerken, gram (-) bakterilerin dış membranlarına bir dereceye kadar bağlanırlar ancak inaktive edemezler. Gram (+) türlerin sitoplazmik membranlarının dışındaki nispeten pöröz olan peptidoglikan ve lipoteikoik asit tabakası fotosensitizer ajanların duyarlı alanlara difüze olmasına olanak sağlar. Gram (-) bakterilerin dış membranları hücre ile çevresi arasında fiziksel ve fonksiyonel bir bariyer gibi görev görür. Negatif yüklü fotosensitizer ajanların gram (-) bakterilere bağlanması fotosensitizer ajana katyonik bir molekülün (poly-L-lysine-chlorin e6) eklenmesiyle artırılabilir.^{95,100-102}

2.4.2 Fotosan Sistemi

Fotosan, ışıkla aktive olan kimyasal ajanlar kullanılarak dental tedavilerde dezenfeksiyon yapılmasını sağlayan bir sistemdir. Fotosan sisteminin endodontide, periodontolojide, periimplantitis, perikoronitis ve çürük tedavisinde kullanım alanları vardır.

Fotosan sistemi, fotosensitizer ajan yani ışığa duyarlı madde ve LED ışık cihazından oluşmaktadır. Fotosensitizer ajanlar düşük, orta ve yüksek viskozite formunda bulunur. Tüm solüsyonlar aynı etken madde konsantrasyonuna sahiptir. Üretici firma, endodontik tedavide düşük viskoziteli fotosensitizer ajanın kullanılmasını önermektedir.

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon, ışığın kazandırdığı enerji ile harekete geçen antimikrobiyal kimyasal maddelerle tedavi prensibidir. Fotosan sisteminin prensibinde ışığa duyarlı madde mikroorganizmanın yüzeyine tutunur ve uygulanan ışığı spesifik bir spektrumda absorbe ederek enerji ile dolar. Alınan enerji mevcut oksijeni reaktif oksijen parçacıklarına ayırır. Bu reaktif oksijen parçacıkları mikroorganizmaların hücresel yapılarına saldırarak ani ölümlerine neden olur. Fotosan tedavisinin etkili olabilmesi için fotosensitizer ajanlar hedeflenen mikroorganizmalar ile temas etmelidir.

Üretici firma fotosan sisteminin sadece bakterilere karşı değil aynı zamanda virüsler, mantarlar ve tek hücreli canlılar dahil tüm mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu belirtmektedir. Uygulanan fotosensitizer ajan, memeli canlıların hücreleri ile uyumluluk gösterdiğinden, tedavinin kaydedilen hiçbir yan etkisi görülmemiştir. Anında etki göstermesi, tüm mikroorganizma türleri üzerinde etkili olması, direnç oluşturmaması, yan etkisinin olmaması, hızlı ve kolay uygulanabilir olması, konseptinin basit ve tedavi maliyetinin düşük olması fotosan sisteminin avantajlarıdır.

2.5 Biyofilm Analiz Yöntemleri

2.5.1 Direkt Analiz Yöntemleri

2.5.1.1 Işık Mikroskobu

Bu yöntem bakteriyel gözlem ve sayım için temel bir metoddur. Işık mikroskobu kullanmak için yüzeyin üst katmanı saydam olmalıdır. Bunun için örnek olabildiğince ince olmalıdır. Genelde bakteriler “kristal viyole” veya “karbol fuksin” gibi boyalar yardımı ile gözlemlenir. Biyofilimde bulunan hücreler, yoğunluklarına bağlı olarak bu yöntem ile çok etkin bir şekilde incelenemezler.

2.5.1.2 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

SEM birçok dalda araştırma-geliştirme çalışmalarında kullanımı yanında, biyolojik bilimlerde, tıp ve kriminal uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadır.

SEM'in çalışma prensibinde yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronlar örnek üzerine odaklanır. Elektron ve örnek atomları arasında oluşan çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkiler uygun algılayıcılarda toplanır. Sinyal güçlendiricilerinden geçirildikten sonra bir katot ışınları tüpünün ekranına aktarılmasıyla görüntü elde edilir. Günümüzde SEM'in ayırım gücü 0,05 nm'ye kadar inmiştir. Büyütme miktarı ise 5X - 300 000X arasında değişmektedir.

Geleneksel SEM incelemesi için örnekler iletken olmalıdır. Bu nedenle metalik olmayan örneklerin kurutulduktan sonra, vakumlu ortamda ve argon gazı varlığında kaplanmaları gereklidir. Kaplama materyali olarak genellikle altın kullanılmakla birlikte; platin, osmiyum, iridyum, tungsten, krom, grafit gibi metaller de kullanılabilir. Örnekler statik elektrik şarjını önleyecek kadar iletken olsalar dahi, çözümülemeyi artırmak ve sinyalleri kuvvetlendirmek için kaplanmaları önerilir.

Taramalı elektron mikroskobu yöntemi ile çok detaylı gözlem yapılabilen, fakat büyütme derecesinden dolayı sadece çok küçük alanlar incelenebilmektedir.

2.5.1.3 Floresan mikroskobu

Dokular, hücre veya bakteriler floresan boylarla boyanıp, UV ışınları altında floresan mikroskopta incelendiğinde, ışık saçan parlak cisimcikler halinde görülürler.

2.5.1.4 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (LSCM)

Hücreler, floresan esasına dayanan bir analiz tekniği olan konfokal lazer tarama mikroskobu ile buldukları yüzeylerden ayrılmadan incelenebilmektedir. Bu yöntem ile biyofilmin üç boyutlu yapısının incelenmesi mümkündür.

LSCM floresan boylar ile işaretlenmiş dokuların ve hücrelerin görüntülenmesini sağlar. İncelenmek istenen örnekler çeşitli floresan özellikteki boylar ile boyanmaktadır. Bu teknoloji ulaşılabilecek en yüksek ışık mikroskobu çözünürlüğü ile hücre yapısının temiz bir şekilde görüntülenmesini sağlar. Konfokal mikroskobun avantajı tek bir plandan gelen ışığı toplayabilmesidir. Objektifteki optiklerin optimal kullanımı için bir lazer ışını gönderilir. x-y yansıtma mekanizması ile bu ışın tarama ışınına çevrilir ve objektif lensi yardımıyla floresan işaretlenmiş örnek üzerindeki tek bir küçük noktaya odaklanır. Yansıtılan lazer ışını ve örnek tarafından yayılan floresan ışık karışımı aynı objektif ile tutularak dikroik ayna ile bir fotodedektör üzerine odaklanır. Floresan işaretlenmiş örnek tarafından yayılan ışık fotomultiplier tüpe gönderilirken yansıtılan ışık dikroik ayna ile ayrıştırılır. Fotodedektör önünde bulunan konfokal açıklık örnek üzerindeki tek bir noktadan yayılan floresan ışığın toplanmasını sağlar. Bu şekilde odaklanılan noktanın etrafından yayılan ışığın toplanması azaltılır. Sonuç olarak taranan örnek yüksek çözünürlükte görüntülenir. Konfokal lazer tarama mikroskobu, x,y,z yönlerinde tabakalar halinde tarama yapmaktadır ve elde edilen görüntüler bilgisayar ortamında üç boyutlu hale getirilebilmektedir. Argon, HeNe gibi lazerler ve 10X, 20X, 40X büyütme objektif lensler kullanılmaktadır.

2.5.2 İndirekt Analiz Yöntemleri

Direkt analiz yöntemlerine alternatif olarak bakteri sayısı ve biyofilm yapısı çeşitli indirekt yöntemler ile de incelenebilmektedir. Bu yöntemler; mikrobiyolojik yöntemler, radyoaktif işaretleme, CTC (5-siyano-2,3-ditolil tetrazolyum klorür) ile işaretleme, spektrofotometre, hücre sayacı ile tayin, biyokimyasal işaretleyiciler olarak sıralanabilir.

Mikrobiyolojik bir yöntem olan kültür metodu canlı bakteri sayısının tespit edilmesi için kullanılan klasik bir yöntemdir. En çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin prensibi mikroorganizmaların katı besiyerinde koloni oluşturması ve bu kolonilerin sayılarak örnekteki mikroorganizma sayısının (cfu/ml) hesaplanması şeklindedir.

Endodontik tedavide kullanılan irrigasyon solüsyonlarının ve diğer dezenfeksiyon sistemlerinin, *E. faecalis*'e karşı gösterdikleri antimikrobiyal etkinlik derecesinin belirlenmesi, kök kanal tedavisi başarısızlıklarında önemli rol oynayan bu bakteriyi elimine etme yolunda önemli bir adım olacaktır.

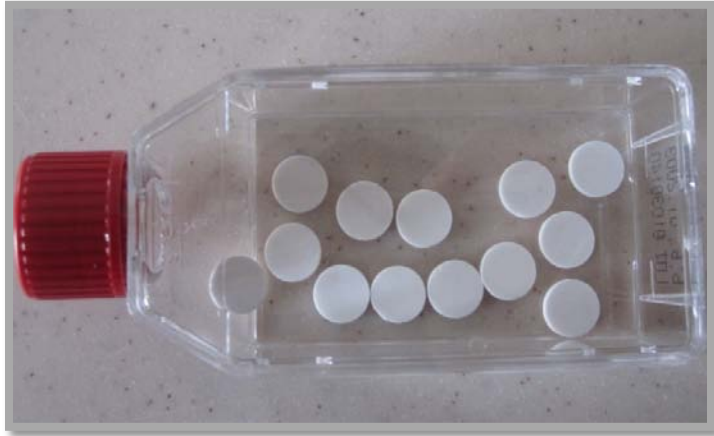
Bu çalışmanın amacı, % 5,25'lik Sodyum hipoklorit, % 2'lik Klorheksidin glukonat, % 100'lük Oktenidin hidroklorit ve iki farklı ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin (Fotosan ve metilen mavisi & diyot lazer kombinasyonu), *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin, bakteri kültür yöntemi ve lazer taramalı konfokal mikroskop ile *in vitro* olarak değerlendirilmesidir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Farklı irrigasyon solüsyonlarının ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin *Enterococcus faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerinin incelenmesinin amaçlandığı bu çalışma "Bakteri Kültür Metodu" ve "Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop" olmak üzere iki farklı yöntem kullanılarak gerçekleştirildi.

3.1 Bakteri Kültür Metodu ile Değerlendirme

Çalışmanın bu bölümü Başkent Üniversitesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bakteri Laboratuvarında gerçekleştirildi. Biyofilm oluşturmak için 9,7 mm çapında, 1,5 mm kalınlığındaki standart hidroksiapatit diskler (Clarkson Chromatography Products, Williamsport, PA, USA) kullanıldı (Şekil 3.1). Bu bölümde altı farklı çalışma grubu, 2 farklı çalışma süresi ve her bir grupta 10 disk olacak şekilde toplam 120 adet hidroksiapatit disk kullanıldı. Kullanımdan önce hidroksiapatit diskler otoklavda 121°C' de 15 dakika steril edildi. Biyofilm oluşumu, besiyeri değişimi yapılırken oluşabilecek kontaminasyon riskini en aza indirmek için ağzı dar ve vidalı bir şekilde kapanan steril hücre kültür şişeleri (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) içinde gerçekleştirildi.



Şekil 3.1 Standart hidroksiapatit diskler ve hücre kültür şişesi

3.1.1 Bakteri Süspansiyonunun Hazırlanması

Çalışmada bakteri olarak American Type Culture Collection (ATCC)'a kayıtlı standart suşlardan *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) suşu kullanıldı. Kanlı agara yoğun ekimleri yapılan *E. faecalis* suşu, 37°C' de mikroaerofilik ortamda 24 saat inkübe edilerek kültürleri hazırlandı (Şekil 3.2). Üreyen *E. faecalis* suşuyla, 4 ml serum fizyolojik solüsyonu içinde, McFarland cihazında (PhoenixSpec, BD, NJ, USA) bulanıklık değeri 0,5 olarak ayarlandı (Şekil 3.3). Daha sonra 47,5 ml Brain Heart Infusion (BHI) broth ve 2,5 ml McFarland 0,5 bulanıklık değerine sahip *E. faecalis* karıştırılarak 1/20 oranında bakteri süspansiyonu hazırlandı.



Şekil 3.2 *E. faecalis* (ATCC 29212) kültürü



Şekil 3.3 McFarland cihazı

3.1.2. Biyofilm Oluşumu

Steril edilen hidroksiapatit diskler her birinde 13 adet olacak şekilde hücre kültür şişelerine dağıtıldı. Oluşabilecek aksilikler göz önünde bulundurularak 15 şişede yedek disklerle birlikte toplam 195 disk üzerinde biyofilm oluşturuldu. Hazırlanan BHI besiyeri ve bakteri süspansiyonu karışımından 8'er ml diskleri örtecek şekilde hücre kültür

şişelerine koyuldu (Şekil 3.4). Hücre kültür şişeleri dört haftalık matür biyofilm oluşumu için 37 °C' lik etüve yerleştirildi. Bu 4 haftalık süre boyunca haftada bir besiyeri değiştirildi. Mevcut besiyerleri boş enjektörlerle çekilip yerine 8 ml taze BHI besiyeri koyuldu. Besiyeri değişimi yapılırken alınan besiyerinden kanlı agara ekim yapılarak 37°C'de etüvde 24 saat inkübe edildi ve kontaminasyon yönünden değerlendirildi. Grupların hiçbirinde *E. faecalis* dışında bir bakteri üremesi gözlenmedi.



Şekil 3.4 Besiyerinin örnekleri örtecek şekilde dağıtılması

Dört haftanın sonunda *E. faecalis* biyofilminin kolonizasyon paternini görüntülemek için disklerden 2 tanesi SEM ile incelendi. Kullanılan diskler, görüntüleme öncesinde % 4'lük gluteraldehit içerisinde 3 saat 4°C'de bekletilerek fikse edildi. Daha sonra artan konsantrasyonlardaki (% 40, % 50, % 70, % 80, % 90, % 100) etanol solüsyonlarında bekletilerek dehidratasyona maruz bırakıldı. Dehidrate örnekler oda ısısında kurutulduktan sonra altın-palladyum ile kaplandı ve SEM ile incelendi.

Görüntüleme işlemi Bilkent Üniversitesi, Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM) laboratuvarında bulunan Quanto 200 F marka (FEI Company, Eindhoven, Netherlands) SEM cihazında yapıldı.

3.1.3 Antimikrobiyal Testlerin Uygulanması

Dört haftalık *E. faecalis* biyofilmi oluşumunu takiben hücre kültür şişeleri içindeki hidroksiapatit diskler, üzerlerindeki besiyeri artıklarını ve yapışmayan bakterileri uzaklaştırmak için 3 kez 8 ml serum fizyolojik solüsyonu ile yıkandı. Daha sonra diskler her grupta 20 adet olacak şekilde 6 farklı gruba ayrıldı. Her grupta da 2 farklı çalışma süresi olup her çalışma süresi grubunda 10 tane disk olacak şekilde dağıtıldı.

Gruplarda kullanılan antimikroyal etkinliği test edilen solüsyonlar ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemleri şu şekilde sıralanmıştır:

Grup 1: Serum fizyolojik (SF), (Eczacıbaşı-Baxter, İstanbul, Türkiye)

Grup 2: % 5, 25'lik Sodyum hipoklorit (NaOCl), (Aklar Kimya, Ankara, Türkiye)

Grup 3: % 2'lik Klorheksidin glukonat (CHX), (Drogsan, Ankara, Türkiye)

Grup 4: % 100'lük Oktenidin hidroklorit, (Octenisept, Schülke & Mayr, Norderdsedt, Germany)

Grup 5: Fotosan sistemi (CMS Dental, Copenhagen, Denmark)

Grup 6: Metilen mavisi (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany) & Diyet lazer (Biolase, San Clemente, CA, USA)

Grup 1, grup 2, grup 3 ve grup 4'te antimikrobiyal etkinliği test edilen irrigasyon solüsyonları, 12 bölmeli steril hücre kültür plaklarına (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany) her bölmesinde 2ml solüsyon olacak şekilde koyuldu. Hidroksiapatit diskler hücre kültür plaklarına koyulan irrigasyon solüsyonları içerisine daldırılarak örneklerin yarısı 1 dk, diğer yarısı 5 dk süreyle solüsyonlar içinde bekletildi (Şekil 3.5).



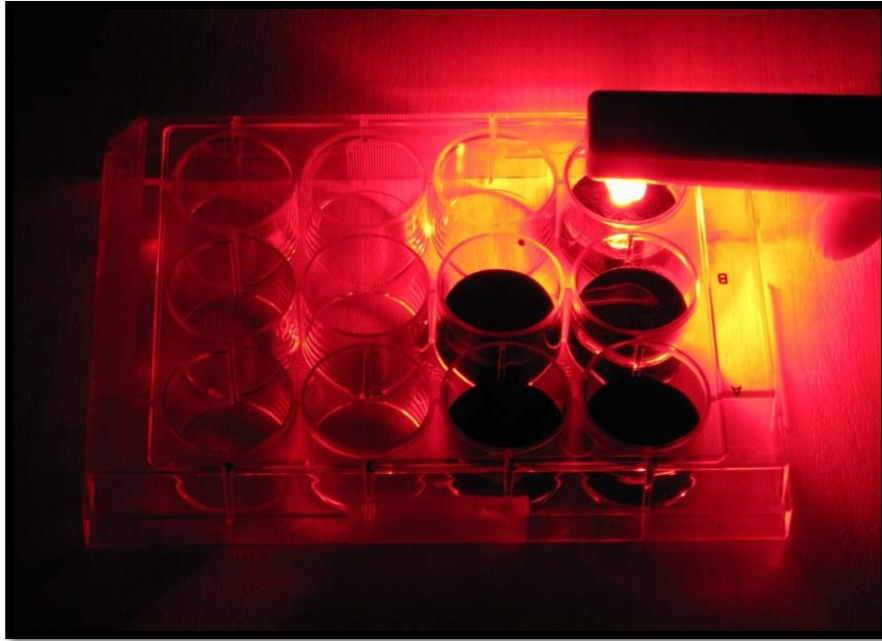
Şekil 3.5 Disklerin antimikrobiyal solüsyon içinde bekletilmesi

Grup 5'te Fotosan sisteminin (Şekil 3.5) antimikrobiyal etkinliği test edildi. Sistem içinde bulunan düşük viskoziteli fotosensitizer ajana maruz bırakılan diskler üretici firmanın talimatları doğrultusunda 30 sn yine sistem içinde yer alan LED ışık cihazı ile ışınlandı (Şekil 3.6). Çalışma süresi 1 dk olan gruptaki diskler fotosensitizer ajana daldırıldıktan hemen sonra alt ve üst yüzeyleri ayrı ayrı 30 sn ışınlandı. Totalde diskler fotosensitizer ajan içinde 1 dk bekletilmiş oldu. Çalışma süresi 5 dk olan gruptaki diskler fotosensitizer ajana daldırılıp 4 dk bekletildi. Daha sonra disklerin alt ve üst yüzeyleri ayrı ayrı 30 sn ışınlandı. Bu grupta da diskler fotosensitizer ajan içinde totalde 5 dk bekletilmiş oldu.

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin kullanıldığı gruplarda, işlemler fotosensitizer ajanların güneş ışığından etkilenmemesi için karanlık odada gerçekleştirildi.



Şekil 3.6 Fotosan sistemi



Şekil 3.7 Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan'ın uygulanması

Grup 6'da antimikrobiyal etkinliği test edilen ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminde fotosensitizer ajan olarak metilen mavisi, ışık kaynağı olarak da 665 nm dalga boyuna, 30 J/cm² enerji seviyesine sahip, 40 mW/cm² gücünde diyot lazer kullanıldı (Şekil 3.7). Toz formunda bulunan metilen mavisi, konsantrasyonu 50 µg/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirildi.

Fotosan sisteminde olduğu gibi çalışma süresi 1 dk olan grupta diskler metilen mavisi içine daldırıldıktan hemen sonra alt ve üst yüzeyleri ayrı ayrı 30 sn ışınlandı. Totalde diskler metilen mavisi içerisinde 1 dk bekletilmiş oldu. Çalışma süresi 5 dk olan grupta diskler metilen mavisine daldırılıp 4 dk bekletildi. Daha sonra disklerin alt ve üst yüzeyleri ayrı ayrı 30 sn ışınlandı. Bu grupta da diskler metilen mavisi içinde totalde 5 dk bekletilmiş oldu.



Şekil 3.8 Diyot lazerin uygulanması

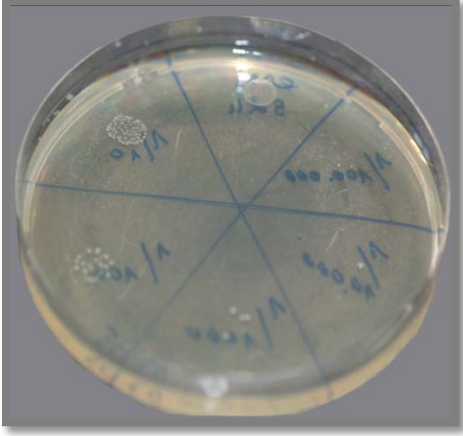
3.1.4 Antimikrobiyal Etkinlik ve Canlı Bakteri Sayısının Değerlendirilmesi

Antimikrobiyal testler uygulandıktan sonra diskler, solüsyonların antimikrobiyal etkilerini durdurmak için serum fizyolojik solüsyonu ile yıkandı ve her disk içinde 2 ml Triptik Soy Broth (TSB) bulunan tüplere yerleştirildi. Daha sonra bu tüpler disklerin üzerindeki yapışık bakterileri (biyofilmleri) sökmek için ultrasonik su banyosunda (WiseClean, Daihan Scientific Co., Seoul, Korea) (Şekil 3.8) 1 dk bekletildi.



Şekil 3.9 Ultrasonik su banyosu

Sonikatörden çıkarılan tüplerdeki süspansiyonlardan 5 kez 10 katlı seri dilüsyonlar (1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000, 1/100000) hazırlandı. Örneklerdeki canlı bakteri sayısını belirlemek için hazırlanan dilüsyonlardan 0,01'er ml alınarak Triptik Soy Agar (TSA)'a ekimler yapıldı. 37 °C'lik etüvde 24 saat inkübe edildi. Bu süre sonunda besiyeri üzerinde oluşan bakteri kolonileri sayıldı (Şekil 3.9). Koloni sayıları kullanılarak gerçek bakteri sayısı cfu/ml olarak hesaplandı.



Şekil 3.10 TSA'daki *E. faecalis* kolonileri

3.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop ile Değerlendirme

Çalışmanın bu bölümünde irrigasyon solüsyonlarının ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin etkinliği LSCM kullanılarak değerlendirildi. Her grupta 5 adet disk olacak şekilde toplam 60 adet disk üzerinde *E. faecalis* biyofilmi oluşturuldu. Gerek biyofilm oluşumunda, gerekse antimikrobiyal testlerin uygulanmasında ilk bölümde anlatılan prosedürlerin tamamen aynısı uygulandı.

Örnekler LSCM'de analiz edilmeden önce serum fizyolojik solüsyonuyla yıkandı. Daha sonra diskler BacLight LIVE/DEAD Bacterial Viability kit (Invitrogen Ltd,

Paisley, UK) içindeki SYTO 9 ve Propidium Iodide floresan boya ları ile boyandı. Boya ları üretici firmanın talimatları doğrultusunda karıştırıldı. -20°C'de ışık görmeyecek şekilde muhafaza edilen boya ların ısı oda sıcaklığına ulaştıktan sonra örnekler üzerine uygulandı. Oda sıcaklığında karanlık bir ortamda 15 dk bekletildikten sonra boya artıklarının uzaklaştırılması için diskler serum fizyolojik solüsyonu ile tekrar yıkandı.

Örnekler üzerindeki canlı ve ölü bakteri hücrelerini görüntülemek ve analizini yapmak için Bilkent Üniversitesi, UNAM laboratuvarında bulunan LSCM (ZEISS LSM 510 META, ZEISS GmbH, Jena, Germany) (Şekil 3.10) kullanıldı. Her bir örnek üzerinde 2 farklı bölgeden görüntü alındı ve analiz edildi. SYTO 9 ve Propidium Iodide boya ları için kullanılan maximum eksitasyon 488 nm iken, maximum emisyon SYTO 9 için 510 nm, Propidium Iodide için 635 nm'dir. Yeşil ve kırmızı floresanları görebilmek için eş zamanlı iki kanallı görüntüleme kullanıldı. Görüntüler 20X büyütmede alındı.



Şekil 3.11 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (ZEISS LSM 510 META)

Elde edilen görüntülerin analizi Image J yazılım programı kullanılarak yapıldı. Bu programla kırmızı renkte görünen ölü bakteri hücreleri ile yeşil renkte görünen total bakteri hücrelerinin volümetrik yoğunluğu hesaplandı. Elde edilen sonuçlarla ölü hücre yoğunluğunun toplam hücre yoğunluğuna oranı hesaplandı.

3.3 İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS 11.5 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) paket programında yapıldı. Sürekli değişkenlerin dağılımının normale yakın olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile araştırıldı. Varyansların homojenliği ise Levene testiyle incelendi. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, ortanca, en küçük ve en büyük olarak gösterildi.

Araştırma grupları arasında canlı mikroorganizma sayısı ve ölü hücre oranları yönünden farkın önemliliği Kruskal Wallis testiyle incelenirken, gruplar içindeki uygulama süreleri arasındaki farkın önemliliği ise Mann Whitney U testiyle değerlendirildi. Kruskal Wallis test istatistiğinin anlamlı bulunması halinde Conover'ın parametrik olmayan çoklu karşılaştırma testi kullanılarak farka neden olan durumlar belirlendi. 2 farklı yöntemle tespit edilen canlı mikroorganizma sayısı ve ölü hücre oranları arasında anlamlı ilişkinin olup olmadığı Spearman'ın Korelasyon testi kullanılarak araştırıldı.

$p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Ancak, olası tüm çoklu karşılaştırmalarda Tip I hatayı kontrol edebilmek için Bonferroni Düzeltmesi yapıldı.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 4 farklı irrigasyon solüsyonunun ve 2 farklı ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin, 2 farklı uygulama süresindeki antimikrobiyal etkinlikleri, 2 farklı yöntem kullanılarak değerlendirilmiştir.

4.1 Bakteri Kültür Metoduna Ait Bulgular

Tablo 4.1’de, test edilen antimikrobiyal ajanlar, uygulama süreleri ve canlı mikroorganizma sayılarına (cfu/ml) ait ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı bakteri sayılarına (cfu/ml) ait tanımlayıcı istatistikler

Gruplar	Süre	Ortalama	Std. Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
SF	1 dk	144000,00	25854,29	140000,00	104000,00	184000,00
	5 dk	136000,00	21333,33	136000,00	96000,00	168000,00
NaOCl	1 dk	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	5 dk	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
CHX	1 dk	8000,00	1995,55	8000,00	4800,00	11200,00
	5 Dk	4800,00	2385,14	4800,00	1600,00	8000,00
Oktenisept	1 dk	3200,00	1995,55	3200,00	1600,00	8000,00
	5 dk	3200,00	1995,55	3200,00	0,00	6400,00
Fotosan	1 dk	64000,00	11586,97	61600,00	48000,00	88000,00
	5 dk	48000,00	8924,37	48800,00	35200,00	64000,00
Diyot lazer	1 dk	48000,00	7580,09	48000,00	36800,00	57600,00
	5 dk	40000,00	4649,49	39200,00	33600,00	48000,00

Uygulama süresi 1 dk olan gruplar arasındaki canlı mikroorganizma sayısına ilişkin farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.2, Şekil 4.1):

- En fazla canlı mikroorganizma sayısı kontrol grubu SF'de görülürken, NaOCl grubunda ise örneklerin hiçbirinde mikroorganizma üremesi gözlenmemiştir.

- NaOCl, CHX, Oktenisept ve Diyot lazer gruplarındaki canlı mikroorganizma sayıları kontrol grubu SF'e göre istatistiksel olarak daha az bulundu ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p=0,005$).

- Kontrol grubu SF ve Fotosan grubu arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,096$).

- CHX, Fotosan ve Diyot lazer gruplarında NaOCl grubuna göre canlı mikroorganizma sayıları istatistiksel olarak daha fazladır ($p=0,004$; $p<0,001$ ve $p<0,001$).

- NaOCl grubu ile Oktenisept grubu arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,112$).

- Fotosan ve Diyot lazer gruplarında CHX grubuna göre canlı mikroorganizma sayısı daha fazladır ($p=0,004$ ve $p<0,05$).

- CHX ve Oktenisept gruplarında canlı mikroorganizma sayıları istatistiksel olarak benzer bulundu ($p=0,178$).

- Fotosan ve diyot lazer gruplarında Oktenisept grubuna göre canlı mikroorganizma sayısı istatistiksel olarak daha fazladır ($p<0,001$ ve $p=0,003$).

- Fotosan ve Diyot lazer grupları arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,231$).

Uygulama süresi 5 dk olan gruplar arasındaki canlı mikroorganizma sayısına ilişkin farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.2, Şekil 4.1):

- Bir dk uygulama süresine sahip gruplardakine benzer şekilde 5 dk uygulama süresi sonunda da en fazla canlı mikroorganizma sayısı kontrol grubu SF'de görülürken, NaOCl grubunda ise örneklerin hiçbirinde mikroorganizma üremesi gözlenmemiştir.

- NaOCl, CHX, Oktenisept ve Diyot lazer gruplarındaki canlı mikroorganizma sayıları kontrol grubu SF'e göre istatistiksel olarak daha az bulundu ($p<0,001$; $p<0,001$; $p<0,001$ ve $p=0,009$).

- Kontrol grubu SF ve Fotosan grubu arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,067$).

- CHX, Fotosan ve Diyot lazer gruplarında NaOCl grubuna göre canlı mikroorganizma sayıları istatistiksel olarak daha fazladır ($p=0,015$; $p<0,001$ ve $p<0,001$).

- NaOCl grubu ile Oktenisept grubu arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,069$).

- Fotosan ve Diyot lazer gruplarında canlı mikroorganizma sayısı CHX grubuna göre istatistiksel olarak daha fazladır ($p=0,002$ ve $p=0,023$).

- CHX ve Oktenisept gruplarında canlı mikroorganizma sayıları istatistiksel olarak benzer bulundu ($p=0,513$).

- Fotosan ve diyot lazer gruplarında Oktenisept grubuna göre canlı mikroorganizma sayısı istatistiksel olarak daha fazladır ($p<0,001$ ve $p=0,004$).

- Fotosan ve Diyot lazer grupları arasında canlı mikroorganizma sayıları bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p=0,394$).

Grupların kendi içinde canlı mikroorganizma sayısı bakımından uygulama süreleri arasındaki farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.2, Şekil 4.2):

- Kontrol grubu SF içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında canlı mikroorganizma sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,529$).

- NaOCl grubunda 1 ve 5 dk uygulama sürelerinin hiçbirinde bakteri üremesi gözlenmedi.

- CHX grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında canlı mikroorganizma sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,009$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p>0,0083$).

- Oktenisept grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında canlı mikroorganizma sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,853$).

- Fotosan grubu içerisinde 5 dk uygulama süresi sonunda görülen canlı mikroorganizma sayısı 1dk'ya göre istatistiksel anlamlı olarak daha azdı ($p=0,003$).

- Diyot lazer grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında canlı mikroorganizma sayısı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,023$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p>0,0083$).

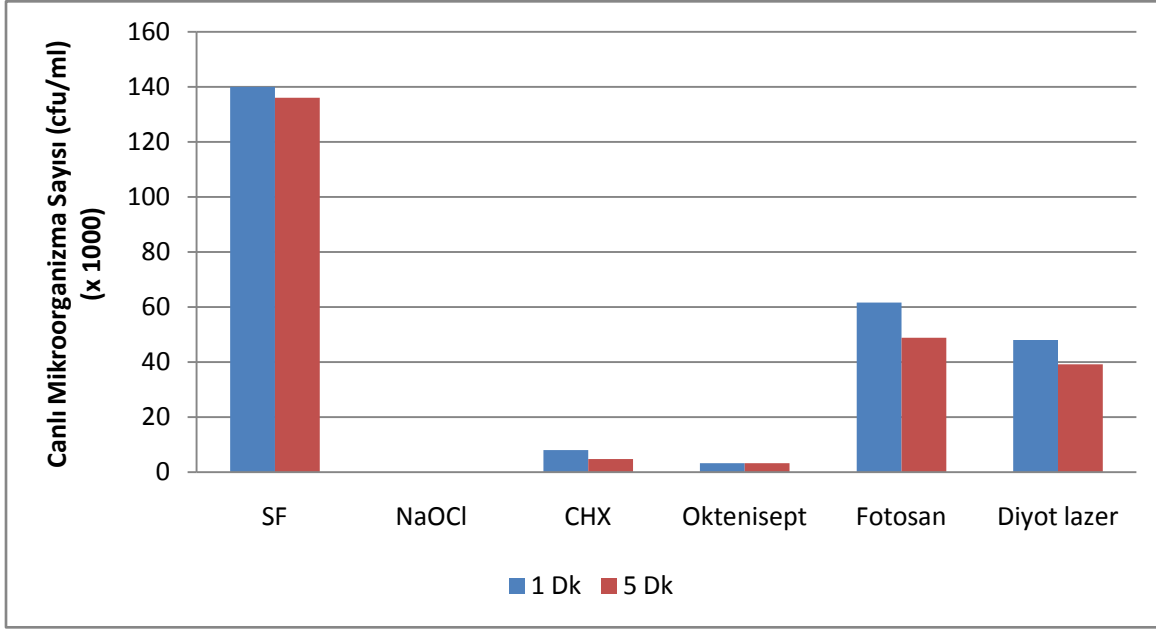
Tablo 4.2 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı bakteri sayılarının (cfu/ml) dağılımı

<u>Canlı bakteri sayısı (cfu/ml)</u>		
Gruplar	1 dk	5 dk
SF (Kontrol)	140,0 (44,0)×10 ³ Aa	136,0 (34,0)×10 ³ Aa
NaOCl	0,0 (0,0)Bb	0,0 (0,0) Bb
CHX	8,0 (3,2)×10 ³ Cc	4,8 (4,0)×10 ³ Cc
Oktenisept	3,2 (2,0)×10 ³ BCd	3,2 (3,2)×10 ³ BCd
Fotosan	61,6 (16,8)×10 ³ AD	48,8 (15,2)×10 ³ DA
Diyot lazer	48,0 (14,8)×10 ³ De	39,2 (7,2)×10 ³ De

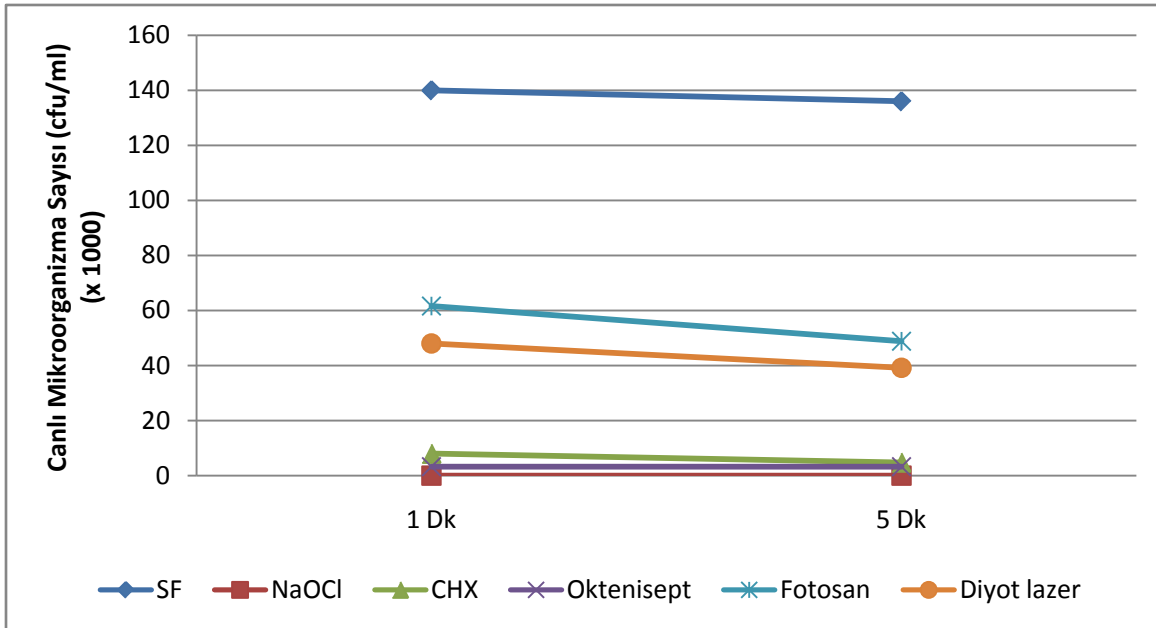
Veriler ortanca (çeyrekler arası genişlik) olarak gösterildi

Sütunlarda aynı büyük harflerin gösterildiği gruplar arasında Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,025)

Satırlarda aynı küçük harflerin gösterildiği uygulama süreleri arasında Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (p>0,0083)



Şekil 4.1 Gruplara ve uygulama sürelerine göre canlı mikroorganizma sayılarının dağılımı



Şekil 4.2 Gruplarda uygulama süresine bağlı canlı mikroorganizma sayısındaki değişim

4.2 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop Analizine Ait Bulgular

Tablo 4.3'de test edilen antimikrobiyal ajanlar, uygulama süreleri ve uygulandıktan sonra ölü hücre / total hücre oranlarına ait ortalama, standart sapma, ortanca, minimum ve maksimum değerleri gösterilmiştir.

Tablo 4.3 Gruplara ve uygulama sürelerine göre volümetrik olarak ölü bakteri hücrelerinin total bakteri hücrelerine oranlarına ait tanımlayıcı istatistikler

Gruplar	Süre	Ortalama	Std. Sapma	Ortanca	Minimum	Maksimum
SF	1 dk	0,03	0,014	0,03	0,01	0,06
	5 dk	0,05	0,012	0,05	0,02	0,06
NaOCl	1 dk	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
	5 dk	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00
CHX	1 dk	0,30	0,087	0,28	0,19	0,46
	5 dk	0,46	0,134	0,46	0,25	0,65
Oktenisept	1 dk	0,38	0,088	0,40	0,26	0,50
	5 dk	0,48	0,113	0,49	0,29	0,63
Fotosan	1 dk	0,11	0,026	0,09	0,09	0,16
	5 dk	0,11	0,027	0,09	0,09	0,16
Diyot lazer	1 dk	0,10	0,026	0,09	0,07	0,16
	5 dk	0,11	0,027	0,10	0,09	0,16

Uygulama süresi 1 dk olan gruplar arasındaki ölü hücre / total hücre oranlarına ilişkin farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.4, Şekil 4.3):

- Bu yöntemde 1 dk uygulama süresine sahip gruplarda en az ölü hücre oranı kontrol grubu SF'de görülürken, en fazla ölü hücre oranı NaOCl grubunda görülmüştür.

- NaOCl, CHX, Oktenisept ve Fotosan gruplarındaki ölü hücre oranı kontrol grubu SF'e göre istatistiksel olarak daha fazladır ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ ve $p = 0,023$).

- Kontrol grubu SF ve Diyet lazer grubu arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,028$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p > 0,025$).

- CHX, Fotosan ve Diyet lazer gruplarında NaOCl grubuna göre ölü hücre oranı istatistiksel olarak daha azdır ($p = 0,010$; $p < 0,001$ ve $p < 0,001$).

- NaOCl grubu ile Oktenisept grubu arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,060$).

- Fotosan ve Diyet lazer gruplarında CHX grubuna göre ölü hücre oranı daha düşük bulundu ($p = 0,010$ ve $p = 0,009$).

- CHX ve Oktenisept gruplarında ölü hücre oranı istatistiksel olarak benzer bulundu ($p = 0,456$).

- Fotosan ve Diyet lazer gruplarında Oktenisept grubuna göre ölü hücre oranı istatistiksel olarak daha düşüktür ($p < 0,001$ ve $p < 0,001$).

- Fotosan ve Diyet lazer grupları arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,939$).

Uygulama süresi 5 dk olan gruplar arasındaki ölü hücre / total hücre oranlarına ilişkin farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.4, Şekil 4.3):

- Beş dk uygulama süresine sahip gruplarda en az ölü hücre oranı kontrol grubu SF'de görülürken, en fazla ölü hücre oranı NaOCl grubunda görülmüştür.

- NaOCl, CHX, Oktenisept ve Diyet lazer gruplarındaki ölü hücre oranı kontrol grubu SF'e göre istatistiksel olarak daha fazladır ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p < 0,001$ ve $p = 0,022$).

- Kontrol grubu SF ve Fotosan grubu arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,029$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p > 0,025$).

- CHX, Fotosan ve Diyet lazer gruplarında NaOCl grubuna göre ölü hücre oranı istatistiksel olarak daha düşük bulundu ($p = 0,020$; $p < 0,001$ ve $p < 0,001$).

- NaOCl grubu ile Oktenisept grubu arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,032$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p > 0,025$).

- Fotosan ve Diyet lazer gruplarında CHX grubuna göre ölü hücre oranı daha düşük bulundu ($p = 0,004$ ve $p = 0,005$).

- CHX ve Oktenisept gruplarında ölü hücre oranı istatistiksel olarak benzer bulundu ($p = 0,855$).

- Fotosan ve Diyet lazer gruplarında Oktenisept grubuna göre ölü hücre oranı istatistiksel olarak daha düşüktür ($p = 0,002$ ve $p = 0,003$).

- Fotosan ve Diyet lazer grupları arasında ölü hücre oranı bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p = 0,903$).

Tablo 4.4 Gruplara ve uygulama sürelerine göre volümetrik olarak ölü bakteri hücrelerinin toplam bakteri hücrelerine oranlarının dağılımı

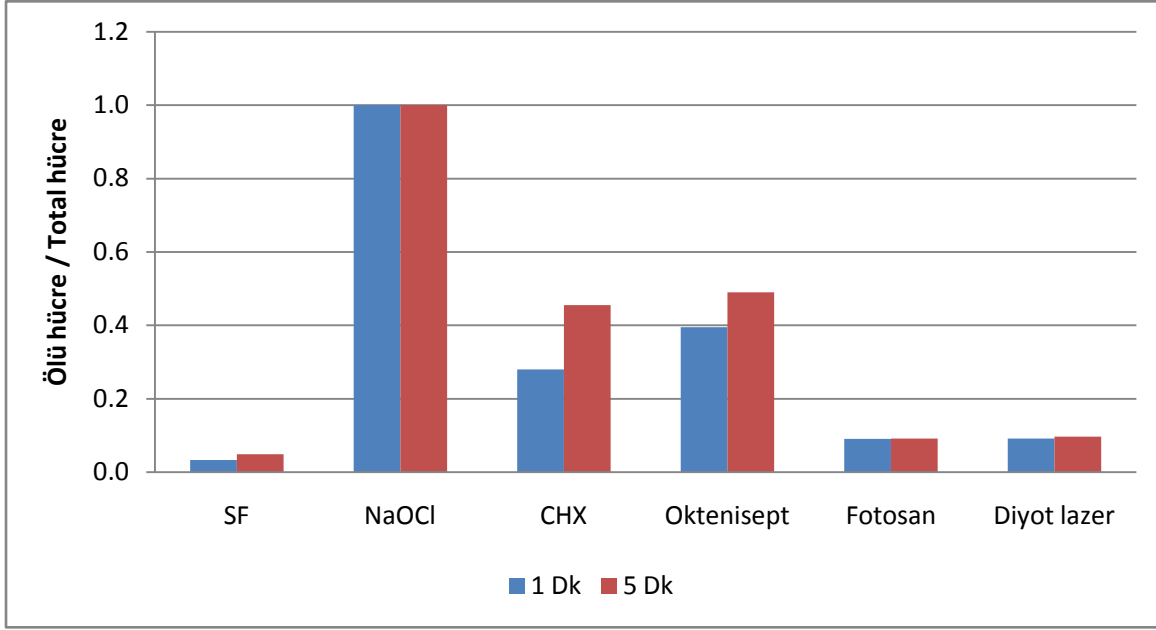
Ölü hücre / Total hücre

Gruplar	1 dk	5 dk
SF (Kontrol)	0,033 (0,019)Aa	0,049 (0,017)Ea
NaOCl	1,0 (0,0)Bb	1,0 (0,0)Bb
CHX	0,280 (0,115)Cc	0,455 (0,232)Cc
Oktenisept	0,395 (0,180)BCd	0,490 (0,172)BCd
Fotosan	0,091 (0,036)De	0,092 (0,039)DEe
Diyot lazer	0,092 (0,035)ADf	0,097 (0,046)Df

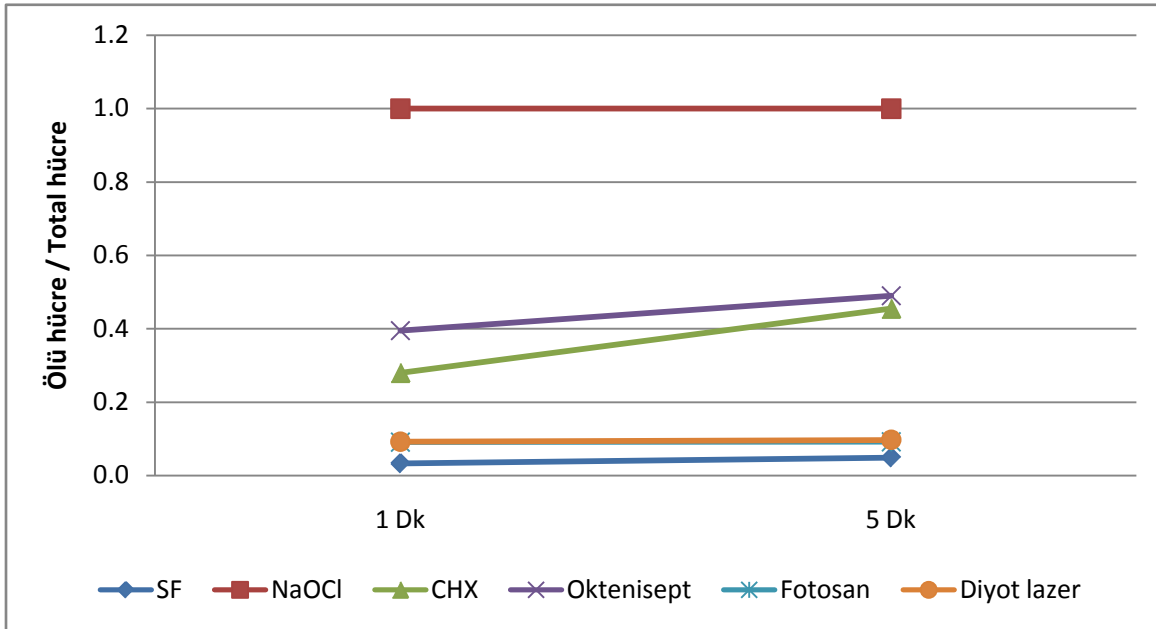
Veriler ortanca (çeyrekler arası genişlik) olarak gösterildi

Sütunlarda aynı büyük harflerin gösterildiği gruplar arasında Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,025$)

Satırlar ise aynı küçük harflerin gösterildiği bekleme zamanları arasında Bonferroni Düzeltmesine göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır ($p>0,0083$)



Şekil 4.3 Gruplara ve uygulama sürelerine göre ölü hücre / total hücre oranlarının dağılımı



Şekil 4.4 Gruplarda uygulama süresine göre değişen ölü hücre / total hücre oranı

Grupların kendi içinde ölü hücre / total hücre oranı bakımından uygulama süreleri arasındaki farklılıklar şu şekildedir (Tablo 4.4, Şekil 4.4)

- Kontrol grubu SF içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,063$).

- NaOCl grubunda 1dk ile 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=1,000$).

- CHX grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,015$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p>0,0083$).

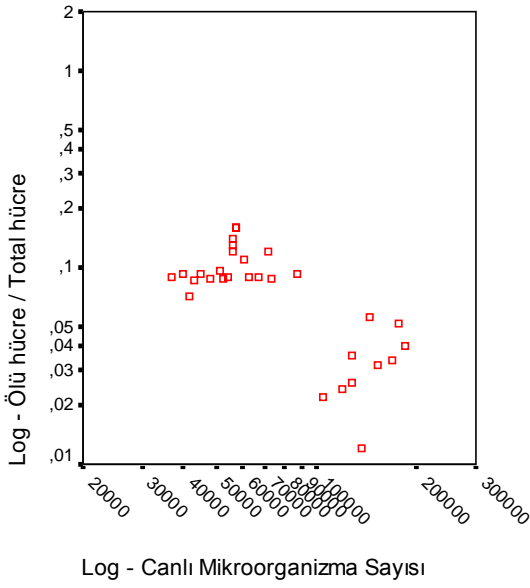
- Oktenisept grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,035$; Bonferroni Düzeltmesine göre $p>0,0083$).

- Fotosan grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,912$).

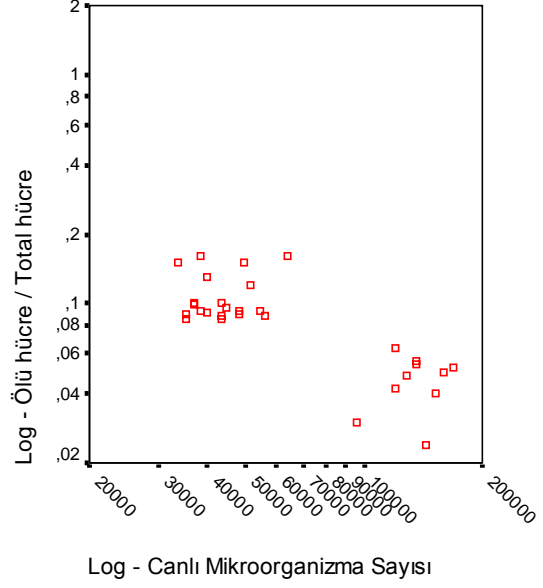
- Diyet lazer grubu içerisinde 1 dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında ölü hücre oranı yönünden istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı ($p=0,529$).

Antimikrobiyal testlerin 1 dk süreyle uygulandığı örneklerde canlı mikroorganizma sayıları ile ölü hücre / total hücre oranları arasında negatif yönlü istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($r=-0,919$ ve $p<0,001$) (Şekil 4.5a).

Antimikrobiyal testlerin 5 dk süreyle uygulandığı örneklerde de canlı mikroorganizma sayıları ile ölü hücre / total hücre oranları arasında negatif yönlü istatistiksel olarak anlamlı korelasyon bulundu ($r=-0,916$ ve $p<0,001$) (Şekil 4.5b).



(a)



(b)

Şekil 4.5 a) 1 dk uygulama süresine sahip örnekler içerisinde canlı mikroorganizma sayısı ile ölü hücre / total hücre oranı arasında deneklerin saçılımı **b)** 5 dk uygulama süresine sahip örnekler içerisinde canlı mikroorganizma sayısı ile ölü hücre / total hücre oranı arasında deneklerin saçılımı

Şekil 4.6'da oluşturulan *E. faecalis* biyofilminin SEM görüntüsü, Şekil 4.9'da ise 3 boyutlu LSCM görüntüsü mevcuttur. SEM'de; disk yüzeyinin, içinde mikroorganizmaların gömülü olduğu düzensiz bir tabaka ile kaplı olduğu görülmektedir.

LSCM ile elde edilen görüntülerde kontrol grubu SF'de örneklerin yoğun bir şekilde canlı hücrelerle (yeşil hücre) kaplı olduğu, alt tabakalarda çok az miktarda ölü hücrelerin bulunduğu gözlemlendi (Şekil 4.10)

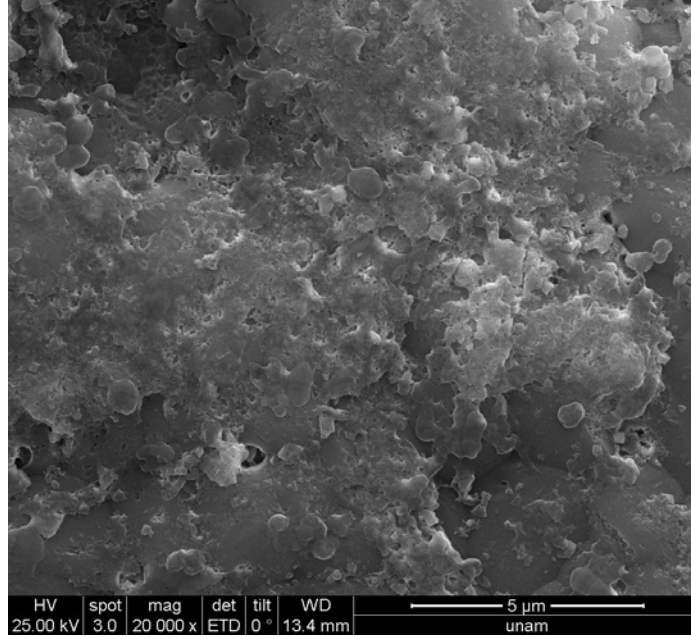
NaOCl grubunda yüzeyde çok az miktarda ölü hücre (kırmızı hücre) tespit edildi. % 5,25'lik NaOCl' in her iki çalışma süresinde de bakterileri tümüyle öldürürken aynı zamanda çok büyük oranda yüzeyden uzaklaştırdığı gözlemlendi (Şekil 4.11). SEM'de

NaOCl grubundaki disklerin yüzeyinde mikroorganizma tespit edilemedi. Orijinal disk yüzeyine benzer bir görüntü elde edildi (Şekil 4.7).

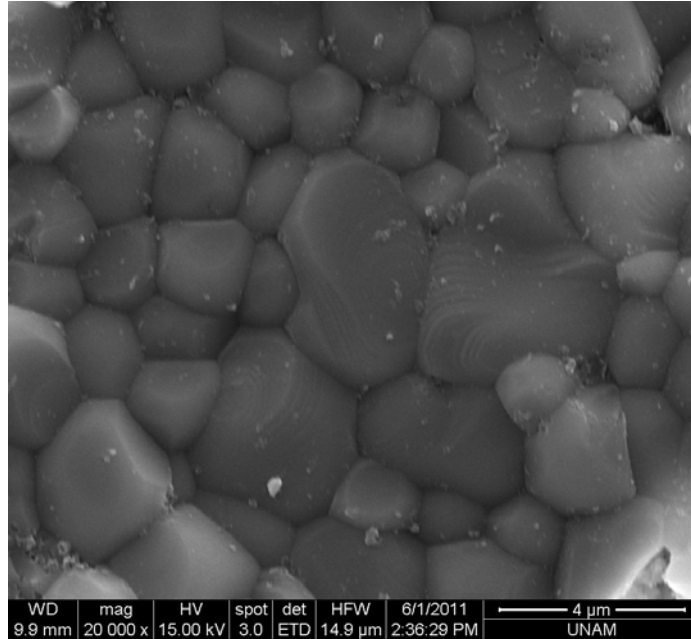
LSCM'de CHX ve Oktenisept gruplarına ait görüntülerde kontrol grubuna göre örnekler üzerindeki hücre yoğunluğundaki azalma dikkat çekmektedir. Görüntülerde Oktenisept ve CHX gruplarındaki ölü hücre oranları benzer görüldü. Her iki solüsyonun da *E. faecalis* biyofilmini bir miktar yüzeyden uzaklaştırdığı gözlemlendi (Şekil 4.12, 4.15). Şekil 4.8'de Oktenisept solüsyonu içerisinde 1 dk bekletilen bir örneğe ait SEM görüntüsünde yüzeydeki mikrobiyal tabakanın bozulduğu ve tek veya zincirler halinde bulunan bakteri hücrelerinin varlığı görülmektedir.

İstatistiksel olarak Oktenisept grubu ile NaOCl arasında fark bulunmamasına karşın görüntülerde % 100'lük Oktenisept'in *E. faecalis* biyofilmini yüzeyden uzaklaştırmada ve öldürmede % 5,25'lik NaOCl kadar etkili olmadığı tespit edildi.

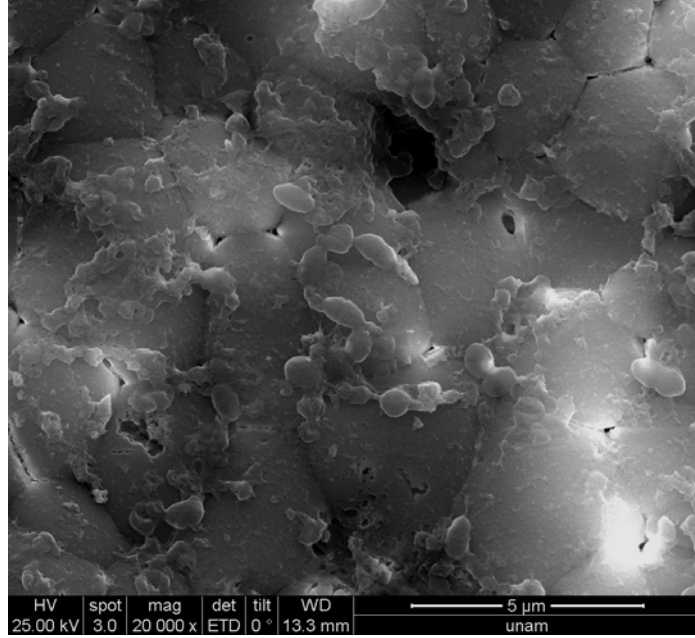
Fotosan ve Diyot lazer gruplarına ait LSCM görüntülerinde kontrol grubuna göre yüzeydeki hücre yoğunluğunda az bir miktar azalma gözlemlendi. Her iki grupta da tespit edilen ölü hücre oranı oldukça azdı. Her iki grubun da *E. faecalis* biyofilmi üzerinde etkisiz olduğu görüldü (Şekil 4.13, 4.14).



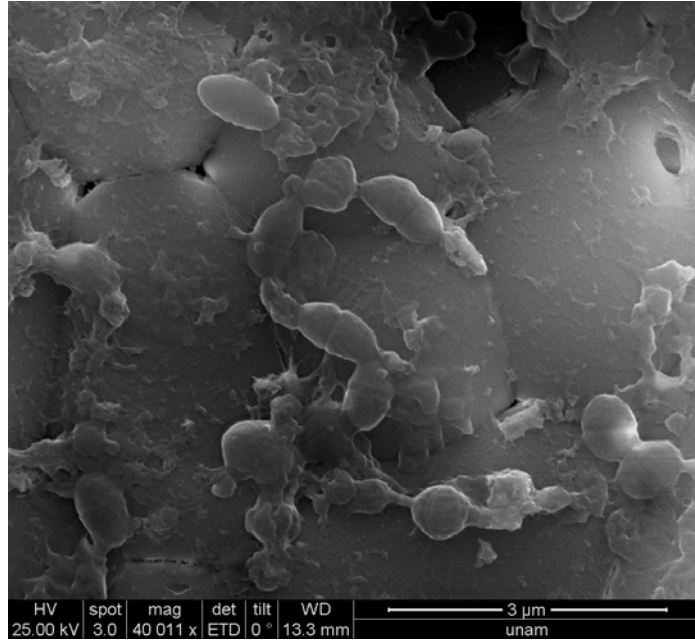
Şekil 4.6 Hidroksiapatit disk üzerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilminin 20000X büyütmedeki SEM görüntüsü



Şekil 4.7 % 5,25'lik NaOCl içinde 5 dk bekletilmiş bir örneğe ait 20000X büyütmede SEM görüntüsü

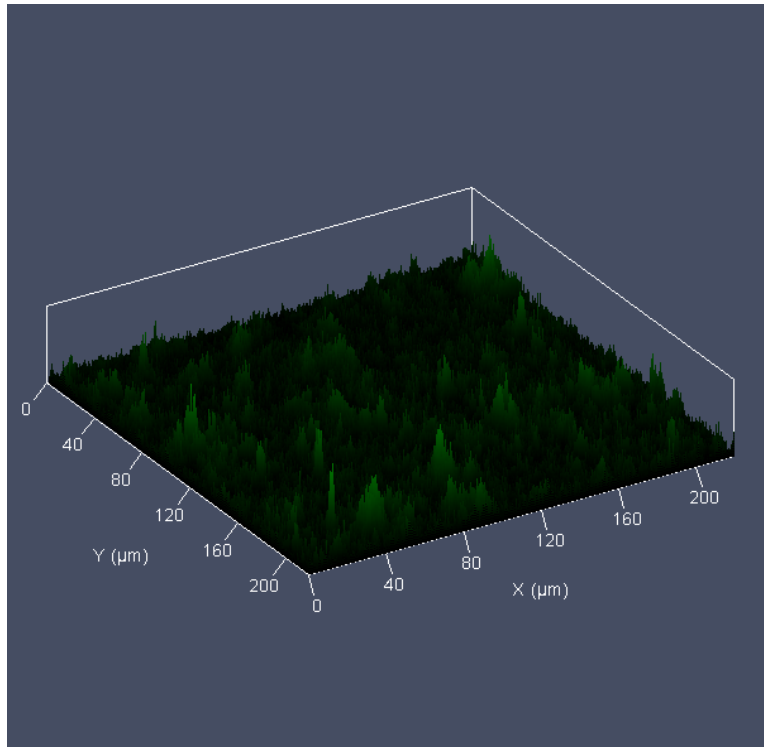
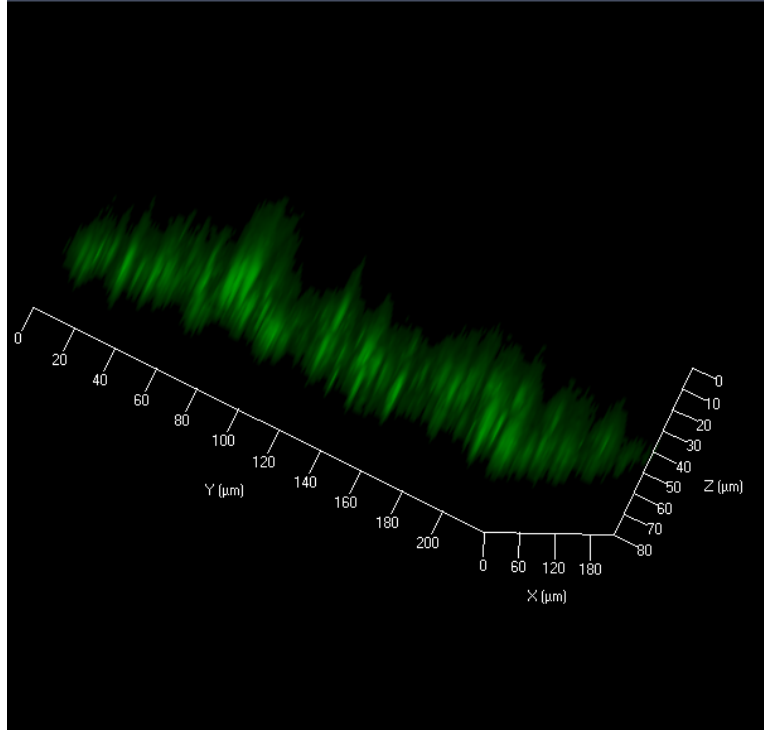


(a)

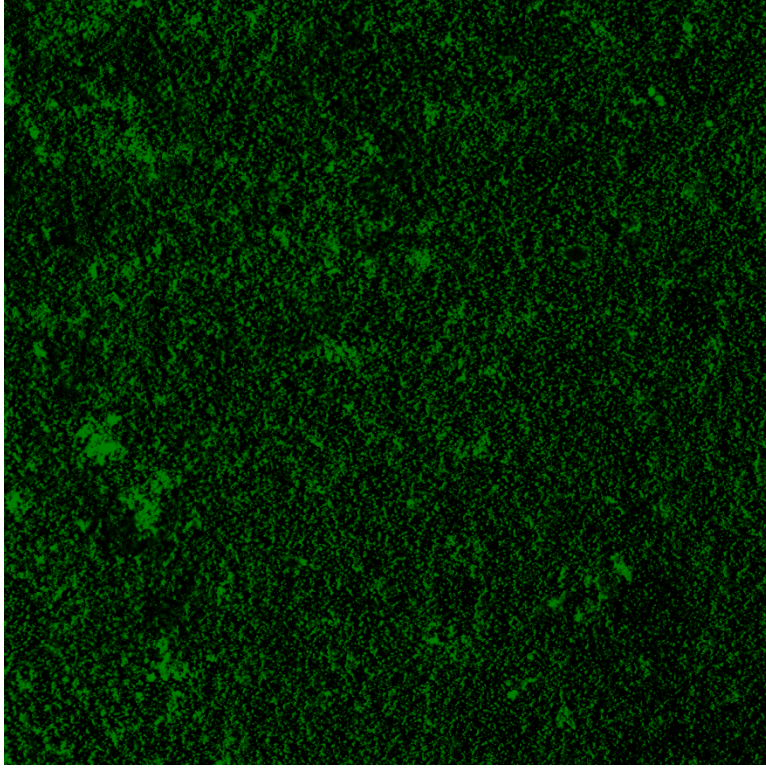


(b)

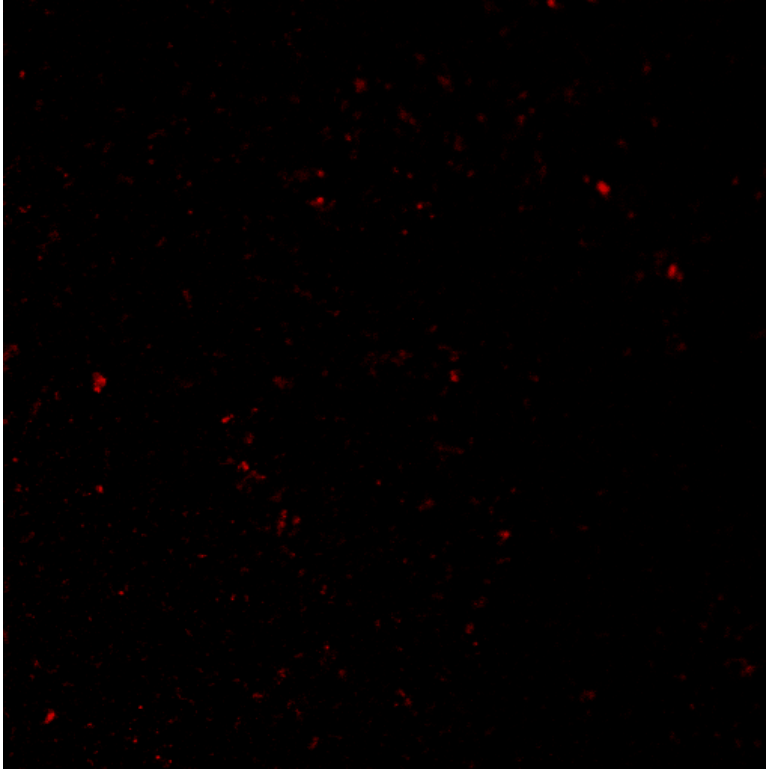
Şekil 4.8 % 100'lük Oktenisept solüsyonu içinde 1 dk bekletilmiş bir örneğe ait
a) 20000X büyütmedeki SEM görüntüsü **b)** 40000X büyütmedeki SEM görüntüsü



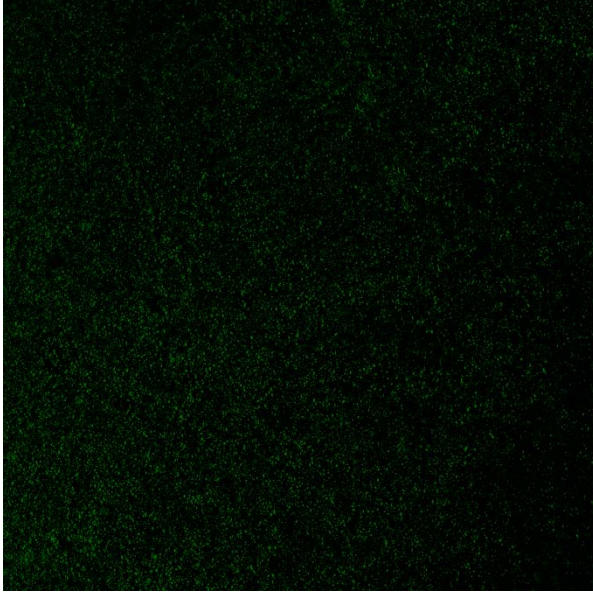
Şekil 4.9 Hidroksiapatit disk üzerinde oluşturulan *E. faecalis* biyofilminin 3 boyutlu LSCM görüntüleri



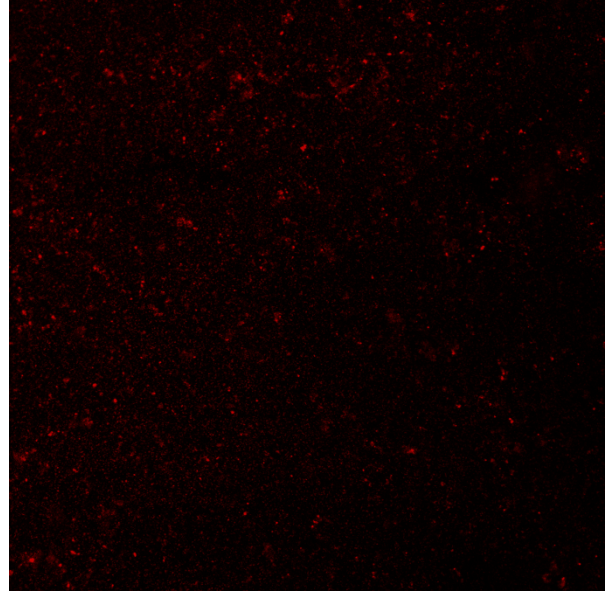
Şekil 4.10 Serum Fizyolojik içinde 5 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü



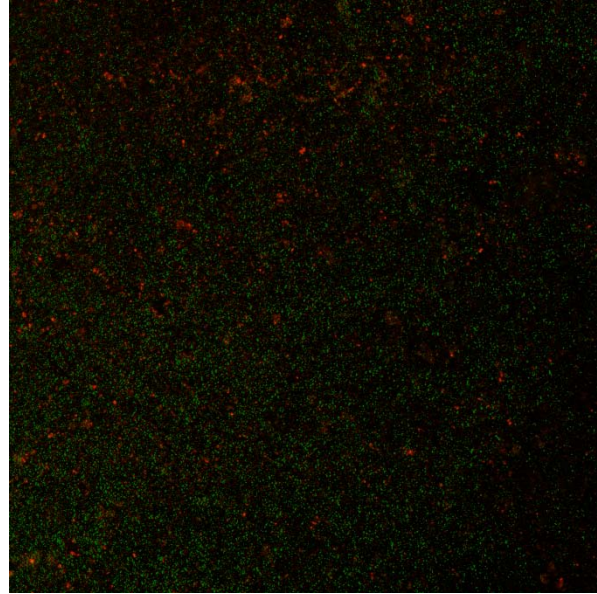
Şekil 4.11 % 5,25'lik NaOCl içinde 5 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü



(a)

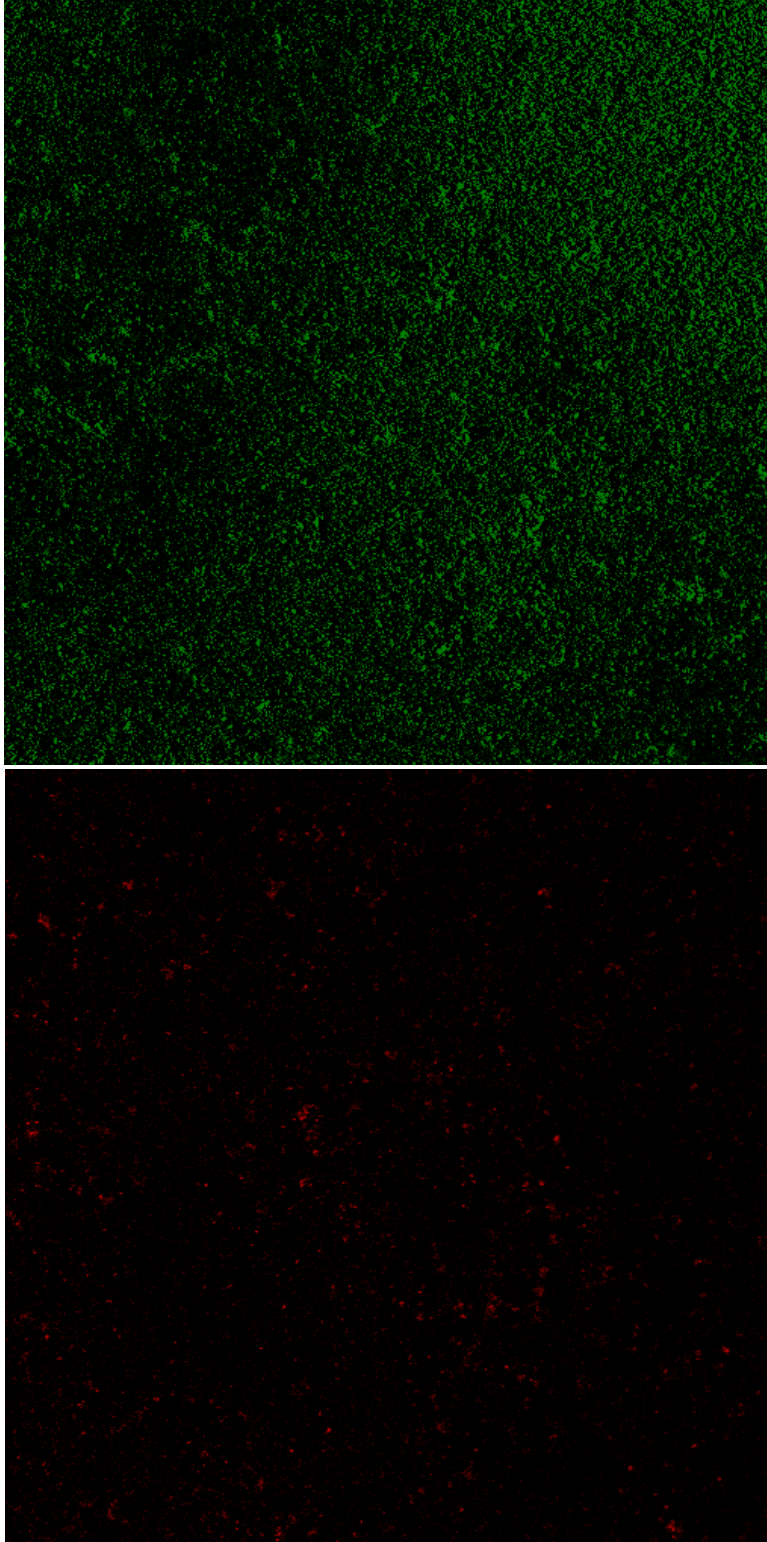


(b)

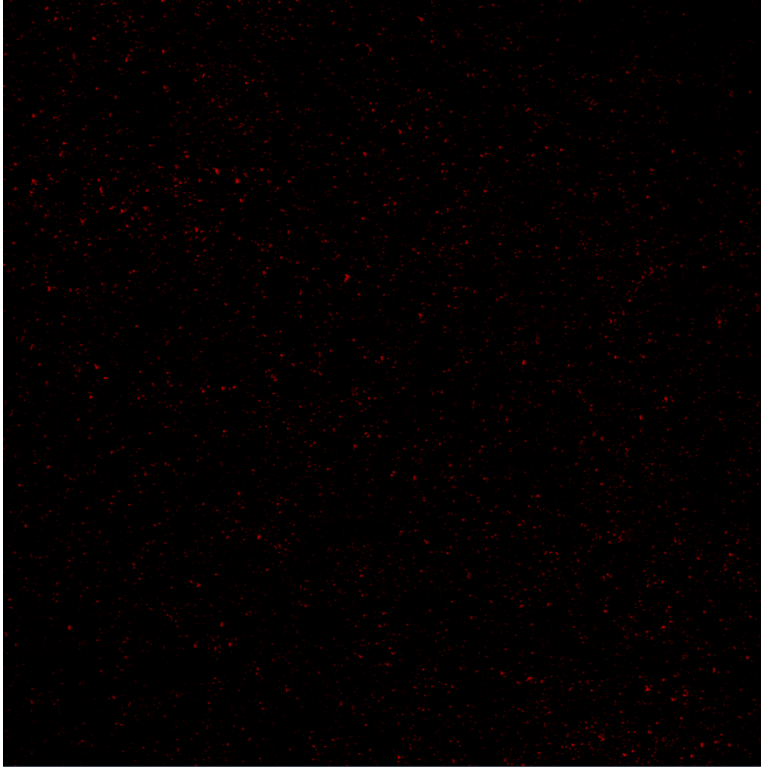
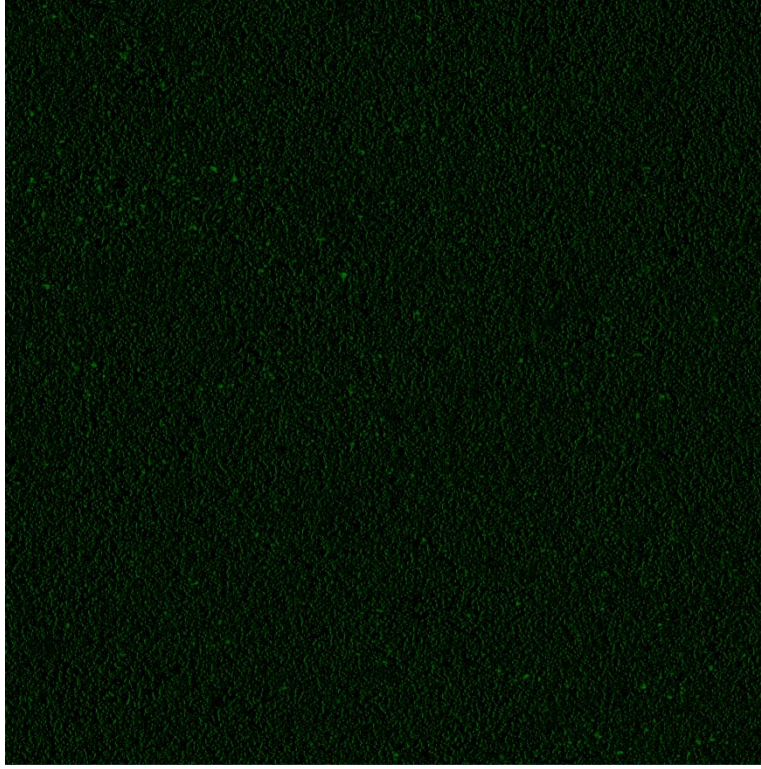


(c)

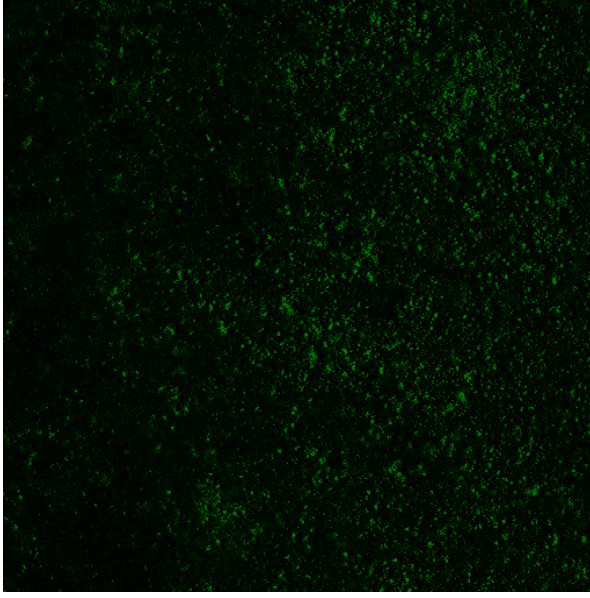
Şekil 4.12 % 100'lük Oktenisept solüsyonu içinde 1 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü **a)** SYTO 9 ile boyanan ölü + canlı bakteri hücreleri **b)** Propidium İodide ile boyanan ölü bakteri hücreleri **c)** Ölü ve canlı bakteri hücrelerinin karışık görüntüsü



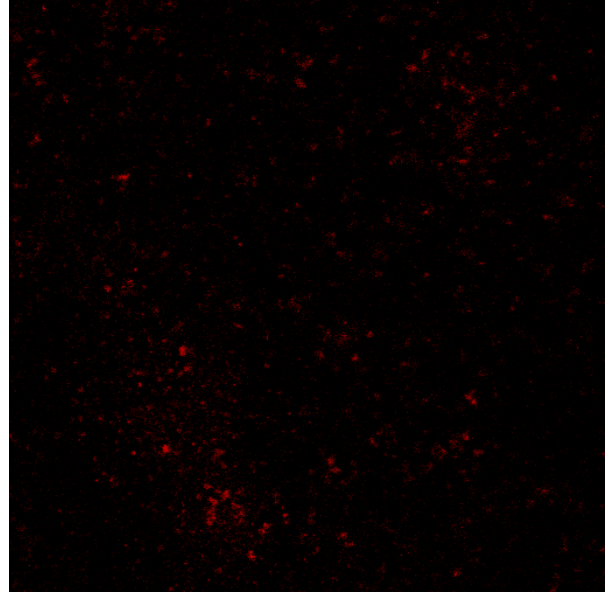
Şekil 4.13 Metilen mavisi ve Diyot lazer ile 5 dk muamele edilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü



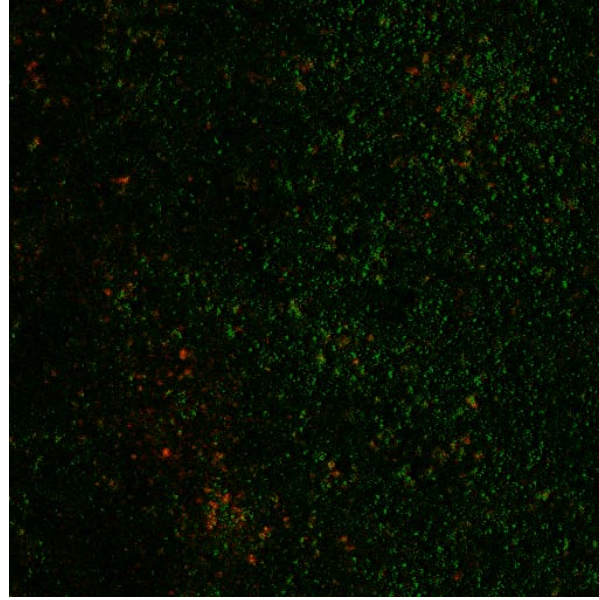
Şekil 4.14 Fotosan sistemi ile 1 dk muamele edilmiş bir örneğe ait LSCM görüntüsü



(a)



(b)



(c)

Şekil 4.15 % 2'lik CHX solüsyonu içinde 1 dk bekletilen bir örneğe ait LSCM görüntüsü **a)** SYTO 9 ile boyanan ölü + canlı bakteri hücreleri **b)** Propidium İodide ile boyanan ölü bakteri hücreleri **c)** Ölü ve canlı bakteri hücrelerinin karışık görüntüsü

5. TARTIŞMA

Bakterilerin biyofilm oluşturabilmeleri için öncelikle bir yüzeye tutunmaları gerekmektedir. *In vitro* çalışmalarda biyofilm oluşturulması aşamasında substrat olarak çok farklı yüzeyler kullanılmıştır. Çekilmiş dişlerden hazırlanan dentin örnekleri,^{75,103,104} polisitiren yüzeyler,^{71,74,105} nitrosellüloz membran filtreler,^{69,70} cam yüzeyler,⁷³ hidroksiapatit diskler⁸³ kullanılan yüzeyler arasındadır. Bu çalışmada da biyofilm oluşumu için 9.7 mm çapında, 1.5 mm kalınlığındaki standart hidroksiapatit diskler kullanılmıştır.

Biyofilm oluşumunun ve biyofilmin yapısının, yapıştığı yüzeyin kimyasal yapısından etkilendiği belirtilmektedir.¹⁰⁶ Dentin dokusunun %70'i inorganik, %20'si organik yapıdadır. Dentinin inorganik kısmı hidroksiapatit kristallerinden, organik kısmı ise %90 oranında kollojenden oluşmaktadır.¹⁰⁷ Bazı bakteriler yüzey adhezinleri üreterek kollojene bağlanmakta ve bu durum biyofilm oluşumu açısından önem taşımaktadır.¹⁰⁸

In vitro çalışmalarda, deney şartları *in vivo* koşulları en iyi yansıtabilecek şekilde ayarlanmalıdır. Polisitiren, nitrosellüloz membran filtreler ve cam gibi yüzeylerde oluşturulan biyofilmlerde gerçek yüzey-bakteri ilişkisi sağlanamayabilir. Çalışmamızda kullanılan hidroksiapatit diskler dentinin inorganik içeriğine sahiptir ve dentin dokusunu kısmen de olsa yansıtmaktadır. Diğer taraftan elde edilen verilerin tutarlı olması için kullanılan örneklerin standart olması önemlidir. Kullanılan standart diskler üzerinde daha tutarlı biyofilm yapıları oluşturmak mümkündür. Biyofilm doğal diş üzerinde oluşturulduğu zaman kompleks anatomik yapısından dolayı standardizasyonu sağlamak daha zordur.

Biyofilmin yapısının tam olarak anlaşılması, ortadan kaldırılması için yapılan antimikrobiyal işlemler açısından da önemlidir. Lazer taramalı konfokal mikroskop, biyofilm çalışmalarına yeni bir boyut getirmiştir. LSCM ile biyofilmin 3 boyutlu görüntüsü elde edilebilmektedir. Ayrıca LSCM görüntülerinin analizi yapılarak kantitatif veriler elde edilebilmektedir. Ancak LSCM'de konkav yapıdaki kök kanal sisteminin fazlaca eğimli

kısımlarında yüksek çözünürlükte görüntü elde edilmesinde problem yaşanmaktadır. Yakın vertikal duvarlardan yansıyan ışığın zayıf olması görüntüyü olumsuz etkilemektedir.¹⁰⁹ Bu nedenle LSCM'de düz yüzeyler üzerinden alınan görüntüler daha doğru sonuçlar vermektedir. Çalışmamızda düz standart yüzeylere sahip hidroksiapatit disklerin kullanılmasındaki bir diğer faktör de oluşturulan biyofilmlerin analizinin LSCM ile yapılmasıdır.

Antimikrobiyal ajanların etkinliklerinin değerlendirilmesinde, yapılan işlemlere karşı en fazla direnç gösteren mikroorganizmalarla çalışılması, o materyalle ilgili elde edilen verilerin diğer pek çok mikroorganizma için de geçerli olması yönünden oldukça önemlidir. *E. faecalis*'in birçok antimikrobiyal ajana karşı yüksek seviyede direnç gösterdiği¹¹⁰ ve inatçı apikal periodontitis vakalarından sıklıkla izole edilen bir bakteri olduğu³ bilinmektedir. Eliminasyonu zor olduğu için bu mikroorganizmanın eşlik ettiği endodontik enfeksiyonların tedavilerinde genellikle problemler meydana gelmektedir.^{110,111} Bundan dolayı da antimikrobiyal etkinlik çalışmalarında mikroorganizma olarak sıklıkla *E. faecalis* kullanılmaktadır.^{70,71,73,112,113} Bu çalışmada da hem belirtilen nedenlerden dolayı hem de elde edilen sonuçların diğer çalışmalarla karşılaştırılmasını kolaylaştırmak amacıyla mikroorganizma olarak *E. faecalis* tercih edilmiştir.

Dezenfeksiyon için kullanılan antimikrobiyal ajanların çoğunlukla planktonik formda üretilen bakterilere karşı olan etkinlikleri belirtilmiştir. Mikroorganizmalar genelde yüzeylere tutunarak organize olmuş mikrobiyal topluluklar oluşturma eğiliminde oldukları için test sistemlerinde planktonik mikroorganizmaların kullanılması *in vivo* koşulları tam anlamıyla yansıtmaz.⁷⁴ Ayrıca belirli bakteri türlerinin biyofilm içinde geliştikleri zaman yeni ve daha virülan tipler sergiledikleri bulunmuştur.⁸ Biyofilm içindeki bakteriler planktonik koşullarda gelişmiş bakterilerle karşılaştırıldığı zaman antimikrobiyal ajanlara karşı karakteristik olarak artmış bir dirence sahiptir.¹¹⁴ Bakterilerin bir yüzeye adezyonu farklı genlerin ekspresyonlarına ve farklı fenotiplerin gelişmesine neden olmaktadır. Dolayısıyla biyofilm içinde organize olmuş bakteriler planktonik türdeşlerinden farklı özellikler sergilemektedirler. Distel ve ark.⁹ *E. faecalis*'in biyofilm oluşturarak 1000 kat daha dirençli hale geldiğini belirtmişlerdir.

Biyofilm oluşumu dinamik bir süreçtir. Planktonik mikroorganizmaların yüzeye tutunmasıyla başlayan bu süreç, olgun ve yapısal olarak karmaşık biyofilmin gelişimiyle devam eder. Biyofilm oluşumunun farklı aşamalarında mikroorganizmaların sergiledikleri fenotipik özellikler birbirinden oldukça farklı olabilir. Kishen ve ark.¹⁰³ *E. faecalis*'in kök kanal dentininde oluşturduğu in vitro biyofilmin yapısını farklı aşamalarda incelemişler ve 4 haftadan sonra dentin üzerinde oldukça kalın, yapısal olarak organize olmuş bir tabaka oluştuğunu göstermişlerdir. *E. faecalis*'in antimikrobiyal ajanlara karşı olan karakteristik direncinin, oluşturdukları bu olgun biyofilm tabakasına bağlı olabileceği düşünülmektedir.¹⁰³

Biyofilm çalışmalarında, biyofilm oluşum süresi çok farklılık göstermektedir. 24 saatten 6 haftaya kadar değişen sürelerde biyofilmler oluşturulmuş ve antimikrobiyal ajanların etkinlikleri değerlendirilmiştir.^{71-73,75,83} Ne yazık ki çalışmalarda biyofilm oluşum süresine ilişkin bir standardizasyon belirlenememiştir. Çalışmamızda olgun biyofilm oluşturmak amacıyla hidroksiapatit diskler 4 hafta boyunca, haftada bir besiyeri değişimi yapılarak, *E. faecalis* süspansiyonu içinde bekletilmiştir .

Biyofilm içindeki mikroorganizmaların canlılığını değerlendirmek için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Geleneksel bakteri kültür metodu bu yöntemlerden biridir. Kültür yöntemi ile sadece metabolik olarak aktif olan canlı bakteriler tespit edilebilmektedir. Ayrıca bakteriler sıcaklık, besiyeri, inkübasyon süresi gibi kültür koşullarına karşı duyarlı olabilirler ve üremeleri için 24 saat veya daha fazla bir süre gerekebilir.¹¹⁵

Biyofilm çalışmalarında mikroskopik değerlendirme önemli bir yer tutmaktadır. LSCM biyofilm yapılarının değerlendirilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle hem biyofilmin 3 boyutlu görüntüsü hem de bu görüntülere ait kantitatif veriler elde edilebilmektedir. Bu yöntemde biyofilm içindeki bakteri hücrelerinin görülebilmeleri için floresan özellikteki boya ile boyanmaları gerekmektedir. Biyofilm içindeki ölü ve canlı hücreleri tespit etmek için kullanılan bu boyalar piyasada BacLight LIVE/DEAD Bacterial Viability Kit adı verilen bir kit içinde yer almaktadır. Kit içindeki SYTO 9 yeşil, propidium iodide ise kırmızı renkte floresan yayan nükleik asit boya boyalarıdır. Bu boya boyaların dalga

bandı karakteristikleri ve bakteri hücrelerine penetrasyonları birbirinden farklıdır. SYTO 9 canlı ve ölü tüm bakteri hücrelerine penetre olurken, propidium iodide sadece hücre membranı hasar görmüş ölü bakteri hücrelerine penetre olur. Bu boyalar birlikte kullanıldıklarında ölü hücreler kırmızı, canlı hücreler yeşil renkte görünmektedir. Bu yöntem hızlı olması, kullanımının kolay olması ve aynı anda hem canlı hem de ölü hücreleri tespit edebilmesi gibi avantajlara sahiptir.

SEM ile sadece 2 boyutlu görüntüler elde edilebilmekte ve görüntülenen yapıların topografik değerlendirmeleri yapılabilmektedir. Biyofilmler çok tabakalı yapılar olup SEM ile bu yapıların tüm derinliğini analiz etmek mümkün değildir. Dolayısıyla bu teknikle elde edilen görüntülerin nitel veya yarı nitel değerlendirmeleri yapılabilmektedir.¹¹²

Biyofilm bakterileri çevresel streslere karşı hayatta kalma stratejileri geliştirmektedirler. Bunlardan biri de besin yetersizliğinde bakterilerin canlı fakat kültüre edilemeyen (Viable-but-non-culturable (VNBC)) duruma geçmeleridir. Bakteriler bu durumdayken çoğalmazlar, ancak canlıdırlar ve koşullar düzeldiği zaman metabolik aktivitelerini tekrar kazanabilirler.¹¹⁵ Bu durumdaki bakteriler canlı olmalarına rağmen metabolik aktivitelerinin çok az olması nedeniyle kültür teknikleriyle tespit edilemezken boyama ile LSCM'de tespit edilebilir. Besin yoksunluğu gibi çevresel streslerin biyofilm bakterilerinin antimikrobiyal ajanlara karşı olan direncini artırdığı belirtilmektedir.¹¹⁵ Bu çalışmada haftada bir taze besiyeri değişimi yapılmıştır ve sıcaklık, inkübasyon süresi gibi diğer çevresel değişkenler de sabit tutulmuştur. Elde edilen sonuçlara göre de kültür yöntemi ile LSCM yöntemi arasında korelasyon olduğu görülmüştür.

Literatürde kök kanal irrigasyon solüsyonlarının hangi konsantrasyon, pH ve hacimde daha etkin olduklarını araştıran pek çok çalışma bulunmaktadır.^{93,116,60,117,118} Gulabivala ve ark.,¹¹⁹ irrigasyon solüsyonunun etkinliğinde; konsantrasyon, uygulama hacmi, uygulama süresi, sıcaklık ve pH seviyesinin önemli olduğunu bildirmişlerdir. Çalışmamızda test edilen irrigasyon solüsyonlarının hepsi oda sıcaklığında, aynı hacimde ve bilinen en etkin konsantrasyonlarında kullanılmıştır.

Çalışmamızın sonuçlarına göre % 5,25'lik NaOCl hem kültür yönteminde hem de LSCM ile analiz yönteminde 1 dk ve 5 dk uygulama sürelerinin her ikisinde de *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda en etkili antimikrobiyal ajan olarak bulunmuştur. LSCM görüntülerinin analizine göre de % 5,25'lik NaOCl'nin, *E. faecalis* hücrelerini çok büyük oranda yüzeyden uzaklaştırdığı, kalan az sayıdaki hücrelerin de hepsini öldürdüğü görülmektedir.

Chavez de Paz ve ark.,⁷⁴ *E. faecalis*, *L. paracasei*, *S. anginosus* ve *S. gordonii* biyofilmleri üzerinde çeşitli antimikrobiyallerin etkilerini LSCM ile değerlendirdikleri çalışmalarında, % 1'lik NaOCl'nin söz konusu mikroorganizmaları uzaklaştırmada en etkili antimikrobiyal olduğunu belirtmişlerdir. Spratt ve ark.,⁶⁹ çeşitli irrigasyon solüsyonlarının 5 farklı bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında % 2,25'lik NaOCl'i en etkili irrigasyon solüsyonu olarak tespit etmişlerdir. Sena ve ark.,¹²⁰ % 5,25'lik NaOCl'nin çalışmada kullanılan bütün bakteri türlerini 30 sn içinde elimine ettiğini göstermişlerdir. Giardino ve ark.,⁷⁰ MTAD, Tetraclean ve % 5,25'lik NaOCl'nin *E. faecalis* biyofilmine karşı antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştırmışlardır. Beş dk içinde *E. faecalis* biyofilmini elimine edebilen tek solüsyonun NaOCl olduğunu, MTAD ve Tetraclean'in total eliminasyon için daha uzun zamana ihtiyaç duyduklarını belirtmişlerdir.

Görüldüğü gibi NaOCl'nin biyofilm üzerindeki antimikrobiyal etkinliği açısından çalışmamızın sonuçları, mevcut literatür sonuçları ile benzerdir. NaOCl'nin biyofilm üzerindeki bu yüksek antimikrobiyal etkisini organik yapıdaki ekzopolisakkarit matriksi ortadan kaldırarak gösterdiği düşünülmektedir.

Çalışmamızda test edilen başka bir antimikrobiyal solüsyon da Oktenidin hidroklorit'tir. Geniş spektrumlu antibakteriyel, ayrıca patojenik mantar ve mayalara karşı aktif bir ajandır.^{84,90,91} Oktenidin hidroklorit'in antibakteriyel ve antimikotik etkinliğini, klorheksidin glukonat'a benzer şekilde yani negatif yüklü hücre duvarının yapısal bütünlüğünü bozup hücrelerin vital fonksiyonlarını etkileyerek gösterdiği bildirilmiştir.⁹¹

Tirali ve ark.,⁹³ Oktenisept ve NaOCl'nin farklı konsantrasyonlarının *E. faecalis*, *C. albicans* ve *S. aureus* üzerine farklı sürelerdeki etkinliklerini *in vitro* olarak incelemiştir. Oktenidin hidroklorit'in incelenilen tüm sürelerde ve konsantrasyonlarda NaOCl'den daha etkili olduğunu ileri sürmüştür. Mikroorganizmaların planktonik formları üzerinde yapılan çalışma, Oktenidin hidroklorit'in NaOCl'e alternatif bir irrigasyon solüsyonu olup olamayacağını gündeme getirmiştir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre Oktenidin hidroklorit solüsyonu *E. faecalis* biyofilmi üzerinde oldukça etkili bulunmuştur. Hatta istatistiksel olarak % 5,25'lik NaOCl ve %100'lük Oktenidin hidroklorit'in *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkileri benzerdir. Ancak LSCM'de Oktenisept'in mikroorganizmaları yüzeyden tam olarak uzaklaştırıpmediği, yüzeyde ölü bakteri hücrelerinin yanısıra canlı bakteri hücrelerinin de bulunduğu görülmüştür. Bu durum, biyofilm bakterileri söz konusu olduğunda, Oktenidin hidroklorit'in % 5,25'lik NaOCl kadar etkili olmadığını göstermektedir. Ancak NaOCl'nin daha düşük konsantrasyonlarının kullanılması durumunda, antimikrobiyal etkinliğinin Oktenidin hidroklorit'ten daha düşük olması da söz konusu olabilir. Bu amaçla farklı konsantrasyonlardaki NaOCl ile Oktenidin hidroklorit'in biyofilm üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştıran çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Literatürde Oktenidin hidroklorit'in mikroorganizmaların biyofilm formları üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamız bu açıdan ileride yapılabilecek araştırmalar için temel teşkil etmektedir.

Çalışmamızda % 2'lik CHX solüsyonunun *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkisi % 5,25'lik NaOCl'e göre hem kültür yönteminde hem de LSCM ile analiz yönteminde istatistiksel olarak daha az bulunmuştur. CHX grubuna ait LSCM görüntülerine bakıldığında kontrol grubu SF'e göre yüzeyden bakteri hücrelerinin belirgin bir şekilde uzaklaştırılabildiği görülmekte ve kalan bakteri hücreleri arasında hem ölü hem canlı hücreler yer almaktadır.

Chavez de Paz ve ark.,⁷⁴ çeşitli irrigasyon solüsyonlarının farklı bakterilerin biyofilm formları üzerindeki antimikrobiyal etkilerini LSCM ile değerlendirmişlerdir. % 1'lik NaOCl en etkili solüsyon olarak tespit edilirken, % 2,5'lük CHX solüsyonunun *E.*

faecalis dahil test edilen bütün mikroorganizmaların biyofilm formlarını elimine etmede yetersiz olduğu gösterilmiştir. Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde LSCM görüntülerinde, CHX solüsyonu ile *E. faecalis* hücrelerinin yaklaşık % 50 oranında yüzeyden uzaklaştırıldığı görülmektedir.

Williamson ve ark.⁷³ da % 2'lik CHX'in *E. faecalis* biyofilmi üzerinde 1 ve 3 dk'da % 6'lık NaOCl'e göre daha az etkili olduğunu belirtmişlerdir. Spratt ve ark.⁶⁹ 'nın çalışmasında % 0,2'lik CHX solüsyonu test edilen tüm gruplarda % 2,25'lik NaOCl'den daha az etkili bulunmuştur.

Literatürdeki çalışmaların sonuçları çalışmamızın sonuçlarını destekler niteliktedir. Ancak çalışmamızdan elde edilen verilere göre % 2'lik CHX solüsyonu % 5,25'lik NaOCl'e göre istatistiksel olarak daha az etkili bulunmasına karşın kontrol grubu SF ile arasında canlı mikroorganizma sayısı bakımından oldukça büyük bir fark vardır. Aslında bu durum çalışmamızda % 2'lik CHX'in, literatürdeki bazı çalışmalara göre daha etkili bulunduğunu göstermektedir. Bazı *in vitro* çalışmalar, biyofilm oluşturulmadan önce kullanılan yüzeyin kollojen ile kaplanmasının biyofilmin kalınlığını artırdığını ve mikroorganizmaların yüzey ile olan bağlantısını güçlendirdiğini göstermişlerdir.^{74,83} Shen ve ark.,⁸³ CHX ve CHX-plus uygulandıktan sonra kollojen ile kaplanmış yüzeylerde, kaplanmamış olanlara göre daha fazla mikroorganizmanın hayatta kaldığını belirtmişlerdir. Çalışmamızda kullanılan % 2'lik CHX'in 4 haftalık *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkisinin beklenenin üzerinde olması, bakterilerin yüzey bağlantısının kollojen kaplı yüzeylerdeki kadar güçlü olmamasından kaynaklanabilir.

Çalışmamızın sonuçlarına göre *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antimikrobiyal etkinlik açısından % 100'lük Oktenidin hidroklorit ile % 2'lik CHX arasında antimikrobiyal etkinlik açısından istatistiksel olarak fark bulunmamıştır. Oktenidin hidroklorit'in antibakteriyel ve antimikotik etkinliğini klorheksidin glukonat'a benzer şekilde gösterdiği bildirilmiştir.⁹¹ Buna göre iki solüsyon arasında farkın olmaması şaşırtıcı değildir. Literatürde CHX ve Oktenidin hidroklorit solüsyonlarının irrigasyon solüsyonu olarak antimikrobiyal etkinliklerini karşılaştıran bir çalışma bulunmamıştır. Doğan ve ark.,¹²¹ ağız gargarası olarak kullandıkları zaman Oktenidin hidroklorit'in; *S. mutans*, *S.*

salivarius ve laktobasil türleri üzerinde % 0,2'lik CHX'den daha etkili olduğunu göstermişlerdir. Bu çalışmada Oktenisept'in daha etkili bulunmasındaki sebep CHX'in ağız gargarası olarak % 0,2'lik konsantrasyonunun kullanılması olabilir.

Kanal tedavisi sırasında kemomekanik preparasyon, kanal içi medikasyon gibi işlemler yapılırken en yüksek teknik standartlar kullanılsa bile kompleks kök kanal sisteminde pulpa artıklarının, mikrobiyal biyofilmlerin bulunduğu hiç dokunulmamış alanlar kalmaktadır.^{122,123} Bu nedenle standart endodontik yöntemlere alternatif olabilecek yeni dezenfeksiyon metodları geliştirilmeye çalışılmıştır.

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi, fotosensitizer ajan ve ışık kaynağı kombinasyonundan oluşan yeni bir antimikrobiyal stratejidir. Fotodinamik terapi ilk olarak kanser tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir. Son dönemde fotodinamik terapi diğer adıyla ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin kök kanal sistemindeki mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini değerlendiren çalışmalar da yapılmaktadır.¹²⁴⁻¹²⁸

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi çalışmalarında fotosensitizer ajan olarak çeşitli maddeler kullanılmaktadır. Metilen mavisi de fotosensitizer ajan olarak kullanılan fenotiazin esaslı bir boyadır. Düşük moleküler ağırlığa sahip, pozitif yüklü, hidrofilik bir maddedir.¹²⁹ Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi çalışmalarının büyük bir kısmında fotosensitizer ajan olarak metilen mavisi kullanılmıştır.^{125,127,128,130}

Xu ve ark.,¹³¹ metilen mavisi ve kırmızı ışığın sinerjistik etkisinin insan fibroblast ve osteoblastlarına etkisini değerlendirmişlerdir. Çalışmalarında 50 µg/mL metilen mavisinin tek başına ve farklı parametrelere sahip 665 nm dalga boyunda kırmızı ışıkla aktive edildiğinde osteoblastlar üzerinde çok az etki gösterdiğini ve apoptozise neden olmadığını belirtmişlerdir. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin bu değerlerde konak hücrelerine zarar vermeden güvenli bir şekilde kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin etkinliğinin fotosensitizer ajanın konsantrasyonuna da bağlı olabileceği belirtilmektedir.¹¹ Yapılan *in vitro* çalışmalarda kullanılan fotosensitizer ajanların konsantrasyonları arasında büyük farklılıklar

görülmektedir. Bu durum çalışmalarda kullanılan fotosensitizer ajanın konsantrasyonunun belirlenmesini zorlaştırmaktadır. Çalışmamızda fotosensitizer ajan olarak kullanılan metilen mavisinin konsantrasyonu, Xu ve ark.¹³¹ 'nın çalışmasından yola çıkarak 50 µg/mL olarak ayarlandı. Biyolojik olarak güvenli sınırlardaki en yüksek konsantrasyon kullanılmaya çalışıldı.

Fotosan sistemi dental tedavilerde kullanılmak üzere geliştirilmiş bir ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemidir. Sistem 3 farklı viskoziteye sahip fotosensitizer ajan ve LED ışık cihazından oluşmaktadır. Üretici firmanın talimatlarına göre endodontik tedavide kök kanalları düşük viskoziteli fotosensitizer ajan ile doldurulduktan sonra 30 sn LED ışık cihazı ile ışınlanmaktadır. Bu çalışmada hem Fotosan grubunda hem de diyot lazer grubunda ışınlama süresi 30 sn olarak sabit tutuldu.

Çalışmamızın sonuçlarına göre *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemleri (Fotosan ve diyot lazer grubu), hem kültür yönteminde hem de LSCM ile analiz yönteminde her iki çalışma süresinde de % 5,25'lik NaOCl, % 2'lik CHX ve % 100'lük Oktenisept'e göre daha az etkili bulunmuştur. Hatta kültür yönteminde her iki uygulama süresinde de, LCSM ile analiz yönteminde ise 5 dk uygulama süresinde Fotosan grubu ile kontrol grubu Salin arasında istatistiksel olarak fark bulunmamıştır.

Çalışmamızda test edilen ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin antimikrobiyal etkinliklerinin düşük bulunması uygulama şeklimizden kaynaklanıyor olabilir. Kullanılan ışık kaynağı ile fotosensitizer ajan içinde bulunan disk arasındaki mesafenin fazla olması sistemin etkinliğini azaltmış olabilir. Ayrıca kök kanalı kapalı bir sistem olduğu için uygulanan ışıkta daha az enerji kaybı beklenirken, çalışmamızdaki uygulama şeklinde ise daha fazla enerji kaybı meydana gelmesi muhtemeldir.

Ayrıca ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin etkinliklerinin değerlendirildiği çalışmalarda ışınlama süreleri arasında farklılık görülmektedir.^{124,127,133} Çalışmamızda diyot lazer grubunda ışınlama süresi, Fotosan sisteminde üretici firmanın belirttiği süre olan 30 sn olarak uygulandı. Burada amacımız çalışmamızda kullanılan ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerindeki ışınlama süresini sabit tutmaktır. 30 sn

ışınlama süresi, klinik olarak uygulanması mümkün olan bir zaman aralığıdır. Ancak ışınlama süresinin artırılmasıyla etkinliğin artması da söz konusu olabilir. Bununla beraber çalışmamızdaki diyot lazer grubuna ilişkin sonuçlar, fotosensitizer ajanların farklı sürelerde diyot lazerle aktive edildiği çalışmalarla benzerdir.

Foschi ve ark.,¹²⁷ çekilmiş dişlerin kök kanallarını *E. faecalis* ile enfekte etmişler ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin bu bakteri üzerindeki antimikrobiyal etkisini değerlendirmişlerdir. Bir gruba sadece metilen mavisi, diğer gruba sadece ışık, diğer gruba ise metilen mavisi ve ışığı birlikte yani ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemini uygulamışlardır. Çalışmanın sonuçlarına göre ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin sadece metilen mavisi ve sadece ışık uygulamasına göre daha etkili olduğunu ve *E. faecalis*'in inaktivasyonunda ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin destekleyici bir antimikrobiyal prosedür olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Ng ve ark.,¹³² pulpa nekrozu ve ilişkili periradiküler radyolüsensileri olan dişler üzerinde ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin etkinliğini *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. Bir grupta % 6'lık NaOCl ile kemomekanik preparasyon yapmışlar diğer grupta ise kemomekanik preparasyona ek olarak kök kanallarını 50 µg/mL metilen mavisi doldurup 5 dk beklettikten sonra 665 nm dalga boyundaki diyot lazer ile aktive etmişlerdir. Sonuçta kemomekanik preparasyon ve ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin birlikte uygulandığı grup, sadece kemomekanik preparasyonun uygulandığı gruba göre daha etkili bulunmuştur.

Garcez ve ark.,¹²⁴ periapikal lezyonlu dişlere sahip hastalarda kemomekanik preparasyon sonrası ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin etkinliğini *in vivo* olarak değerlendirmişlerdir. Fotosensitizer ajan olarak polyethyleneimine ve ce6 bileşiğini, ışık kaynağı olarak 660 nm dalga boyunda diyot lazer kullanmışlardır. Fotosensitizer ajanı kök kanallarında 2 dk bekletip diyot lazer ile 2 dk boyunca ışınlamışlardır. Sonuç olarak bu sistemin kemomekanik preparasyon sonrası kullanıldığında mikroorganizmaların eliminasyonuna katkıda bulunduğunu belirtmişlerdir.

Souza ve ark.,¹³³ kemomekanik preparasyon sonrası, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin 2 farklı fotosensitizer ajan (metilen mavisi ve toluidin mavisi)

kullanıldığında *E.faecalis*'in kök kanal sisteminden eliminasyonuna katkısını değerlendirmişlerdir. Her iki fotosensitizer ajan kullanıldığında da ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin kemomekanik preparasyona anlamlı bir katkısının olmadığını göstermişlerdir.

Bergmans ve ark.,¹²⁵ ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin *S. anginosus*, *E. faecalis* ve *F. nucleatum* üzerindeki antimikrobiyal etkisini incelemişlerdir. Işıkla aktive olan dezenfeksiyon sisteminin tüm mikroorganizma gruplarında kontrol grubuna göre bakteri sayısında bir miktar azalmaya neden olduğu ancak bakterilerin eliminasyonunda yetersiz olan bu sistemin alternatif bir antimikrobiyal tedavi seçeneği olamayacağı belirtilmiştir.

Farklı fotosensitizer ajanların farklı konsantrasyonlarda kullanımı ve değişik ışık parametrelerinin kullanımı gibi metodolojik farklılıklar, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin antimikrobiyal etkinliklerini değerlendiren çalışmaların birbirleriyle karşılaştırılmalarını zorlaştırırsa da genel olarak yapılan çalışmalar, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin kök kanal sistemindeki mikroorganizmaları elimine etmede tek başlarına yetersiz olduklarını, kemomekanik preparasyon sonrası kullanıldıkları zaman destekleyici rol oynayabileceklerini göstermektedir. Bu çalışmanın sonuçları da ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda yetersiz olduklarını desteklemektedir.

Çalışmaların birbirleriyle karşılaştırılmalarını kolaylaştırmak ve *in vivo* koşulları daha iyi şekilde yansıtabilmek amacıyla standart biyofilm modellerinin oluşturulması büyük önem taşımaktadır. Diğer taraftan kök kanal sisteminin kompleks yapısı, antimikrobiyal ajanların mikroorganizmalarla temasını sınırlayıcı bir etki göstermektedir. Çalışmamızda kullanılan yöntem ise, antimikrobiyal ajanların biyofilm oluşturulan yüzeydeki mikroorganizmalarla maksimum temasına izin vermektedir. Dolayısıyla çalışmamızda test edilen antimikrobiyal ajanların *in vivo* koşullara göre daha etkili bulunması muhtemeldir.

In vitro araştırmalar klinik şartları tam olarak yansıtamamakla birlikte *in vivo* çalışmalara öncülük etmesi açısından oldukça önemlidir. *In vivo* şartlarda kök kanal

sisteminin kompleks yapısı ve bunun standardize edilmesindeki zorluklar, kullanılacak irrigasyon solüsyonunun hacim, süre ve uygulama açısından standardizasyonunun zorluğu gibi pek çok faktörün deneysel koşullardaki gibi standart hale getirilmesi oldukça büyük problemdir.

6. SONUÇLAR

Çalışmamızın limitasyonları göz önünde bulundurularak elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibi sıralanabilir:

1. Hem bakteri kültür yöntemi hem LSCM ile analiz yönteminde, 1 dk ve 5 dk uygulama sürelerinin her ikisinde de, % 5,25'lik NaOCl solüsyonu *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda en etkili antimikrobiyal ajan olarak bulundu. % 5,25'lik NaOCl'nin mikroorganizmaları öldürürken etkin bir şekilde yüzeyden de uzaklaştırdığı görüldü. % 5,25'lik NaOCl'in, gerekli önlemlerin alınması ve kontrollü çalışılması koşulu ile inatçı kök kanal enfeksiyonlarının tedavisinde kullanımı önerilebilir.

2. Her iki yöntem ve uygulama süresinde de, % 2'lik CHX solüsyonu *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda mikroorganizma miktarını belirgin bir şekilde azaltmakla beraber, % 5,25'lik NaOCl'den daha az etkili bulundu.

3. Her iki yöntem ve uygulama süresinde de, % 100'lük Oktenidin hidroklorit solüsyonu *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda istatistiksel olarak % 5,25'lik NaOCl solüsyonu ile benzer etkili bulundu.

4. Her iki yöntem ve uygulama süresinde de, *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda % 2'lik CHX solüsyonu ile % 100'lük Oktenidin hidroklorit solüsyonu arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

5. Test edilen tüm irrigasyon solüsyonları, kontrol grubu Serum fizyolojiktan daha etkili bulundu.

6. Her iki yöntem ve uygulama süresinde de, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemleri % 5,25'lik NaOCl, % 2'lik CHX ve %100'lük Oktenidin hidroklorit'den daha az etkili bulunmakla birlikte kendi aralarında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

7. Bakteri kültür yönteminde her iki uygulama süresinde de ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan ile kontrol grubu Serum fizyolojik arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

8. LSCM ile analiz yönteminde, 1dk uygulama süresinde, Diyot lazer ve metilen mavisi kullanılan ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi ile kontrol grubu Serum fizyolojik arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

9. LSCM ile analiz yönteminde, 5 dk uygulama süresinde, ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan ile kontrol grubu Serum fizyolojik arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

10. Her iki yöntemde de ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemlerinin *E. faecalis* biyofilminin eliminasyonunda yetersiz olduğu görüldü. Bu nedenle ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemleri kök kanal tedavisinde sadece destekleyici tedavi olarak kullanılabilir.

11. Bakteri kültür yönteminde ışıkla aktive olan dezenfeksiyon sistemi Fotosan hariç, diğer tüm gruplarda her iki yöntemde de 1dk ve 5 dk uygulama süreleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı.

12. Elde edilen sonuçlara göre bakteri kültür yöntemi ile LSCM ile analiz yöntemi arasında korelasyon bulundu.

7. KAYNAKLAR

1. KAKEHASHI S, STANLEY HR, FITZGERALD RJ. (1965). The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 20:340-349.
2. COSTERTON JW. (1999). Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents* 11:217-221
3. NAIR PN, HENRY S, CANO V, VERA J. (2005). Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99:231-252.
4. RAMACHANDRAN NAIR PN. (1987). Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod* 13:29-39.
5. MOLVEN O, OLSEN I, KEREKES K. (1991). Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 7:226-229.
6. SEN BH, PISKIN B, DEMIRCI T. (1995). Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 11:6-9.
7. SIQUEIRA JF, JR., LOPES HP. (2001). Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study. *Int Endod J* 34:216-220.
8. DONLAN RM, COSTERTON JW. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 15:167-193.
9. DISTEL JW, HATTON JF, GILLESPIE MJ. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 28:689-693.
10. SIQUEIRA JF JR. (2001). Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 34:1-10.

11. KONOPKA K, GOSLINSKI T.(2007). Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 86:694-707.
12. DONLAN RM. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8:881-890.
13. DAVEY ME, O'TOOLE G A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol Mol Biol Rev* 64:847-867.
14. SVENSÄTER G, BERGENHOLTZ G. (2004). Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 9:27-36.
15. BUSCHNER JH, VAN DER MEI HC.(2000). Initial microbial events: mechanisms and implications. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-scott HM, Wilson M, editors. *Community structure and co-operation in biofilms*. Cambridge: Cambridge University Press; 2000: p. 25-36.
16. KOLENBRANDER PE, ANDERSEN RN, BLEHERT DS, EGLAND PG, FOSTER JS, PALMER RJ JR.(2002) Communication among oral bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:486-505.
17. LEE SF, LI YH, BOWDEN GH.(1996) Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun* 64:1035-1038.
18. ZAURA-ARITE E, VAN MARLE J, TEN CATE JM. (2001). Confocal microscopy study of undisturbed and chlorhexidine-treated dental biofilm. *J Dent Res* 80:1436-1440.
19. LI Y, BURNE RA. (2001). Regulation of the *gtfBC* and *fff* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. *Microbiology* 147:2841-2848.
20. BOWDEN GH, HAMILTON IR. (1998). Survival of oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 9:54-85.
21. CVITKOVITCH DG, LI YH, ELLEN RP. (2003). Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. *J Clin Invest* 112:1626-1632.

22. CERI H, OLSON ME, STREMICK C, READ RR, MORCK D, BURET A. (1999). The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *J Clin Microbiol* 37:1771-1776.
23. LEWIS K. (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 45:999-1007.
24. COSTERTON JW, STEWART PS, GREENBERG EP. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:1318-1322.
25. STEWART PS. (1996) Theoretical aspects of antibiotic diffusion into microbial biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 40:2517-2522.
26. LOMCALI G, SEN BH, CANKAYA H. (1996). Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol* 12:70-76.
27. TRONSTAD L, BARNETT F, CERVONE F. (1990). Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. *Endod Dent Traumatol* 6:73-77.
28. LEONARDO MR, ROSSI MA, SILVA LA, ITO IY, BONIFACIO KC. (2002). EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 28:815-818.
29. JETT BD, HUYCKE MM, GILMORE MS. (1994). Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7:462-478.
30. FLAHAUT S, FRERE J, BOUTIBONNES P, AUFRAY Y. (1996). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* 62:2416-2420.
31. FLAHAUT S, BENACHOUR A, GIARD JC, BOUTIBONNES P, AUFRAY Y. (1996). Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch Microbiol* 165:317-324.

32. FLAHAUT S, HARTKE A, GIARD JC, BENACHOUR A, BOUTIBONNES P, AUFFRAY Y. (1996). Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* 138:49-54.
33. FLAHAUT S, HARTKE A, GIARD JC, AUFFRAY Y. (1997). Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. *Appl Environ Microbiol* 63:812-814.
34. KAYAOGLU G, ORSTAVIK D. (2004). Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 15:308-320.
35. ROCAS IN, SIQUEIRA JF, JR., SANTOS KR. (2004). Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 30:315-320.
36. ROCAS IN, JUNG IY, LEE CY, SIQUEIRA JF JR. (2004). Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* 30:504-508.
37. SIQUEIRA JF JR., ROCAS IN. (2004). Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:85-94.
38. SEDGLEY C, NAGEL A, DAHLEN G, REIT C, MOLANDER A. (2006). Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. *J Endod* 32:173-177.
39. LOVE RM. (2001). *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 34:399-405.
40. LEE W, LIM S, SON HH, BAE KS. (2004). Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod* 30:209-212.
41. SEDGLEY CM, LENNAN SL, CLEWELL DB. (2004). Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol* 19:95-101.

42. HUBBLE TS, HATTON JF, NALLAPAREDDY SR, MURRAY BE, GILLESPIE MJ. (2003). Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol* 18:121-126.
43. HAAPASALO M, ORSTAVIK D. (1987). In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 66:1375-1379.
44. SHERMAN JM. (1937). The Streptococci. *Bacteriol Rev* 1:3-97.
45. FIGDOR D, DAVIES JK, SUNDQVIST G. (2003). Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 18:234-239.
46. SEDGLEY CM, LENNAN SL, APPELBE OK. (2005). Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J* 38:735-742.
47. ORSTAVIK D, HAAPASALO M. (1990). Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 6:142-149.
48. PETERS LB, WESSELINK PR, MOORER WR. (2000). Penetration of bacteria in bovine root dentine in vitro. *Int Endod J* 33:28-36.
49. WEIGER R, DE LUCENA J, DECKER HE, LOST C. (2002). Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J* 35:166-171.
50. SOBRINHO AP, BARROS MH, NICOLI JR, CARVALHO MA, FARIAS LM, BAMBIRRA EA et al. (1998). Experimental root canal infections in conventional and germ-free mice. *J Endod* 24:405-408.
51. STEVENS RH, GROSSMAN LI. (1983). Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. *J Endod* 9:372-374.
52. SIQUEIRA JF, JR., DE UZEDA M. (1996). Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 22:674-676.

53. SIREN EK, HAAPASALO MP, WALTIMO TM, ORSTAVIK D. (2004). In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. *Eur J Oral Sci* 112:326-331.
54. SJOGREN U, FIGDOR D, PERSSON S, SUNDQVIST G. (1997). Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297-306.
55. ALACAM T. (2000). *Endodonti*. 2. Baskı. Ankara: Barış Yayınları
56. TORABINEJAD M, HANDYSIDES R, KHADEMI AA, BAKLAND LK. (2002). Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 94:658-666.
57. SIQUEIRA JF, JR., ROCAS IN, FAVIERI A, LIMA KC. (2000). Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod* 26:331-334.
58. GOMES BP, FERRAZ CC, VIANNA ME, BERBER VB, TEIXEIRA FB, SOUZA-FILHO FJ. (2001). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 34:424-428.
59. HAAPASALO M EU, ZANDI H, COIL JM. (2005). Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics* 10:77-102.
60. RADCLIFFE CE, POTOURIDOU L, QURESHI R, HABAHBEH N, QUALTROUGH A, WORTHINGTON H et al. (2004). Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 37:438-446.
61. VIANNA ME, GOMES BP, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC, DE SOUZA-FILHO FJ. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 97:79-84.

62. WALTIMO TM, ORSTAVIK D, SIREN EK, HAAPASALO MP. (1999). In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 32:421-429.
63. HAAPASALO M, SHEN Y, QIAN W, GAO Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 54:291-312.
64. SPANGBERG L, ENGSTROM B, LANGELAND K. (1973). Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 36:856-871.
65. HAAPASALO HK, SIREN EK, WALTIMO TM, ORSTAVIK D, HAAPASALO MP. (2000). Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 33:126-131.
66. SIM TP, KNOWLES JC, NG YL, SHELTON J, GULABIVALA K. (2001). Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J* 34:120-132.
67. MARENDING M, LUDER HU, BRUNNER TJ, KNECHT S, STARK WJ, ZEHNDER M. (2007). Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J* 40:786-793.
68. PETERS OA, SCHONENBERGER K, LAIB A. (2001). Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J* 34:221-230.
69. SPRATT DA, PRATTEN J, WILSON M, GULABIVALA K. (2001). An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 34:300-307.
70. GIARDINO L, AMBU E, SAVOLDI E, RIMONDINI R, CASSANELLI C, DEBBIA EA. (2007). Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 33:852-855.

71. ARIAS-MOLIZ MT, FERRER-LUQUE CM, ESPIGARES-GARCIA M, BACA P. (2009). Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. J Endod 35:711-714.
72. BRYCE G, O'DONNELL D, READY D, NG YL, PRATTEN J, GULABIVALA K. (2009). Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. J Endod 35:1243-1248.
73. WILLIAMSON AE, CARDON JW, DRAKE DR. (2009). Antimicrobial susceptibility of monoculture biofilms of a clinical isolate of Enterococcus faecalis. J Endod 35:95-97.
74. CHAVEZ DE PAZ LE, BERGENHOLTZ G, SVENSATER G. (2010). The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod 36:70-77.
75. PRABHAKAR J, SENTHILKUMAR M, PRIYA MS, MAHALAKSHMI K, SEHGAL PK, SUKUMARAN VG. (2010). 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. J Endod 36:83-86.
76. GOMES BP, SOUZA SF, FERRAZ CC, TEIXEIRA FB, ZAIA AA, VALDRIGHI L et al. (2003). Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J 36:267-275.
77. KHADEMI AA, MOHAMMADI Z, HAVAEE A. (2006). Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. Aust Endod J 32:112-115.
78. ZAMANY A, SAFAVI K, SPANGBERG LS. (2003). The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 96:578-581.
79. RUSSELL AD, DAY MJ. (1993). Antibacterial activity of chlorhexidine. J Hosp Infect 25:229-238.
80. BUCK RA, ELEAZER PD, STAAT RH, SCHEETZ JP. (2001). Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. J Endod 27:206-208.

81. JEANSONNE MJ, WHITE RR. (1994). A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 20:276-278.
82. VAHDATY A, PITT FORD TR, WILSON RF. (1993). Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 9:243-248.
83. SHEN Y, QIAN W, CHUNG C, OLSEN I, HAAPASALO M. (2009). Evaluation of the effect of two chlorhexidine preparations on biofilm bacteria in vitro: a three-dimensional quantitative analysis. *J Endod* 35:981-985.
84. SLEE AM, O'CONNOR JR. (1983). In vitro antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 23:379-384.
85. KRAMER A, ROTH B, MULLER G, RUDOLPH P, KLOCKER N. (2004). Influence of the antiseptic agents polyhexanide and octenidine on FL cells and on healing of experimental superficial aseptic wounds in piglets. A double-blind, randomised, stratified, controlled, parallel-group study. *Skin Pharmacol Physiol* 17:141-146.
86. BUHRER C, BAHR S, SIEBERT J, WETTSTEIN R, GEFFERS C, OBLADEN M. (2002). Use of 2% 2-phenoxyethanol and 0.1% octenidine as antiseptic in premature newborn infants of 23-26 weeks gestation. *J Hosp Infect* 51:305-307.
87. HARKE HP. (1989). [Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]. *Zentralbl Hyg Umweltmed* 188:188-193.
88. WAGNER KH, JURSS A, ZAREMBACH B, ELMADFA I. (2004). Impact of antiseptics on radical metabolism, antioxidant status and genotoxic stress in blood cells: povidone-iodine versus octenidine dihydrochloride. *Toxicol In Vitro* 18:411-418.
89. MULLER G, KRAMER A. (2006). Comparative study of in vitro cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics. *Dermatology* 212 Suppl 1:91-93.

90. BAILEY DM, DEGRAZIA CG, HOFF SJ, SCHULENBERG PL, O'CONNOR JR, PARIS DA et al. (1984). Bispyridinamines: a new class of topical antimicrobial agents as inhibitors of dental plaque. *J Med Chem* 27:1457-1464.
91. SEDLOCK DM, BAILEY DM. (1985). Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. *Antimicrob Agents Chemother* 28:786-790.
92. TANDJUNG L, WALTIMO T, HAUSER I, HEIDE P, DECKER EM, WEIGER R. (2007). Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *Int Endod J* 40:845-851.
93. TIRALI RE, TURAN Y, AKAL N, KARAHAN ZC. (2009). In vitro antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 108:e117-120.
94. WOOD S, METCALF D, DEVINE D, ROBINSON C. (2006). Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. *J Antimicrob Chemother* 57:680-684.
95. KOMERIK N, MACROBERT AJ. (2006). Photodynamic therapy as an alternative antimicrobial modality for oral infections. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25:487-504.
96. SMITH AW. (2005). Biofilms and antibiotic therapy: is there a role for combating bacterial resistance by the use of novel drug delivery systems? *Adv Drug Deliv Rev* 57:1539-1550.
97. SHARWANI A, JERJES W, SALIH V, MACROBERT AJ, EL-MAAYTAH M, KHALIL HS et al. (2006). Fluorescence spectroscopy combined with 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX fluorescence in detecting oral premalignancy. *J Photochem Photobiol B* 83:27-33.
98. SALVA KA. (2002). Photodynamic therapy: unapproved uses, dosages, or indications. *Clin Dermatol* 20:571-581.

99. KUBLER A, NIZIOL C, SIDHU M, DUNNE A, WERNER JA. (2005). [Analysis of cost effectiveness of photodynamic therapy with Foscan (Foscan-PDT) in comparison with palliative chemotherapy in patients with advanced head-neck tumors in Germany]. *Laryngorhinootologie* 84:725-732.
100. WAINWRIGHT M. (1998). Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 42:13-28.
101. ROVALDI CR, PIEVSKY A, SOLE NA, FRIDEN PM, ROTHSTEIN DM, SPACCIAPOLI P. (2000). Photoactive porphyrin derivative with broad-spectrum activity against oral pathogens In vitro. *Antimicrob Agents Chemother* 44:3364-3367.
102. HAMBLIN MR, HASAN T. (2004). Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci* 3:436-450.
103. KISHEN A, GEORGE S, KUMAR R. (2006). Enterococcus faecalis-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *J Biomed Mater Res A* 77:406-415.
104. GEORGE S, KISHEN A, SONG KP. (2005). The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. *J Endod* 31:867-872.
105. LIU H, WEI X, LING J, WANG W, HUANG X. (2010). Biofilm formation capability of Enterococcus faecalis cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod* 36:630-635.
106. STEPANOVIC S, CIRKOVIC I, RANIN L, SVABIC-VLAHOVIC M. (2004). Biofilm formation by Salmonella spp. and Listeria monocytogenes on plastic surface. *Lett Appl Microbiol* 38:428-432.
107. HAAPASALO M, QIAN W, PORTENIER I, WALTIMO T. (2007). Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod* 33:917-925.

108. KAYAOGLU G, ERTEN H, ORSTAVIK D. (2008). Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol* 23:449-454.
109. WATSON TF. (1997). Fact and artefact in confocal microscopy. *Adv Dent Res* 11:433-441.
110. STUART CH, SCHWARTZ SA, BEESON TJ, OWATZ CB. (2006). *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod* 32:93-98.
111. SIQUEIRA JF, JR., MACHADO AG, SILVEIRA RM, LOPES HP, DE UZEDA M. (1997). Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J* 30:279-282.
112. BHUVA B, PATEL S, WILSON R, NIAZI S, BEIGHTON D, MANNOCCI F. (2010). The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular *Enterococcus faecalis* biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J* 43:241-250.
113. ARIAS-MOLIZ MT, FERRER-LUQUE CM, GONZALEZ-RODRIGUEZ MP, VALDERRAMA MJ, BACA P. (2010). Eradication of *Enterococcus faecalis* biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod* 36:87-90.
114. WHITELEY M, BANGERA MG, BUMGARNER RE, PARSEK MR, TEITZEL GM, LORY S et al. (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature* 413:860-864.
115. CHAVEZ DE PAZ LE, HAMILTON IR, SVENSATER G. (2008). Oral bacteria in biofilms exhibit slow reactivation from nutrient deprivation. *Microbiology* 154:1927-1938.
116. O'CONNELL MS, MORGAN LA, BEELER WJ, BAUMGARTNER JC. (2000). A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. *J Endod* 26:739-743.

117. DUNAVANT TR, REGAN JD, GLICKMAN GN, SOLOMON ES, HONEYMAN AL. (2006). Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod* 32:527-531.
118. MERCADE M, DURAN-SINDREU F, KUTTLER S, ROIG M, DURANY N. (2009). Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 107:295-298.
119. GULABIVALA K PB, EVANS G, YUAN-LING NG. (2005). Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endodontic Topics* 10: 103–122.
120. SENA NT, GOMES BP, VIANNA ME, BERBER VB, ZAIA AA, FERRAZ CC et al. (2006). In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 39:878-885.
121. DOGAN AA, ADILOGLU AK, ONAL S, CETIN ES, POLAT E, USKUN E et al. (2008). Short-term relative antibacterial effect of octenidine dihydrochloride on the oral microflora in orthodontically treated patients. *Int J Infect Dis* 12:e19-25.
122. FOSCHI F, NUCCI C, MONTEBUGNOLI L, MARCHIONNI S, BRESCHI L, MALAGNINO VA et al. (2004). SEM evaluation of canal wall dentine following use of Mtwo and ProTaper NiTi rotary instruments. *Int Endod J* 37:832-839.
123. LIN LM, PASCON EA, SKRIBNER J, GANGLER P, LANGELAND K. (1991). Clinical, radiographic, and histologic study of endodontic treatment failures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 71:603-611.
124. GARCEZ AS, NUNEZ SC, HAMBLIN MR, RIBEIRO MS. (2008). Antimicrobial effects of photodynamic therapy on patients with necrotic pulps and periapical lesion. *J Endod* 34:138-142.
125. BERGMANS L, MOISIADIS P, HUYBRECHTS B, VAN MEERBEEK B, QUIRYNEN M, LAMBRECHTS P. (2008). Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 41:227-239.

126. LIM Z, CHENG JL, LIM TW, TEO EG, WONG J, GEORGE S et al. (2009). Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy. *Aust Dent J* 54:108-114.
127. FOSCHI F, FONTANA CR, RUGGIERO K, RIAHI R, VERA A, DOUKAS AG et al. (2007). Photodynamic inactivation of *Enterococcus faecalis* in dental root canals in vitro. *Lasers Surg Med* 39:782-787.
128. FIMPLE JL, FONTANA CR, FOSCHI F, RUGGIERO K, SONG X, PAGONIS TC et al. (2008). Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 34:728-734.
129. WAINWRIGHT M, PHOENIX DA, MARLAND J, WAREING DR, BOLTON FJ. (1997). A study of photobactericidal activity in the phenothiazinium series. *FEMS Immunol Med Microbiol* 19:75-80.
130. SOUKOS NS, CHEN PS, MORRIS JT, RUGGIERO K, ABERNETHY AD, SOM S et al. (2006). Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 32:979-984.
131. XU Y, YOUNG MJ, BATTAGLINO RA, MORSE LR, FONTANA CR, PAGONIS TC et al. (2009). Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod* 35:1567-1572.
132. NG R, SINGH F, PAPAMANOU DA, SONG X, PATEL C, HOLEWA C et al. (2011). Endodontic photodynamic therapy ex vivo. *J Endod* 37:217-222.
133. SOUZA LC, BRITO PR, DE OLIVEIRA JC, ALVES FR, MOREIRA EJ, SAMPAIO-FILHO HR et al. (2010). Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 36:292-296.

