T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İŞLEM GÖRMÜŞ DENTİN KOLLAJENİNE *ENTEROCOCCUS FAECALİS*'İN ADEZYONUNDA JELATİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ

Dt. Mehmet Burak GÜNEŞER

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ

KONYA-2013

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İŞLEM GÖRMÜŞ DENTİN KOLLAJENİNE *ENTEROCOCCUS FAECALİS*'İN ADEZYONUNDA JELATİNAZ ENZİMİNİN ETKİSİ

Dt. Mehmet Burak GÜNEŞER

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 11202025 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2013

İİ. ÖNSÖZ

Doktora öğrenimim boyunca bana her konuda destek olan ve yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman sevgisini ve desteğini hissettiğim danışman hocam Sayın Prof. Dr. Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ'e,

Doktora eğitimim boyunca kendilerinden çok şey öğrendiğim, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Endodonti Anabilim Dalı'ndaki sevgili hocalarıma,

Tezimin ve diğer çalışmalarımızın istatistiksel analizindeki yardım ve sonsuz sabrından dolayı Sayın Doç. Dr. Serhan AKMAN'a,

Doktora eğitimim süresince bana maddi ve manevi destek sağlayan TÜBİTAK'a,

Projemizi desteklediği için Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne,

Hayatımın her anında sonsuz sevgi ve destekleri ile yanımda olan aileme,

Doktoranın hayatıma kazandırdığı çok değerli asistan arkadaşlarıma,

Doktora tezim boyunca hep yanımda olan, yardımlarını benden hiç esirgemeyen sevgili dostum Lokman GENÇTÜRK'e,

Teşekkürlerimi sunarım.

İİİ. İÇİNDEKİLER **Sayfa**

SİMGELER VE KISALTMALAR…….....v-vi

1.GİRİŞ..... 1

1.1.Endodontide İrrigasyon 1

1.1.1.Sodyum Hipoklorit (NaOCl) 4

NaOCl'nin Smear Tabakasına Olan Etkisi..... 5

NaOCl'nin Dentin Dokusuna Olan Etkisi 6

1.1.2. Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA) 8

EDTA'nın Smear Tabakasına Olan Etkisi 9

EDTA'nın Dentin Dokusuna Olan Etkisi 10

1.1.3. Klorheksidin Glukonat 11

1.1.4. NaOCl ve EDTA'nın Etkileşimi ve Kombine Kullanımları 13

1.1.5. NaOCl ve CHX'in Etkileşimi ve Kombine Kullanımları 14

1.1.6. EDTA ve CHX'in Etkileşimi ve Kombine Kullanımları 15

1.1.7. Serum Fizyolojik 15

1.1.8. QMix 15

1.1.9. Oktenidin Hidroklorit (OCT)..... 17

1.2. Biyofilm 19

1.2.1.Biyofilm Oluşumunun Aşamaları..... 20

1.2.2. Biyofilm Bakterilerinde Gerçekleşen Değişiklikler 20

1.2.3. Endodontide Biyofilm 21

1.3. *Enterococcus faecalis* 22

1.3.1. *E. faecalis*'in Sahip Olduğu Virülans Faktörleri 24

1.3.2. *E. faecalis*'in Dentine Adezyon Mekanizmaları 25

1.3.3. *E. faecalis*'in Dentine Adezyonunda Jelatinaz Enziminin Önemi 27

1.4. Bakteri Sayım Yöntemleri 28

1.4.1. Petri Koloni Sayım Tekniği..... 29

1.4.2. Floresan ve Kolorimetrik Teknikler 30

Floresan in situ Hibridizasyon Tekniği (FISH) 30

Canlı/Ölü *Bac*Light Boyama Tekniği 30

XTT Tekniği 31

1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu- Enerji Dağılımlı X Işını Analizi (SEM-EDX Analizi) 32

2.GEREÇ ve YÖNTEM 34
2.1.Örneklerin Seçimi ve Dentin Disklerinin Hazırlanması 34
2.2.Mikrobiyolojik İşlemler 38
2.2.1. Besi yerlerinin Hazırlanması 38
2.2.2. Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması 38
2.3. XTT Kolorimetrik Analizinde Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması 42
2.4. Dentin Disklerinin Farklı İrrigasyon Solüsyonları ve İrrigasyon Kombinasyonlarıyla Muamele Edilmesi 43
2.5. Dentin Örneklerinin *E. faecalis* ile Enfekte Edilmesi 46
2.6. XTT ile Dentine Yapışmış Canlı Bakteri Sayısının Değerlendirilmesi 49
2.7. SEM-EDX Analizi 52
2.8. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi 53
3.BULGULAR 54
3.1. İki farklı *E. faecalis* suşunun dentine adezyonlarının kıyaslanmasına ait bulgular 54
3.2. JEL(+) *E. faecalis*'in farklı irrigasyon deney gruplarında gerçekleştirdiği dentin adezyonuna ait bulgular 54
3.3. JEL(-) *E. faecalis*'in farklı irrigasyon deney gruplarında gerçekleştirdiği dentin adezyonuna ait bulgular 57
3.4. Her bir irrigasyon deney grubunun kendi içinde JEL(+) *E. faecalis* ve JEL (-) *E. faecalis*'in dentin adezyonlarının karşılaştırılmasına ait bulgular 60
3.5. SEM Analizi Bulguları 67
3.6. SEM-EDX Analizi Bulguları 79
3.6.1. Kalsiyum ile İlgili Bulgular 80
3.6.2. Fosfor ile İlgili Bulgular 80
3.6.3. Karbon ile İlgili Bulgular 83
3.6.4. Sodyum ile İlgili Bulgular 83
3.6.5. Oksijen ile İlgili Bulgular 86
3.6.6. Magnezyum ile İlgili Bulgular 86
4.TARTIŞMA 89
5.SONUÇ ve ÖNERİLER 113

6.ÖZET 116
7.SUMMARY 117
8.KAYNAKLAR 118
9.EK: Etik Kurul Kararı 133
10.ÖZGEÇMİŞ 134

İV. SİMGELER VE KISALTMALAR

NaOCl: Sodyum hipoklorit

EDTA: Etilendiamin tetraasetik asit

CHX: Klorheksidin glukonat

OCT: Oktenidin hidroklorit

SEM: Scanning electron microscope (taramalı elektron mikroskobu)

PBS: Fosfat tamponlanmış solüsyon

EDX: Enerji dağılımlı X-ışını analizi

FISH: Floresan in situ hibridizasyon tekniği

PI: Propidyum iyodid

PMS: Fenazin metasülfat

TSB: Triptik soy bulyon

TSA: Triptik soy agar

NAOH: Sodyum hidroksit

MMP: Matriks metalloproteinaz

Esp: Enterokokkal yüzey proteinleri

MMP: Matriks metalloproteinaz

BSL 2: Biyogüvenlik seviyesi 2

JEL(+): Jelatinaz enzimi üreten

JEL(-): Jelatinaz enzimi üretemeyen

OD: Optik dansite

°C: Derece santigrad

pH: Hidrojen gücü (power of hydrogen)

nm: Nanometre

µm: Mikrometre

mm: Milimetre

cm: Santimetre

gr: Gram

ml: Mililitre

lt: Litre

sn: Saniye

1. GİRİŞ

Başarılı bir kök kanal tedavisi için kök kanalında yaşayan mikroorganizmaların tümüyle ortadan kaldırılması ve tedavi sonrası kanal içine bakterilerin yeniden girişinin önlenmesi büyük önem taşımaktadır (Kakehashi ve ark 1965, Sjogren ve ark 1997, Saunders ve Saunders 1994, Siqueira ve ark 2000a). Kök kanal tedavisi sonrası başarısızlığa neden olan inatçı periradiküler enfeksiyonlara intraradiküler enfeksiyon, ekstraradiküler enfeksiyon, yabancı cisim reaksiyonu ve kolesterol kristalleri içeren kistler sebep olmaktadır (Nair 2006). Bu faktörler arasından en sık karşılaşılanı endodontik tedavi sonrası kök kanal sisteminde canlı kalabilen ve ardından yeniden çoğalan veya ağız boşluğundan koronal sızıntı yoluyla kök kanal sistemine nüfuz eden mikroorganizmaların neden olduğu intraradiküler enfeksiyondur (Molander ve ark 1998). Ağız içinde bulunan bakterilerin kök kanal sistemini tekrar enfekte edebilmesinin nedenleri olarak tedavi esnasında aseptik koşulların ihlali, seanslar arasında geçici dolgunun sızdırması veya kanal tedavisi sonrasında daimi dolgunun sızdırması veya kırılması şeklinde sıralanabilir (Siqueira ve ark 2000a).

1.1. Endodontide İrrigasyon

Kök kanal sisteminde bulunan veya kanal tedavisi sonrası yeniden kanala giren mikroorganizmalar apikal periodontitis oluşumunun temel nedenidir (Sjögren ve ark 1997, Molander ve ark 1998). Bu nedenle endodontik tedavinin temel amacı kök kanal dezenfeksiyonunun sağlanması ve yeniden enfeksiyonunun önlenmesi olmalıdır. Kök kanalının mekanik preparasyonuyla beraber irrigasyon solüsyonları kullanılarak vital ve/veya nekrotik doku artıkları, mikroorganizmalar, biyofilmler ve debrisler uzaklaştırılarak kök kanal sisteminin dezenfeksiyonu amaçlanmaktadır. (Bystrom ve Sundqvist 1983, Zehnder 2006, Mohammadi ve Abbott 2009). Kök kanal tedavisinde irrigasyonun yararları ise şu şekilde sıralanabilir (Sundqvist ve Figdor 1998, Alaçam 2000, Zehnder 2006):

- Kanalın ıslatılması ve yıkanarak sağlanan sıvı akışı ile enfekte materyalleri, organik ve inorganik debrisleri, yumuşak ve sert doku artıklarını fiziksel ve kimyasal olarak uzaklaştırır. Bu sayede irrigasyon

solüsyonları mikroorganizmaların beslenmelerini güçleştirerek sayı ve tiplerini azaltır.

- İrrigasyon solüsyonları antimikrobiyal özellikleri sayesinde kök kanalında bulunan mikroorganizmaları uzaklaştırırken, kök kanal sisteminde mekanik preparasyonla ulaşılamayan alanlardaki bakteriyel biyofilmin ortadan kaldırılmasını sağlar.

- Mekanik preparasyon esnasında oluşan dentin talaşlarının apikal bölümde birikmesini önleyerek apikalde tıkanma oluşmasını önler.

- Lubrikasyon (kayganlaştırıcı) özellikleri sayesinde kanal aletlerinin daha rahat çalışmasını sağlar ve mekanik preparasyonda oluşabilecek işlemsel hataları azaltır.

- Smear tabakasını uzaklaştırarak dezenfektanların dentin tübülleri içine girişini kolaylaştırır. Böylece kanalda kullanılan dezenfektanların etkinliğini artırır.

- Dişleri ağartma özellikleri sayesinde kanal tedavisinden sonra dişlerin doğal renklerini korumalarını sağlar.

İdeal bir irrigasyon solüsyonunda bulunması gereken özellikler ise şu şekilde sıralanabilir (Sundqvist ve Figdor 1998, Alaçam 2000, Çalışkan 2006, Zehnder 2006, Haapasalo ve ark 2010):

- Geniş antimikrobiyal spektruma sahip olmalı ve biyofilm içerisinde bulunan bakteri ve mantarlara karşı yüksek düzeyde etkili olmalıdır.

- Nekrotik doku artıklarını, organik ve inorganik doku ve debrisleri çözebilmelidir.

- Bakteriyel endotoksinleri etkisiz hale getirebilmelidir.

- Kayganlaştırıcı özellikte olmalıdır. Enstrümanların kanalda daha rahat çalışmalarını sağlamalıdır.

- Smear tabakasını uzaklaştırabilmelidir. Bu esnada kanal duvarlarındaki dentin yapısında bozulmalara neden olmamalıdır.
- Düşük yüzey gerilimi göstererek girilemeyen alanlara nüfuzu artırmalıdır.
- Vital dokulara teması halinde antijenik, toksik ve karsinojenik etki göstermemelidir.
- Kullanım sonrasında kök kanallarında rezidüel etkisi devam etmelidir.
- Kanal dolgusu maddesine olumsuz bir etkisi olmamalıdır.
- Kanalda kolaylıkla nötralize olmamalıdır.
- Restoratif maddelerin pulpa odası ve kavite duvarlarına bağlanma özelliklerinde değişime neden olmamalıdır.
- Raf ömrü uzun olmalıdır.
- Saklama kolaylığı olmalıdır.
- Düşük maliyetli olmalıdır.
- Dişin rengini değiştirmemelidir.
- Kolay elde edilmelidir.
- Kolay saklanabilmelidir.
- Tadı ve kokusu kabul edilebilir olmalıdır.
- Kullanıcıya zarar vermemelidir.

1940'lı yıllardan önce endodontide en çok kullanılan irrigasyon solüsyonu su olup, geçmişten günümüze kadar çeşitli anestezik solüsyonlar, asitler, proteolitik enzimler, sodyum hipoklorit, etilendiamin tetraasetik asit, klorheksidin gibi pek çok irrigasyon solüsyonu kullanılmıştır. Kanal tedavisinde irrigasyon amaçlı kullanılan bu solüsyonların hiç biri tek başına ideali sağlayamamaktadır. Bu nedenle günümüzde farklı irrigasyon uygulama tekniklerinin yanı sıra yeni irrigasyon solüsyonları arayışları devam etmektedir. Fotodinamik terapi, elektrokimyasal

olarak aktive edilmiş su, ozonlanmış su, MTAD, Tetraclean, morinda citrifolia ve oktenidin hidroklorit yukarıda bahsedilen yeni irrigasyon yaklaşımlarından bazılarıdır (Gulabivala ve ark 2004, Dunavant ve ark 2006, Garcez ve ark 2007, Giardino ve ark 2007, Tandjung ve ark 2007, Murray ve ark 2008, Huth ve ark 2009).

1.1.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

Günümüzde en popüler irrigasyon solüsyonu olan NaOCl ilk kez 1. Dünya Savaşı esnasında kimyager Dakin ve cerrah Carrel tarafından yara antiseptiği olarak kullanılmıştır. 'Dakin solüsyonu' olarak bilinen bu solüsyon NaOCl'nin tamponlanmış %0,5'lik çözeltisidir (Zehnder 2006). NaOCl suda sodyum (Na^+) ve hipoklorit iyonlarına ayrışır ve hipoklorik asit oluşturarak denge sağlar. Asidik ve nötral pH'da klor daha çok hipoklorik asit formunda bulunsa da pH 9 ve üzerinde olduğu durumlarda hipoklorit halindedir. NaOCl'nin antibakteriyel etkinliğini sağlayan yapı hipoklorit asittir ve mikroorganizmaların hücresel fonksiyonlarını bozarak hücre ölümlerine sebep olur (McKenna ve Davies 1988, Barrette ve ark 1989).

Geniş bir antibakteriyel spektruma sahip olan NaOCl mevcut irrigasyon solüsyonları içinde en iyi antifungal ajan olma özelliğine sahiptir (Mohammadi 2008). Mikrobiyal biyofilmlerin yapısını bozarak tamamen ortadan kaldırılmasında diğer irrigasyonlara göre oldukça üstündür (Clegg ve ark 2006). Kemomekanik preparasyon esnasında vital ve nekrotik organik artıklara karşı çözücü etkinliği bulunmaktadır. Düşük yüzey gerilimi nedeniyle dentin duvarlarına kolayca diffüze olabilmektedir (Stojicic ve ark 2010). Ayrıca ucuz, kolay ulaşılabilirlik ve uzun raf ömrü gibi özelliklerinden dolayı NaOCl endodontide en çok tercih edilen irrigasyon solüsyonudur (Frais ve ark 2001).

Alkali bir solüsyon olan sodyum hipokloritin ticari formlarının pH'sı genellikle 10-12 civarında olup bu pH değeri solüsyonun kimyasal olarak daha stabil olmasını sağlamaktadır (Sassone ve ark 2008). Endodonti pratiğinde genel olarak NaOCl'nin %0,5 ve %6 arası değişen konsantrasyonları kullanılmakla beraber konsantrasyon arttıkça NaOCl'nin etkinliğinde önemli rol oynayan aktif klor oranı da

artmaktadır (Moorer ve Wesselink 1982). Yüksek konsantrasyonlu NaOCl solüsyonlarının antibakteriyel aktivitesi ve doku çözücü etkinliğinin daha iyi olmasına rağmen periapikal dokulara taşırıldığı zaman son derece sitotoksik olduğu bildirilmiştir (Spångberg ve ark 1973). Üstelik yüksek konsantrasyonda NaOCl organik dentin matriksini parçalayarak dentinin mekanik özelliklerini zayıflatmaktadır (Marending ve ark 2007). Solüsyonun istenmeyen bu etkilerini en aza indirmek amacıyla düşük konsantrasyonlu solüsyonların kullanılması önerilmektedir (Türkün ve ark 1998, Hu ve ark 2010). Kanalların irrigasyonu esnasında kullanılan solüsyon miktarının artırılması, kanal içindeki solüsyonun daha sık değiştirilmesi, solüsyonun ısısının artırılması, solüsyona yüzey aktif ajanların ilavesi, kök kanalı içindeki solüsyonun ultrasonik aktivasyonu ile düşük konsantrasyonlu NaOCl solüsyonlarının etkinliği artırılabilir (Moorer ve Wesselink 1982, Siqueira ve ark 2000b, Stojicic ve ark 2010).

NaOCl'nin Smear Tabakasına Olan Etkisi:

Kanal tedavisi esnasında kanal aletleri ile dentin kesildiğinde mineralize doku parçalanır ve bunun sonucunda önemli miktarda debris oluşur. Eğeleme işleminin gerçekleştiği yüzeylerde mineralize kollajen matriks yapısından kaynaklı bu tabakaya smear tabakası adı verilir (Mc Comb ve Smith 1975). Bu tabaka ilk kez 1970 yılında Eick ve ark (1970) tarafından taramalı elektron mikroskop (SEM) yardımıyla görüntülenmiştir. Smear tabakası dentin doku parçacıklarının yanı sıra, odontoblastik uzantılar, pulpa dokusu ve bakterileri de içermektedir (Mc Comb ve Smith 1975).

Kök kanal sistemindeki nekrotik veya canlı pulpa dokusu parçaları ve mikroorganizmaların varlığı nedeniyle kök kanalı preparasyonunun ilk evrelerinde smear tabakası yüksek oranda organik yapı içermektedir (Cameron 1988). Ancak eğeleme işlemi devam ettikçe smear tabakası şelasyon ajanlarıyla uzaklaştırılamayacak ölçüde kalınlaşır (Jodaikin ve Austin 1981).

Amorf, düzensiz ve granüler yapıda gözlenen smear tabakası kanal duvarlarını kaplayan 1-2 μm kalınlığındaki yüzeyel tabaka ve dentin tübülleri içerisinde 40 μm derinliğine kadar ulaşabilen derin tabaka olmak üzere iki kısımdan

oluşmaktadır (Mader ve ark 1984). Smear tabakasının dentin tübüllerindeki penetrasyon derinliği dentinin kuru ya da nemli preparasyonuna, kök kanal aletinin keskinliğine ve tipine, kök kanalının şekline, çapına ve kullanılan irrigasyon solüsyonunun miktarı ve içeriğine bağlı olarak değişmektedir (Gilboe ve ark 1980).

Bazı araştırmacılar smear tabakasının kaldırılmaması gerektiğini, dentin kanallarının ağzının tıkanmasıyla bakteri ve toksinlerin dentin tübüllerine penetrasyonunun önüne geçildiğini ileri sürmektedir (Dippel ve ark 1984, Safavi ve ark 1990). Öte yandan Nissan ve ark (1995) kanal içi mikroorganizma ve toksinlerinin smear tabakasına tutunabileceğini ve bu tabakanın mikroorganizmalara karşı etkili bir bariyer olmadığını belirtmiştir. Ayrıca smear tabakası nedeniyle irrigasyon solüsyonları ve medikamentlerin dentin tübüllerine penetre olamayacağı, kanal dolgu materyallerinin kanal duvarlarına tam adaptasyonunun sağlanamayacağı ve bünyesinde nekrotik materyal ve mikroorganizma barındırarak düzensiz yapısıyla ileride sızıntı için yol oluşturabileceği savunulmaktadır (Mader ve ark 1984, Haapasalo ve Orstravik 1987, Orstravik ve Haapasalo 1990, Guttmann 1993).

Smear tabakasının yalnızca organik kısmını uzaklaştırabilen NaOCl ancak EDTA veya sitrik asit gibi şelasyon ajanlarının kombine kullanımıyla smear tabakasının tümünü ortadan kaldırabilmektedir (Baumgartner ve Mader 1987, Aktener ve Bilkay 1993, Garberoglia ve Becce 1994, Haapasalo ve ark 2010, Leow ve ark 2012).

NaOCl'nin Dentin Dokusuna Olan Etkisi:

Endodontik tedavinin temel amaçlarından biri kalan diş yapısını korumaktır. Bu nedenle kanal tedavisi işlemleri süresince kök ve dentin yapısının zayıflamasına neden olacak fiziksel ve kimyasal işlemlerden kaçınmak gerekir (Haapasalo ve ark 2010). Dentin ağırlıkça yaklaşık olarak %22 oranında organik materyal içermektedir. Organik dokunun büyük bir kısmı ise tip I kollajenlerden oluşur. Dentine dayanıklılık ve esneklik sağlayan bu kollajenlerin içeriğindeki uzun peptid zincirlerinin NaOCl tarafından kırılmasıyla dentinin organik içeriği ayrışır ve mekanik özellikleri olumsuz etkilenir (Currey ve ark 1994, Marending ve ark 2007).

Slutzky-Goldberg ve ark (2004) %2,5 ve %6 konsantrasyonlu NaOCl solüsyonlarının kök dentini sertliğine olan etkisini araştırdıkları çalışmalarında 10 dakika ve daha fazla NaOCl'ye maruz kalan örneklerde anlamlı ölçüde dentin sertliğinde azalma olduğunu tespit etmişlerdir. Ayrıca %6 NaOCl ile irrigasyon, %2,5 NaOCl ile irrigasyona göre kök dentini sertliğinde daha fazla bir düşüşe sebep olmuştur. Sim ve ark (2001) %3'ten daha yüksek konsantrasyonlu NaOCl solüsyonlarına 2 saat maruz kalan insan kök dentini örneklerinin sertlik ve elastisitesinin serum fizyolojiğe göre önemli ölçüde azaldığını belirtmişlerdir.

Bir başka çalışmada ise %5 NaOCl'nin dentin kollajeni ve glikozaminoglikanların yapısında değişikliklere neden olduğu ve NaOCl'den etkilenmeyen hidroksiapatit kristallerinin dentin organik matriksinin korunmasında önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Aynı zamanda %5,25'lik konsantrasyon serum fizyolojik ile kıyaslandığında dentinin elastik modülü ve bükülme direncini de azaltmaktadır (Sim ve ark 2001).

Marending ve ark (2007) NaOCl ile irrigasyonun insan kök dentininin yapısal, kimyasal ve fiziksel özelliklerine olan etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında NaOCl'nin konsantrasyonu arttıkça dentinin sertliği ve elastisitesinde daha fazla düşüşe neden olduğunu rapor etmişlerdir. Dentinin inorganik yapılarında herhangi bir değişiklik bulunmazken karbon ve nitrojen içeriğinde azalma gözlenmiştir. Ayrıca NaOCl'nin konsantrasyonundaki artış dentin tübüllerinin bazik fuksin boyasına karşı geçirgenliğinde artışa neden olmuştur.

Hu ve ark (2010) yaptıkları çalışmada insan kök dentininin inorganik kısmına herhangi bir etki gösteremeyen NaOCl'nin dentinden yalnızca organik materyalleri değil karbonat ve magnezyum iyonlarını da uzaklaştırdığını ileri sürmüşlerdir. Düşük konsantrasyonda uzun süreli NaOCl kullanımını tavsiye eden araştırmacılara göre solüsyonun konsantrasyonu ile dentin deproteinasyonu doğru orantılı artış göstermektedir.

NaOCl'nin dentinin kimyasal ve mekanik yapısını etkilemesi, yüksek toksisitesi, irrigasyon esnasında gerçekleşen komplikasyonlar sonrası oluşan doku yıkımları, nadir de olsa gözlenen alerjik reaksiyonlar, antibakteriyel ve doku çözücü

özelliğinin dentin tarafından tamponlanarak etkinliğini yitirmesi, kötü koku ve tat gibi dezavantajları nedeniyle günümüzde yeni irrigasyon solüsyonu arayışları devam etmektedir (Mohammadi 2008). Ayrıca NaOCl solüsyonunun smear tabakasını uzaklaştırmada yetersiz kalması ve inatçı patojenlere karşı etki gösterememesi nedeniyle NaOCl'nin birden fazla solüsyonla kombine kullanımı tavsiye edilmektedir (Bystrom ve Sundqvist 1985).

1.1.2 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)

Kök kanallarının preparasyonunda dekalsifiye edici bir ajan olan EDTA endodontide ilk kez Nygaard-Østby tarafından %15'lik EDTA kullanımı ile dar ve kalsifiye kök kanallarını şekillendirmeye yardımcı olması için kullanılmıştır (Hülsmann ve ark 2003). Nygaard-Østby'e göre dentin gibi ana mineral içerikleri fosfat ve kalsiyum olan lipofobik maddeler suda çözünebilir. EDTA'nın disodyum tuzları ise bu ortama eklendiğinde kalsiyum iyonları bu solüsyondan uzaklaştırılır. Bu reaksiyon dentindeki minerallerin çözünmesini başlatır ve şelatörlerin dentinde dekalsifikasyona sebep olmasıyla sonuçlanır (Çalışkan 2006).

EDTA'nın (%15 veya 17 konsantrasyon) yanı sıra sitrik asit (%10, 20 ya da 50 konsantrasyon), laktik asit (%75 konsantrasyon) ve fosforik asit (%6 konsantrasyon) gibi farklı asitler de smear tabakasının inorganik kısmının kaldırılması amacıyla endodontide kullanılmaktadır (Mc Comb ve Smith 1975, Wayman ve ark 1979, Aktener ve Bilkay 1993, Takeda ve ark 1999). Organik dokulara çok az etkisi bulunan EDTA, günümüzde daha çok %17 konsantrasyonda ve nötral pH'da kullanılmaktadır (Haapasalo ve ark 2010).

EDTA sınırlı bir antimikrobiyal etkinliğe sahiptir. Gram negatif bakterilerin hücre duvarları dışındaki katyonlarına bağlanarak lipopolisakkaritlerin salınımına ve hücrelerin yapısının bu yolla bozulmasında rol oynayabilir. Aynı etkiyi ise gram pozitif bakterilere karşı gösterememektedir (Russel ve ark 1991). EDTA'nın dentin yüzeyinde herhangi bir antimikrobiyal etkisi bulunmamaktadır. Ancak smear tabakasını uzaklaştırması sonrası dentinin derin kısımlarında dezenfeksiyonu sağlayan antiseptiklerin antibakteriyel etkinliğini artırmaktadır (Haapasalo ve Orstravik 1987). Ayrıca EDTA biyofilm içinde bulunan bakterilerin birbirine

tutunmasını sağlayan ağır metallere bağlanarak biyofilmin parçalanmasına ve ardından kullanılan antiseptiklerin bakterilerle doğrudan temasına olanak sağlamaktadır (Chavez de Paz ve ark 2010).

EDTA'nın Smear Tabakasına Olan Etkisi:

Smear tabakasının hem organik hem de inorganik komponentler içermesi nedeniyle günümüzde kullanılan irrigasyon solüyonlarının tek başına smear tabakasını ortadan kaldırması mümkün olmamaktadır. Bu nedenle organik ve inorganik dokuları çözen solüsyonların sırasıyla kullanılması önerilmektedir (Baumgartner ve Mader 1987, Aktener ve Bilkay 1993, Garberoglia ve Becce 1994, Leow ve ark 2012). Smear tabakasının uzaklaştırılmasında 10 ml %17 EDTA'nın ardından 10 ml %5,25 NaOCl kullanımının en etkili kombinasyon olduğu belirtilmiştir (Goldman ve ark 1982). Ancak son yıkama NaOCl yerine EDTA ile bitirildiğinde smear tabakasında bulunan kollajen dahil diğer organik yapılar ortamdan uzaklaştırılamamaktadır (Goldman ve ark 1982). *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) gibi birçok bakterinin duyarlı olduğu kollajenin bakterilerin dentin yüzeyine adezyonunda rol oynadığı düşünüldüğünde EDTA ile bitirilen son yıkama bakterilerin adezyonunda bir artışa neden olabilir (Love 2001, Hubble ve ark 2003).

İrrigasyon solüsyonlarının ulaşmasının oldukça güç olduğu kökün apikal üçlüsündeki smear tabakası sırasıyla %17 EDTA ve %5 NaOCl ile yapılan irrigasyon sonrası etkili bir şekilde uzaklaştırılabilmektedir (Mader ve ark 1984, O'Connell ve ark 2000, Çalt ve Serper 2002). Ancak bu sonuçların tam aksine kökün apikal üçlüsündeki smear tabakasının bu irrigasyon solüsyonları ile dahi ortadan kaldırılamadığını ortaya koyan çalışmalar da mevcuttur (Mc Comb ve Smith 1975, Takeda ve ark 1999, Saito ve ark 2008). Yüzey gerilimini düşüren katyonik ve anyonik ajanların %17 EDTA solüsyonu içerisine ilavesiyle smear tabakasını kaldırma etkinliğinin artırıldığı SmearClear solüsyonu ile %17 EDTA'nın karşılaştırıldığı bir çalışmada ise her ikisinin de kökün apikal üçlüsündeki smear tabakasına etki edemediği bulunmuştur (Khedmat ve Shokouhinejad 2008).

Mader ve ark (1984)'ın %17'lik EDTA'nın uygulama süresi ile smear tabakasını kaldırma etkinliğini değerlendirdikleri çalışmalarında EDTA'nın etkisinin

5. dakikada başladığı ve 30. dakikaya kadar artış gösterdiği ancak bu süreden sonra 24 saate kadar herhangi bir değişikliğin gözlenmediği bulunmuştur. Çalt ve Serper'e (2002) göre EDTA ile smear tabakasının uzaklaştırılabilmesi için 1 dakika yeterlidir. Aynı araştırmacıların başka bir çalışmasında ise farklı konsantrasyon ve pH'lardaki EDTA'nın smear tabakasının uzaklaştırma etkinliği incelenmiş ve nötral pH'daki %17 EDTA'nın pH'sı 9 olan EDTA'ya oranla daha etkili olduğu belirtilmiştir (Serper ve Çalt 2002). Araştırmalardan elde edilen sonuçların farklılığında test edilen dişlerin yaşı, tipi, örnek büyüklüğü, kök kanal enstrümantasyon teknikleri, irrigasyon teknikleri, solüsyonun hacmi, pH'sı, uygulama süresi ve kökte ulaştığı derinlik gibi faktörler önemli rol oynamaktadır (Estrela ve ark 2009).

EDTA'nın Dentin Dokusuna Olan Etkisi:

Dentindeki kalsiyum iyonlarına bağlanarak kalsiyum şelatları oluşturan EDTA'nın 5 dakikalık uygulama sonrası dentinin 20-30 μm derinliğindeki yüzeyini dekalsifiye edebildiği ortaya konmuştur (Violich ve Chandler 2010). Hatta insan kök kanallarında 2 saatten fazla süreyle %17 EDTA bekletilmesi sonrasında kök yüzeyi dentininin 150 μm derinliğine kadar kalsiyum iyonunun tamamen ortadan kalktığı ileri sürülmektedir (Kawasaki ve ark 2000). Tek başına %17 EDTA ve %17 EDTA + %2,5 NaOCl ile yapılan irrigasyon ile dentinden önemli ölçüde kalsiyum iyonunun uzaklaştığı bildirilmektedir. Dentinin EDTA'ya maruz kalma süresi ile dentinden kalsiyum iyonunun uzaklaşması arasında doğru orantılı bir artış bulunmaktadır (Sayın ve ark 2007).

Kök kanalı enstrümantasyonu enasında 10 ml %17 EDTA ardından 10 ml %5,25 NaOCl ile yapılan irrigasyon smear tabakasını tamamen uzaklaştırırken kök kanal dentininde ciddi erozyonlara yol açmaktadır. (Çalt ve Serper 2002). Yapılan bir çalışmada kök kanalının yalnızca %15 EDTA ile yıkanması durumunda dentin yüzeyinin pürüzsüz, dentin tübül ağızlarının ise birbirinden ayrılmış ve düzenli bir görünüme sahip olduğu belirtilmiştir. Ancak %15 EDTA sonrası uygulanan %6 NaOCl kombinasyonunun dentin yüzeyinde erozyona sebep olduğu, dentin tübül ağızlarını düzensizleştirdiği belirtilmiştir.

EDTA ve NaOCl ile irrigasyon sonrası smear tabakasının kalkması ve dentin tübüllerinin açığa çıkması neticesinde dentinin yüzey pürüzlülüğünde artış meydana gelmektedir (Arı ve ark 2004, Eldeniz ve ark 2005, Tay ve ark 2007). Ayrıca bu solüsyonların kullanımıyla kök dentini sertliğinde azalma söz konusudur (Saleh ve Ettman 1999, Arı ve ark 2004, Eldeniz ve ark 2005, Saghiri ve ark 2009). İntertübüler dentinde bulunan minerallerin ve hidroksiapatit miktarının dentin yapısının sertliğinde rol oynadığı göz önünde bulundurulduğunda EDTA ve NaOCl'nin dentinin kimyasal yapısını doğrudan etkilediği anlaşılmaktadır (Panighi ve G'Sell 1992). Dentinin bükülme direnci ve elastik modülü EDTA ile irrigasyon sonrası olumsuz etkilenmektedir (Vollenweider ve ark 2007). Dentinin mekanik yapısında gözlenen bu değişimler dişte kök kırıklarının görülme riskini artırmaktadır (Saleh ve Ettman 1999).

1.1.3. Klorheksidin Glukonat (CHX)

Bisguanid grubunun en etkili üyesi olan klorheksidin 1940'lı yılların sonunda Imperial Chemical Industries Ltd. tarafından geliştirilmiştir (Zehnder 2006). Tuz formu en stabil halidir ve orijinal tuzları klorheksidin asetat ile hidroklorit suda çok az miktarda çözünür (Foulkes 1973). Diş hekimliğinde klorheksidin diglukonat daha yaygın kullanılan formdur (Haapasalo ve ark 2010). Güçlü bir antiseptik olan CHX plak oluşumunun önlenmesi amacıyla periodontolojide suda çözünmüş %0,1-0,2 konsantrasyonlarında kullanılmaktadır. Endodonti pratiğinde ise kök kanal irrigasyon solüsyonu olarak %2'lik konsantrasyonu önerilmektedir (Zamany ve ark 2003).

Hidrofobik ve lipofilik bir molekül olan CHX katyonik özellikleri sayesinde bakterilerin hücre membranlarındaki fosfolipit ve polisakkaritlerine bağlanarak hücre içine girebilir. CHX düşük konsantrasyonlarda bakteriostatik, %2 gibi yüksek konsantrasyonlarda ise bakterisidal etkiye sahiptir. Güçlü bakterisidal etkisini hücre içindeki sitoplazmik ürünlerin yıkımı ve hücrelerin ölümüyle göstermektedir (Athanassiasidis ve ark 2007). Sahip olduğu geniş antimikrobiyal spektrumu sayesinde gram pozitif bakteriler, gram negatif bakteriler ve mantarlara karşı oldukça etkilidir. Ancak mikobakteriler, bakteri sporları ve çoğu virüsler CHX'e karşı dirençlidir (Haapasalo ve ark 2005).

CHX'in bakteriler üzerine antimikrobiyal etkisinin en az NaOCl kadar yüksek olduğu belirtilmektedir (Jeansonne ve White 1994, Heling ve Chandler 1998, Roças ve Siqueira 2011). Çeşitli konsantrasyonlardaki NaOCl ve CHX'in *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkinliğini araştıran Gomes ve ark (2001) %5,25 NaOCl ile %2 CHX'in en etkin konsantrasyonlar olduğunu ve bakterileri tümüyle ortadan kaldırabildiğini bulmuşlardır.

CHX'in NaOCl'ye karşı bir diğer üstünlüğü ise göreceli olarak daha düşük toksisiteye sahip olmasıdır (Jeansonne ve White 1994). Ancak Giannelli ve ark (2008) CHX'in osteoblastik, endotelyal ve fibroblastik hücrelerde apoptozis ve nekroz ile hücre ölümüne neden olduğunu belirtmişlerdir. Üstelik CHX mitokondrilerin fonksiyonlarının bozulmasına, hücre içi kalsiyum iyonu ve oksidatif stresin artışına yol açmaktadır.

CHX'i diğer solüsyonlardan ayıran başka bir özelliği mine ve dentin gibi sert dokulara bağlanarak 'substantivite' adı verilen yavaş salınımı sayesinde antimikrobiyal etkisini uzun bir süre koruyabilmesidir (Mohammadi ve Abbott 2009). CHX'e maruz kalan dentinin yüzeyinden salınan pozitif yüklü moleküller bakterilerin membranlarına yapışarak yapısını bozmakta ve bunun sonucunda bakterilerin dentine adezyonu önlenmektedir. Enstrümante edilmiş kök kanallarında CHX rezidüel antimikrobiyal etkisini 48-72 saat süreyle koruyabilmektedir (Yang ve ark 2006).

Nekrotik doku artıklarını çözememesi ve kök kanal sistemini kimyasal olarak temizleyememesi CHX'in endodonti pratiğinde NaOCl'nin alternatifi olamayışının sebepleri arasında bulunmaktadır (Naenni ve ark 2004, Zehnder 2006). CHX antibakteriyel etkinliğini tip I kollajen, ölü hücreler ve dentin gibi organik yapılar varlığında kaybetmektedir (Portenier ve ark 2002). Gram negatif bakterilere karşı gram pozitif bakterilere olduğu kadar güçlü bir antibakteriyel etkinlik gösterememektedir (Athanassiasidis ve ark 2007). Ayrıca %2 CHX biyofilm yapısını ortadan kaldıramamaktadır ve bu nedenle biyofilmi fiziksel olarak parçalayabilen NaOCl gibi bir solüsyonla kombine kullanımı tavsiye edilmektedir (Clegg ve ark 2006). Yine başka bir çalışmada antimikrobiyal etkinliği NaOCl'den daha düşük

bulunan CHX'in biyofilmi parçalamakta yetersiz kaldığı gözlenmiştir (Bryce ve ark 2009).

CHX sahip olduğu katyonik özellikler sayesinde hidroksiapatit kristalleri içerisinde bulunan fosfat gruplarına güçlü bir şekilde tutunur ve bu şekilde dişin mine ve dentin dokusuna bağlanma gösterir Smear tabakası içinde bulunan hidroksiapatit artıkları da bu nedenle CHX'in mine ve dentine bağlantısını olumlu yönde etkilemektedir. Yani CHX smear tabakası ile kaplanmış yüzeylere çok daha fazla bağlantı göstermektedir (Hiraishi ve ark 2009).

CHX'in açığa çıkan dentin kollajeninin demineralizayonunu önleyemediği belirtilmektedir (van Strijp ve ark 1997). Bu görüşe kısmen destek veren Tay ve Pashley (2009) CHX'in dentin yıkımının önüne geçemediğini ancak sınırlı substantivitesi sayesinde bir süre geciktirebildiğini ileri sürmüştür. Ayrıca %2 konsantrasyonlu CHX uygulaması sonrasında dentinin elastik modülünde ilk 2 hafta bir değişiklik gözlenmediği ancak 4-6 hafta sonrasında önemli ölçüde artış gerçekleştiği belirtilmiştir (Kim ve ark 2011).

1.1.4. NaOCl ve EDTA'nın Etkileşimi ve Kombine Kullanımları

Hiçbir irrigasyon solüsyonunun tek başına smear tabakasını kaldırıp organik dokuları çözememesinden dolayı kök kanal enstrümantasyonu esnasında antibakteriyel etkisi güçlü bir solüsyonla beraber EDTA gibi bir şelasyon ajanının kombine kullanımı tavsiye edilmektedir (Zehnder 2006). Üstelik bakterilerin uzaklaştırılmasında NaOCl ile EDTA kombine kullanımının tek başına NaOCl kullanımına göre daha etkili olduğu bulunmuştur (Bystrom ve Sundqvist 1985).

NaOCl ile EDTA solüsyonlarının karıştırılmasıyla NaOCl'nin pH değeri düşmekte ve solüsyon içindeki aktif klorin yapısı etkilenmektedir. Açığa hipokloröz asit ve klorin gazı çıkmasıyla hipoklorit etkinliğini kaybetmektedir. Böylelikle NaOCl'nin antibakteriyel özellikleri ve doku çözücü etkinliğinde bir düşüş gözlenmektedir (Zehnder ve ark 2005). EDTA ise kalsiyuma bağlanma özelliğini, smear tabakasını uzaklaştırma etkinliğini ve antibakteriyel özelliklerini kaybetmeyerek klinik performansını sürdürmektedir (Grawehr ve ark 2003). Kök

kanalında EDTA irrigasyonunu takiben NaOCl kullanımı iki nedenle tavsiye edilmektedir:

- NaOCl'nin doku çözücü ve antimikrobiyal etkinliğinin korunması (Grawehr ve ark 2003).
- EDTA'nın kök kanalı içindeki rezidüel asidik etkilerinin ortadan kaldırılması (Grandini ve ark 2002).

1.1.5. NaOCl ve CHX'in Etkileşimi ve Kombine Kullanımları

CHX'in doku çözücü özelliğinin bulunmayışı nedeniyle NaOCl ile kombine kullanımı tavsiye edilmektedir (Naenni ve ark 2004, Haapasalo ve ark 2010). NaOCl ile irrigasyonun ardından CHX kullanımı NaOCl'nin tek başına kullanımına göre kök kanal sistemindeki bakterilerin ortadan kaldırılmasında daha etkilidir (Zamany ve ark 2003). Yalnızca NaOCl veya CHX ile irrigasyon sonrası kök kanalı içindeki mikrobiyal florada sırasıyla %59,4 ve %70 oranında bir düşüş sağlanırken NaOCl'nin ardından CHX kullanımıyla bu oran %84,6'ya yükselmektedir (Kuruvilla ve Kamath 1998).

Kök kanalı içinde NaOCl bulunurken kanalın CHX ile irrigasyonu sonucu iki solüsyon arasında kimyasal bir asit-baz reaksiyonu gerçekleşmektedir. Dikatyonik bir asit olan CHX'ten çıkan protonlar alkalen NaOCl'ye bağlanmaktadır ve nötr yapıda suda çözünemeyen bir çökelti meydana gelmektedir (Rossi-Fedele ve ark 2012). Koyu kahverengi/açık turuncu renkli bu çökelti içinde oldukça karsinojen olan parakloranilin bulunmaktadır (Chhabra ve ark 1991). Yapılan bir çalışmada %1 NaOCl ile %2 CHX uygulaması sonrası kanal içinde oluşan bu çökeltinin dentin tübül ağızlarını kimyasal bir smear tabakası gibi tıkadığı belirtilmiştir (Akisue ve ark 2010). Hatta kök kanalı içindeki NaOCl'nin paper-pointlerle uzaklaştırılıp ardından CHX irrigasyonunda dahi bu tabakanın oluşumunun önüne geçilemediği gözlenmiştir (Bui ve ark 2008). Klinikte NaOCl ile CHX kombine kullanılacağı zaman iki irrigasyon arasında kök kanalının alkol, distile su veya serum fizyolojik ile yıkanması tavsiye edilmektedir (Krishnamurthy ve Sudhakaran 2010).

1.1.6. EDTA ve CHX'in Etkileşimi ve Kombine Kullanımları

EDTA ve CHX'in teması sonucu homojen olmayan beyaz renkte bir çökelti oluşmaktadır. Çökeltinin esasının tuz olduğu ve katyonik yapıdaki CHX ile anyonik yapıdaki EDTA'nın nötralizasyonuyla oluştuğu belirtilmiştir. Günümüzde hakkında çok çalışma bulunmayan bu çökeltinin %90'dan fazlası EDTA veya CHX içerirken çökelti içinde parakloranilin maddesi tespit edilmemiştir (Rasimick ve ark 2008). Bunun yanı sıra EDTA'nın CHX ile temasında smear tabakasını kaldırma etkinliğini yitirdiği ileri sürülmektedir (Haapasalo ve ark 2010).

1.1.7. Serum Fizyolojik

Tıp biliminde kullanılan bir serum türü olan serum fizyolojik %0,9 NaCl izotonik yapıda bir eriyiktir. Bir miktar antibakteriyel etkinliğinden dolayı pediatride bebeklerin burun temizliğinde kullanılmaktadır. Tıpta kullanım alanları arasında diyabet koması, meme protezi, kan ve plazma hacminin ani düşmesiyle ortaya çıkan şok gibi durumlar bulunmaktadır.

Endodontide irrigasyon solüsyonu olarak kullanılan serum fizyolojiğin antibakteriyel etkinliği NaOCl ve CHX ile kıyaslandığında oldukça düşüktür (Jeansonne ve White 1994, Zamany ve ark 2003). Serum fizyolojik nekrotik doku çözücü özelliğine sahip değildir (Naenni ve ark 2004). Kök kanal sistemini temizleme kapasitesi oldukça düşük olup smear tabakasını uzaklaştırma etkinliği de yok denecek kadar azdır (Mc Comb ve Smith 1975, Yang ve ark 2006, Carvalho ve ark 2008, Gürbüz ve ark 2008). Serum fizyolojikle irrigasyon sonrası kök kanal dentininin mekanik özelliklerinde bir değişiklik gözlenmemektedir (Sim ve ark 2001). Ayrıca yüzey gerilimi yüksek olup dentin yüzeyinde erozyona neden olmadığı belirtilmiştir (Saghiri ve ark 2009).

1.1.8. QMix

Smear tabakasını çıkarmak ve kök kanal dezenfeksiyonu sağlamak amacıyla EDTA, CHX ve deterjan gibi antimikrobiyal ajanların karışımından üretilen QMix piyasaya 2011 yılında 'QMix® 2in1' ismiyle sunulmuştur (Ma ve ark 2011). EDTA

ile CHX'in karışımında oluşan beyaz renkli çökelti QMix'in kimyasal yapısı sayesinde gözlenmemektedir (Rasimick ve ark 2008, Ma ve ark 2011). Ayrıca NaOCl ile CHX karışımında ortaya çıkan karsinojenik parakloranilin ve kahverengi renklenme QMix ile NaOCl karışımında meydana gelmemektadir. Nötr pH'a sahip olan QMix'in içeriğine deterjan ilavesi ile solüsyonun yüzey gerilimi düşürülmüştür. Kanalların NaOCl ile irrigasyonunun ardından son yıkama solüsyonu olarak QMix kullanımı tavsiye edilmektedir. Böylece EDTA'nın smear tabakasını çıkarabilme etkinliği ve CHX'in antimikrobiyal ve substantivite özelliklerinden yararlanılması amaçlanmaktadır (Stojicic ve ark 2012).

Kök kanal duvarlarından smear tabakasının çıkarılmasında %5,25 NaOCl solüsyonu ile irrigasyonun ardından uygulanan QMix'in %17 EDTA kadar etkili olduğu belirtilmiştir (Dai ve ark 2011). Bir başka *in vitro* çalışmada QMix'in planktonik ve biyofilm yapıda bulunan *E. faecalis*'e ve karışık plak bakterilerine karşı antimikrobiyal etkinliği ve smear tabakasını çıkarabilme etkinliği değerlendirilmiştir. QMix ve %1 NaOCl planktonik *E. faecalis* hücrelerini 5 sn içinde tümüyle ortadan kaldırırken %2 CHX ve bir başka antimikrobiyal solüsyon olan MTAD 3 dakikadan sonra bile bakterilere tam olarak etki edememiştir. QMix plak biyofilm bakterilerine karşı %2 CHX'e göre daha etkin bulunurken smear tabakasını uzaklaştırma etkinliği bakımından QMix ve %17 EDTA arasında bir fark bulunamamıştır. Araştırmacılar NaOCl'nin ardından EDTA ile yıkanan kök kanallarının dentin yüzeyinde gerçekleşen erozyonun NaOCl ile Qmix'in kombine kullanımında görülmediğini belirtmiştir (Stojicic ve ark 2012).

QMix'in %6 NaOCl kadar etkili bir antimikrobiyal solüsyon olduğu ve dentin tübülleri içine penetre olan *E. faecalis* hücrelerini oldukça kısa bir sürede yok edebildiği bulunmuştur (Ma ve ark 2011). Yine bir başka çalışmada QMix ve %6 NaOCl'nin *E. faecalis* biyofilmlerini %2 NaOCl ve %2 CHX'e göre daha etkili ortadan kaldırdığı bulunmuştur. Ayrıca içeriğindeki deterjan sayesinde yüzey gerilimi düşürülen QMix'in dentin tübüllerinin derinliklerindeki mikroorganizmalara daha etkin bir şekilde ulaşabildiği belirtilmiştir. QMix ve NaOCl her ne kadar güçlü antibakteriyel etkinliğe sahip olsalar da dentinin inhibitör etkisi karşısında bu etkinliklerini kaybetmektedirler. Böylece bakterilerin tümüyle ortadan

kaldırılabilmeleri için kök kanalında bu solüsyonların daha uzun süre kullanımlarına ihtiyaç duyulmaktadır (Wang ve ark 2012).

QMix'in biyouyumluluğunu fareler üzerinde *in vivo* inceleyen Chandrasekhar ve ark (2013) QMix'in %3 NaOCl, %2 CHX ve %17 EDTA'ya kıyasla daha az toksik olduğunu bulmuşlardır.

1.1.9. Oktenidin Hidroklorit (OCT)

Oktenidin hidroklorit (N,N'-(1,10-Decanediyldi–1(4H)-pyrindinyl–4-ylidene)bis-[1-octanamine] dihydrochloride); travmatik, akut, kronik, cerrahi ve yanık yaralarının iyileşmesinde, mukoza membranı dezenfeksiyonunda ve ağız gargaralarında antiplak ajan olarak kullanılan bir dezenfektandır. Solüsyon bisprimidin bileşiği olan oktenidin hidroklorit (0,1 gr) ve etanolün bir türevi olan fenoksietanoldan (2 gr) oluşmaktadır. OCT geniş bir antimikrobiyal spektruma sahip olup gram pozitif ve gram negatif bakteriler, mantarlar ve bazı virüs çeşitlerine karşı oldukça etkilidir (Slee ve O'Connor 1983, Sedlock ve Bailey 1985, Decker ve ark 2003, Tiralı ve ark 2009, Zumtobel ve ark 2009). OCT katyonik yapısından dolayı negatif yüklü hücre duvarına bağlanır. Böylece hücrelerin yapısal bütünlüğü dağılır ve vital fonksiyonlarında meydana gelen bozulmalar sonrası hücre ölümü gerçekleşir (Brill ve ark 2006). Oktenidin hidroklorit solüsyon içinde fenoksietanole göre daha düşük konsantrasyonda bulunmaktadır. Buna rağmen solüsyonun aktif antimikrobiyal ajanı oktenidin hidroklorittir. Fenoksietanol ise oktenidin hidroklorit ile sinerjistik etki göstererek antibakteriyel etkinliğin artmasına yardımcı olmaktadır (Tandjung ve ark 2007).

OCT'in dental plak oluşumuna neden olan bakterilere karşı bakterisidal etkisi CHX kadar güçlüdür (Slee & O'Connor 1983). Hatta Sedlock ve Bailey (1985) OCT'in antibakteriyel etkinliğinin CHX'ten daha üstün olduğunu ve düşük konsantrasyonda bile bakterilere karşı oldukça hızlı etki gösterebildiğini ileri sürmüştür. Yine bir başka çalışmada OCT'in CHX'e kıyasla planktonik veya yüzeye yapışık halde bulunan bakterileri daha etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı belirtilmiştir. Ayrıca OCT'in üstün antiadeziv özelliklerine dikkat çekilmiştir (Decker ve ark 2003). Antimikrobiyal ajanlara karşı oldukça dirençli bakterilerden

biri olan *Listeria monocytogenes*'in oluşturmuş olduğu biyofilm yapısının OCT tarafından etkin bir şekilde parçalandığı ve hatta bu bakterinin yüzeye bağlanmasının engellendiği belirtilmiştir (Amalaradjou ve ark 2009). Zumtobel ve ark (2009) OCT ile kaplanmış yüzeylerde OCT'in antimikrobiyal etkinliğinin devam ettiğini, yüzeye yapışan bakterilerin sayısında düşüş gözlendiğini ve biyofilm oluşumunun engellendiğini ortaya koymuşlardır.

Endodontik tedavinin başarısızlığından sorumlu tutulan bakterilerden *Staphylococcus aureus, Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*'ın öldürülmesinde NaOCl ile OCT'in farklı konsantrasyonlarını kıyaslayan Tiralı ve ark (2009) yarı yarıya sulandırılmış OCT'in %5,25 NaOCl'den bile daha etkili olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Tandjung ve ark (2007) deneysel olarak enfekte edilmiş kök kanal dentinindeki *E. faecalis'e* karşı kanal içi medikament olarak hazırlanan OCT'in antimikrobiyal aktivitesini değerlendirdikleri *ex vivo* çalışmalarında 10 dakikalık temasın sonunda bakterilerin büyük ölçüde ortadan kaldırıldığını bulmuşlardır. Bir haftanın sonunda ise yalnızca bir örnekte bakteriye rastlanmıştır.

E. faecalis ile 8 hafta süreyle enfekte edilen kök kanallarındaki kanal içi medikamentlerin antibakteriyel etkinliğini *in vitro* değerlendiren Lucena ve ark (2013) CHX veya OCT içerikli medikamentlerin 12 hafta sonunda kalsiyum hidroksite göre daha fazla antibakteriyel etki gösterdiklerini belirtmişlerdir. Üstelik CHX veya OCT içerikli medikamentlerin yerleştirildiği kök kanallarının hiç birinde 12 hafta sonunda bakteriyel büyüme gerçekleşmemiştir.

OCT'in bir başka avantajı ise bakterilerin bu antimikrobiyal ajana karşı direnç gelişimi göstermemesidir. Örneğin 3 ay boyunca düşük dozda OCT'e maruz bırakılan *Staphylococcus aureus*'un bu antiseptiğe karşı rezistans kazanmadığı bildirilmiştir (Al-Doori ve ark 2007).

Ortamda bulunan kan, albümin, müsin gibi organik yapılar veya 4-37°C arasında değişen sıcaklıkların OCT'in antimikrobiyal etkinliğinde bir kayba neden olmadığı bulunmuştur (Pitten ve ark 2003, Amalaradjou ve ark 2009).

OCT'in ayrıca sitotoksik ve genotoksik olmadığı bildirilmiştir (Wagner ve ark 2004). Cilt tarafından absorbe edilmediği ve oral yoldan alınan yüksek dozajlarda bile herhangi bir sistemik etkisinin bulunmadığı rapor edilmiştir (Harke 1989). OCT yeni doğan bebeklerde cilt dezenfektanı olarak kullanımında bile herhangi bir yan etkiye neden olmamıştır (Bührer ve ark 2002).

1.2. Biyofilm

Doğada yüzeye yapışık halde bulunan ve ince bir tabaka halinde bir araya gelen mikroorganizma topluluklarına (bakteriler, mantarlar, protozoalar) biyofilm adı verilir. Biyofilmin oluşumu için sıvı ortamda serbest halde bulunan ve planktonik adı verilen mikroorganizmaların bir yüzeye tutunması şarttır. Diş hekimliğinde bugüne kadar en çok araştırılan biyofilm yapısı tükürük içindeki planktonik mikroorganizmaların diş yüzeyine tutunarak oluşturdukları dental plaktır (Bowden ve ark 1976).

Mikroorganizmalarca üretilen polisakkaritler ve proteinler bakterilerin yüzeye adezyonunda önemli bir role sahip olup ayrıca biyofilm bakterilerinin bir arada tutunmasını sağlamaktadır. Bu sürecin devamında yüzeye birçok farklı mikroorganizma tutunmaya devam eder. Adezyon mekanizması ve sonrasında gerçekleşen biyofilm oluşumu bakterilerin kolonizasyonu ve konakta canlılığını sürdürmesi için oldukça önemlidir (Costerton ve ark 1999). Mikroorganizmaların biyofilm içinde bulunmalarının en önemli avantajı planktonik türleriyle kıyaslandığında dış etkenlere karşı daha korunaklı ve daha dirençli olmalarıdır (Lewis 2001).

1.2.1. Biyofilm Oluşumunun Aşamaları

Tükürük ve diş eti oluğu sıvısından gelen protein, glikoprotein ve bir takım mikrobiyal ürünlerin yüzeye yapışarak ince organik bir film tabakası meydana getirmeleri biyofilm oluşumunun ilk aşamasıdır. Bu film tabakası mikroorganizmaları yüzeye çeker ve hangi mikroorganizmanın yüzeye tutunacağını belirleyerek biyofilm içeriğini doğrudan etkiler (Buschner ve Mei 2000).

İkinci aşama ise mikroorganizmaların bu ince film tabakasına adezyonu ve ardından diğer türlerin de bu tabaka içine katılmalarını içerir. Biyofilme sonradan katılan mikroorganizmaların türü yüzeye ilk tutunan mikroorganizmalar tarafından belirlenmektedir (Kolenbrander ve ark 2002).

Üçüncü aşamada biyofilm içindeki mikroorganizma türlerinin sayısı giderek artış gösterir ve karışık mikrobiyal toplulukların bulunduğu organize bir yapı ortaya çıkar. Bundan sonra biyofilmin büyümesini ve türlerin çeşitliliğini mikroorganizmaların karakteristik özellikleri ve dış etkenlerden gelen uyaranlar belirler. Biyofilm içinde yaşayan bakteriler ekzopolisakkarit, protein ve nükleik asitlerden oluşan bir ekstrasellüler polimer matriks tarafından bir arada tutulmaktadır (Costerton ve ark 1999).

Oluşan biyofilmin üst tabakasından mikroorganizmalar zamanla koparak biyofilmden ayrılır. Mikroorganizmaların yüzeyden düzenli olarak ayrılmaları biyofilm gelişimi boyunca devam eden bir süreç olup bu durum mikroorganizmaların başka alanlara dağılımı ve kolonize olmaları anlamına gelmektedir (Lee ve ark 1996).

1.2.2. Biyofilm Bakterilerinde Gerçekleşen Değişiklikler

Mikroorganizmaların yüzeye adezyonu sonrasında bünyelerindeki çok sayıda genin değişime uğrayarak bakterilerin fenotiplerinde farklılıklar meydana getirdiği düşünülmektedir. Yüzeyin indüklediği bu değişiklikler bakteri türüne ve yüzeyin özelliğine göre değişmektedir (Svensäter ve Bergenholtz 2004). Bakterilerin

yüzeye adezyonu sonrası protein sentezinde anormal bir artış gözlendiği ve farklı tiplerde protein üretimine başlandığı saptanmıştır (O'Toole ve Kolter 1998).

Biyofilm bakterilerince gerçekleştirilen fenotip değişiklikleri sayesinde antimikrobiyal ajanlara karşı direnç gelişimi ortaya çıkmaktadır. Örneğin yapılan bir çalışmada *Streptococcus sobrinus*'un biyofilm içindeki ve planktonik türü kıyaslandığında biyofilm içinde bulunanların klorheksidine 300 kat, amin floride ise 75 kat daha dirençli olduğu ortaya konmuştur. Kazandıkları bu direnç sayesinde biyofilm yapısına katılan mikroorganizmaları antimikrobiyal ajanlarla ortadan kaldırmak oldukça güç olmaktadır (Shani ve ark 2000). Planktonik fazdan biyofilme geçiş sürecinde bakterilerin fonksiyon ve fenotiplerinde meydana gelen değişiklikler üzerine çalışmalar devam etmektedir.

Biyofilm içinde bulunan bakteriler ortamda besin azlığı söz konusu olduğunda açlıktan korunabilmek için fizyolojik statülerini inaktif ya da yarı büyüme fazına geçirerek metabolizmalarını yavaşlatabilmektedir (Portenier ve ark 2005). Biyofilm bakterileri ayrıca yeterli sayıya ulaştıklarında kendi aralarında iletişim kurarak gen transferi yapabilmektedirler. Hücreler arası bu iletişim bakterilerin virülans özellik kazanmalarını, biyofilm oluşturabilmelerini ve DNA'larını hücre dışında birleştirerek çevresel streslere karşı daha dirençli hale gelmelerini sağlamaktadır (Cvitkovitch ve ark 2003). Bakterilerin kendi aralarında ve hatta diğer türlerle kurabildikleri bu iletişim üretmiş oldukları peptit-sinyal molekülleri sayesinde gerçekleşmektedir (Aamdal ve Petersen 2004). Bu moleküller ayrıca çevresel faktörler gibi hareket etmekte ve kök kanalında oluşan biyofilm bakterilerinin gen üretimlerinde değişikliklere neden olmaktadır (Svensäter ve Bergenholtz 2004).

1.2.3. Endodontide Biyofilm

Kök kanallarında biyofilm oluşumu ilk kez Nair tarafından 1987 yılında ortaya konmuştur. Çekilmiş periapikal lezyonlu dişlerden alınan görüntülerde kök kanal duvarları boyunca ekstrasellüler polimer matriks içine gömülmüş yoğun kok ve rod hücreleri gözlenmiştir. Tronstad ve ark (1990) endodontik tedaviye direnç gösteren inatçı enfeksiyonlu çekilmiş dişlerin köklerinden alınan görüntülerde

köklerin apikal forameni ve çevresinde düzgün ve organize olmayan çeşitli bakteriyel formların bulunduğu bir yapı gözlemişlerdir. Bir ekstrasellüler materyal yardımıyla birbirlerine tutunan bu mikroorganizmaların büyük kısmının koklar, rodlar ve az da olsa fibriler yapıdaki bakteriler olduğu belirtilmiştir.

Kök kanallarından enflamatuar lezyon boyunca gerçekleşen sıvı akışı kök kanalını istila eden mikroorganizmalar için sıvı ve besin kaynağı olmaktadır. Bu sıvı akışı hem mikroorganizmaların çoğalmalarına hem de kök kanal duvarlarına adezyonuna olanak sağlamaktadır. Biyofilm yüzeyinden bakterilerin koparak ayrılma süreci kök kanalı içinde de gerçekleşmekte olup kök kanalı içinde bulunan biyofilmden ayrılan bakteriler enflamatuar lezyon içinde kolonize olabilmektedirler (Nair ve ark 2005).

Carr ve ark (2009) endododontik tedavileri 10 yıl önce yapılıp yaklaşık 2 yıl önce kanal tedavileri yenilenen ancak buna rağmen başarısız olunup çekilen alt molar dişlerin kök uçlarını rezeke edip elektron mikroskobu ile incelemişlerdir. Kompleks, değişken ve birçok türü bir arada bulunduran biyofilm yapısının örneklerin tümünde var olduğu tespit edilmiştir. Fuji ve ark (2009) inatçı enfeksiyona sahip periapikal lezyonlu dişlerin mikrobiyal florasını inceledikleri çalışmalarında toplam 74 adet mikroorganizma türü tespit etmişlerdir. Bu mikroorganizmalardan 31'inin bakteri türü ve bunların % 51,6'sının da fakültatif anaerop olduğunu bulmuşlardır.

Subramanian ve Mickel (2009) başarısız endodontik tedavili ve inatçı periapikal lezyonlu 34 dişe kök ucu rezeksiyonu yapmışlar ve bütün kök uçlarında yüksek oranda bakteri varlığını rapor etmişlerdir. *Burkholderia cepacia* ve *Enterecoccus faecalis* tüm örneklerden izole edilmiştir.

1.3. Enterococcus faecalis

Enterokoklar gram pozitif fakültatif anaeroblar olup oksijen varlığı veya yokluğunda varlığını sürdürebilmektedirler (Roças ve ark 2004). Karbonhidrat, gliserol, laktat, sitrat, aljinin ve birçok keto asit türevini parçalayabilen enterokoklar oldukça yüksek pH (9,6) ve tuz konsantrasyonlarında bile canlılığını

koruyabilmektedir (Gilmore 2002, Tendolkar ve ark 2003). Tuz, deterjan, ağır metaller, etanol ve kurutma gibi zor çevresel koşullara dayanıklılık gösterirler (Gilmore 2002). Çoğalabildikleri sıcaklık değerleri 10-45°C arasında değişmekte olan enterokoklar 60°C'de 30 dakika boyunca hayatta kalabilmektedirler (Tendolkar ve ark 2003). Bakteriyemi, endokardit, bakteriyel menenjit ve idrar yolları gibi birçok sistemik hastalığa yol açabilen *E. faecalis* hastane enfeksiyonlarının büyük çoğunluğunun tek başına sorumlusudur (Jett ve ark 1994).

İnsan bağırsak boşluğu mikroflorasının normal bir üyesi olan enterokoklar genellikle bulunduğu konağa zarar vermezler. Ayrıca ağız boşluğunda ve kadınların genital bölgesinde düşük oranlarda bulunmakta olup *E. faecalis* ve *E. faecium* enterokokların en baskın iki türüdür (Koch ve ark 2004). Ağız boşluğunda en baskın rastlanan enterokok türü ise *E. faecalis*'tir (Sedgley ve ark 2004).

E. faecalis fermante süt ve süt ürünleri gibi besinler yoluyla ağız ortamı ile tanışmaktadır. Sağlıklı 50 gönüllünün katıldığı bir çalışmada *E. faecalis*'in yoğun bulunduğu peynirlerin tüketiminden 1, 10 ve 100 dakika sonrasında ağız boşluğundan örnekler alınmıştır. Zamana bağlı olarak ağız boşluğunda bulunma oranı giderek düşen *E. faecalis* 100 dakika sonrasında ağız boşluğundan izole edilememiştir. Bu durum enterokokların aslında ağız boşluğuna tutunabildiğini ancak büyüyemediğini ve kısa bir süre sonra ağız boşluğundan ayrıldığını göstermektedir (Razavi ve ark 2007).

Yapılan bir başka çalışmada daha önce endodontik tedavi görmüş 100 hastanın ağız boşluğundan alınan örnekler değerlendirilmiş ve 11 hastada *E. faecalis*'e rastlanmıştır. Endodontik tedavi görmemiş ağız hijyeni iyi olan 100 diş hekimliği öğrencisinden ise yalnızca 1'inde rastlanmıştır. Kısacası ağız hijyeni iyi olan bireylerin ağız boşluğunda çoğu zaman bu bakteriye rastlanmamaktadır (Sedgley ve ark 2004). Böylelikle enterokokların aslında ağız mikroflorasının normal bir üyesi olmayıp ağız boşluğunu geçiş yolu olarak kullanan bakteriler olduğu anlaşılmaktadır (Sedgley ve ark 2005, Razavi ve ark 2007).

Kanal tedavisi yapılmış dişlerde görülen başarısızlıktan sorumlu bakteriler arasında en popüler olanı *E. faecalis*'tir (Molander ve ark 1998). *E. faecalis* kanal tedavisi yapılmamış nekrotik kök kanallarındaki mikrobiyal florada oldukça düşük oranda bulunmaktadır. Ancak bunun aksine inatçı periradiküler enfeksiyonun bulunduğu başarısız kök kanal tedavili dişlerin kök kanallarından sıklıkla izole edilmektedir (Evans ve ark 2002).

Kanal tedavisinin başlangıcında *E. faecalis*'e rastlanmayıp ikinci seans kök kanallarından izole ediliyor oluşu bu bakterinin tedavi esnasında yeterli izolasyonun sağlanamaması veya geçici dolgu materyalinin sızıntısıyla kök kanalı içine girdiğini akla getirmektedir (Sjogren ve ark 1991, Sundqvist ve ark 1998). Başarısız bir daimi restorasyondan kaynaklanan koronal sızıntı varlığında dolumu yapılmış kök kanalları ile ağız boşluğu sürekli temas halindedir (Saunders ve Saunders 1994). Bu nedenle endodontik tedavi tamamlandıktan sonra da *E. faecalis*'in kök kanal sistemine girebileceği belirtilmiştir (Molander ve ark 1998, Kaufman ve ark 2005). Dentine adezyonu ve biyofilm oluşturabilmesi neticesinde ortamda besin yokluğunda dahi *E. faecalis* canlılığını sürdürebilmekte ve antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirmektedir. Dolumu yapılmış enfekte kanallarda *E. faecalis*'in sıklıkla bulunuyor olmasının nedeni kök kanallarından uzaklaştırılmasını güçleştiren bu faktörler değerlendirildiğinde daha iyi anlaşılmaktadır (Engström 1964, Wang ve ark 2011).

1.3.1. *E. faecalis'in* Sahip Olduğu Virülans Faktörleri

E. faecalis sitolsin, agregasyon maddeleri, feromonlar, enterokokkal yüzey proteinleri (esp), endokarditisle ilişkili antijen (EfaA), kapsüler polisakkarit, lipoteikoik asit, kollajen-bağlanma proteini, jelatinaz ve serin proteaz gibi birçok virülans faktöre sahiptir (Coque ve ark 1995, Roças ve ark 2004, Di Rosa ve ark 2006). Bu virülans faktörleri sayesinde konak hücrelerine ve ekstrasellüler matrikse yapışabildiği, ürettiği bazı proteinler yardımıyla diğer bakterilerle yarışabildiği, konak cevabında değişikliklere yol açtığı, bağışıklık sistemini etkilediği ve salgıladıkları toksinler nedeniyle konağa zarar verebildikleri gösterilmiştir (Love 2001, Roças ve ark 2004). Ayrıca *E. faecalis*'in büyük olasılıkla lenfositlerin fonksiyonlarını baskılayarak endodontik başarısızlıklara neden olduğu

düşünülmektedir (Lee ve ark 2004). Bütün bu faktörlerin yanında *E. faecalis*'in enfeksiyon sürecindeki en önemli özelliği kök kanallarında inatçı bir patojen olarak canlılığını sürdürebilmesidir (Roças ve ark 2004).

E. faecalis kök kanal sistemi içindeki zorlu yaşam koşullarının üstesinden birkaç yolla gelebilmektedir (Stuart ve ark 2006). Öncelikle bu bakterinin yaygın birçok genetik farklılığı bulunmaktadır (Sedgley ve ark 2004). Serin proteaz, jelatinaz ve kollajen-bağlanma proteinleri yardımıyla dentine bağlanabilen *E. faecalis* yeterince küçük yapısıyla dentin tübülleri içine girerek yaşamını sürdürebilmektedir (Love 2001, Hubble ve ark 2003). Ortamda besin yokluğunda uzun süre dayanabilme kapasitesindedir. Üstelik böyle bir durumda serumu bir besin kaynağı olarak kullanabilmektedir (Figdor ve ark 2003). Alveoler kemik ve periodontal ligamentten gelen serum ayrıca *E. faecalis*'in dentinin tip I kollajenine bağlanmasını da artırmaktadır (Love 2001).

Dentin tübüllerine yerleşen *E. faecalis*'in kanala yerleştirilen kalsiyum hidroksite 10 günden fazla bir süre direnç gösterebildiği bildirilmiştir (Haapasalo ve Ørstravik 1987, Ørstravik ve Haapasalo 1990). Ayrıca *E. faecalis* biyofilm oluşturabilme yeteneğine sahip olup kendisini ortadan kaldıracak olan antikor, fagosit ve antimikrobiyal maddelere karşı biyofilm içinde olmayan türlerine göre yaklaşık 1000 kat daha fazla direnç gösterebilmektedir (Distel ve ark 2002). Brändle ve ark (2008) dentin yüzeyine adezyon yapmış veya süspansiyon içinde bulunan planktonik formdaki *E. faecalis*'in kalsiyum hidroksite olan duyarlılığını test etmişler ve dentine adezyon yapmış olan *E. faecalis*'in kalsiyum hidroksite çok daha dirençli olduğunu tespit etmişlerdir.

1.3.2. *E. faecalis*'in Dentine Adezyon Mekanizmaları

Endodontik enfeksiyonların başlangıcı sürecinde bakterilerin dentin tübüllerine adezyonu ve yayılımı oldukça önemlidir (Love 2001). *E. faecalis*'in diş yüzeyine bağlantısında yüzey özellikleri, ortamda besin varlığı, bu bakterinin sahip olduğu iletişim molekülleri ve genel sıvı akışının önemli faktörler olduğu belirtilmiştir (Carniol ve Gilmore 2004).

Dentinin organik matriks yapısını oluşturan kollajen *E. faecalis*'in dentin yüzeyine spesifik bağlantısında oldukça önemlidir. *E. faecalis* öncelikle dentin yüzeyine hidrofobik veya Van der Wall's kuvvetleri gibi fiziksel bir bağlantı ile tutunmaktadır (Carniol ve Gilmore 2004). *E. faecalis* klinik suşuna bağlı olarak farklı mekanizmalar aracılığıyla dentin yüzeyine bağlanabilme yeteneğindedir (Di Rosa ve ark 2006). *E. faecalis*'in farklı suşlarının salgıladığı serin proteaz, Ace ismi verilen kollajen bağlanma proteinleri ve jelatinaz enziminin bu bakterinin dentine adezyonunda önemli etkilerinin olduğu düşünülmektedir (Hubble ve ark 2003). Çevresel uyaranlar virülans faktörlerinin ortaya çıkışında oldukça etkilidir ve bakterilerin zor koşullara karşı gelebilmesinde virülans faktörleri önemli rol oynamaktadır (Wang ve ark 2011).

Nallapareddy ve ark (2000) kollajen bağlanma proteininin *E. faecalis*'in ekstrasellüler matrikse bağlanmasında önemli rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Ortam sıcaklığının yükselişi gibi bakteride strese neden olabilecek çevresel koşullarda bu proteinin salımında artış gözlenmiştir. Dentin kollajeninin *E. faecalis*'in adezyonu için oldukça uygun bir yüzey olduğu ve kollajen-bağlanma proteininin bu bağlantıyı artırdığı belirtilmiştir. Ayrıca *E. faecalis*'in dentine bağlantısı ortamdaki kollajen miktarına bağlı olarak değişmektedir.

Hubble ve ark (2003) *E. faecalis*'in kollajen-bağlanma proteini salgılamayan klinik suşunun (TX5256) 37ºC'de dentine minimum bağlandığını belirtmişlerdir. Ayrıca ortama Anti-Ace IgG proteininin eklenmesi *E. faecalis*'in dentine adezyonunu önemli derecede azaltmıştır.

Kayaoğlu ve ark (2009) *E. faecalis*'in A197A klinik suşunun kollajene bağlanma eğiliminde olduğunu ve ortama serbest kollajen ilave edildiğinde bakteri hücrelerinin kollajenle çevrelendiğini tespit etmişlerdir. Kollajene bağlanan bu bakterilerin klorheksidin ve iyodin potasyum iyodid solüsyonlarına karşı direnç kazanabildiği belirtilmiştir.

1.3.3. *E. faecalis*'in Dentine Adezyonunda Jelatinaz Enziminin Önemi

Normal doku oluşum sürecinde veya patolojik durumlarda ekstrasellüler matriks yapının yıkımında matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin bir üyesi olan jelatinaz önemli rol oynamaktadır. Normal fizyolojik şartlar altında proteaz enzimleri denatüre olmamış kollajen yapısında yıkıma yol açamazken MMP ailesinden jelatinaz ve kollajenaz gibi enzimler oldukça yıkıcı bir etkiye sahip olabilmektedir. Dokularda jelatinazın aşırı salgılanması romatoid artrit, metastatik kanser, anevrizma, osteoporoz, kornea rahatsızlıkları ve yetişkin periodontitis gibi birçok hastalığa yol açmaktadır (Ramamurthy ve ark 2002). Hastane enfeksiyonları nedeniyle yatmakta olan hastalardan izole edilen *E. faecalis*'in çoğunlukla jelatinaz enzimini üretebildiği bildirilmiştir (Coque ve ark 1995). Ayrıca yapılan hayvan çalışmalarıyla oldukça şiddetli endokardite neden olduğu ortaya konmuştur (Gutschik ve ark 1979).

Geçmişte ismi literatürde *Streptococcus faecalis var. liquefaciens* olarak geçen *E. faecalis*'in jelatinaz üretebilen türleri Engsröm (1964) tarafından enfekte kök kanallarında tespit edilmiştir. Yapısında çinko bulunan jelatinaz; non-plazmid bir metallo-endopeptidazdır. Ortalama 6–8 pH'ya sahip hidrofobik bir proteindir. Dentin kollajeni, jelatin, fibrin, hemoglobin, kasein ve diğer peptitleri parçalayabilmektedir (Makinen ve ark 1989, Coque ve ark 1995, Carniol ve Gilmore 2004). Hayvan çalışmaları ve epidemiyolojik verilere göre *E. faecalis*'in virülans faktörlerinden biri olan jelatinaz yüzeylerde biyofilm oluşumunu artırmaktadır (Coque ve ark 1995, Cvitkovitch ve ark 2003, Wang ve ark 2011). Üstelik jelatinaz üretebilen *E. faecalis* türünün hayvanlar üzerindeki ölümcül etkisinin üretmeyen türe göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (Singh ve ark 1998).

Jelatinaz enziminin direkt veya indirekt olarak kollajen ve konak hücrelerin dokularındaki proteinleri çözebildiği belirtilmiştir (Makinen ve ark 1989). Ayrıca jelatinaz enzimi kemikte rezorbsiyonların oluşumuna neden olmaktadır (Ramamurthy ve ark 2002).

Hancock ve Perego (2004) bakterilerin yüzeye yapışmasında jelatinazın büyük etkisi olduğunu belirtmişlerdir. Jelatinazın inhibe edilmesiyle cam veya

plastik gibi hidrofobik yüzeylere enterokokların ilk adezyonunun engellenebileceği ve böylece biyofilm oluşumunun önüne geçilebileceği ileri sürülmüştür.

Di Rosa ve ark (2006) esp ve jelatinazın biyofilm sürecine etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında biyofilm oluşumunda esp ve jelatinazın katkılarının bulunmadığını ancak sinerjistik etkileriyle enfeksiyonu hızlandırdıklarını belirtmişlerdir. Ayrıca izole edilen 83 adet *E. faecalis* örneğinden 31'inin (%37,3) jelatinaz enzimini üretebildiği ortaya konmuştur.

Sedgley (2007) yaptığı *in vitro* çalışmada *E. faecalis*'in jelatinaz enzimi üreten ve üretmeyen iki suşu ile enfekte edilmiş kök kanallarının dolumunu takiben 8 ay sonra kanallardaki bakterilerin canlılığını değerlendirmiştir. Araştırmacıya göre kanal dolgusu yapılmış kök kanalları içinde *E. faecalis*'in oldukça uzun süre canlı kalabilmesinde ürettiği jelatinazın rolü büyüktür. Ayrıca jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis*'in üretmeyen türe göre dentin tübüllerine daha derin penetre olabildiğini belirtmiştir.

Wang ve ark (2011) endodontik tedavisi başarısız olmuş 135 dişten 53'ünde *E. faecalis*'e rastlamışlardır. Kanallardan izole edilen 53 adet *E. faecalis* örneğinden 40 tanesinin biyofilm oluşturabildiği ve 47 tanesinin jelatinaz enzimi üretebildiği bulunmuştur. Böylece jelatinaz üretimi ile biyofilm oluşumu arasında bir ilişki olduğu belirtilmiştir. Ayrıca jelatinaz üreten bakterilerin izole edildiği kanalların apikalinde radyolusensi varlığına dikkat çekilmiştir. Kısacası *E. faecalis*'in virülans faktörlerindeki artışla beraber periapikal dokulardaki hasar da büyümektedir. *E. faecalis*'in jelatinaz enzimi üretmesi periapikal alveoler kemik kaybı sürecinde önemli bir faktör olup köklerin apikalinde büyük hasarlara yol açabilmektedir.

1.4. Bakteri Sayım Yöntemleri

Bir yüzeye adezyonda bulunmuş bakterilerin sayısının belirlenmesinde içinde bulundukları fizyolojik statü oldukça önemlidir. Bir bakterinin fizyolojik statüsünün açıklanmasında ölü, ölmek üzere olan, açlıktan ölmüş, hareketsiz, dinlenmekte, durağan, yaralı, ölümcül hasar görmüş, canlı, canlı ama kültür

edilemeyen, hareketli gibi birçok kavram kullanılmaktadır (Breeuwer ve Abee 2000).

1.4.1. Petri Koloni Sayım Tekniği

Petri koloni sayım tekniği bakteriyel canlılığın ölçümünde kullanılan bir teknik olup bakterilerin koloni sayılarını yaklaşık olarak yaşayan bakteri sayısı olarak ele almaktadır. Böylece bakterileri *in vitro* olarak sayılabilir düzeyde büyüyenler ve henüz sayılamayanlar olmak üzere iki farklı fizyolojik gruba ayırmaktadır (Kell ve ark 1998). Bu teknikte laboratuar koşulları altında enfekte örneklerden mikrobiyal türler alınır ve ardından içinde spesifik bir substratın bulunduğu besiyerlerine yerleştirilerek kültür edilir. Ardından bakteriler fizyolojik, biyokimyasal ve moleküler düzeyde olmak üzere sınıflandırılır. Bakterilerin çevresel rollerinin açıklanmasında bu bakteri suşlarının metabolik özelliklerinden faydalanılır. Bazen çeşitli nedenlerden dolayı petri koloni sayım tekniğinin bakteri sayısını normalden az gösterdiği bilinmekle beraber bu nedenler şöyle sıralanabilir:

- Az hasarlı bakterilerin bulunduğu bazı vakalar (Blackburn ve McCarthy 2000)
- Laboratuarda kullanılan büyüme besiyerinin bir veya birkaç besin açısından yetersiz olması durumunda örnekteki bazı bakterilerin büyümesinin engellenmesi (Ward ve ark 1990)
- Koloni formu oluşturma yeteneğini kaybetmiş ancak hala canlı hücrelerin bulunuyor olması (Xu ve ark 1982)
- Bunların da ötesinde planktonik bir bakterinin durgun fazda bulunurken gösterebildiği düşük metabolik aktivitenin bir benzerini biyofilm içindeki birçok bakterinin çok uzun süre gösterebiliyor olması (Nyström 2001)

Yukarıda sayılan sebeplerle bakterilerin mevcut sayıları kültür teknikleriyle tam olarak belirlenemeyebilir.

1.4.2. Floresan ve Kolorimetrik Teknikler

Günümüzde bakterilerin metabolik aktivitesini, hücre bütünlüğünü veya nükleik asitlerinin varlığını gösteren bir takım metotlar kullanarak bakteri hücrelerinin fizyolojik statüsü belirlenebilmektedir. En güvenilir sonucu veren metot ise bakterilerin membran potansiyeli, enzim aktivitesi, nükleik asitleri ve membran bütünlüğü gibi çeşitli hücresel fonksiyonlarını değerlendirebilen floresan ve kolorimetrik tekniklerdir (Joux ve Lebaron 2000).

Floresan in situ Hibridizasyon Tekniği (FISH)

Bu teknikle bakteri hücrelerindeki ribozomal RNA miktarları belirlenerek hem bakteriler tanımlanabilmekte hem de doğal ortamlarında bakterilerin fizyolojik durumları saptanabilmektedir (Moter ve Gobel 2000). Bu tekniğin dezavantajlarından biri ise düşük fizyolojik aktivite durumunda olan bakterilerin daha az rRNA miktarına sahip olmalarından dolayı yeterince sinyal alınamaması ve bu durumun o bakterinin ölü gibi değerlendirilmesine yol açmasıdır (Poulsen ve ark 1993). FISH tekniği periapikal lezyonlu ve semptomsuz kök kanal dolgulu dişlerdeki bakterilerin görüntülenip tanımlanmasıyla endodontide de kullanım alanı kazanmıştır (Sunde ve ark 2003).

Canlı/Ölü *Bac*Light Boyama Tekniği

Bu teknik bakteriyel canlılığı ölçen diğer floresan tekniklerden biri olup bu kit içinde SYTO-9 ve propidyum iyodid (PI) isimli iki nükleik asit boyası bulunmaktadır. PI boyası ölü veya hasarlı hücreleri floresan kırmızısına, SYTO-9 boyası ise sağlam hücreleri floresan yeşiline boyayarak bakterilerin hücre membran bütünlüğünü açığa çıkarmaktadır. Kısacası bu metotla ölü hücreler kırmızı renge, canlı hücreler ise yeşil renge boyanmaktadır (Leuko ve ark 2004). Ayrıca bu floresan tekniğiyle *ex vivo* olarak kök kanal türlerinin canlılığı ve akut endodontik enfeksiyonlu dişlerden izole edilen bakterilerin otoagregasyonu ve koagregasyonu belirlenebilmektedir (Chavez de Paz 2007).

XTT Tekniği

Bu teknik yüzeye bağlanmış aerobik bakterilerin metabolik aktivitesini ölçerek hücresel canlılığını değerlendiren bir kolorimetrik mikrobiyolojik ölçüm tekniğidir. Bu yöntem metabolik olarak aktif bakterilerin varlığında XTT gibi tetrazolyum tuzlarının (sodyum 3,3'-[1-[(fenilamino)karbonil]-3,4-tetrazolyum]Bis(4-metoksi)-6-nitro)benzen sulfonik asit hidrat) indirgenmesini esas alır (Marshall ve ark 1995). Canlı hücrelerin mitokondriyal dehidrogenazı ile tetrazolyum tuzları açık sarı veya portakal rengindeki tetrazolyum formazan tuzlarına indirgenir (Marshall ve ark 1995, Şen ve ark 2003, Koban ve ark 2012). Ayrıca reaksiyonun yoğunluğu fenazin metasülfat (PMS) gibi elektron bağlama ajanlarının ilavesiyle de artırılabilir (Cerca ve ark 2005, Koban ve ark 2012). Yalnızca canlı hücrelerin boyanması ile ortaya çıkan renkli solüsyon kontrol grubuyla kıyaslanmaktadır ve canlı hücrelerdeki artış veya düşüş hem renk değişikliğiyle hem de spektrofotometrik analiz yardımıyla ölçülebilmektedir. Radyoaktif maddeler içermeyen bu teknikle elde edilen sonuçlar oldukça güvenilir olup bir diğer avantajı ise tekrarlanabilir olmasıdır (Zvab ve ark 2012).

XTT tekniğinin diğer histolojik, mikrobiyolojik, ışık ve elektron mikroskobu tekniklerine olan üstünlükleri şu şekildedir (Şen ve ark 2003):

- Diğer metotlara göre daha hızlı hücre sayımı yapılmasını sağlar.
- Yalnızca metabolik olarak aktif yani canlı hücrelerin sayısını belirler.
- Mikroskop çalışmalarında örneklerin preparasyonu esnasında sıklıkla karşılaşılan hücre kaybının önüne geçer.
- Dental dokuların transparan olmayışından dolayı dentin yüzeyine yapışık bakterilerin belirlenmesinde ışık mikroskobuyla sağlıklı sonuçlar alınamamaktadır. Oysa XTT tekniği dentin yüzeyine bağlanan hücrelerin sayımına olanak tanır.

Endodonti alanında XTT tekniği kullanılarak yapılmış sınırlı sayıda *in vitro* hücre ve mikrobiyoloji çalışması bulunmaktadır (Şen ve ark 2003, De-Deus ve ark 2009, Scelza ve ark 2012, Ning ve ark 2013).

1.5. Taramalı Elektron Mikroskobu- Enerji Dağılımlı X Işını Analizi (SEM-EDX Analizi)

Taramalı elektron mikroskobunda (SEM) görüntü oluşumu için yüksek voltaj ile hızlandırılmış elektronlar örnek üzerine odaklanır. Bu elektron demeti ile örnek yüzeyinin taratılması sırasında elektron ve örnek atomları arasında çeşitli girişimler sonucunda meydana gelen etkiler uygun alıcılarda toplanır. Sinyal güçlendiricilerden geçirildikten sonra bir katot ışını tüpünün ekranına yansıtılmasıyla görüntüler elde edilir. Günümüz sistemlerinde bu algılayıcılardan gelen sinyaller dijital sinyallere çevrilerek bilgisayar monitörüne verilmektedir. Hem çözünürlük ve net alan derinliği hem de görüntü ve analizi birleştirebilme özelliği, taramalı elektron mikroskobununun kullanım alanını artırmaktadır. Öyle ki 1000X büyütmede optik mikroskobun net alan derinliği 0,1 μm ile sınırlı iken taramalı elektron mikroskobunun net alan derinliği 30 μm'dir (Wells ve ark 2006).

Enerji dağılımlı X ışını analizi (EDX) tekniğinde ise materyalin kimyasal yapısı ve element miktarı hakkında veriler elde etmede kullanılan analitik bir tekniktir. Numunenin yüzeyine yüksek enerjili elektronların çarpmasıyla bu çarpışmalardan sonra numune yüzeyinden bazı elektronlar kopar. Eğer bu elektronlar içteki (çekirdeğe yakın) orbitallerden koparılmışlarsa atomlar kararlılıklarını kaybederler. Tekrar kararlı hale dönüşebilmek için dış orbitallerdeki elektronlar iç orbitallerdeki boşlukları doldururlar. Dış orbitallerdeki elektronların enerjileri iç orbitallerdeki elektronların enerjilerinden daha yüksek olmasından dolayı dış orbital elektronlar iç orbitalleri doldururken belli bir miktar enerji kaybetmek zorundadırlar. Bu kaybedilen enerji X-ışını seklinde ortaya çıkmaktadır. Ortaya çıkan X-ışınlarının enerjisi ve dalga boyu sadece atomla ilgili olmayıp o atomun alışverişte bulunduğu orbitalleri ile ilgili karakteristik bir özelliktir. Sadece ilgi duyulan elementin sahip olduğu piklerin temsil ettiği X ışınlarının seçilmesiyle ve sadece X ışınlarının EDX detektöründe sayılmasıyla, numune yüzeyindeki her bir nokta için o elementin göreceli oranı tespit edilebilir.

Dentinin organik kısmı büyük oranda tip I ve III kollajenden meydana gelmektedir. Ancak tip I kısmı dentinin organik kısmının çoğunluğunu oluşturur. Dentinin inorganik kısmı ise kalsiyumdan yoksun ama karbonattan zengin hidroksiapatit kristallerinden oluşur ve dentinin hacimce yarısını içerir. Dentinin kimyasallara maruz kaldığı kök kanal tedavilerinde, EDTA gibi şelasyon ajanlarıyla inorganik kısmın kaldırılması sonucu dentinin daha çok tip I kollajen olan organik dokusu ortaya çıkmaktadır (Karjalainen ve Söderling 1984). Kimyasalların kollajene olan etkisinden dolayı yüzeydeki olası retantif alanlara bakterilerin adezyonunda bir artış söz konusu olabilir (Sum ve ark 2008). *E. faecalis*'in ortamdaki kollajen varlığıyla dentine adezyonu arasında bir ilişki olabileceği göz önünde bulundurulduğunda, kök kanal tedavisi esnasında kullanılan farklı kimyasalların dentin ve kollajene etkileri sonucu *E. faecalis*'in dentin kollajenine adezyonunda değişiklikler söz konusu olabilir.

Bu çalışmanın amacı; *E. faecalis*'in jelatinaz üretebilme yeteneğinin bu bakterinin dentin yüzeyine adezyonuna katkısını belirlemek ve endodontik tedavide kullanılan farklı irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının dentin yüzeyinde ve mineral yapısında yol açtığı değişiklikleri SEM-EDX analizi ile belirleyerek bu değişiklikler neticesinde bakterilerin dentin yüzeyine adezyon miktarını değerlendirmektir.

2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmaya Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu 08.02.2011 tarihinde yapılan 2011/02 sayılı toplantısında 09 no'lu etik kurul onayı vermiştir. Çalışmanın örnek hazırlama kısmı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Araştırma Merkezi, mikrobiyolojik deneyler kısmı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuarı, SEM-EDX analizi ise Selçuk Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma laboratuarında gerçekleştirilmiştir.

Çalışma iki aşamada gerçekleştirilmiş olup ilk olarak bakterilerin dentin yüzeyine adezyonu değerlendirildi. Bir sonraki aşamada ise dentin örnekleri yüzeyindeki smear tabakası ve dentin örneklerinin mineral yapısı incelendi.

2.1. Örneklerin Seçimi ve Dentin Disklerinin Hazırlanması

Çalışmada toplam 288 adet daimi insan gömülü yirmi yaş dişi kullanıldı. Bunlardan 240 tanesi dentine bakteriyel adezyonun değerlendirilmesinde, 48 tanesi ise dentin örneklerinin semar tabakası ve mineral yapısının incelenmesinde kullanıldı. Dişler çekildikten sonra dişlerin üzerindeki sert ve yumuşak doku artıkları bir kretuar yardımıyla uzaklaştırıldı ve çalışmanın yapılacağı süreye kadar %1 NaOCl solüsyonu (Çağlayan Kimya San, Konya, Türkiye) içerisinde bekletildi. Örnek elde edilmesinde kullanılmak üzere 2,5 cm çapında plastik manşetler hazırlandı ve manşetlerin içine vazelin sürüldü. Hazırlanan manşetlerin içine soğuk akrilik döküldü ve dişler mine-sement sınırına kadar kronları dışarıda kalacak şekilde gömüldü. Daha sonra akrilik bloklar plastik manşetlerden çıkarıldı (Resim 2.1.1).



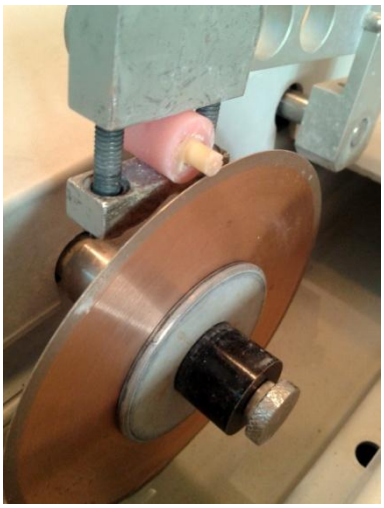
Resim 2.1.1. Akrilik bloklara gömülü yirmi yaş dişleri

Su soğutması altında sanayi tipi kesme cihazı yardımıyla akrilik bloklara gömülü dişlerin mine tabakası tümüyle kaldırıldı ve anatomik kron çevresi standart 5 mm olana dek küçültüldü (Resim 2.1.2).



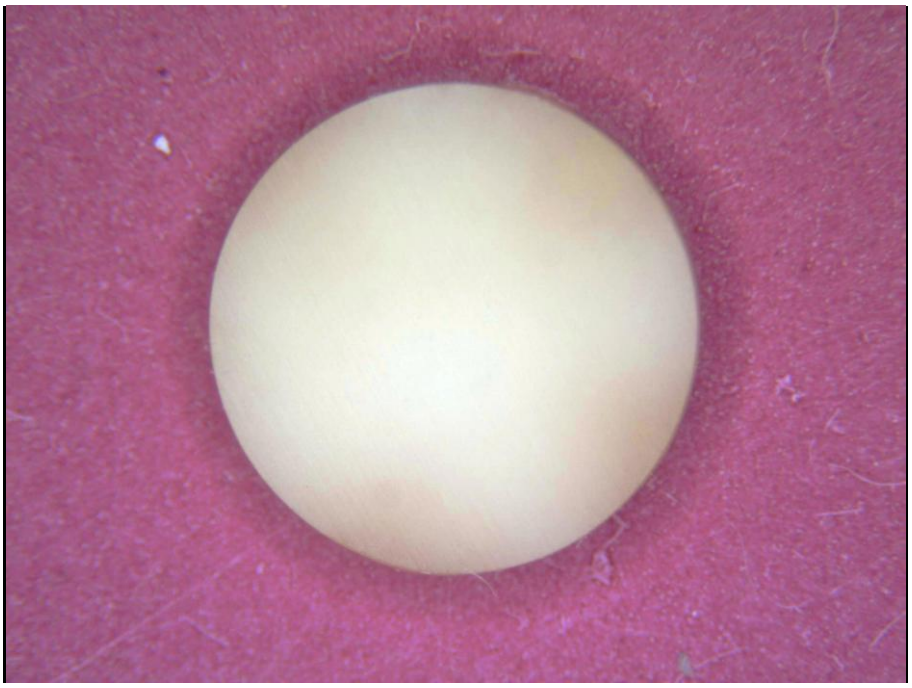
Resim 2.1.2. Akrilik bloklara gömülü dişlerin minesinin kaldırılmasında kullanılan kesme cihazı

Horizontal olarak dentin diskleri elde etmek amacıyla dişler okluzali ile pulpa odası tabanı arasındaki kısımdan ISOMET elmas separe (Buehler, Lake Bluff, NY) yardımıyla düşük hızlı kesme cihazında kesildi (Resim 2.1.3).



Resim 2.1.3. Örneklerin ISOMET cihazı ile horizontal olarak kesilmesi işlemi

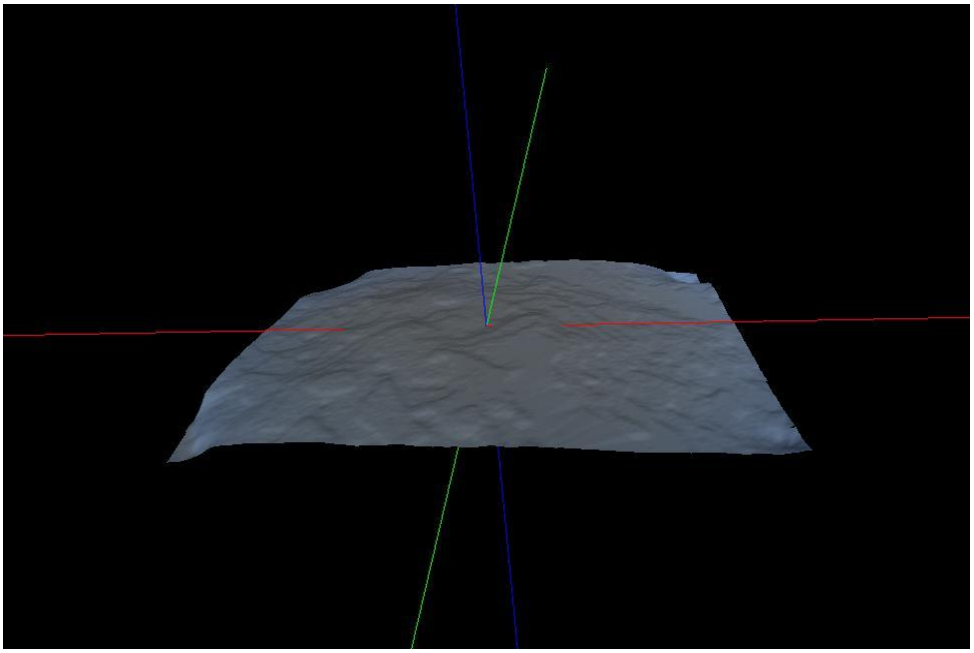
Standart 1,2 mm kalınlığında elde edilen dentin disklerinin boyutu dijital kumpasla doğrulandı. Diskler sırasıyla #400, #600, #800 ve #1200 grit zımpara kağıtları yardımıyla distile su ile ıslatılarak her iki yüzeyi ve vertikal duvarları düzleştirilerek disk kalınlıkları 1,0 mm'ye indirildi. Bu uygulama ile dentin disklerinin tüm yüzeylerinde smear tabakasının oluşması sağlandı. Ardından disklerin kalınlıkları tekrar dijital kumpasla doğrulandı. Dentin disklerinden tüm minenin kaldırıldığı stereo-mikroskop altında (SZTP; Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) 15× büyütmede teyit edildi (Resim 2.1.4).



Resim 2.1.4. Hazırlanan bir dentin diski örneğinin 15× büyütmede stereo-mikroskopla alınan görüntüsü

Tüm örneklerin yüzeylerinin standart zımpara işlemlerinden geçirilmesinden dolayı yüzey pürüzlülüklerinin yaklaşık olarak aynı olduğu düşüncesini doğrulamak amacıyla her gruptan rastgele 3'er örnek seçildi. Örneklerin yüzeyleri bir bilgisayar programında (Leica Stereo Explorer, Leica Microsystems Ltd, Heerbrugg, İsviçre) taranarak üç boyutlu ölçüm yapabilmek için yüzey görüntüleri elde edildi (Resim 2.1.5). Ardından belirli bir ölçüm uzunluğundaki ortalama yüzey pürüzlülük değerleri (Ra) ölçüldü (Resim 2.1.6). Örneklerin pürüzlülük değerlerinin anlamlı bir fark oluşturmadığı doğrulandı. Çalışmada kullanılacak tüm örneklerin geometrik

alanı, geometrik alan formülü ($2\pi rh$) kullanılarak bir kumpas yardımıyla hesaplandı ve pürüzlülük değerleri dikkate alınmadan elde edilen geometrik alan değerleri gerçek yüzey alanı olarak kabul edildi.



Resim 2.1.5. Leica Stereo Explorer programı ile üç boyutlu ölçüm yapabilmek için dentin diski örneği yüzeyinden alınan görüntü

Leica Stereo Explorer - Analysis - Roughness Profile - [2]

File View Help

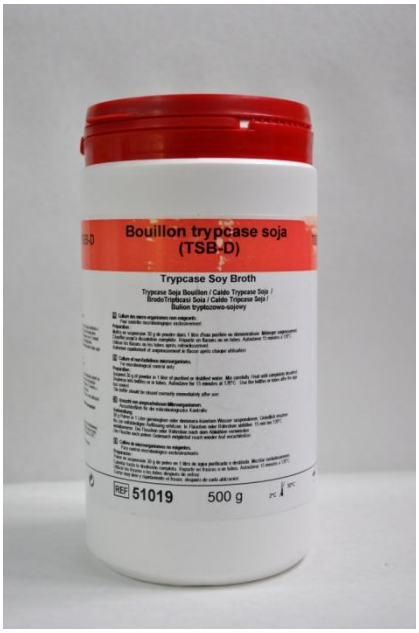
Sign	Value	Description
RL	1.00174	Ratio of true profile length to projected profile length
Ra	6.241 µm	Average roughness of profile
Rq	7.122 µm	Root-Mean-Square roughness of profile
Rz	29.19 µm	Maximum height of roughness profile
Rp	13 µm	Maximum peak height of roughness profile
Rv	16.19 µm	Maximum valley depth of roughness profile
Rc	20.78 µm	Mean height of profile irregularities of roughness profile
RSm	1275 µm	Mean spacing of profile irregularities of roughness profile
Rsk	-0.269403	Skewness of roughness profile
Rku	1.88888	Kurtosis of roughness profile
Rdq	0.0591703	Root-Mean-Square slope of roughness profile
Lc	1845 µm	Filter wavelength for roughness profile

Resim 2.1.6. Bir dentin diski örneğinden elde edilen yüzey pürüzlülük değerleri

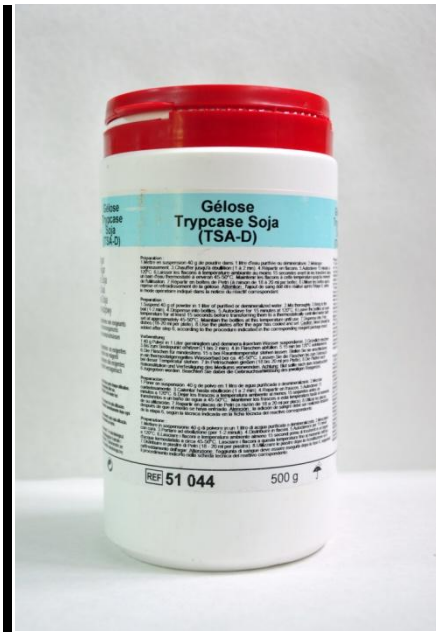
2.2. Mikrobiyolojik İşlemler

2.2.1. Besi yerlerinin Hazırlanması

Çalışmamızda sıvı besi yeri olarak Triptik soy bulyon (TSB) (Biomérieux, Marcy-L'etoile, Fransa) (Resim 2.2.1) ve katı besi yeri olarak Triptik soy agar (TSA) (Biomérieux, Marcy-L'etoile, Fransa) (Resim 2.2.2) besi yerleri üreticinin tavsiyesine uygun olarak hazırlandı. Sıvı besi yeri hazırlanırken 1 lt distile su içine 30 gr TSB, katı besi yeri hazırlanırken ise 1 lt distile su içine 40 gr TSA ilave edilerek 121°C'de 20 dakika süreyle otoklavda steril edilmiştir.



Resim 2.2.1. Triptik soy bulyon



Resim 2.2.2. Triptik soy agar

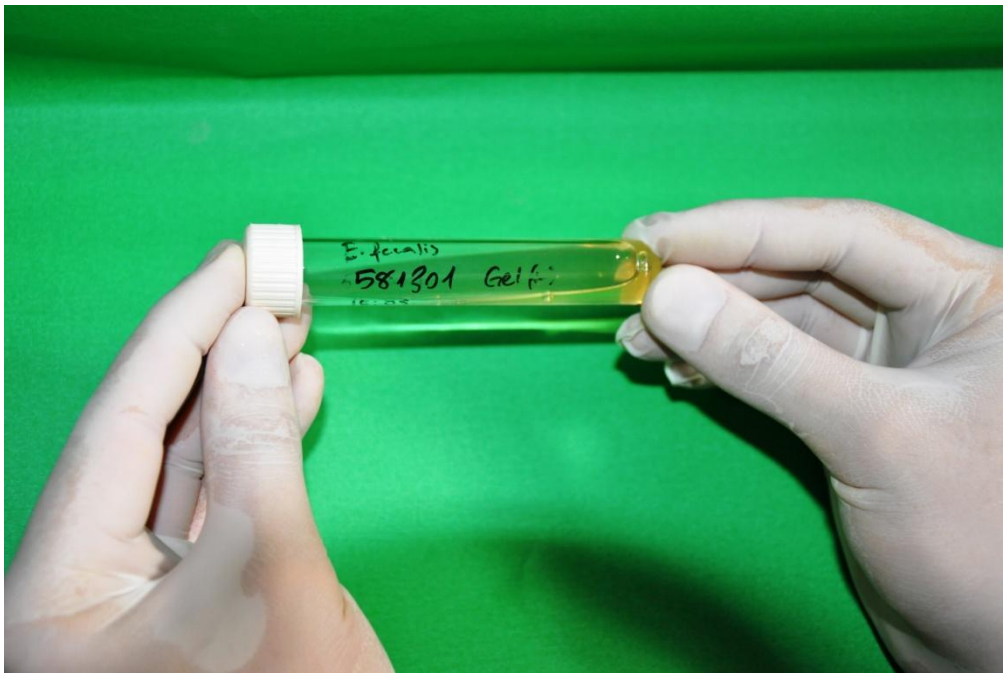
Sıvı besi yerlerinde standart mikroorganizma suşları hazırlanırken steril tüpler içine aktarılarak kullanılmıştır. Katı besi yerleri ise otoklav sterilizasyonu sonrasında ısısı 50^{o}C'ye düştüğünde steril petri kaplarına konmuştur.

2.2.2. Bakteri Solüsyonlarının Hazırlanması

Bu çalışmada kullanılan *Enterococcus faecalis* suşları Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Kültür Kolleksiyonundan temin edildi. *E. faecalis* suşlarından jelatinaz üreten ve üretmeyen suşlarının belirlenmesi

amacıyla Selçuk Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Mikrobiyoloji Laboratuvarında bakterilerin jelatinaz aktivitesi ölçüldü.

Bu işlem için bakteri suşları tüp içinde %3 jelatin bulunan sıvı besi yerlerine ekildi. Ardından 37°C'de 1-2 gün boyunca aerobik koşullarda inkübe edildi. İnkübatörden çıkarılan tüpler 1 saat süreyle soğutucuda bekletildi. Jelatinaz enzimi üreten JEL(+) *E. faecalis* (581301) suşunun besiyeri içindeki jelatini parçalaması nedeniyle besiyerinin sıvı hale geçtiği (Resim 2.2.3) ancak jelatinaz enzimi üretemeyen JEL(-) *E. faecalis* (599427) suşunun bulunduğu besiyerinin hala katı halde olduğu gözlendi (Resim 2.2.4). Böylelikle *E. faecalis*'in jelatinaz enzimi üreten ve üretmeyen suşları belirlenmiş oldu.

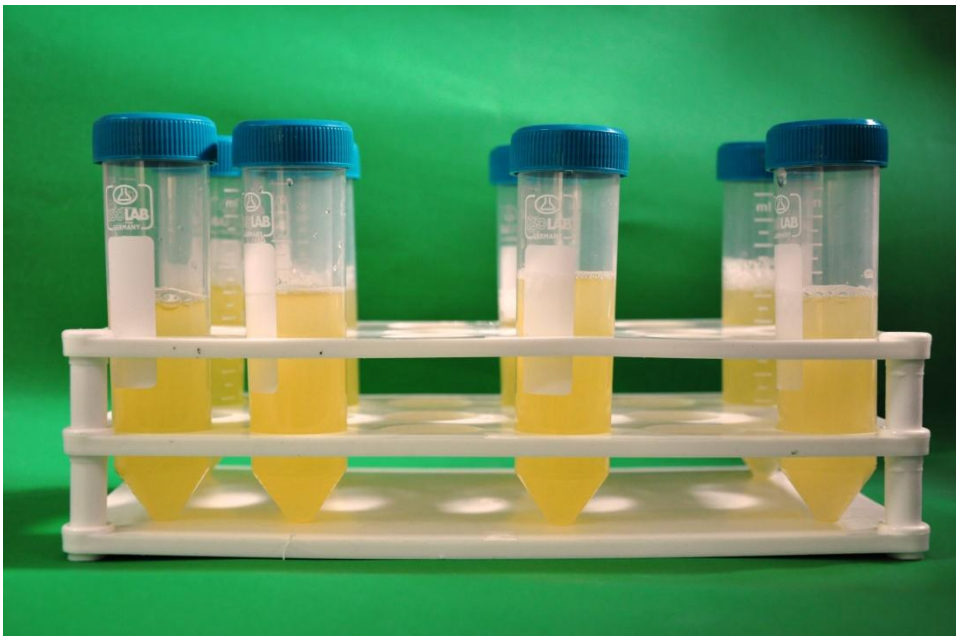


Resim 2.2.3. Jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* JEL(+) (581301) suşunun besiyeri içinde bulunan jelatini parçalamasıyla sıvı hale geçen besiyeri görüntüsü



Resim 2.2.4. Jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* JEL(-) (599427) suşunun besiyeri içinde bulunan jelatine etki edememesi nedeniyle katı halde bulunan besiyeri görüntüsü

TSA besi yerine ekilen *E. faecalis* mikroorganizmaları 24 saat süresince 37°C etüvde inkübe edildi. Ardından elde edilen taze kültürlerinden öze dolusu alınan koloniler TSB içine aktarıldı (Resim 2.2.5). Elde edilen bakteri süspansiyonu 24 saat süresince 37°C etüvde inkübe edildikten sonra optik yoğunluğu mikroplate okuyucu (µ Quant ELISA Reader, Bio-Tek Instruments**,** Winooski, VT, Amerika) (Resim 2.2.6) kullanılarak spektrofotometrik olarak (OD_{600}) =0,6 olacak şekilde ayarlanarak çalışmaya hazır hale getirildi.



Resim 2.2.5. TSB içinde hazırlanan taze mikroorganizma kültürleri



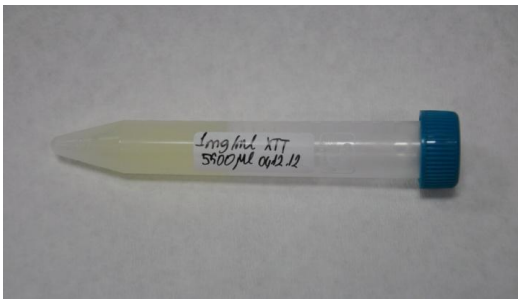
Resim 2.2.6. Bakteri süspansiyonunun optik yoğunluğunun ölçümünde kullanılan mikroplate okuyucu

2.3. XTT Kolorimetrik Analizinde Kullanılacak Solüsyonların Hazırlanması

XTT (SERVA Electrophoresis, Heidelberg, Almanya) (Resim 2.3.1) kullanımı üretici firmanın tavsiyesi ve daha önce Ning ve ark'ın (2012) belirttiği üzere deneye uyarlanmıştır. XTT tozu 100 ml steril fosfat tamponlanmış çözelti (PBS, pH=7,2, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) solüsyonu içinde 100 mg toz olacak şekilde çözdürülmüş ve elde edilen süspansiyon deneyde kullanılacak oranlara bölünerek steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır (Resim 2.3.2).



Resim 2.3.1. XTT tozu

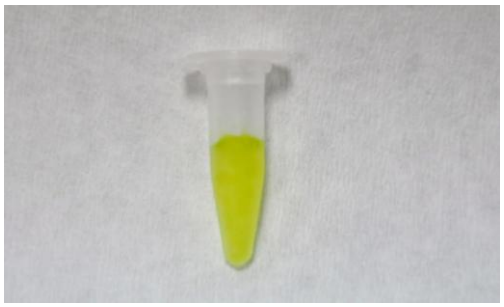


Resim 2.3.2. Hazırlanan XTTsüspansiyonu

XTT'nin indirgenmesinde kullanılan elektron transfer ajanlarından fenazin metasülfat (PMS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD) (Resim 2.3.3) 100 ml steril PBS solüsyonu içinde 38,3 mg toz olacak şekilde çözdürülmüş ve elde edilen süspansiyon deneyde kullanılacak oranlara bölünerek steril Eppendorf tüplerine aktarılmıştır (Resim 2.4.4).



Resim 2.3.3. PMS tozu



Resim 2.3.4. Hazırlanan PMS süspansiyonu

Işığa maruz kalmaları halinde etkinliklerini yitirmeleri nedeniyle hazırlanan solüsyonların bulunduğu Eppendorf tüpleri alüminyum folyolara sarılarak bakterilerin dentine adezyonu ölçümüne kadar -20°C'de bir derin dondurucuda saklanmıştır.

2.4. Dentin Disklerinin Farklı İrrigasyon Solüsyonları ve İrrigasyon Kombinasyonlarıyla Muamele Edilmesi

Hazırlanan 288 adet dentin diski PBS içeren Eppendorf tüplerine her birine bir dentin diski gelecek şekilde yerleştirildi ve 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi. Ardından steril dentin diskleri 10 deney grubuna ve pozitif ve negatif kontrol gruplarına her bir grupta 24'er adet örnek olacak şekilde ayrıldı. Her bir gruptaki 24 örnekten rastgele 4 tanesi SEM-EDX analizinde kullanıldı. Deneyde kullanılan ve farklı kombinasyonları yapılan irrigasyon solüsyonları ve üretici firmaları Tablo 2.4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 2.4.1. Deneyde kullanılan irrigasyon solüsyonları ve üretici firmaları

İrrigasyon solüsyonu	**Üretici Firma**
%2,5 Sodyum hipoklorit (NaOCl)	Çağlayan Kimya San, Konya, Türkiye
%5,25 Sodyum hipoklorit (NaOCl)	Çağlayan Kimya San, Konya, Türkiye
%2 Klorheksidin glukonat (CHX)	Klorhex, Drogsan İlaç San, Ankara, Türkiye
%17 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)	Merck KGaA, Darmstadt, Almanya
Serum fizyolojik solüsyonu	İ.E Uragay, İstanbul, Türkiye
QMix	Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, ABD
Oktenidin hidroklorit (OCT)	Octenisept, Schülke & Mayr, Norderstadt, Almanya
PBS (Fosfat Tamponlanmış Solüsyon)	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, ABD

Çalışmada EDTA dışındaki diğer solüsyonlar piyasada ticari olarak hazır bulunmaktadır (Resim 2.4.1-2.4.6). Laboratuarda %17'lik EDTA solüsyonunun hazırlanması için; 1 lt distile su içerisine 170 gr EDTA tozu (etilendiamin tetraasetik asit disodyum tuzu) (Merck KGaA, Darmstadt, Almanya) ve 18,5 gr sodyum hidroksit (NaOH) (Merck, KGaA, Darmstadt, Almanya) eklendi. NaOH hazırlanan solüsyonun pH'sını 7,2'ye ayarlanması için kullanıldı. Bir manyetik karıştırıcı (Nüve, MK 418, Ankara, Türkiye) yardımıyla karışımın suda çözünmesini sağlandı. Hazırlanan solüsyon kullanım öncesinde 0,2 µm por çapı olan selüloz asetat filtre (Sortarius, North America, ABD) kullanılarak steril edildi.



Resim 2.4.1. NaOCl



Resim 2.4.2. CHX



Resim 2.4.3. EDTA tozu



Resim 2.4.4. Serum fizyolojik



Resim 2.4.5. QMix



Resim 2.4.6. OCT

PBS solüsyonu hazırlanması amacıyla bir tablet PBS, 200 ml distile su ile karıştırıldı ve elde edilen karışım 121°C'de 20 dakika otoklavda steril edildi.

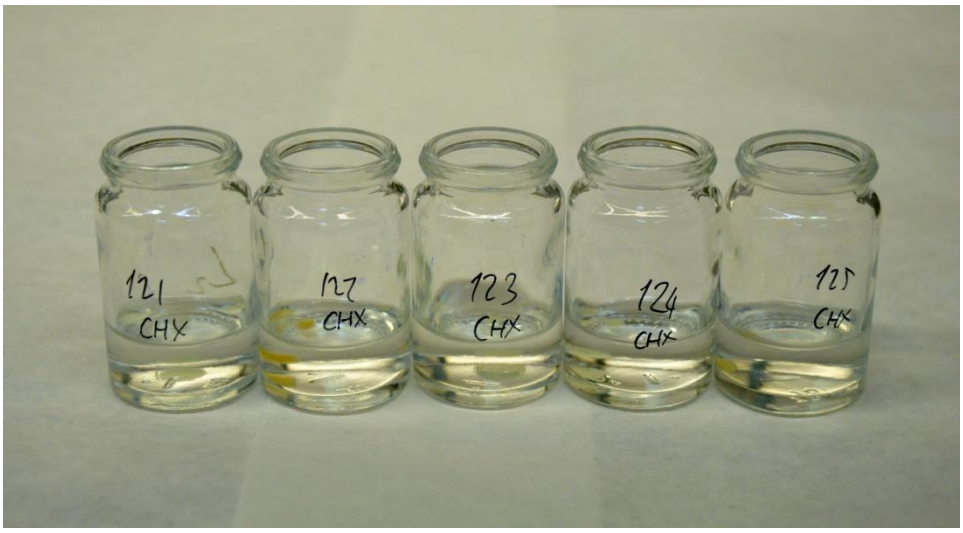
İrrigasyon solüsyonları ve bunların birbiriyle kombinasyonlarını içeren deney ve kontrol grupları ise Tablo 2.4.2'de verilmiştir.

Çizelge 2.4.2. Deney ve Kontrol Grupları

Grup	İrrigasyon solüsyonu ve kombinasyonları
Grup 1	5 ml %2,5 NaOCl
Grup 2	5 ml %2 CHX
Grup 3	5 ml %2,5 NaOCl + 5 ml serum fizyolojik + 5 ml %2 CHX
Grup 4	5 ml %2,5 NaOCl + 5 ml %17 EDTA + 5 ml %2,5 NaOCl
Grup 5	5 ml %17 EDTA + 5 ml %2,5 NaOCl + 5 ml %17 EDTA
Grup 6	5 ml %17 EDTA + 5 ml %2 CHX + 5 ml %17 EDTA
Grup 7	5 ml QMix (Üretici firmanın tavsiyesi üzerine bu grubun irrigasyon protokolü 5 ml %5,25 NaOCl + 5 ml serum fizyolojik + 5 ml QMix (90 sn) şeklinde düzenlendi.
Grup 8	5 ml OCT
Grup 9	5 ml OCT + 5 ml %17 EDTA + 5 ml OCT
Grup 10	5 ml PBS
Pozitif Kontrol	5 ml Serum fizyolojik
Negatif Kontrol	Steril edilmiş dişler PBS çözeltisi içinde bekletildi ve herhangi bir bakteri solüsyonuna maruz bırakılmadı.

Tüm irrigasyon solüsyonları steril cam şişelere her birinde 5 ml olacak şekilde konuldu. Farklı yüzey alanlarına sahip olmalarından ötürü dentin örnekleri her biri ayrı numaralandırılmış içinde irrigasyon solüsyonlarının bulunduğu cam şişeler içerisine daldırıldı (Resim 2.4.7). Kombinasyon yerine tek bir irrigasyon

solüsyonunun bulunduğu gruplardaki örnekler irrigasyon solüsyonu içinde 15 dakika süreyle bekletildi. İrrigasyon solüsyonunun kombine kullanıldığı gruplarda ise her bir irrigasyon solüsyonunda 5'er dakika bekletildi ve böylelikle toplam 15 dakika süreyle irrigasyon solüsyonlarına maruz bırakılması sağlandı.



Resim 2.4.7. Dentin disklerinin irrigasyon solüsyonlarında bekletildiği steril cam şişeler

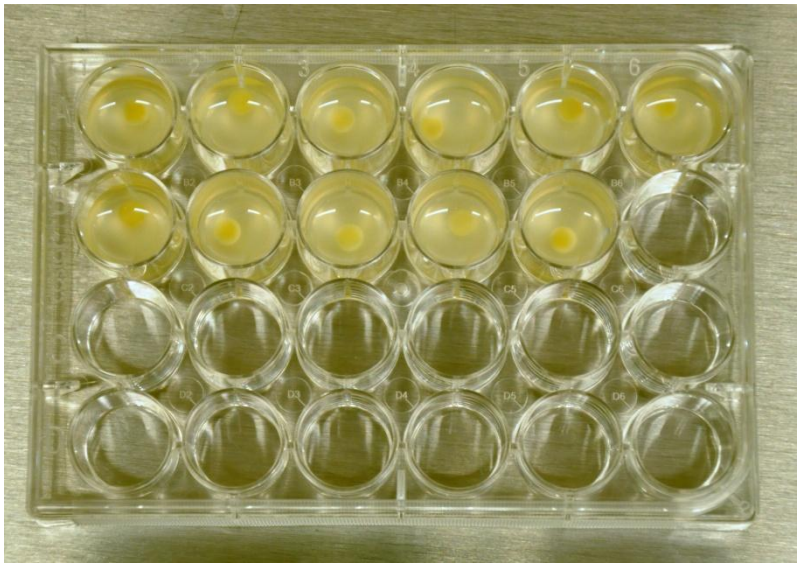
İrrigasyon solüsyonlarında bekletilen örnekler daha sonra steril bir presel yardımıyla cam şişelerden alınarak 50 ml distile su içeren iki kaba sırasıyla 3'er kez daldırılmak suretiyle yıkandı ve steril Wattman kağıtları ile kurulandı.

2.5. Dentin Örneklerinin *E. faecalis* ile Enfekte Edilmesi

JEL(+) ve JEL(-) olmak üzere iki farklı bakteri suşunun dentine adezyonunun değerlendirilmesi amacıyla her bir grup kendi içinde 11 adet dentin örneği olacak şekilde 2 alt gruba ayrıldı. Her bir alt gruptaki dentin örneklerinin 48 saat boyunca bakteri ile inkübasyonunun sağlanabilmesinde her bir dentin örneği için farklı numaralandırılmış 24 kuyucuklu hücre kültür kapları kullanıldı. Örnekler her bir kuyucukta birer tane bulunacak şekilde steril aletler yardımıyla yerleştirildi.

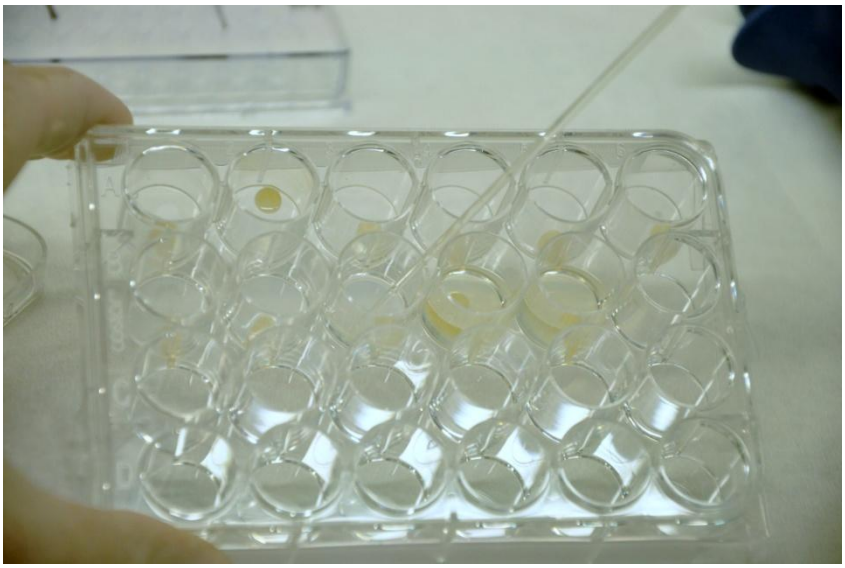
Spektrofotometrede optik densitesi 600 olarak ayarlanmış TSB içindeki JEL(+) *E. faecalis* (581301) suşu ile JEL(-) *E. faecalis* (599427) suşunun bulunduğu bakteri süspansiyonlarından 1 ml alınarak gruplara ayrılmış farklı hücre kültür

kaplarındaki her bir dentin örneğinin üstüne ilave edildi (Resim 2.5.1). Böylece örneklerin tüm yüzeylerinin bakteri solüsyonu ile direkt teması sağlanmış oldu. Buharlaşma yoluyla sıvı kaybının önüne geçebilmek için hücre kültür kabının etrafı parafilmle kaplandı. Hücre kültür kabı bu şekilde 37°C etüvde 24 saat süresince bekletildi.



Resim 2.5.1. Dentin örnekleri ve *E. faecalis* süspansiyonunun bulunduğu 24 kuyucuklu hücre kültür kabı

Hücre kültür kapları etüvde 24 saat bekletildikten sonra steril pastör pipetler yardımıyla hücre kültür kabı kuyucukları içinde bulunan dentin örneklerine temas ettirilmeden bakteri süspansiyonu aspire edildi. Ardından içinde dentin örneğinin bulunduğu her bir kuyucuğa bir mikropipet yardımıyla 600 µl PBS yerleştirildi ve tekrar steril pastör pipetlerle hücre kültür kabından aspire edildi (Resim 2.5.2). Örneklerin hücre kültür kapları içindeki PBS ile gerçekleştirilen yıkama işlemi iki kez tekrarlandı. Böylelikle dentin yüzeyine yapışmamış bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı.



Resim 2.5.2. Örneklerin PBS ile yıkanmasının ardından steril bir pastör pipet yardımıyla aspire edilmesi

Son olarak spektrofotometrede optik densitesi 600 olarak hazırlanmış bakteri süspansiyonundan mikropipet yardımıyla 1 ml alınarak her bir örneğin üstüne yeniden ilave edildi. Buharlaşma sonucu sıvı kaybının önüne geçebilmek için hücre kültür kabının etrafı parafilmle kaplandı. Hücre kültür kabı bu şekilde 37°C etüvde 24 saat süresince bekletildi.

Bakteri süspansiyonuyla toplam 48 saatlik inkübasyon sonrasında etüvden çıkarılan hücre kültür kabı içindeki kuyucuklarda bulunan bakteri süspansiyonu aspire edildi. Ardından dentin örneklerinin yüzeyine yapışmamış bakterilerin ortamdan uzaklaştırılması amacıyla örnekler hücre kültür kapları içindeki 600 µl PBS ile iki kez yıkandı. Steril bir pastör pipet yardımıyla oldukça nazik bir şekilde dentin örneğine hiç dokunmadan kuyucuk içindeki tüm PBS aspire edildi. Steril bir presel yardımıyla 24 kuyucuklu hücre kültür kabından alınan örnekler 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirildi (Kültür Kabı A) (Resim 2.5.2).



Resim 2.5.2. *E. faecalis* ile 48 saatlik inkübasyondan sonra 96 kuyucuklu hücre kültür kabına yerleştirilen dentin örnekleri (Kültür Kabı A).

Deney düzeneğinin doğruluğunu test etmek için negatif ve pozitif kontrol grupları planlandı. Negatif kontrol grubu hücre kültürü kabının kontaminasyonunun kontrolü için oluşturuldu ve bu grupta kuyucuklara bakteri süspansiyonu olmaksızın steril edilmiş dentin örnekleri yerleştirildi. Dentin örneklerinin PBS bulunan şişeler içinde steril edilmiş olması ve bakteri adezyonu testinde örneklerin PBS ile yıkanması nedeniyle pozitif kontrol grubunda PBS kullanıldı. Pozitif kontrol grubundaki dentin örnekleri 15 dakika süreyle 5 ml PBS'e maruz bırakıldı ve bakteriler ile 48 saat inkübe edildi. İrrigasyon solüsyonları ile muamele edilen dentin örneklerine yapışan canlı bakterilerin sayısını kıyaslayabilmek amacıyla XTT kolorimetrik değerlendirme testi uygulandı.

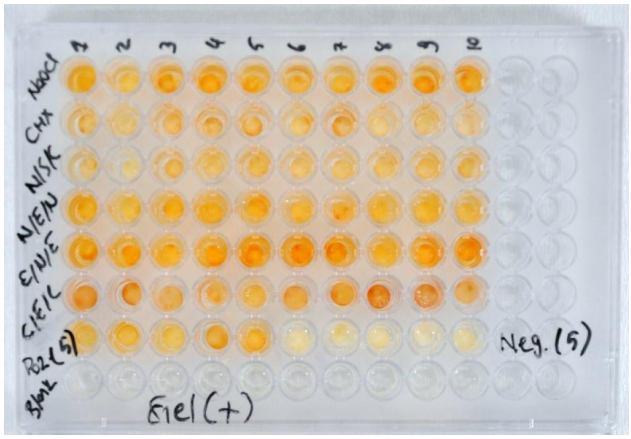
2.6. XTT ile Dentine Yapışmış Canlı Bakteri Sayısının Değerlendirilmesi

Deney öncesinde XTT ve PMS solüsyonları derin dondurucudan çıkarılarak 37°C'lik sıcak su banyosuyla içerisinde herhangi bir tortu gözlenmeyinceye kadar çözdürüldü. Vortekste düşük devirde karıştırıldıktan sonra XTT ve PMS solüsyonları ışıkları kapatılmış Biyogüvenlik Seviyesi 2 (BSL 2) güvenlik kabini içerisinde steril bir cam beherde hacimce 20:1 oranında karıştırıldı.

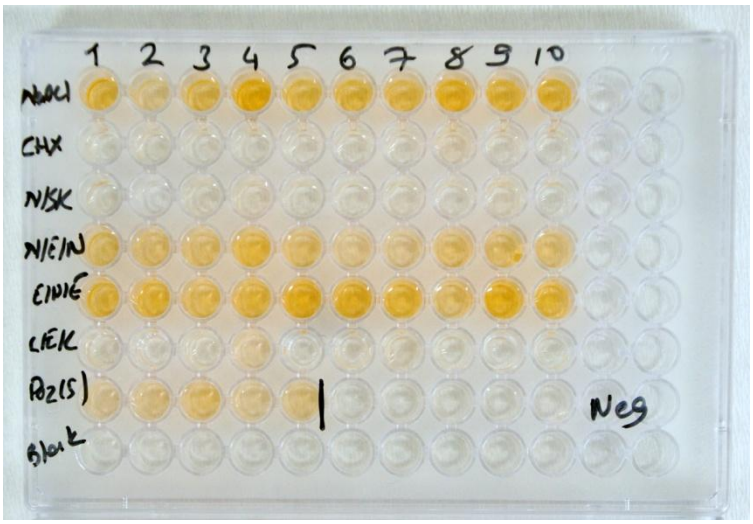
Dentin örneklerinin 96 kuyucuklu hücre kültür kaplarına yerleştirilmesinin ardından her bir kuyucuğa 158 µl PBS, 40 µl XTT ve 2 µl PMS eklendi. JEL(+) *E. faecalis* suşunun değerlendirildiği grup için 2 adet ve JEL(-) *E. faecalis* suşunun değerlendirildiği grup için 2 adet olmak üzere toplam 4 adet 96 kuyucuklu hücre kültür kabı kullanıldı (Kültür Kabı A).

Hücre kültür kabının etrafı önce parafilmle sarılıp ardından alüminyum folyoyla kaplanarak örneklerin ışık alması önlendi. Ardından XTT'nin indirgenerek çözünebilir formazan ürünlerinin oluşması amacıyla hücre kültür kapları 3 saat 37°C etüvde inkübe edildi. Her 1 saat sonunda hücre kültür kapları karıştırıcıda oldukça düşük devirde 30 sn karıştırıldı.

Üç saatlik inkübasyon süreci sonunda etüvden çıkarılan hücre kültür kapları (Resim 2.6.1) ışıkları kapatılmış Biyogüvenlik Seviyesi 2 (BSL 2) güvenlik kabini içerisinde açıldı. Her bir kuyucuktaki PBS, XTT ve PMS karışımından 100 µl süspansiyon alınarak yeni bir 96 kuyucuklu hücre kültür kabına aktarıldı (Kültür Kabı B) (Resim 2.6.2). Bu işlem için de toplam 4 adet 96 kuyucuklu hücre kültür kabı kullanıldı. Her bir hücre kültür kabında dentin örneklerine ait pozitif ve negatif kontrol gruplarına yer verildi. Bu kontrol gruplarına ilaveten spektrofotometrik analizde kalibrasyonda kullanılmak üzere yalnızca PBS, XTT ve PMS süspansiyonunun bulunduğu bir grup daha (Blank data) tüm hücre kültür kaplarına eklendi.

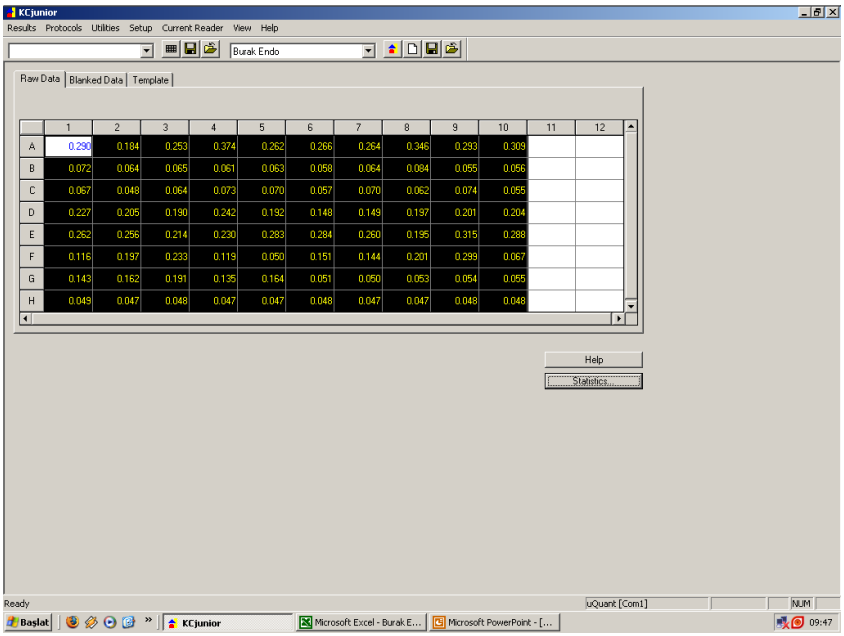


Resim 2.6.1. Dentin örnekleri üzerine XTT, PMS ve PBS solüsyonu ilavesinden 3 saat sonra etüvden çıkarılan 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Kültür Kabı A).



Resim 2.6.2. Dentin örneklerinin bulunmayıp yalnızca Kültür Kabı A'dan alınan süspansiyonun yer aldığı 96 kuyucuklu hücre kültür kabı (Kültür Kabı B)**.**

İçinde dentin örneklerinin bulunmadığı Kültür Kabı B'ye her bir gruptaki süspansiyonun sırasıyla aktarılma işlemi sonrasında süspansiyonun optik yoğunluğu mikroplate okuyucu kullanılarak spektrofotometrik olarak 492 nm dalga boyunda ölçüldü. Elde edilen veriler kaydedildi (Resim 2.6.3). Ayrıca hücre kültür kaplarındaki canlı bakterilerin varlığıyla oluşan formazan ürünlerinin ortaya çıkardığı renk ile mikroplate okuyucu ile elde edilen spektrofotometrik veriler arasında doğrudan gözle görülür bir ilişki olduğu teyit edildi. Örneğin spektrofotometrik okuma sonucunda canlı bakterilerin daha az bulunduğu gruplarda oluşan renk sarıya daha yakınken, bakterilerin yoğun olduğu gruplarda ise renk turuncuya yakın gözlendi.



Resim 2.6.3. Spektrofotometrik okuma ile ölçüm sonrası elde edilen veriler

Deney aşamasında herhangi bir kontaminasyonun olmadığını doğrulamak üzere bir öze yardımıyla her gruptaki rastgele üç kuyucuktan TSA petrilere ekim yapıldı ve ardından 24 saat 37°C etüvde inkübe edildi.

2.7. SEM-EDX Analizi

Her bir deney grubundan rastgele seçilen 4 örnek ve hiçbir enfeksiyon ve irrigasyon işlemine tabii tutulmayan distile suda bekletilmiş 4 örnek (kontrol grubu) olmak üzere toplam 48 adet dentin diski örneği SEM ve Enerji Dağılımlı X-Işınları Analizi (EDX) analizi için hazırlandı. Fiksasyonu %2'lik gluteraldehit (Merck, Damstdat, Almanya) içinde yapılan örnekler, sırasıyla %30, %50, %70, %80, %96 ve %100'lük alkol serisinde 30'ar dakika bekletilerek dehidratasyon işlemi gerçekleştirildi. Dehidrate edilen örnekler Selçuk Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi Araştırma laboratuarında vakumlu bir ortamda Polaron Sc7620 Sputter Coater (VG Microtech Inc. Japonya) cihazı kullanılarak ince bir altın film tabakası ile kaplandı. Farklı büyütmelerde (500×-10000×) taramalı elektron mikroskobu (SEM) (Leo 440, Electron Microscopy Ltd.Cambridge, UK) altında smear tabakası ve dentin yüzeyine yapışan mikroorganizmaların varlığı incelendi. Ayrıca dentin örneklerinin yüzeylerinden elde edilen SEM görüntülerinin hemen

ardından yüzeydeki kalsiyum, fosfor, karbon, sodyum, oksijen ve magnezyum iyonları hakkında bilgi elde etmek amacıyla her bir örneğin rastgele üç ayrı noktasından EDX analizi yapıldı.

2.8. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

XTT test yöntemi ile elde edilen verilerin istatistiksel analizi SPSS 17.0 V bilgisayar programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analiz için her gruptan elde edilen optik dansite (OD) değerleri veri olarak kullanıldı. Yapılan Kolmogorov-Smirnov Normallik Testi istatistiksel analizi sonucunda verilerin normal dağılım gösterdiği belirlendi. Bakteriyel adezyon açısından test edilen iki farklı bakteri suşunun öncelikle irrigasyon solüsyonları deney grupları dikkate alınmaksızın kıyaslanması için Bağımsız iki örneklem T testi kullanıldı. Ardından her bir bakteri suşu alt grubunda bulunan irrigasyon solüsyonları deney grupları arasındaki farklılığın belirlenmesi amacıyla Tek Yönlü Varyans Analizi ve Tukey HSD istatistiği uygulandı. Her bir irrigasyon deney grubunun kendi içinde jelatinaz enzimi üreten ve üretmeyen bakterilerin adezyonunda farklılığa yol açıp açmadığı ise yine Bağımsız iki örneklem T testi kullanılarak değerlendirildi.

SEM-EDX sonucunda elde edilen kalsiyum, fosfor, karbon, sodyum, oksijen ve magnezyum ile ilgili verilerin istatistiksel analizi ise Tek Yönlü Varyans Analizi ve Tukey HSD istatistiği kullanılarak yapıldı. Yapılan tüm istatistiksel değerlendirmelerde anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

3.1. İki farklı *E. faecalis* suşunun dentine adezyonlarının kıyaslanmasına ait bulgular

İrrigasyon deney grupları dikkate alınmaksızın iki farklı bakteri suşunun adezyonunu değerlendirmek üzere Bağımsız iki örneklem T testi uygulandı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun bakteriyel adezyonları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Dentin yüzeyine bağlanan JEL(+) *E. faecalis*'e ait OD değerleri JEL(-) *E. faecalis*'e ait OD değerlerinin yaklaşık iki katı kadar fazla olduğu belirlendi (Çizelge 3.1).

Çizelge 3.1 Dentin yüzeyine adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* suşlarına ait veriler

Bakteri Suşları	Örnek sayısı	Ortalama	Standart sapma	Standart Hata Ortalaması
JEL(+) *E. faecalis*	**120**	**,1290**	**,10913**	**,00996**
JEL(-) *E. faecalis*	**120**	**,0659**	**,05387**	**,00492**

3.2. JEL(+) *E. faecalis*'in farklı irrigasyon deney gruplarında gerçekleştirdiği dentin adezyonuna ait bulgular

JEL(+) *E. faecalis* grubuna ait irrigasyon deney gruplarının bakteriyel adezyona etkilerinde aralarında istatistiksel bir fark bulunup bulunmadığını değerlendirmek için Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) uygulandı.

Varyans Analizi sonucunda farklı irrigasyon deney grupları arasında JEL(+) *E. faecalis*'in dentin adezyonuna olan etkilerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

İrrigasyon deney grupları arasında gözlenen farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirleyebilmek için deney gruplarına Post-Hoc testlerinden Tukey HSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalar yapılmıştır. JEL(+) *E. faecalis* grubuna

ait verilerin ortalamaları, standart sapmaları, minimum-maksimum değerleri ve gruplar arası harflendirmeler Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. JEL(+) *E. faecalis*'in dentine adezyonunda irrigasyon deney gruplarına ait tanımlayıcı istatistikler ve Tukey HSD istatistik sonuçlarına göre harflendirme

İrrigasyon Solüsyonları ve Kombinasyonları	Örnek sayısı	Ortalama±SD	Minimum	Maksimum
%2,5 NaOCl	10	0,319±0,094^{e*}	0,17	0,47
%2 CHX	10	0,021±0,010^{a}	0,01	0,04
%2,5 NaOCl+Serum fizyolojik+%2 CHX	10	0,020±0,010^{a}	0,00	0,04
%2,5 NaOCl+%17 EDTA+%2,5NaOCl	10	0,197±0,048^{d}	0,13	0,30
%17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17EDTA	10	0,282±0,068^{e}	0,16	0,41
%17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA	10	0,021±0,011^{a}	0,01	0,04
QMix	10	0,129±0,047^{cd}	0,05	0,20
OCT	10	0,115±0,048^{c}	0,03	0,19
OCT+%17 EDTA+OCT	10	0,043±0,021^{ab}	0,02	0,08
PBS	10	0,136±0,045^{cd}	0,08	0,21
Serum Fizyolojik (Pozitif Kontrol)	10	0,105±0,021^{bc}	0,07	0,14

*: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre; CHX grubu, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubu, EDTA+CHX+EDTA grubu ve OCT+EDTA+OCT grubu diğer tüm irrigasyon deney grupları arasında JEL(+) *E. faecalis*'in en düşük ortalama OD değerlerini vermiştir. Bu gruplar ile diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

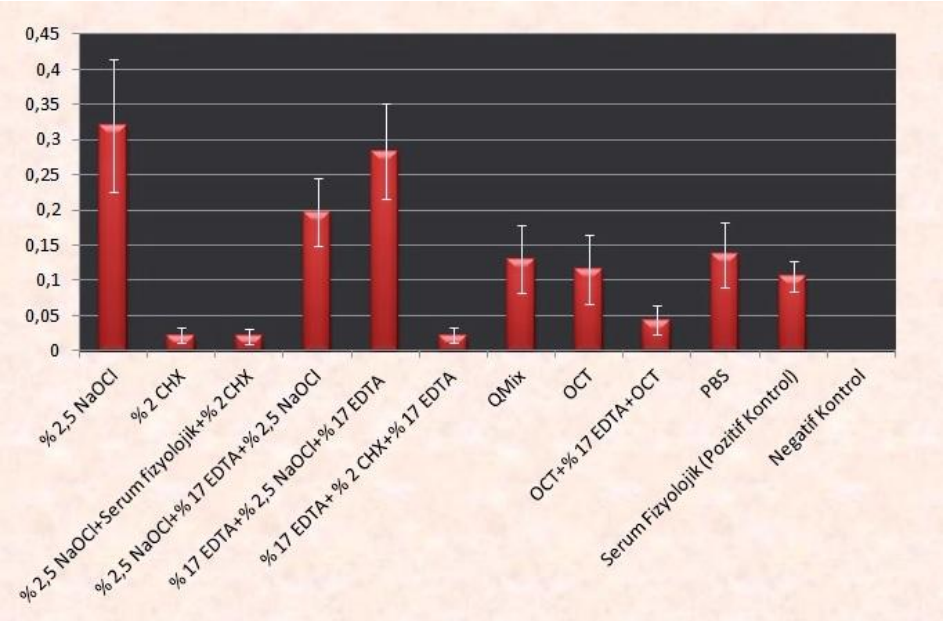
OCT grubu kontrol grubu olan serum fizyolojikten daha yüksek ancak QMix grubu ve PBS grubuna göre daha düşük ortalama OD değerleri göstermiştir. Ancak bu üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda kontrol grubu olan serum fizyolojiğe göre istatistiksel olarak anlamlı olmak üzere daha yüksek bakteriyel adezyon gözlenmiştir ($p<0,05$). NaOCl+EDTA+NaOCl grubu ile QMix ve PBS grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir benzerlik bulunduğu gözlenmiştir ($p>0,05$).

NaOCl grubu ve EDTA+NaOCl+EDTA grupları ise tüm deney grupları içerisinde JEL(+) *E. faecalis*'in dentine adezyonunda en yüksek ortalama OD değerlerini vermiştir ($p<0,05$). Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Negatif kontrol grubundaki tüm örneklerin OD değerleri sıfır bulunmuş ve böylece tüm deney süresince herhangi bir mikroorganizma kontaminasyonunun olmadığı belirlenmiştir.

Farklı irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının dentine uygulanması sonrası JEL(+) *E. faecalis*'in dentine adezyonunu gösteren ortalama OD değerleri Grafik 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. İrrigasyon solüsyonları ve kombinasyonları uygulaması sonrası dentine adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

3.3. JEL(-) *E. faecalis*'in farklı irrigasyon deney gruplarında gerçekleştirdiği dentin adezyonuna ait bulgular

JEL(-) *E. faecalis* grubuna ait irrigasyon deney gruplarının bakteriyel adezyona etkilerinde aralarında istatistiksel bir fark bulunup bulunmadığını değerlendirmek için Tek-Yönlü Varyans Analizi (One-Way ANOVA) uygulandı.

Varyans Analizi sonucunda irrigasyon deney gruplarının JEL(-) *E. faecalis*'in dentin adezyonuna olan etkilerinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın bulunduğu saptanmıştır ($p<0,05$).

İrrigasyon deney grupları arasında gözlenen farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirleyebilmek için deney gruplarına Post-Hoc testlerinden Tukey HSD testi kullanılarak çoklu karşılaştırmalar yapılmıştır. JEL(-) *E. faecalis* grubuna ait verilerin ortalamaları, standart sapmaları, minimum-maksimum değerleri ve gruplar arası harflendirmeler Çizelge 3.3'te verilmiştir.

Çizelge 3.3. JEL(-) E. *faecalis*'in dentine adezyonunda irrigasyon deney gruplarına ait tanımlayıcı istatistikler ve Tukey HSD istatistik sonuçlarına göre harflendirme

İrrigasyon Solüsyonları ve Kombinasyonları	Örnek sayısı	Ortalama±SD	Minimum	Maksimum
%2,5 NaOCl	10	0,144±0,024^{d*}	0,10	0,18
%2 CHX	10	0,016±0,010^{a}	0,01	0,04
%2,5 NaOCl+Serum fizyolojik +%2 CHX	10	0,014±0,09^{a}	0,00	0,04
%2,5 NaOCl+%17 EDTA+%2,5 NaOCl	10	0,111±0,028^{bc}	0,08	0,18
%17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA	10	0,132±0,026^{cd}	0,10	0,18
%17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA	10	0,014±0,010^{a}	0,00	0,03
QMix	10	0,084±0,013^{b}	0,06	0,11
OCT	10	0,027±0,012^{a}	0,01	0,05
OCT+%17 EDTA+OCT	10	0,027±0,016^{a}	0,01	0,06
PBS	10	0,109±0,027^{bc}	0,07	0,16
Serum fizyolojik (Pozitif Kontrol)	10	0,100±0,028^{b}	0,07	0,16

*: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

Tukey HSD çoklu karşılaştırma testine göre; CHX grubu, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubu, EDTA+CHX+EDTA grubu, OCT grubu ve OCT+EDTA+OCT grubu tüm irrigasyon deney grupları arasında JEL(-) *E. faecalis*'in en düşük ortalama OD değerlerini vermiştir. Diğer deney gruplarıyla aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$).

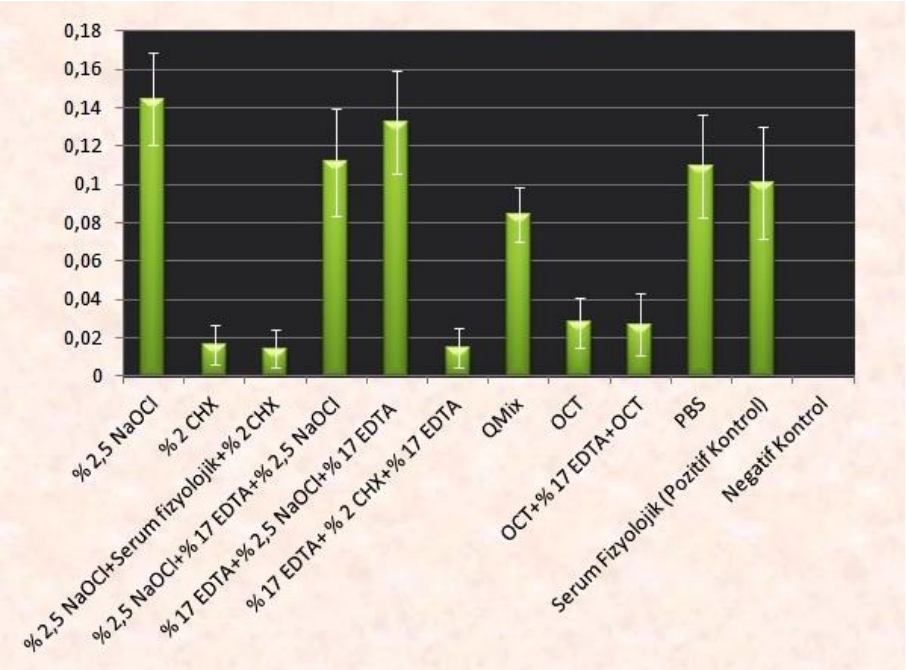
QMix grubu ile kontrol grubu olan serum fizyolojik grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

NaOCl+EDTA+NaOCl grubu ve PBS grubu arasında istatistiksel bir fark olmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$). Bu iki grubun adezyon değerleri QMix grubu ve Serum fizyolojik grubundan istatistiksel olarak anlamlı olmayacak şekilde daha yüksek bulunmuştur ($p>0,05$).

NaOCl grubu ve EDTA+NaOCl+EDTA grubu tüm gruplar içerisinde JEL(-) *E. faecalis*'in dentine adezyonunda en yüksek ortalama OD değerlerini vermiştir ($p<0,05$). Bu iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

Negatif kontrol grubundaki tüm örneklerin OD değerleri sıfır bulunmuş ve böylece tüm deney süresince herhangi bir mikroorganizma kontaminasyonun olmadığı belirlenmiştir.

Farklı irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının dentine uygulanması sonrası JEL(-) *E. faecalis*'in dentine adezyonunu gösteren OD değerleri ortalamaları grafiksel olarak da Grafik 3.3'te gösterilmiştir.



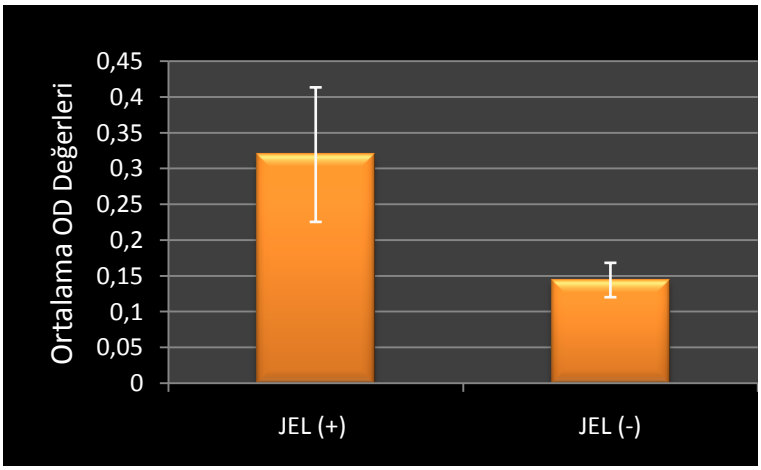
Şekil 3.3. İrrigasyon solüsyonları ve kombinasyonları uygulaması sonrası dentine adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

3.4. Her bir irrigasyon deney grubunun kendi içinde JEL(+) *E. faecalis* ve JEL (-) *E. faecalis*'in dentin adezyonlarının karşılaştırılmasına ait bulgular

Her bir irrigasyon test grubu kendi içinde bakteri suşu değişken olarak ele alınıp tüm deney gruplarına tek tek Bağımsız iki örneklem T testi (Independent Samples T Test) yapılmış ve her bir irrigasyon deney grubu içinde iki farklı bakteri suşunun adezyon ortalamaları karşılaştırılmıştır.

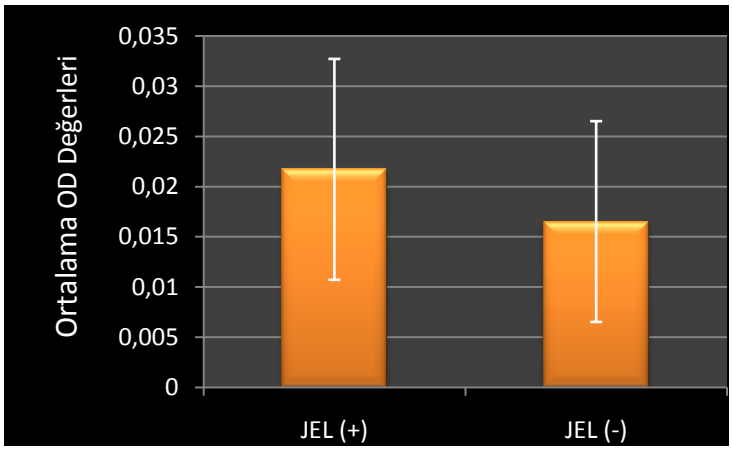
Farklı irrigasyon deney grupları ile dentinin muamele edilmesinden sonra dentin adezyonu gösteren iki farklı bakteri suşuna ait ortalama OD değerleri grafiksel olarak Grafik 3.4.1.-3.4.11.'de verilmiştir.

Elde edilen istatistiksel bulgular sonucunda NaOCl grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşunun JEL(-) *E. faecalis* suşuna göre dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 3.4.1).



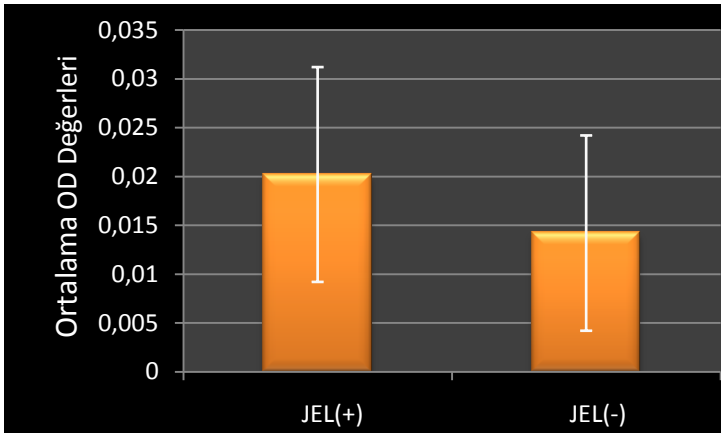
Şekil 3.4.1. Dentin örneklerinin %2,5 NaOCl ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

CHX grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Grafik 3.4.2).



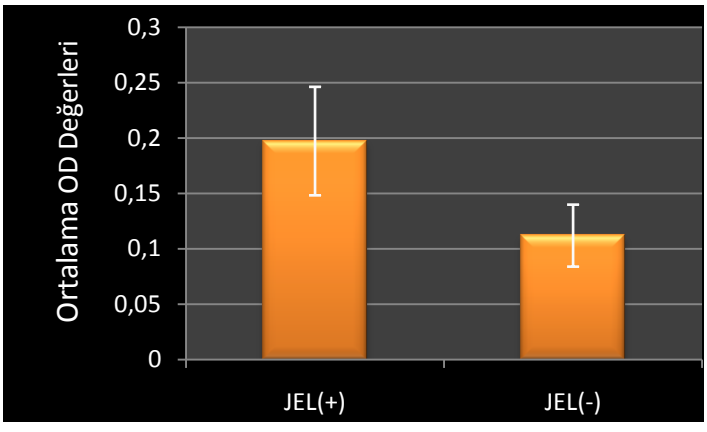
Şekil 3.4.2. Dentin örneklerinin %2 CHX ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Grafik 3.4.3).



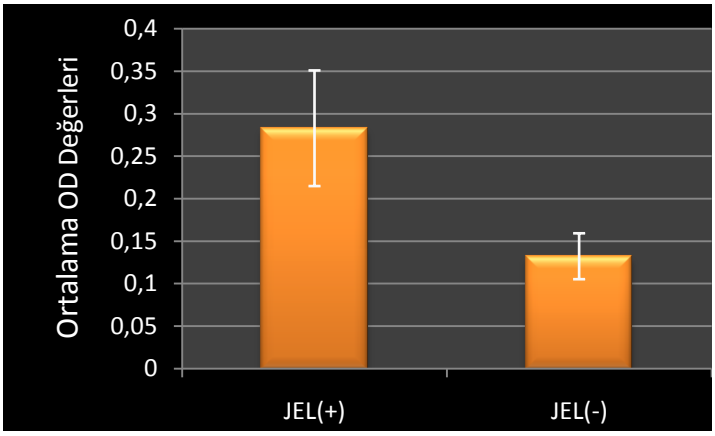
Şekil 3.4.3. Dentin örneklerinin %2,5 NaOCl+Serum fizyolojik+%2 CHX ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşunun JEL(-) *E. faecalis* suşuna göre dentin adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlenmiştir (p<0,05) (Grafik 3.4.4).



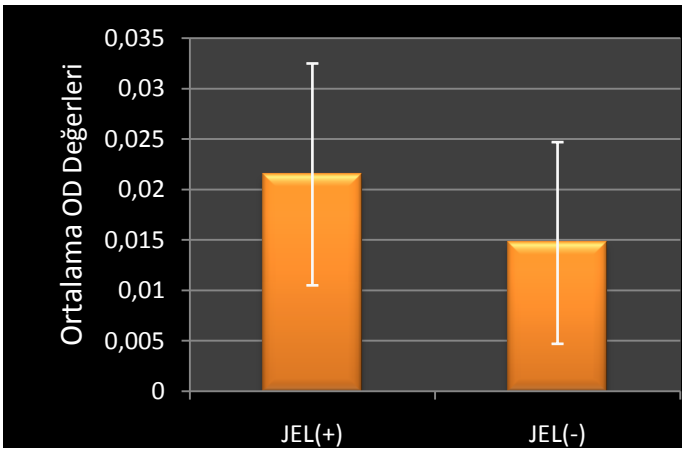
Şekil 3.4.4. Dentin örneklerinin %2,5 NaOCl+%17 EDTA+%2,5 NaOCl ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

EDTA+NaOCl+EDTA grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşunun JEL(-) *E. faecalis* suşuna göre dentin adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 3.4.5).



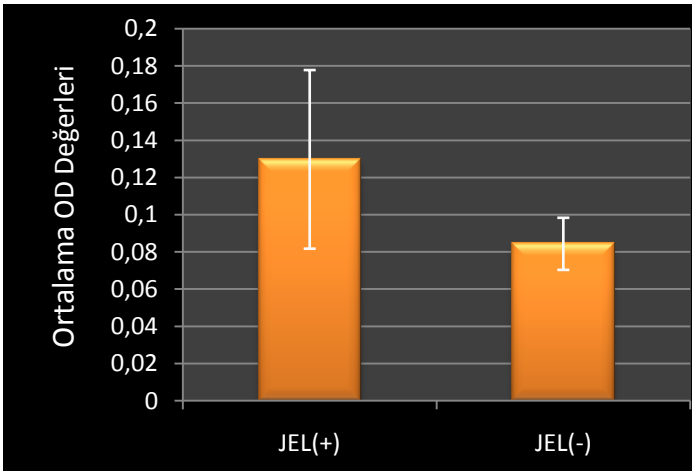
Şekil 3.4.5. Dentin örneklerinin %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

EDTA+CHX+EDTA grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$) (Grafik 3.4.6).



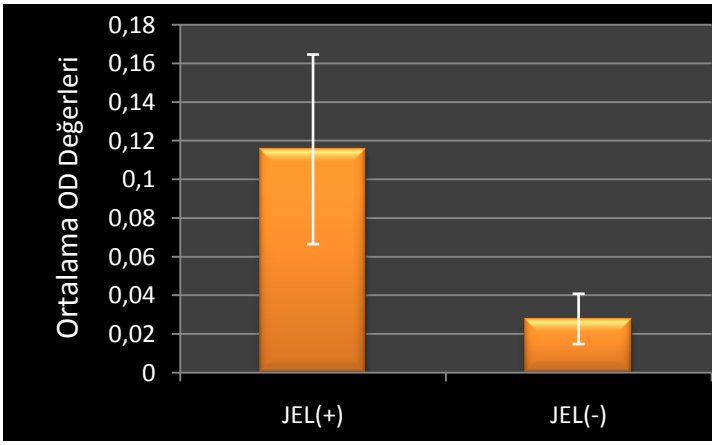
Şekil 3.4.6. Dentin örneklerinin %17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

QMix grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşunun JEL(-) *E. faecalis* suşuna göre dentin adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 3.4.7).



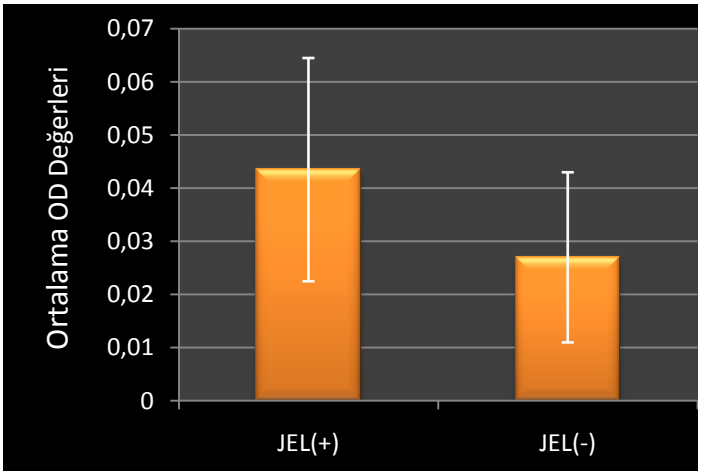
Şekil 3.4.7. Dentin örneklerinin QMix ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

OCT grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşunun JEL(-) *E. faecalis* suşuna göre dentin adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek ortalamaya sahip olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$) (Grafik 3.4.8).



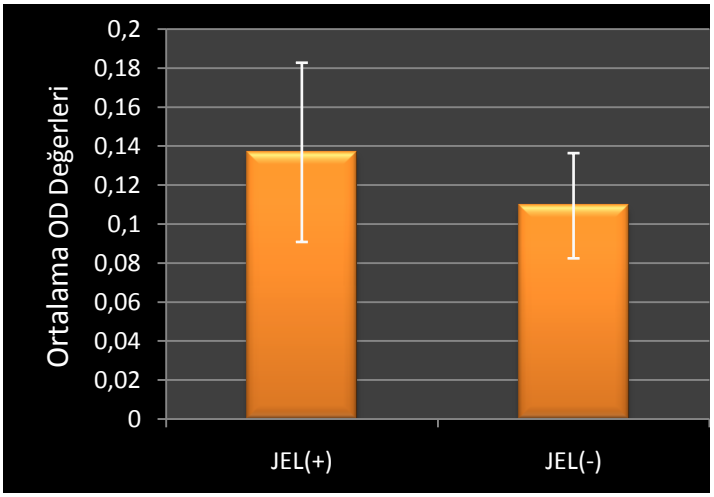
Şekil 3.4.8. Dentin örneklerinin OCT ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

OCT+EDTA+OCT grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Grafik 3.4.9).



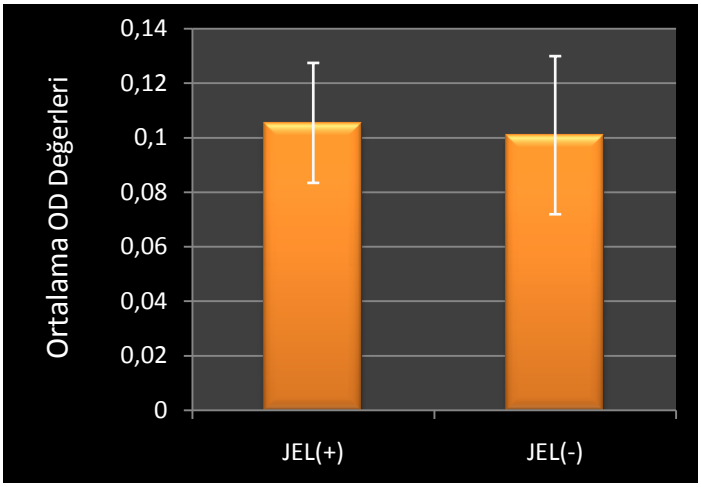
Şekil 3.4.9. Dentin örneklerinin OCT+%17 EDTA+OCT ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

PBS grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Grafik 3.4.10).



Şekil 3.4.10. Dentin örneklerinin PBS ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

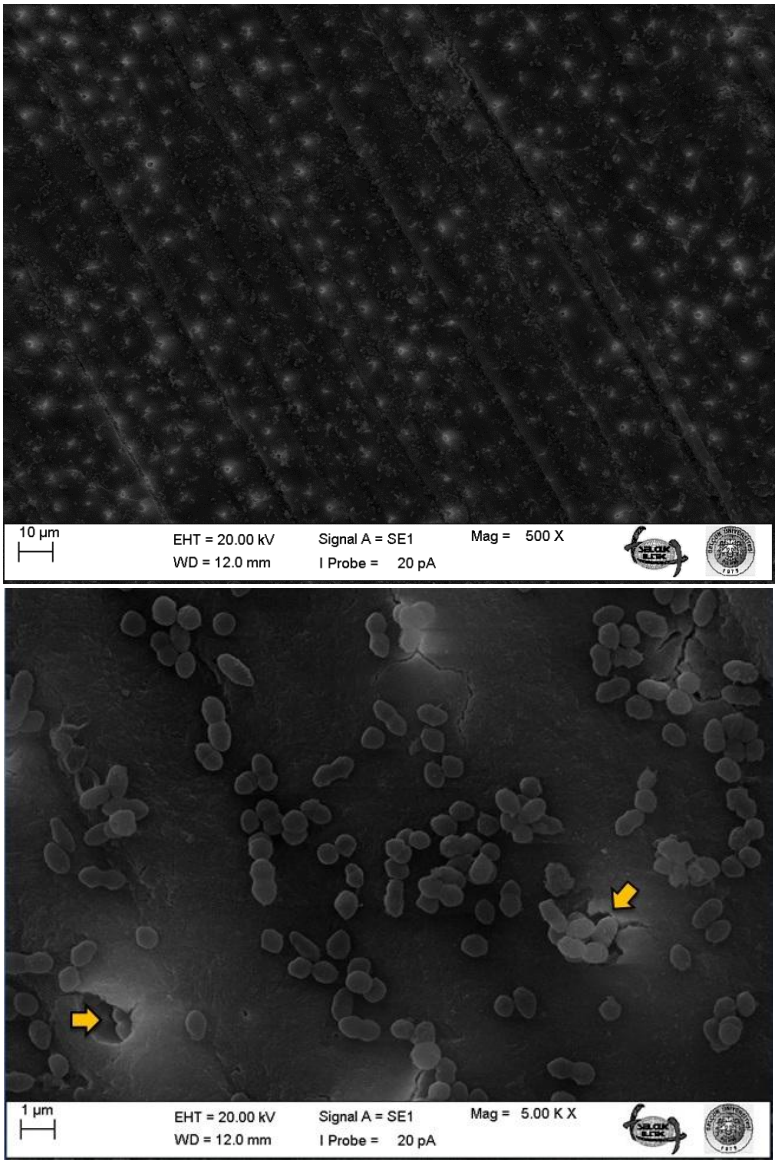
Kontrol grubu olan serum fizyolojik grubunda JEL(+) *E. faecalis* suşu ile JEL(-) *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır (p>0,05) (Grafik 3.4.11).



Şekil 3.4.11. Dentin örneklerinin serum fizyolojik ile irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyine adezyon yapan JEL(+) *E. faecalis* ve JEL(-) *E. faecalis* bakterilerinin 492 nm'deki ortalama OD değerleri

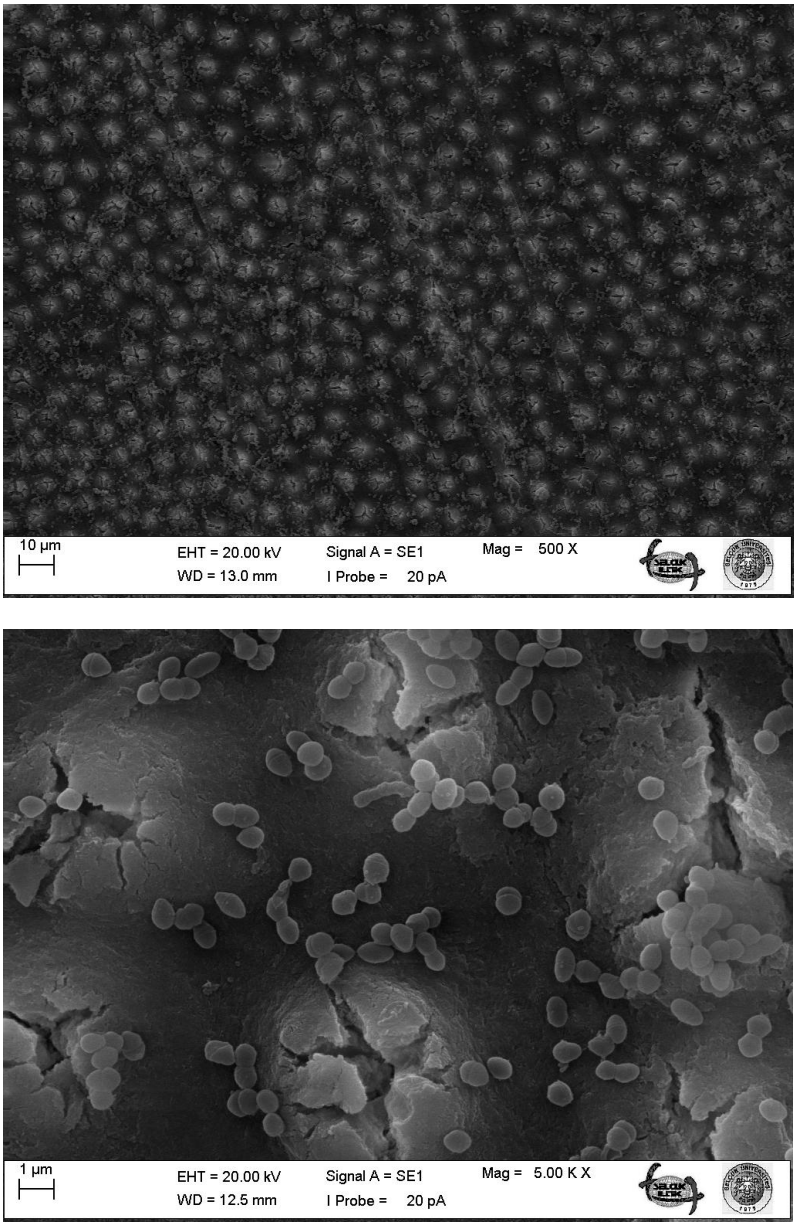
3.5. SEM Analizi Bulguları

Yapılan %2,5 NaOCl ile irrigasyon sonrasında dentin yüzeyinin yoğun debris ile kaplı olduğu ve yüzeydeki smear tabakasının dentin tübül ağızlarını büyük oranda örttüğü gözlenmektedir. Dentin yüzeyinde kolonize halde bulunan bakterilerin çok az da olsa açılan bazı dentin tübül ağızları içine de girebildiği görülmektedir (Resim 3.5.1).



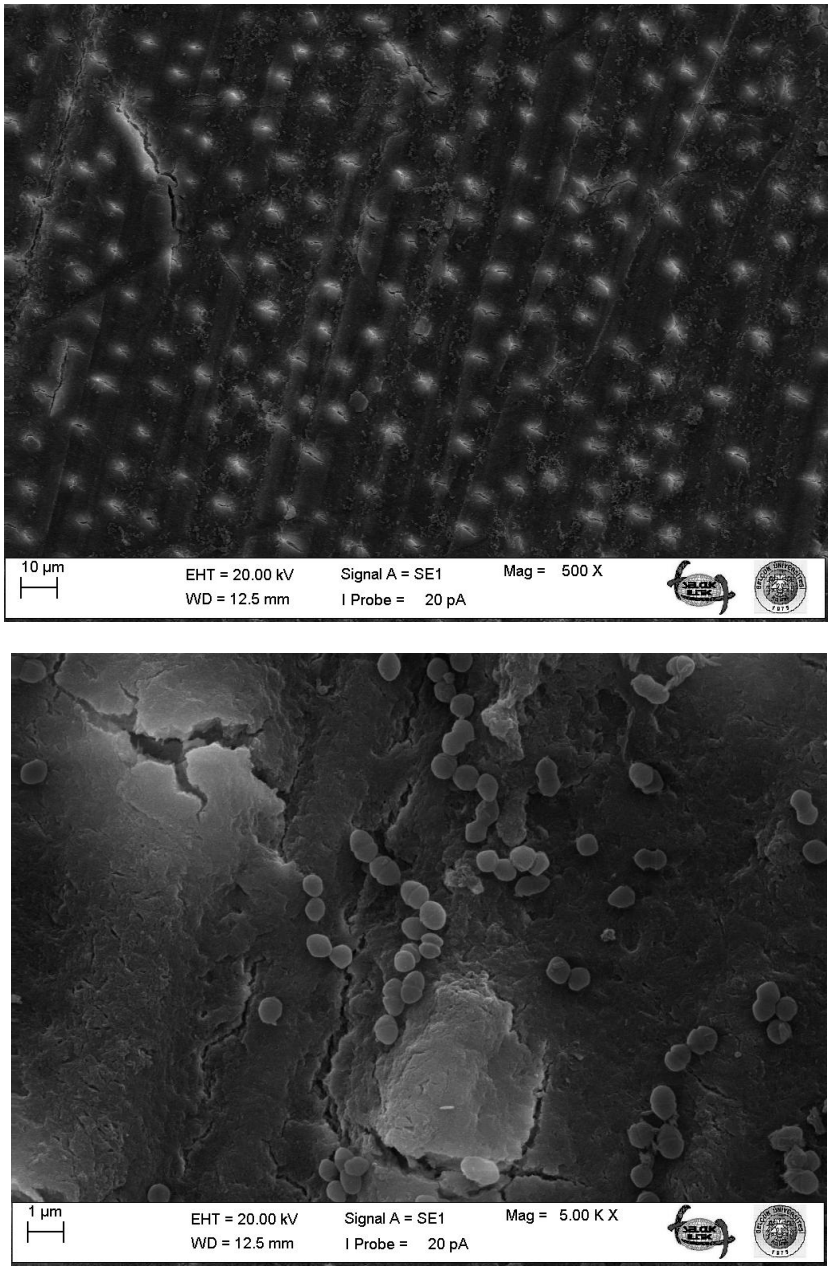
Resim 3.5.1. NaOCl ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

Dentin örneklerinin %2 CHX ile irrigasyonu sonrası dentin yüzeyindeki smear tabakası uzaklaştırılamamış olup dentin tübül ağızlarının tümüyle debris ile tıkalı olduğu gözlenmektedir. Adezyon OD değerlerinin en düşük olduğu gruplardan biri olan CHX grubunda dahi *E. faecalis*'in dentin yüzeyine bakteriyel adezyon gerçekleştirebildiği Resim 3.5.2'de gösterilmiştir.



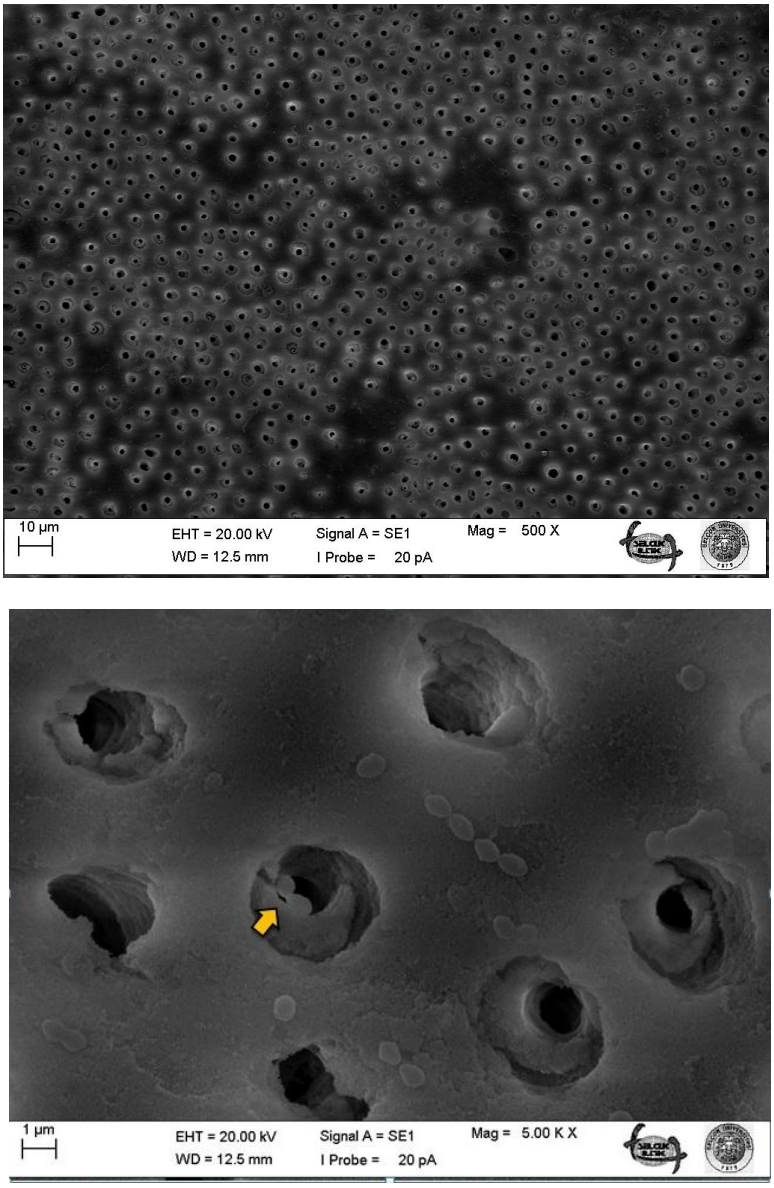
Resim 3.5.2. CHX ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

Dentin yüzeyinden smear tabakasının % 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX ile irrigasyon sonrasında uzaklaştırılamadığı izlenmektedir. Dentin tübül ağızlarının tıkalı olduğu ve yoğun debrisle çevrelendiği açıkça gözlenmektedir. Yüzey görüntüsü CHX grubuna benzer olup dentine adezyon yapan *E. faecalis* hücreleri Resim 3.5.3'te gösterilmiştir.



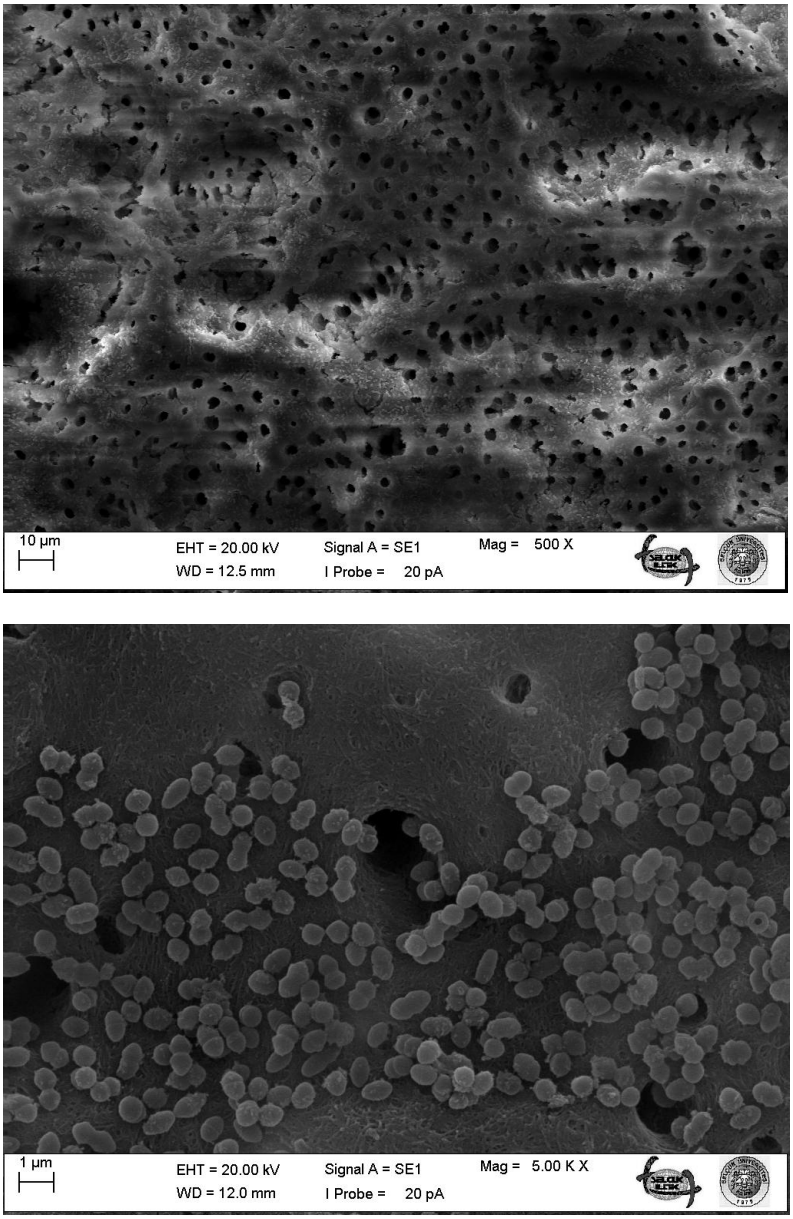
Resim 3.5.3. NaOCl+Serum fizyolojik+CHX ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

İrrigasyon solüsyonlarından %17 EDTA'nın kullanımı ile NaOCl grubundan farklı olarak NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda smear tabakası önemli ölçüde uzaklaştırılmıştır. Debrisin uzaklaştırılarak dentin tübül ağızlarının açıldığı gözlenmektedir. Ayrıca %2,5 NaOCl'nin %17 EDTA ile kombine kullanımı sonrası dentin tübüllerinin düzensiz genişlemesi ve tübül içindeki pürüzlülük dentin yüzeyinde gerçekleşen erozyonun açık belirtilerindendir. Dentin tübülü içine giren bakteriler Resim 3.5.4'te 5000x büyütme ile elde edilen görüntüde ok ile gösterilmektedir.



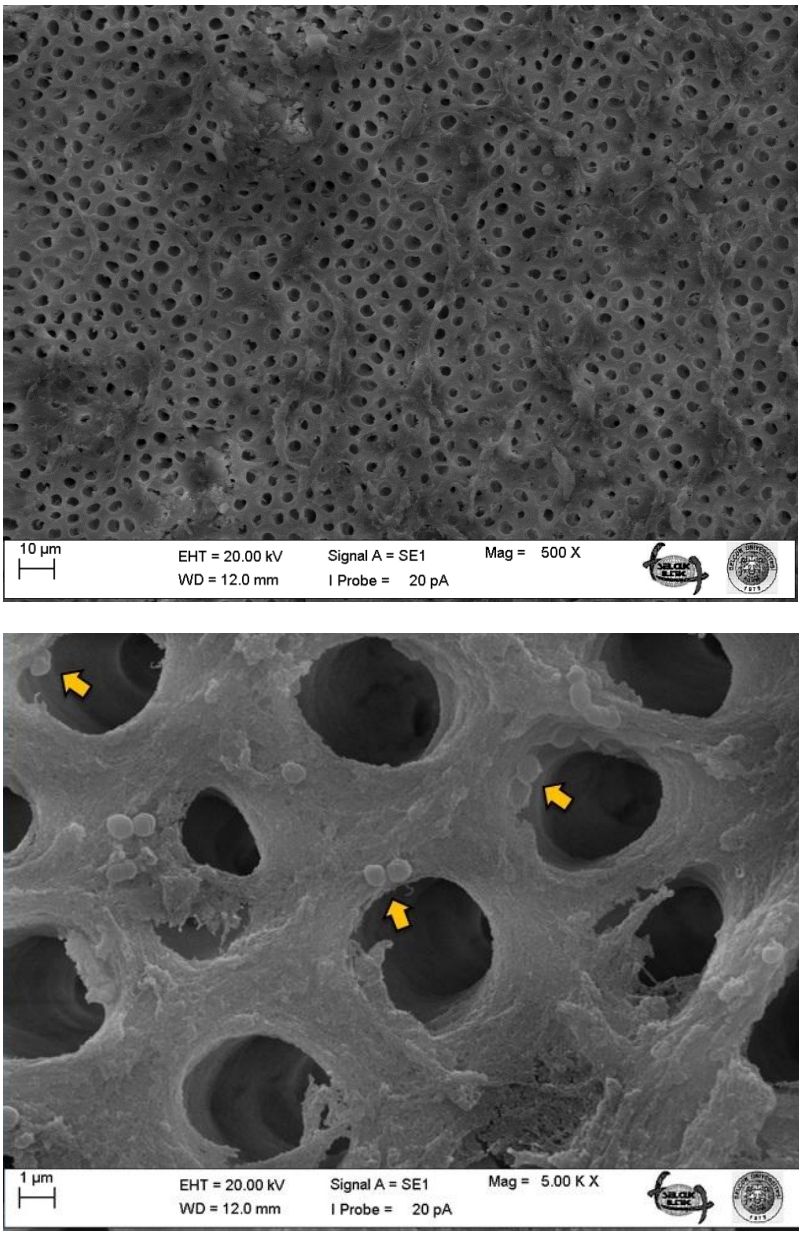
Resim 3.5.4. NaOCl+EDTA+NaOCl ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

Final irrigasyon solüsyonu olarak %17 EDTA'nın kullanıldığı EDTA+NAOCl+EDTA grubunda dentin yüzeyinden smear tabakası ve debris tümüyle uzaklaştırılmıştır. Ancak dentin yüzeyinde meydana gelen şiddetli erozyon NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda gözlenenden çok daha şiddetlidir. Dentin yüzeyindeki bozulmalarla beraber bazı dentin tübül ağızlarının genişliğinin giderek arttığı ve hatta bazı yerlerde tübül ağızlarının birleştiği izlenmektedir. Bunun yanı sıra yüzeyde yoğun şekilde kolonize olan bakterilerin dentin tübülleri içine kadar nüfuz ettiği görülmektedir (Resim 3.5.5).



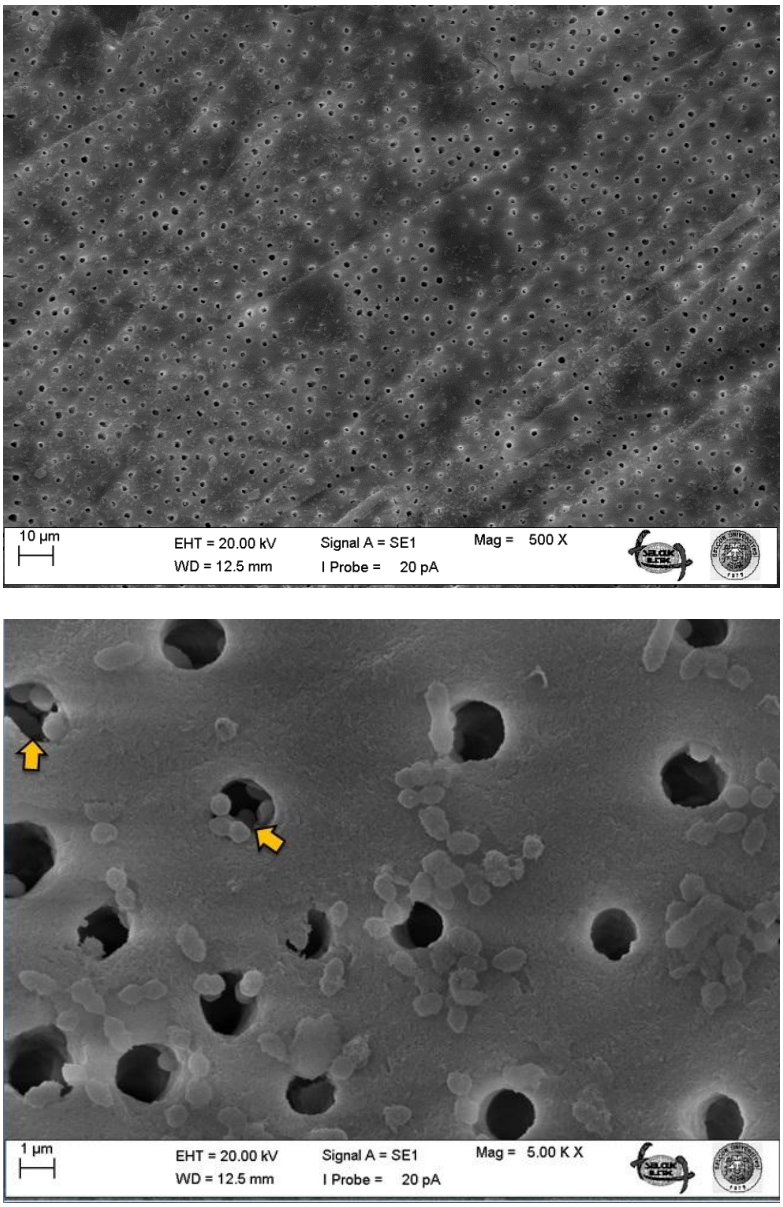
Resim 3.5.5. EDTA+NaOCl+EDTA ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

EDTA+CHX+EDTA grubunda dentin yüzeyinden smear tabakasının büyük ölçüde uzaklaştırıldığı ancak bazı bölgelerde yüzeydeki debrisin tümüyle ortadan kaldırılamadığı görüntülenmiştir. Dentin tübül ağızlarının yer yer debrisle tıkalı olduğu gözlendiği bu gruptaki erozyon bulguları EDTA+NaOCl+EDTA grubunda gözlenen erozyon kadar şiddetli değildir. Ancak bazı dentin tübül ağızlarının genişleyerek düzensizleştiği görülmektedir. Oklarla işaret edilen yerlerde dentin tübül ağzı ve çevresine adezyon yapan bakteriler izlenmektedir (Resim 3.5.6).



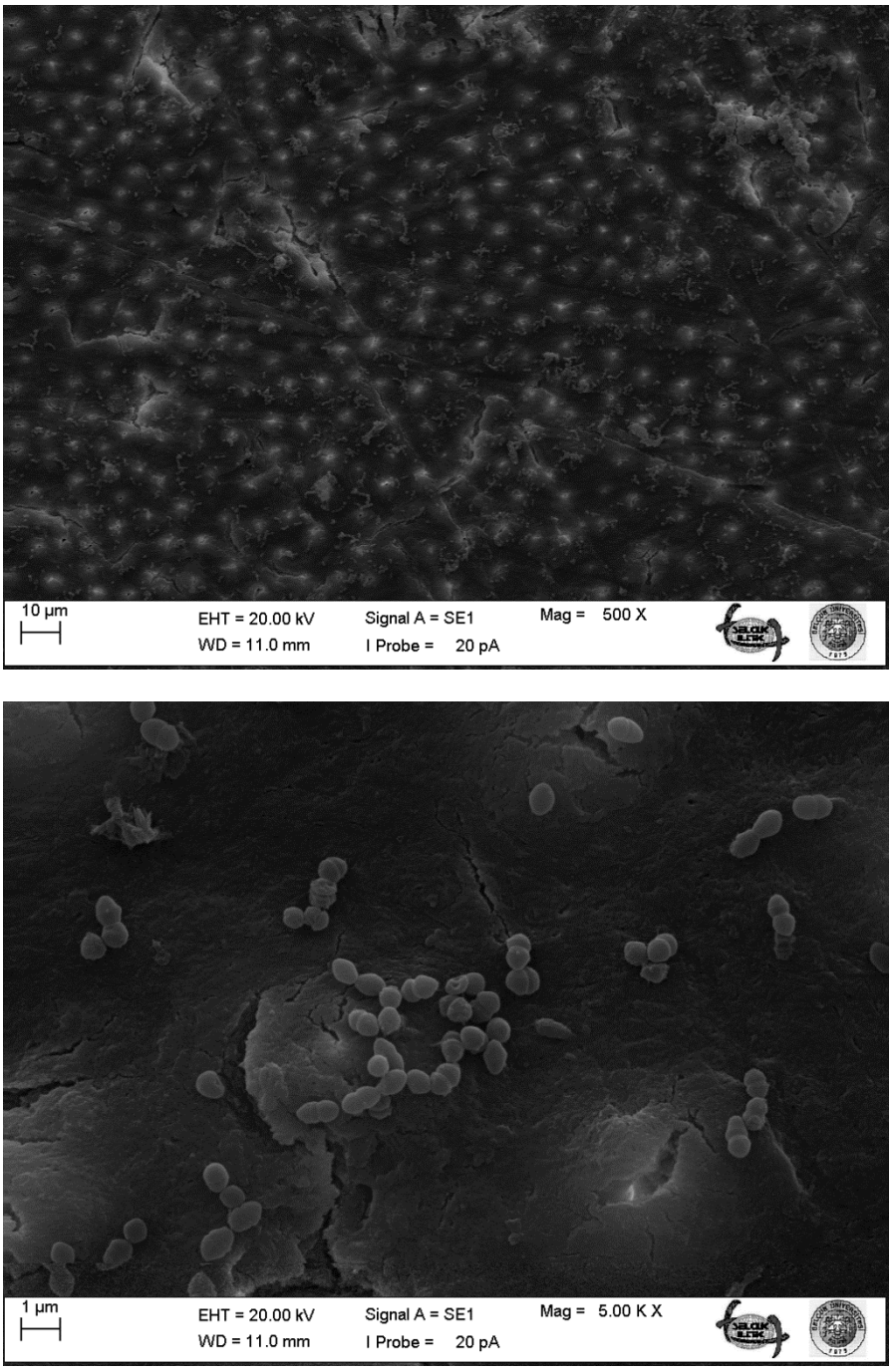
Resim 3.5.6. EDTA+CHX+EDTA ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

QMix ile irrigasyon sonrası smear tabakasının büyük ölçüde uzaklaştığı, dentin yüzeyindeki debris miktarında önemli bir azalma olduğu ve dentin tübül ağızlarının büyük çoğunluğunun açıldığı görülmektedir. EDTA+CHX+EDTA grubu ile kıyaslandığında dentin yüzeyinde erozyonun neredeyse hiç olmadığı söylenebilir. QMix ile muamele edilen dentin yüzeyinin oldukça pürüzsüz olduğu gözlenmektedir. QMix grubunda smear tabakası ve debrisin uzaklaştırılmasıyla açığa çıkan dentin tübülleri içine penetre olabilen bakteriler okla gösterilmiştir (Resim 3.5.7).



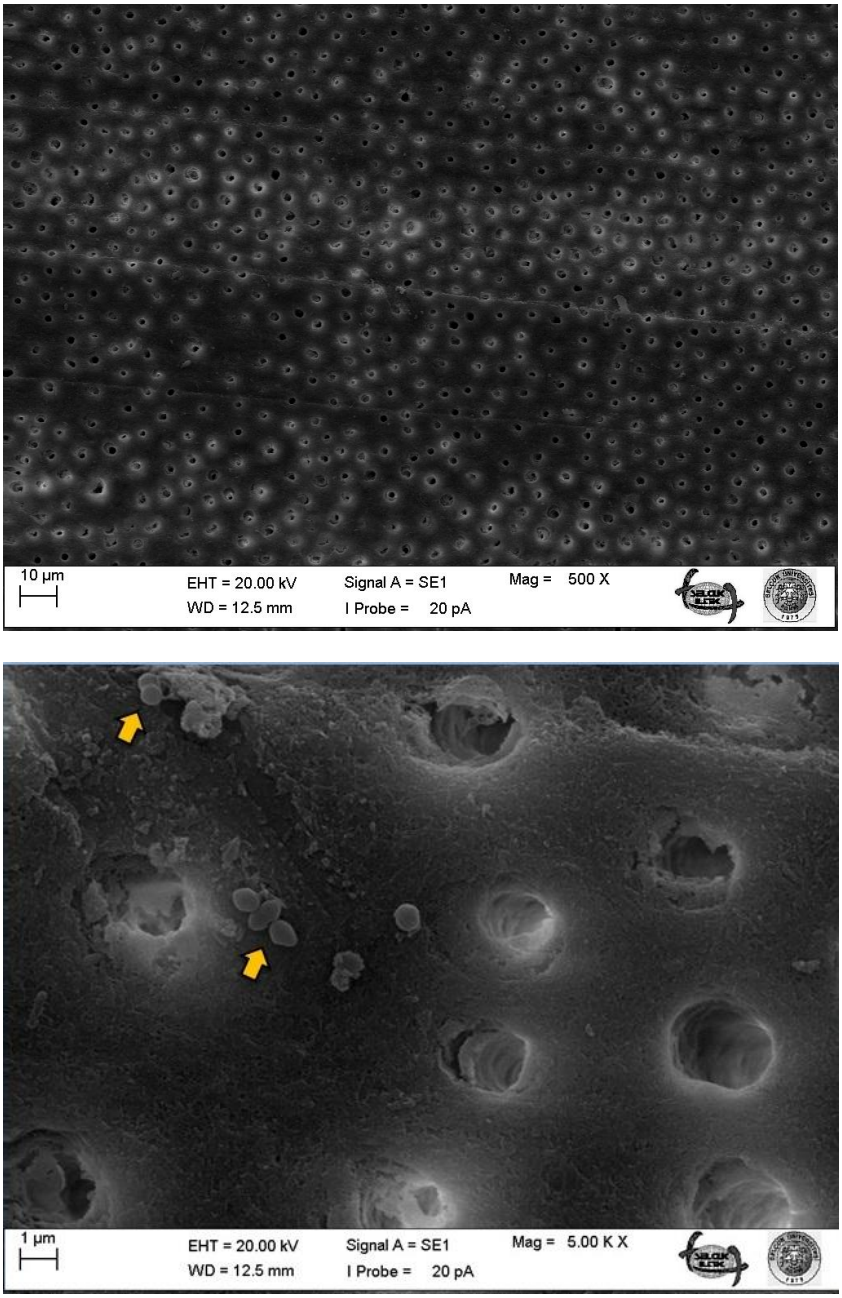
Resim 3.5.7. QMix ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

OCT ile yapılan irrigasyon sonrası dentin yüzeyindeki smear tabakası ve yoğun debris ortadan kaldırılamamıştır. Tüm dentin tübül ağızlarının debrisle tıkalı olduğu izlenmektedir. OCT grubunda dentin yüzeyinde gözlenen *E. faecalis* adezyonu resim 3.5.8'de verilmiştir.



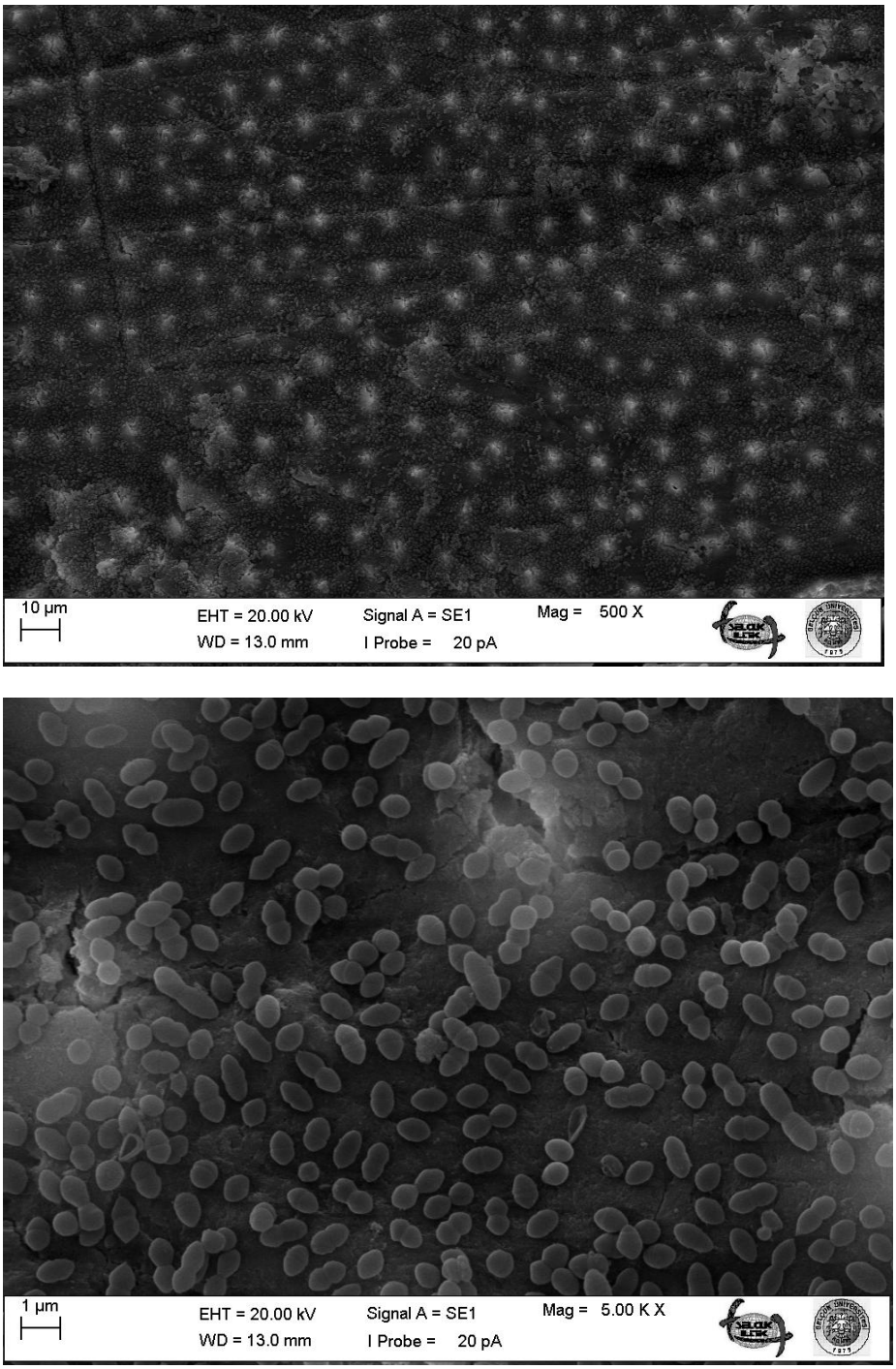
Resim 3.5.8. OCT ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(+) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

OCT+EDTA+OCT ile irrigasyon sonrasında smear tabakasının kısmen kaldırılabildiği, dentin tübül ağızlarının büyük çoğunluğunun açıldığı ancak tübül çevresinde debris birikiminin olduğu görülmektedir. Tek başına OCT ile muamele edilen dentin yüzeyiyle kıyaslanacak olduğunda bu grupta gözlenen smear tabakası çıkarma etkinliğinin EDTA ile sağlandığı anlaşılmaktadır. Oklarla işaretli yerlerde dentin yüzeyine adezyon gösteren bakteriler izlenmektedir (Resim 3.5.9).



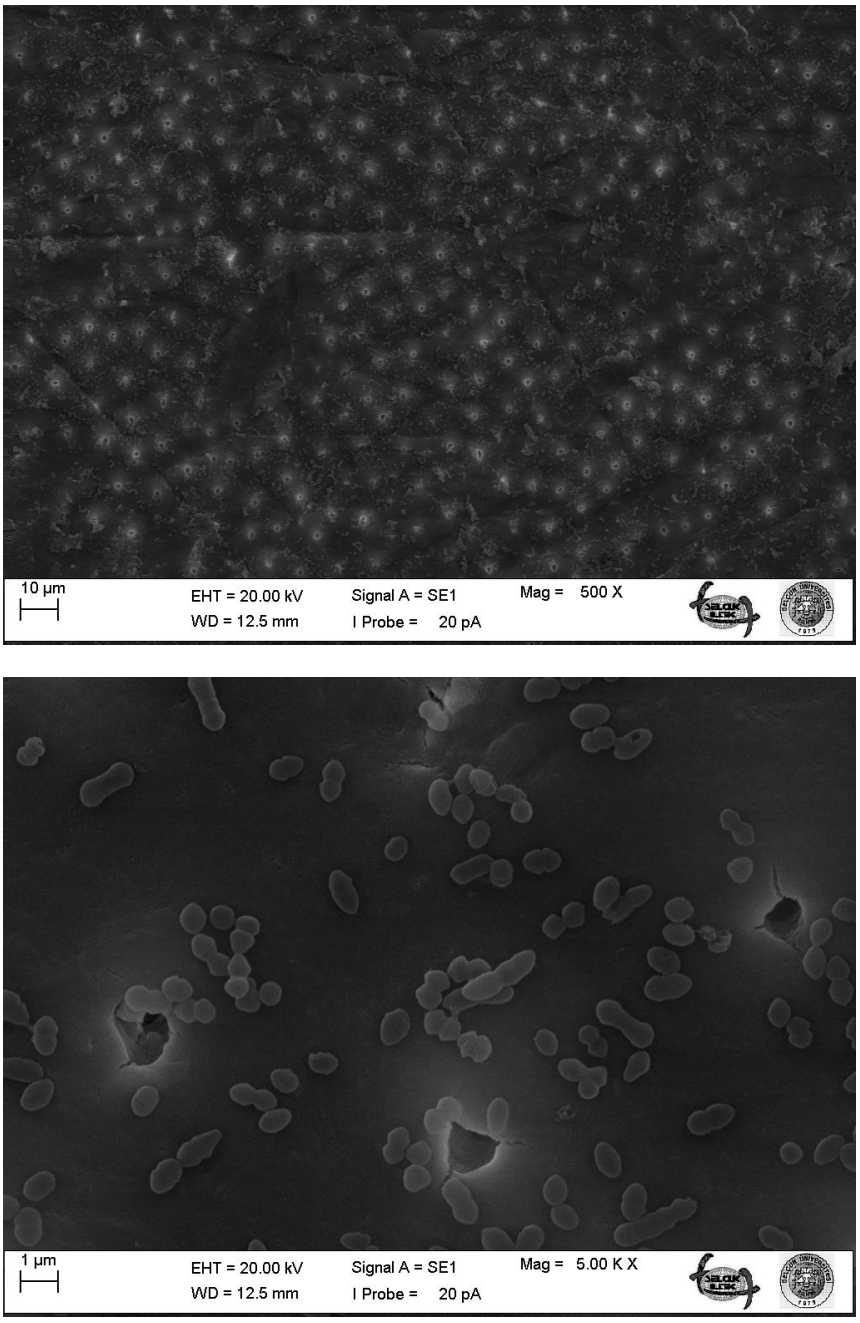
Resim 3.5.9. OCT+EDTA+OCT ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

PBS ile yapılan irrigasyon sonrası dentin yüzeyinden smear tabakası ve debrisin uzaklaştırılamadığı görülmektedir. Dentin tübül ağızları debrisle tıkalı olup dentin yüzeyinde yoğun bir bakteri kolonizasyonu izlenmektedir. Alınan SEM görüntüsünde yoğun bakteri kolonizasyonu gözlenmektedir (Resim 3.5.10).



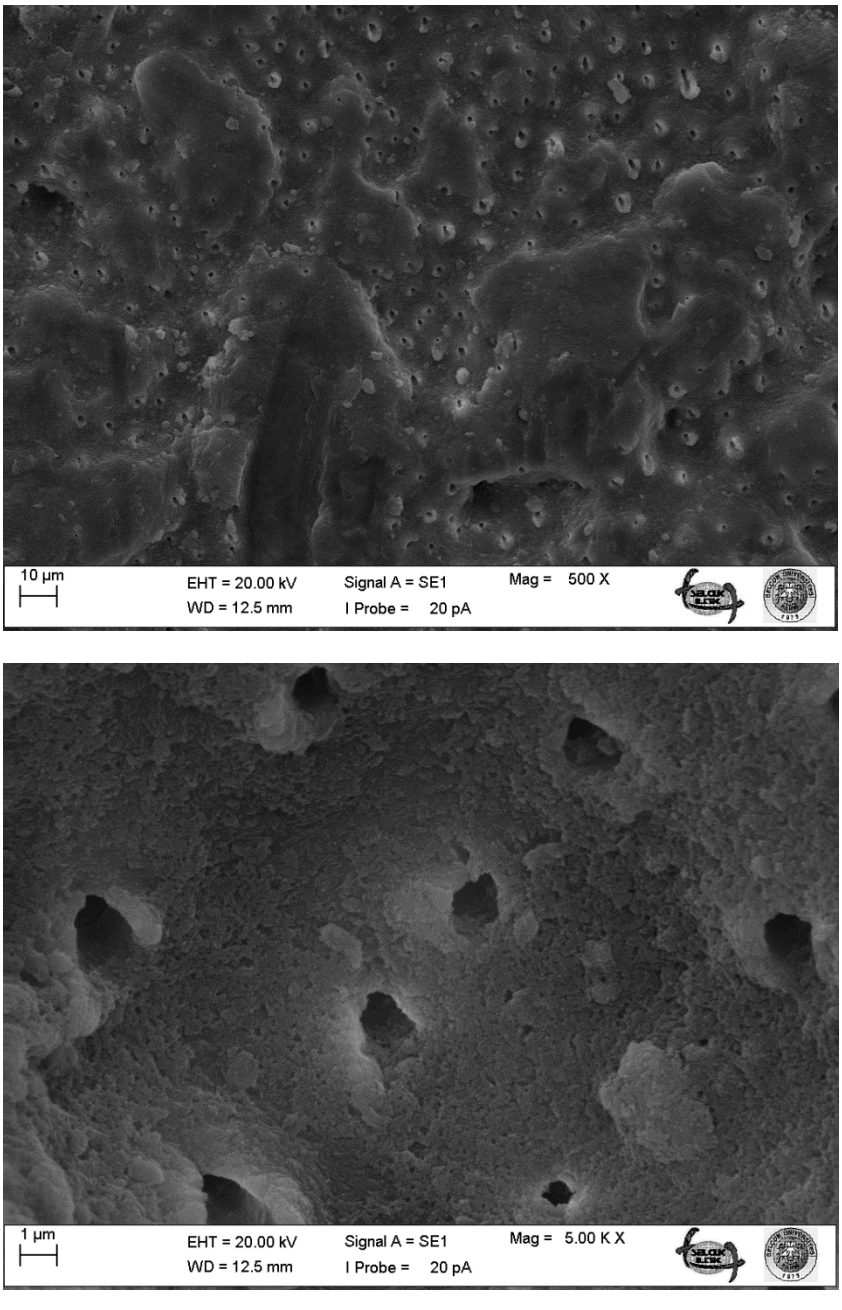
Resim 3.5.10. PBS ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

Serum fizyolojik ile yapılan irrigasyon sonrası dentin yüzeyindeki smear tabakası ortadan kaldırılamamıştır. Dentin tübül ağızlarının az da olsa yer yer açıldığı ancak tübül ağızları etrafının yoğun miktarda debris ile kaplı olduğu görülmektedir. Dentin yüzeyine adezyon yapan *E. faecalis* hücreleri Resim 3.5.11'de verilmiştir.



Resim 3.5.11. Pozitif kontrol grubu olan serum fizyolojik ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyi ve bu yüzeye adezyon gösteren JEL(-) *E. faecalis*'e ait SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

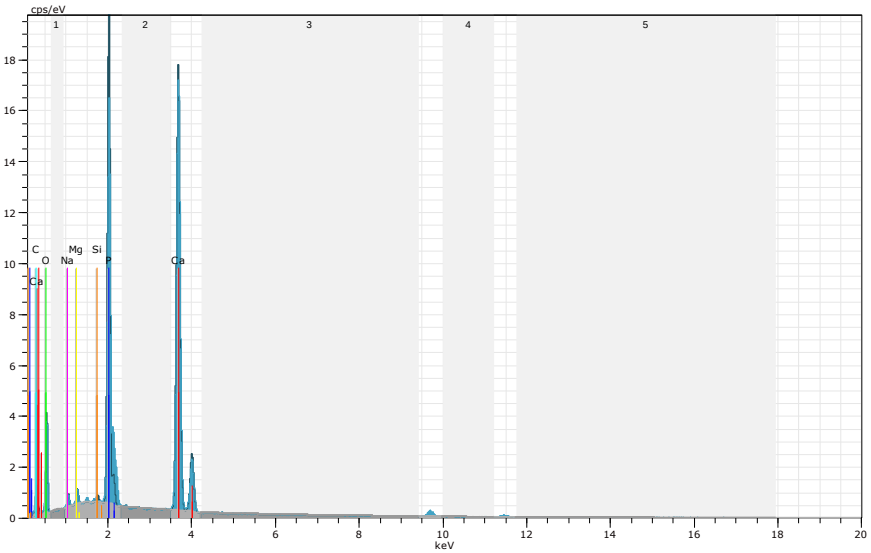
Zımpara işlemi dışında yüzeyine herhangi bir işlem yapılmamış negatif kontrol grubu örneğinde yoğun smear tabakası ve bol miktarda debris izlenmektedir. Tipik 'kalkosferik' dentin yapısının gözlendiği yüzeyde hiçbir mikroorganizmanın bulunmayışı deney sürecinde herhangi bir kontaminasyonun bulunmadığını kanıtlamaktadır (Resim 3.5.12).



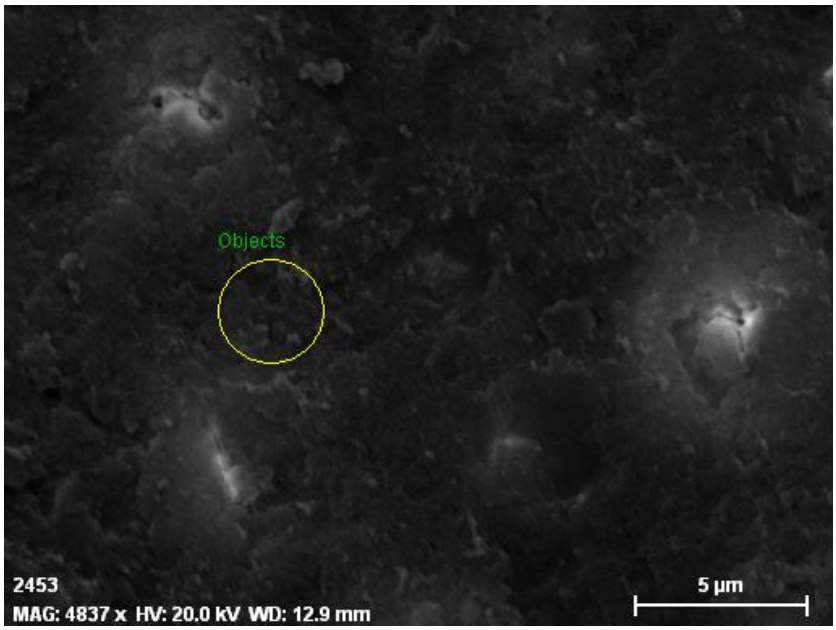
Resim 3.5.12. Steril edilen negatif kontrol grubuna ait bir dentin örneği yüzeyinin SEM görüntüleri (500x ve 5000x büyütme)

3.6. SEM-EDX Analizi Bulguları

Kontrol grubundan (distile suda bekleyen örnekler) rastgele seçilen bir örnekte yapılan SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen verileri gösteren bir grafik örneği ve görüntüsü Grafik 3.6 ve Resim 3.6'da gösterilmiştir.



Şekil 3.6. Kontrol grubundan seçilen bir dentin diski örneğine ait SEM-EDX analizi verilerini gösteren grafik



Resim 3.6. Grafik 3.6'da gösterilen değerlerin elde edildiği alanın SEM görüntüsü (×5000)

3.6.1. Kalsiyum ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen kalsiyum ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.1 ve Grafik 3.6.1'de verilmiştir. Yapılan analize göre en düşük kalsiyum değerleri kontrol grubuyla kıyaslandığında sırasıyla EDTA+NaOCl+EDTA grubu, EDTA+CHX+EDTA grubu, NaOCl+EDTA+NaOCl grubu ve OCT grubunda gözlenmiştir. Kontrol grubu ile bu gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). CHX grubu, PBS grubu, Serum fizyolojik grubu, OCT+EDTA+OCT grubu ve QMix grubunda kalsiyum miktarında azalma belirlenmiştir ancak kontrol grubu ile bu gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$). Öte yandan NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubu ve NaOCl gruplarında kalsiyum değerlerinde kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış belirlenmiştir ($p>0,05$).

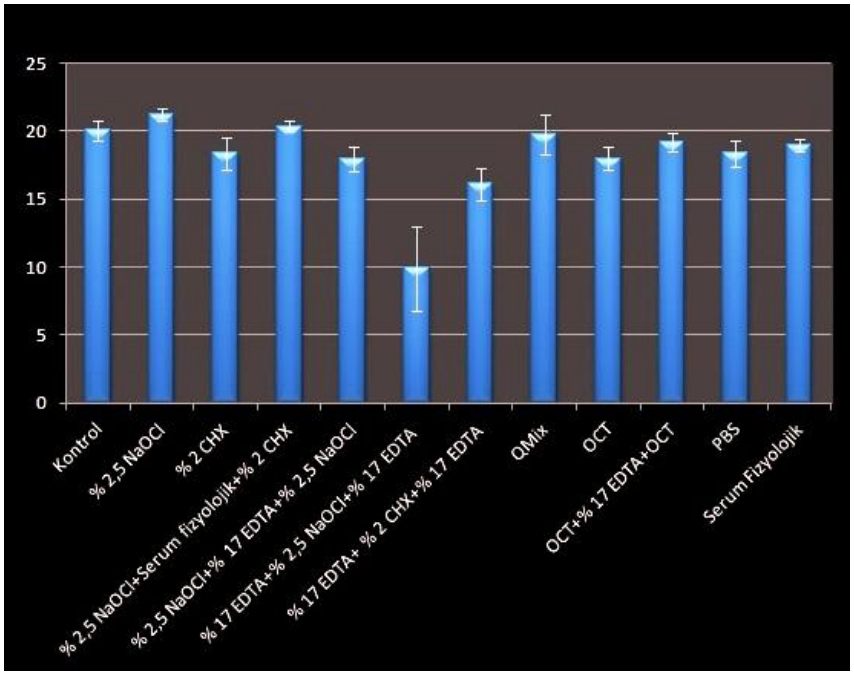
3.6.2. Fosfor ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen fosfor ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.2 ve Grafik 3.6.2'de verilmiştir. En düşük fosfor değerleri sırasıyla EDTA+NaOCl+EDTA grubu ve EDTA+CHX+EDTA grubunda gözlenmiştir. Bu gruplar ile kontrol grubu arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). NaOCl ve OCT gruplarında istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış söz konusuyken diğer tüm gruplarda yine anlamlı olmayan bir fosfor kaybı gözlenmektedir ($p>0,05$).

Çizelge 3.6.1. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen kalsiyum ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**20,066 ±0,773^{def}**
% 2,5 NaOCl	**21,231 ±0,452^{f}**
% 2 CHX	**18,368 ±1,143^{cd}**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**20,380 ±0,419^{ef}**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**17,928 ± 0,916^{bc}**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**9,926 ±3,112^{a}**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**16,100 ±1,227^{b}**
QMix	**19,763 ±1,455^{cdef}**
OCT	**18,018 ±0,800^{bc}**
OCT + %17 EDTA + OCT	**19,196±0,708^{cde}**
PBS	**18,406±0,950^{cd}**
Serum fizyolojik	**18,962±0,489^{cde}**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

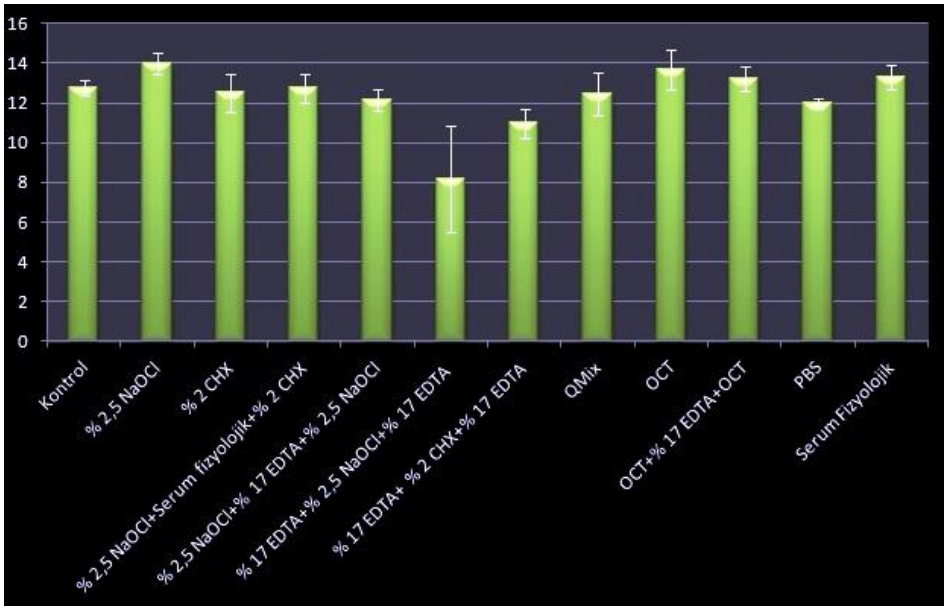


Şekil 3.6.1. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen kalsiyum ile ilgili bulguları gösteren grafik

Çizelge 3.6.2. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen fosfor ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**12,774±0,390^{cd}**
% 2,5 NaOCl	**13,980 ±0,555^{d}**
% 2 CHX	**12,507 ±0,948^{bcd}**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**12,745±0,756^{cd}**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**12,157 ± 0,559^{bc}**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**8,173 ±2,66^{a}**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**10,971±0,737^{b}**
QMix	**12,471 ±1,057^{bcd}**
OCT	**13,707 ±0,996^{d}**
OCT + %17 EDTA + OCT	**13,248±0,609^{cd}**
PBS	**11,976±0,250^{bc}**
Serum fizyolojik	**13,331±0,624^{cd}**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.6.2. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen fosfor ile ilgili bulguları gösteren grafik

3.6.3. Karbon ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen karbon ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.3 ve Grafik 3.6.3'te verilmiştir. Elde edilen verilere göre kontrol grubuyla kıyaslandığında NaOCl ile muamele edilen dentin yüzeyinde karbon miktarında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir ($p<0,05$). Öte yandan EDTA+NaOCl+EDTA grubu ve EDTA+CHX+EDTA grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir karbon artışı söz konusudur ($p<0,05$). Diğer gruplar ile kontrol grubu arasında ise karbon değerleri bakımından önemli bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$).

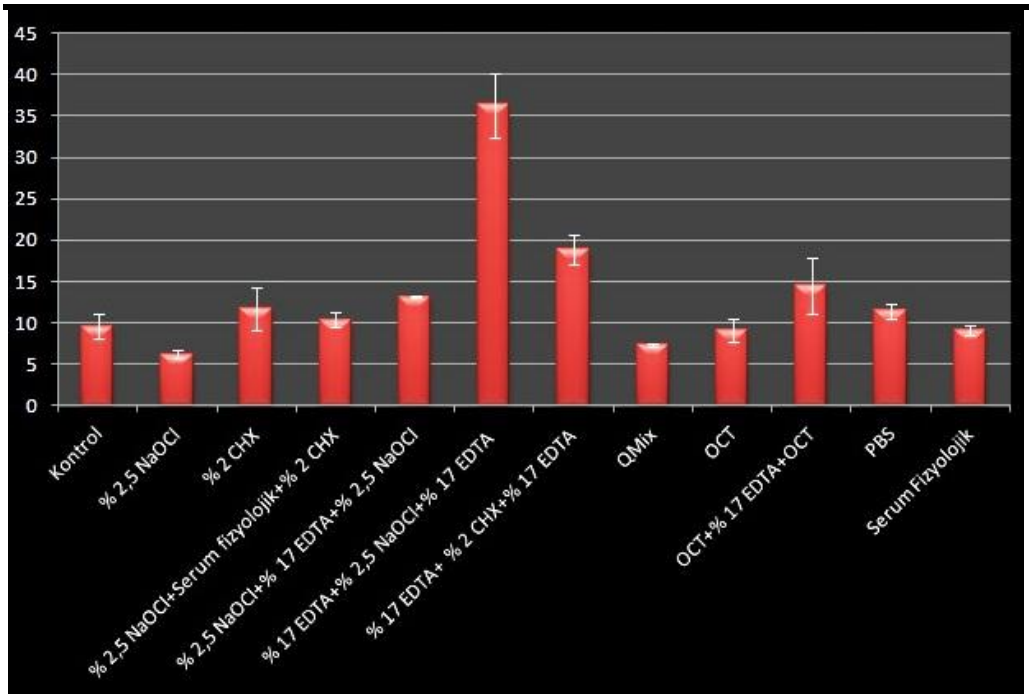
3.6.4. Sodyum ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen sodyum ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.4 ve Grafik 3.6.4'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre tüm gruplarda sodyum miktarında bir azalma söz konusudur. Yalnızca NaOCl grubu ve OCT grubundaki sodyum miktarındaki azalma kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı değildir ($p>0,05$). Ancak diğer tüm gruplardaki sodyum kaybı istatistiksel olarak anlamlı olup en düşük değerler EDTA+NaOCl+EDTA grubu ve NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda belirlenmiştir ($p<0,05$).

Çizelge 3.6.3. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen karbon ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**9,586 ±1,447[bc]**
% 2,5 NaOCl	**6,126 ±0,494[a]**
% 2 CHX	**11,671 ±2,576[cd]**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**10,385 ±0,823[cd]**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**13,138 ± 0,143[de]**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**36,327 ±3,926[e]**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**18,854 ±1,878[e]**
QMix	**7,370 ±0,180[ab]**
OCT	**9,049 ±1,433[bc]**
OCT + %17 EDTA + OCT	**14,446±3,349[de]**
PBS	**11,459±0,883[cd]**
Serum fizyolojik	**9,108±0,663[bc]**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

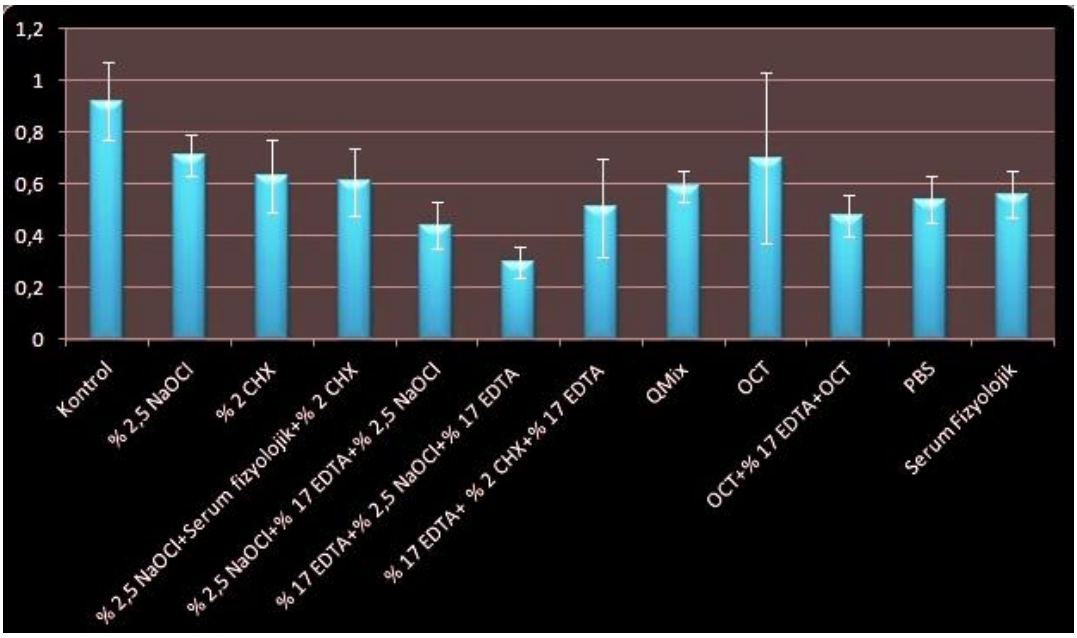


Şekil 3.6.3. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen karbon ile ilgili bulguları gösteren grafik

Çizelge 3.6.4. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen sodyum ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**0,924 ±0,152[e]**
% 2,5 NaOCl	**0,711 ±0,885[de]**
% 2 CHX	**0,632 ±0,147[bcd]**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**0,616±0,133[bcd]**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**0,444± 0,903[ab]**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**0,306 ±0,680[a]**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**0,517 ±0,197[abcd]**
QMix	**0,598 ±0,687[bcd]**
OCT	**0,706 ±0,335[cde]**
OCT + %17 EDTA + OCT	**0,486±0,826[abc]**
PBS	**0,549±0,908[bcd]**
Serum fizyolojik	**0,568±0,988[bcd]**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).



Şekil 3.6.4. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen sodyum ile ilgili bulguları gösteren grafik

3.6.5. Oksijen ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen oksijen ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.5 ve Grafik 3.6.5'te verilmiştir. Elde edilen bulgulara göre tüm gruplarda oksijen miktarında bir azalma söz konusudur. En düşük oksijen değerleri sırasıyla EDTA+NaOCl+EDTA grubu, EDTA+CHX+EDTA grubu, OCT+EDTA+OCT grubu ve NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda gözlenmiştir ($p<0,05$). Diğer gruplarda gözlenen oksijen kaybı ise kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

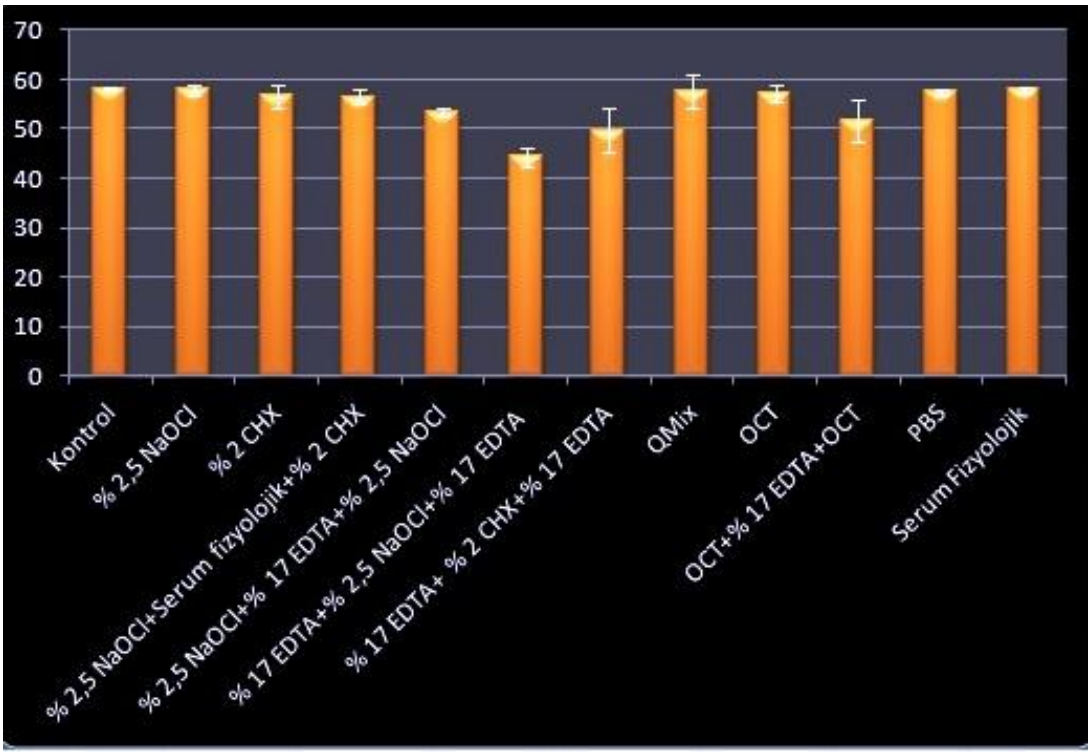
3.6.6. Magnezyum ile İlgili Bulgular

SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen magnezyum ile ilgili bulgular Çizelge 3.6.6 ve Grafik 3.6.6'da verilmiştir. Hiçbir deney grubunun dentin yüzeyindeki magnezyum değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılığa yol açmadığı gözlenmiştir ($p>0,05$).

Çizelge 3.6.5. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen oksijen ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**58,188 ±0,241[e]**
% 2,5 NaOCl	**57,953±1,040[e]**
% 2 CHX	**56,733 ±2,367[de]**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**56,467±1,543[de]**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**53,306± 0,793[cd]**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**44,278±1,860[a]**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**49,745 ±4,385[b]**
QMix	**57,570 ±3,314[e]**
OCT	**56,992 ±1,712[e]**
OCT + %17 EDTA + OCT	**51,658±4,397[bc]**
PBS	**57,478±0,675[e]**
Serum fizyolojik	**57,879±0,740[e]**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır ($p<0,05$).

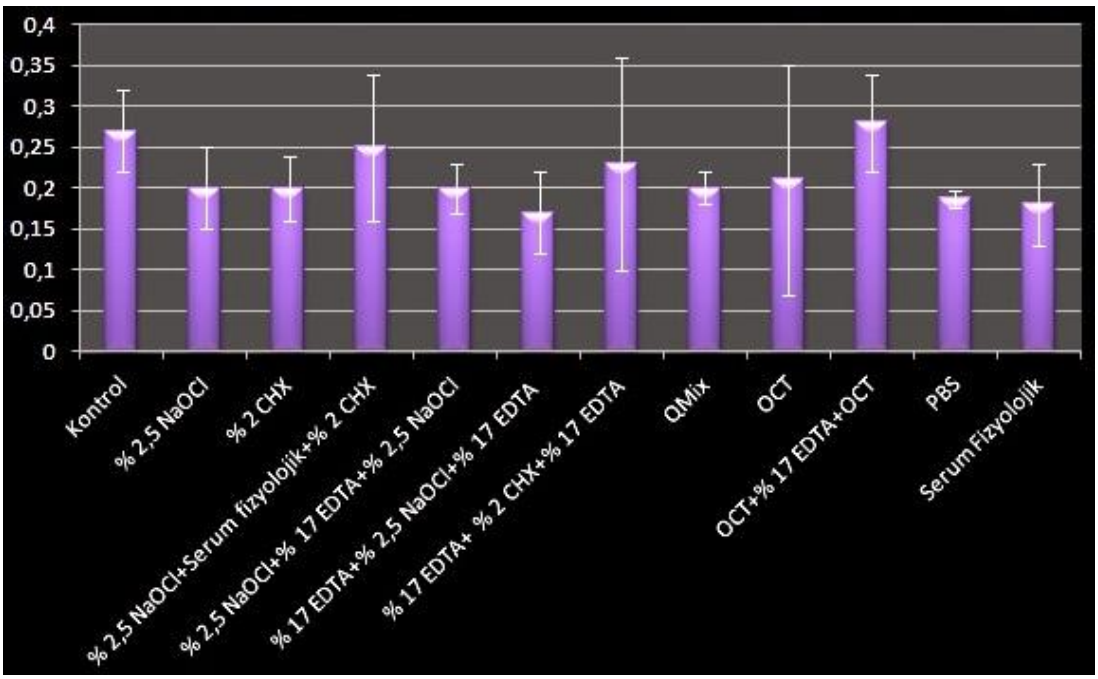


Şekil 3.6.5. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen oksijen ile ilgili bulguları gösteren grafik

Çizelge 3.6.6. SEM-EDX analizi sonucunda elde edilen magnezyum ile ilgili bulgular

Test Grupları	Ortalama ± Standart Sapma
Kontrol	**0,272 ±0,502[a]**
% 2,5 NaOCl	**0,202 ±0,500[a]**
% 2 CHX	**0,209 ±0,486[a]**
% 2,5 NaOCl + Serum fizyolojik + % 2 CHX	**0,256±0,78[a]**
% 2,5 NaOCl + %17 EDTA + % 2,5 NaOCl	**0,207± 0,323[a]**
%17 EDTA + % 2,5 NaOCl + %17 EDTA	**0,178 ±0,594[a]**
%17 EDTA + % 2 CHX + %17 EDTA	**0,238 ±0,137[a]**
QMix	**0,203 ±0,298[a]**
OCT	**0,214 ±0,140[a]**
OCT + %17 EDTA + OCT	**0,286±0,646[a]**
PBS	**0,187±0,639[a]**
Serum fizyolojik	**0,188±0,516[a]**

NOT: Farklı harf taşıyan gruplar arasındaki fark anlamlıdır (p<0,05).



Şekil 3.6.6. SEM-EDX Analizi sonucunda elde edilen magnezyum ile ilgili bulguları gösteren grafik

4. TARTIŞMA

Günümüzde ağız boşluğunun enterokokların yerleşip çoğalmaları ve yaşamlarını sürdürebilmeleri için uygun bir ortam olmadığı ancak bu bakterilerin yiyecek yoluyla veya endodontik tedavi esnasında yapılan işlemler nedeniyle ağız boşluğuna girebildiği düşünülmektedir (Razavi ve ark 2007). Dentin çürüklerinin oluşumunda rol almadığı ileri sürülen enterokoklar ayrıca nekrotik ve kanal tedavisi yapılmamış dişlerde de mikrobiyal flora içinde baskın değildir (Sundqvist ve ark 1998, Zehnder ve Guggenheim 2009). Ancak başarısız kök kanal tedavili dişlerden sıklıkla bu bakterinin izole ediliyor oluşu (Molander ve ark 1998) kanal tedavisi sonrası kök kanallarının bu bakteriler için uygun bir yaşam alanı haline nasıl dönüştüğü sorusunu akla getirmektedir. Kanal tedavisi uygulanırken kullanılan materyallerin dentinde meydana getirdiği bir takım değişiklikler bu bakterilerin kök kanalı dentinine bağlanmasını cazip kılıyor olabilir (Stuart ve ark 2006, Zehnder ve Guggenheim 2009). Bu nedenle çalışmamızda endodontik tedavide kullanılan irrigasyon solüsyonlarının dentin yüzeyinde ve mineral yapısında yol açtığı değişiklikleri ve bu değişiklikler ile *E. faecalis*'in dentin yüzeyine gerçekleştirdiği adezyon arasındaki ilişkinin değerlendirilmesini amaçladık.

Endodonti alanında yapılan mikrobiyolojik çalışmaların büyük çoğunluğu filtre kağıtları üzerinde ya da kliniği daha iyi yansıtabilmesi amacıyla çekilmiş dişlerin kök kanallarında deneysel olarak gerçekleştirilen enfeksiyon sonrasında bakterilerin ortadan kaldırılmasına yöneliktir (Byström ve Sundqvist 1983, Haapasalo ve Ørstravik 1987, Heling ve Chandler 1998, Gulabivala ve ark 2004, Garcez ve ark 2007, Giardino ve ark 2007, Brandle ve ark 2008, Bryce ve ark 2009, Lucena ve ark 2013). Araştırmacıları bu duruma yönelten başlıca sebep ise antimikrobiyal ajanlara oldukça dirençli olan *E. faecalis*'in bir kez yerleştiği kök kanallarında kök kanal tedavisi yenilense dahi başarı oranının oldukça düşük oluşudur (Sundqvist ve ark 1998). Kısacası *E. faecalis*'in kök kanallarında hangi mekanizmaları kullanarak enfeksiyona sebep olduğunun araştırılmasındansa kök kanalında deneysel olarak oluşturulan enfeksiyonla nasıl mücadele edilebileceği üzerinde durulmaktadır. Çalışmamızda ise *E. faecalis*'in dentin yüzeyine bağlanmasında etkisi olabileceği düşünülen jelatinaz enziminin dentin yüzeyine

adezyondaki ilişkisine ve endodontide kullanılan irrigasyon solüsyonlarının adezyon sürecine olumlu veya olumsuz katkısına cevap arandı.

Yapılan *in vitro* bakteri adezyonu çalışmalarında nadiren sığır dişi kullanılırken (Haapasalo ve Orstravik 1987, Heling ve Chandler 1998, Yang ve ark 2006, Brandle ve ark 2008) daha çok çekilmiş insan dişi tercih edilmektedir. (Hubble ve ark 2003, Gulabivala ve ark 2004, Sedgley ve ark 2005, Kowalski ve ark 2006, Yang ve ark 2006, George ve Kishen 2007, Sedgley 2007, Garcez ve ark 2007, Brandle ve ark 2008, Chivatxaranukul ve ark 2008, Kishen ve ark 2008, Jaramillo ve ark 2012, Li ve ark 2012, Lucena ve ark 2013). Çalışmamızda klinik koşulları daha iyi yansıtabilmek ve çalışmanın güvenilirliğini artırabilmek amacıyla insan dişleri kullanılmıştır.

Çekilmiş insan dişleri kullanılarak yapılan *in vitro* çalışmalarda en sık karşılaşılan güçlüklerden biri örneklerin standardizasyonunu sağlamaktır. Nitekim dişlerin fizyolojik yaşı, anatomik varyasyonlar, çekim sonrası geçen süre ve dişlerin bekletilme ortamı gibi değişen çok sayıda faktör örneklerin tümüyle standart olmasına engel olabilmektedir. Araştırmacılar artan yaşla birlikte dentinin mineral içeriğinde gerçekleşen artışın dentin tübüllerinin giderek daralmasına ve hatta tamamen tıkanmasına yol açtığını ileri sürmüşlerdir (Love ve Jenkinson 2002). Ayrıca dentin tübül miktarının artan yaşa bağlı olarak apikal bölgeye gidildikçe azaldığı belirtilmiştir (Carrigan ve ark 1984).

Çalışmamızda artan yaş veya fizyolojik kuvvetler sonucu dentinin mineral ve kollajen yapısındaki değişimler gibi standardizasyonu bozabilecek faktörleri sınırlandırmak ve böylelikle daha doğru bir değerlendirme yapabilmek için herhangi bir okluzal kuvvete henüz maruz kalmamış, gömülü yirmi yaş dişleri kullanılmıştır. Dişlerden hazırlanan örneklerin çap ve yüksekliğinin standardizasyonu dijital kumpasla ölçülmüş ve yüzeylerin eşit pürüzlülüğünü sağlayabilmek için tüm yüzeylere standart zımpara işlemi uygulanmıştır (Şen ve ark 2003, Baca ve ark 2012). Dentin disklerinin çevresinde mine kalıntısı olmadığı stereo-mikroskop ile teyit edilmiş ve ayrıca bakteri adezyonunu etkileyebileceğinden ötürü örneklerin yüzey pürüzlülüğü bir bilgisayar programı yardımıyla taranarak elde edilen verilerle anlamlı bir farkın gözlenmediği deney öncesi belirlenmiştir. Böylece bu tür

çalışmalarda ortaya çıkabilecek örnek farklılıklarına bağlı yanlış adezyon değerlerinin alınmasının önüne geçilmeye çalışılmıştır.

Çalışmamızın limitasyonlarından biri ise hazırlanan dentin disklerinin sterilizasyonunun otoklav ile yapılmış olmasıdır. White ve ark (1994) otoklav ile steril edilen dişlerde dentinin mineral yapısında değişikliklerin söz konusu olduğunu ileri sürmüştür. Araştırmacılar gama irradyasyonu ile sterilizasyon sonrası dentin disklerini FTIR ile incelediklerinde dentinin mineral yapısında herhangi bir değişiklik gözlemlemediklerini ancak etilen oksit, kuru sıcak veya otoklav ile yapılan sterilizasyon sonrası dentinin mineral içeriğinin değiştiğini ileri sürmüşlerdir. Öte yandan Parsell ve ark (1998) bu bulguların aksine 700°C'de steril edilen dentin örnekleri ile otoklavda steril edilen örneklerin kollajen yapılarında herhangi bir fark gözlemlememişlerdir. Chivatxaranukul ve ark (2008) ise otoklav edilmiş dişlerde sterilizasyonun gama-irradyasyonu ile yapıldığı dişlere göre daha az bakteri adezyonu gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Ancak yapılan pek çok çalışma *E. faecalis*'in otoklavda steril edilen dentin örneklerine de yeterince bağlanabildiğini açıkça ortaya koymaktadır (Distel ve ark 2002, Hubble ve ark 2003, Gulabivala ve ark 2004, Sedgley ve ark 2005, George ve Kishen 2007, Sedgley 2007, Ma ve ark 2011, Jaramillo ve ark 2012, Li ve ark 2012). Yüksek ısının dentin yapısındaki matriks proteinlerini denatüre etme olasılığına rağmen çalışmamızın mikrobiyolojik açıdan güvenilirliğini artırabilmek için dentin örneklerini sterilizasyon etkinliği kanıtlanmış bir yöntem olan otoklav ile steril etmeyi tercih ettik. Ayrıca çalışmamızda otoklav ile steril edilmiş dentin yüzeyine bakterilerin yeterince adezyonda bulunabildiği alınan SEM görüntüleriyle de gösterilmiştir.

Çalışmamızda test edilen tüm gruplarda standardizasyonu sağlayabilmek ve klinik koşulları daha iyi yansıtabilmek amacıyla CHX'in bilinen rezidüel etkisine (carry-over effect) rağmen (Yang ve ark 2006) herhangi bir inaktivasyon ajanı kullanılmadı. Rezidüel etki deney esnasında test edilen medikamentlerin bakteri besiyerine taşınması veya örneklerde yüksek dozda artık halde bulunması nedeniyle bakteriyel büyümenin inhibe edilmesi anlamına gelmektedir. Bu etki özellikle yüksek dozda antibiyotiklerin kullanıldığı *in vitro* çalışmalarda gözlenmektedir (Stojicic ve ark 2012). Önceki çalışmalarda NaOCl için tavsiye edilen % 0,6 sodyum tiyosülfat, CHX için önerilen %3 Tween 80 ve %0,3 Lösitin gibi inaktivasyon

ajanlarının (Tiralı ve ark 2012) ilave antimikrobiyal etkinliklerinin olabileceği ve böylelikle araştırmanın gerçek sonuçlarını maskeleyebileceği bildirilmiştir (Arias-Moliz ve ark 2010). Ayrıca bu ajanların dentin yüzeyinde gerçekleşecek olan bakteriyel adezyonu ne yönde etkileyebileceği hakkında net bir bilgi bulunmamaktadır. Üstelik yeni bir irrigasyon solüsyonu olan QMix için literatürde herhangi bir inaktivasyon ajanından bahsedilmemektedir. Bu sebeplerden ötürü çalışmamızda dentin örneklerinin deney irrigasyon solüsyonlarına maruz bırakılmasından sonra tüm örnekler Sum ve ark (2008)'in bakteriyel adezyon çalışmasında olduğu gibi distile su ile yıkandı.

Deneyin tekrarlanabilirliği ve verilerin hızlı bir şekilde elde edilebilmesi gibi avantajlara sahip olan metabolik aktivite testlerinden kolorimetrik XTT testi esas olarak hücrelerin mitokondriyal aktivitelerinin ölçümüne dayanmaktadır (Koban ve ark 2012). Bu tekniklerde hücreler birer kolorimetrik substrat olan MTT ve XTT gibi tetrazolyum tuzları ile inkübe edilirler (Cerca ve ark 2005). Tetrazolyum tuzları hücre proliferasyonu/sitotoksisite testleri ve histokimyasal prosedürlerden bakteriyolojik değerlendirmelere kadar geniş bir alanda kullanım alanına sahiptir (Marshall ve ark 1995). Kolorimetrik ölçüm yöntemlerinden biri olan XTT mitokondriyal aktivitelerini sürdüren canlı bakteriyel hücrelerini tetrazolyum tuzlarına çevirir ve reaksiyon sonrası suda çözünebilen turuncu renkli bir formazan boyaya dönüştürür. Hızlı bir şekilde gerçekleşen bu reaksiyon sonucunda oluşan formazan ürünleri spektrofotometrik yöntemlerle ölçülür (De-Deus ve ark 2009). XTT tekniğinin hızlı bir metot oluşu sebebiyle mikrobiyolojik metotlarda sıklıkla karşılaşılan zamana bağlı hücre ölümleri önlenebilmektedir (Şen ve ark 2003).

XTT'nin etkin şekilde indirgenmesi ve doğru, pratik ve güvenilir bir değerlendirme yapabilmesi amacıyla bir elektron transfer ajanının kullanımı gerekmektedir (Koban ve ark 2012). *Candida albicans* veya gram negatif bakterilerin test edildiği mikrobiyolojik çalışmalarda elektron transfer ajanı olarak sıklıkla menadione kullanılırken (Cerca ve ark 2005, Ning ve ark 2013) gram pozitif kok bakterilerde daha çok PMS tercih edilmektedir (Koban ve ark 2012). Çalışmamızda bir gram pozitif fakültatif anaerob üyesi olan *E. faecalis*'in test edilecek olması nedeniyle XTT testinin duyarlılığını artırmak için PMS kullanımı uygun görülmüştür.

Petri koloni sayım tekniğinde karşılaşılan sorunlardan biri koloni oluşturabilme yeteneğini kaybeden canlı hücrelerin yol açtığı negatif bulgular olup XTT tekniği ile bu problemin önüne geçilebilmektedir (Xu ve ark 1982, Marshall ve ark 1995). Ayrıca bu teknikte kullanılan bakteri besiyerinin içeriği de oldukça önemli olup uygun olmayan bir besiyeri bakterilerin büyümesini engelleyerek yine negatif sonuçların elde edilmesiyle sonuçlanabilir (Ward ve ark 1990). Petri koloni sayım tekniğinde yapılan dilüsyon ve petri ekimi aşamalarında yüksek teknik hassasiyetin gerekmesi ve çok sayıda örneğin değerlendirileceği çalışmalarda pratik olmayışı gibi nedenlerle çalışmamızda petri koloni sayım tekniği yerine XTT tekniğinin kullanımı tercih edildi. Mevcut çalışmada XTT tekniğinden elde edilen bulgular alınan SEM görüntüleri ile doğrulandığından bu tekniğin *E. faecalis*'in dentine adezyonu çalışmalarında güvenilir bir şekilde kullanılabileceği savunulabilir.

Yüzeye adezyon yaparak biyofilm oluşumunu başlatan bakteriler bu yolla doku sıvılarının uzaklaştırma etkilerinden korunmakta ve ayrıca zorlu çevresel koşullara karşı direnç gösterebilmektedir (Lewis 2001, Stoodley ve ark 2002). Yüzeye gerçekleştirilen adezyonun iki farklı fazda gerçekleştiği ileri sürülmektedir. Faz 1 aşamasında mikrobiyal hücre ile yüzey arasındaki yüzeyel etkileşime bağlı olan çekim kuvveti ve/veya itici kuvvet sayesinde gerçekleşmektedir. Hücre ile yüzey arasındaki hidrofobik etkileşimler daha çok çekim kuvvetine yol açmaktayken hem hücrelerin hem de yüzeyin negatif yüklü oluşu itici kuvvetlere neden olmaktadır. Hücrenin yüzeye tutunacağı ilk aşama olan Faz 1 süreci saniyeler veya dakikalar içerisinde gerçekleşmektedir. Saatler veya günler süren Faz 2 sürecinde ise mikrobiyal hücre yüzeylerinden salgılanan adezyon molekülleri ile yüzey arasındaki etkileşim önemli rol oynamaktadır. Faz 2 etkileşimi bakteri ile yüzey arasındaki adezyonun daha sıkı olmasını sağlamaktadır (Cowan ve ark 1987, Miron ve ark 2001, Kishen ve ark 2008).

Çalışmamızda dentin yüzeyinde gözlemlediğimiz bakteri adezyonunun hem Faz 1 hem de Faz 2 sürecini içerdiğini belirtebiliriz. Çünkü saniyeler içinde gerçekleştiği belirtilen Faz 1 sürecinin ötesinde *E. faecalis*'in yüzeye adezyonu için gerçekleştirilen inkübasyon süreci çalışmamızda 48 saat olup bu sürenin Faz 2 ile sağlanan adezyon için yeterli bir süre olacağı söylenebilir.

E. faecalis'in dental yüzeye adezyonunu etkileyen faktörler arasında yüzeyin yapısı ve pürüzlülüğü, ortamdaki besin varlığı, bakteriler arası iletişimde rol alan 'quorum sensing' molekülleri, kök kanalı içindeki hidrodinamik teori ve bakterilerin sahip olduğu virülans faktörleri bulunmaktadır (Hubble ve ark 2003, Carniol ve Gilmore 2004, Sedgley 2007).

Biyofilm oluşumu sürecinde *E. faecalis*'in sahip olduğu çeşitli virülans faktörlerinden önde gelenleri sitolsin, proteolitik enzimler (serin proteaz ve jelatinaz), adezinler (Agregasyon maddesi), enterokok yüzey proteini (Esp), kollajen bağlanma proteini (Ace), ve kapsül/hücre duvarı polisakkaritleri olup (Hubble ve ark 2003, Carniol ve Gilmore 2004, Hancock ve Perego 2004, Di Rosa ve ark 2006, Wang ve ark 2011) bu faktörlerin *E. faecalis*'in dentin adezyonunu artırdığı ve zor çevresel koşullara karşı direnç gösterebilmesine yardımcı olduğu düşünülmektedir (Hubble ve ark 2003, Zoletti ve ark 2011). İnatçı bir patojen olarak kök kanallarındaki zor çevresel koşullara karşı direnç göstererek yaşamını devam ettirebilmesi *E. faecalis*'i endodontide önemli bir patojen kılmaktadır (Roças ve ark 2004, Chavez de Paz 2007). Bu açıdan *E. faecalis*'in sahip olduğu fenotip ve genotip özelliklerinin araştırılması bu bakterinin endodontik enfeksiyonlardaki rolünün anlaşılmasında önem kazanmaktadır (Zhu ve ark 2010).

Matriks metalloproteinaz (MMP) ailesinin üyelerinden biri olan ve jelatinaz olarak isimlendirilen MMP-2 ve MMP-9 enzimleri ekstrasellüler matriks yapısında bulunan y kollajen ve jelatin gibi ürünleri parçalayabilme özelliğine sahiptir. MMP'ler dokuların yeniden yapılanması, morfogenezis, yara iyileşmesi, normal gelişimsel süreç gibi fizyolojik durumlarda önemli rol oynamakla beraber romatoit/osteoartrit gibi yıkıcı eklem hastalıklarında, tümör hücresi invazyonu, metastaz ve periodontitise katkıları da söz konusudur (Ramamurthy ve ark 2002, Santos ve ark 2001, Accorsi-Mendonça ve ark 2008). Ayrıca pulpa enflamasyonunda, kronik enflamasyonda ve periodontal ve periapikal doku yıkımlarında önemli role sahip olmaları neticesinde jelatinaz enzimine olan ilgi artmıştır (Shin ve ark 2002, Accorsi-Mendonça ve ark 2008, Zehnder ve ark 2011).

Jelatinaz enziminin biyofilm oluşumuna ne tür katkılarda bulunduğu konusunda kesin bir kanı bulunmayıp bu konuyla ilgili birkaç teori mevcuttur. Bunlardan ilki, salgılanan jelatinazın kendi yapılarına parçalandığında hidrofobik parçaların ortaya çıkmasıdır (Makinen ve ark 1989). Böylelikle jelatinaz bakteri hücrelerinin yüzeyinin hidrofobisitesini artırıyor olabilir (Carniol ve Gilmore 2004). Ancak bu görüşe katılmayan Thomas ve ark (2008) çalışmalarında jelatinazın hücrelerin hidrofobisitesinde herhangi bir değişikliğe yol açmadığını ileri sürmüşlerdir.

Bir başka teori ise jelatinazın hücre duvarı otolizinlerini aktive ederek biyofilm oluşumunu başlatmasıdır. Jelatinaz üreten ve üretmeyen bakteriler arasında otoliz oranı ve eDNA salım miktarında farklılık olduğu ve bunun biyofilm sürecine katkıda bulunabileceği belirtilmiştir. Zira eDNA'nın biyofilmin matriks yapısının temel bileşenlerinden biri olduğu ve ortama eDNA'nın inhibitörü olan DNAaz I enzimi ilavesiyle biyofilm oluşumunun azaldığı söylenmektedir (Thomas ve ark 2008).

Jelatinazın biyofilm sürecindeki bir diğer katkısı ise 'fsr' sinyal transdüksiyonu ile ilişkili olabilir. Hücre içinde enzimlerin yürüttüğü biyokimyasal reaksiyonlarla gerçekleşen sinyal transdüksiyonu bir hücrenin bir tür sinyal veya uyarıyı başka bir sinyale dönüştürme sürecidir. Bakterilerde de gözlenen sinyal transdüksiyon süreçleri ile bakterinin çevresine nasıl tepki vereceği belirlenir. *E. faecalis*'in biyofilm oluşturabilme yeteneğinin 'fsr' sinyal transdüksiyonunun kontrolünde bulunan jelatinaz salımından ileri geldiği bildirilmiştir (Hancock ve Perego 2004).

Jelatinaz üretiminden sorumlu olduğu düşünülen *gelE* geni ile jelatinaz enzimi üretimi arasındaki ilişkiyi araştıran Zhu ve ark (2010) izole ettikleri farklı *E. faecalis* suşlarının hepsinde *gelE* geni bulunduğunu ancak bu türlerden hiçbirinin jelatin, kasein, insülin, fibrinojen ve küçük peptitleri parçalayabilen jelatinaz enzimini üretemediğini belirtmişlerdir. Buna sebep olarak ise *gelE* geninin varlığıyla jelatinaz enzimi üretiminin doğrudan ilişkili olmadığı ancak 'fsr' sinyal transdüksiyon sisteminin jelatinaz enzimi üretimini kontrol edebileceği düşünülmüştür (Nakayama ve ark 2002, Wang ve ark 2011). Başka bir çalışmada

kök kanal tedavisi yapılmış enfekte dişlerin kök kanallarından elde edilen 20 farklı *E. faecalis* suşunun *gelE* genini bulundurduğu ve bunların ancak yarısının jelatini parçalayabildiği bildirilmiştir (Zoletti ve ark 2011). Tüm bu sonuçlardan yola çıkarak yapısında *gelE* geni bulundursa bile *E. faecalis*'in jelatinaz üretimi yapamayabileceği söylenebilir. Bu nedenle çalışmamızda kullanılacak olan *E. faecalis* suşlarının belirlenmesi aşamasında *gelE* geninin varlığının araştırılmasından ziyade doğrudan jelatinaz üretimi yapıp yapamadığı dikkate alınmıştır.

Jelatinazın biyofilme katkısının anlaşılmasında jelatinazın parçalanmasıyla ortaya çıkan yapıların özelliklerini de göz önünde bulundurmak gerekmektedir. Örneğin jelatinaz fibrine ayrışabilmektedir ve ortamda bulunan fibrinin bakteri adezyonunu ve biyofilm oluşumunu artırıcı bir etkisi söz konusu olabilir (Waters ve ark 2003). Bunun yanı sıra kollajenin yıkımıyla ortaya çıkan ürünlerden biri olan jelatin özellikle jelatinaz enzimi üretebilen bakteriler için bir besin kaynağı olabilir ve böylelikle bakterilerin yüzeye adezyonunu artırıcı bir rol oynayabilir. Bu bakış açısıyla kök kanal tedavisi esnasında dentinin kollajen yapısına olumsuz etkilerde bulunabilecek her uygulama jelatinin ortaya çıkmasına neden olarak jelatinaz enzimi üreten bakterileri bu bölgeye çekebilir.

Çalışmamızda elde edilen bulgular sonucunda jelatinaz enzimi üretiminin *E. faecalis*'in dentin yüzeyine adezyonunda önemli olduğu ve jelatinaz üretebilen *E. faecalis* suşunun jelatinaz üretemeyen suşa göre daha fazla adezyonda bulunduğu tespit edilmiştir. Endodonti literatüründe *E. faecalis*'in jelatinaz üretimi ile dentin adezyonuna etkisini değerlendiren çalışma sayısı oldukça azdır.

Örneğin elde ettiğimiz bulgulara paralel olarak Wang ve ark (2011) enfekte kök kanallarından izole ettikleri *E. faecalis* suşlarının çoğunluğunun jelatinaz enzimi üretebildiğini ve biyofilm oluşturabildiğini ileri sürerek jelatinaz üretimi ve biyofilm oluşumu arasındaki ilişkiye dikkat çekmiştir.

Sedgley ve ark (2005) çekilmiş dişlerin kök kanallarını jelatinaz üreten ve üretmeyen iki farklı *E. faecalis* ile enfekte ettiği çalışmasında besin desteği olmadan 12 ay sonunda her iki bakteri suşunun da canlı kalabildiğini ve jelatinaz üretiminin bakteriyel canlılığın devamında çok etkili olmadığını belirtmişlerdir. Ancak aynı

araştırmacı (Sedgley 2007) yaptığı *in vitro* çalışmasında jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşunun üretmeyen suşa göre dentin tübüllerinin daha derinlerine penetre olabildiğini ve farklı patlarla doldurulmuş kök kanallarında 8 ay sonunda canlılığını sürdüren bakterilerin daha çok jelatinaz üretebilen *E. faecalis* suşları olduğunu ileri sürmüştür.

Di Rosa ve ark (2006) jelatinazın tek başına biyofilm sürecini hızlandırmadığını ancak Esp proteini ile aralarındaki sinerjistik etki sonucu enfeksiyonun ilerlediğini bildirmişlerdir. Hubble ve ark (2003) ise *E. faecalis*'in sahip olduğu virülans faktörlerinden kollajen bağlanma proteini ve serin proteazın dentin adezyonunu artırdığını ancak jelatinazın etkisinin ise belirsiz olduğunu ileri sürmüşlerdir. Araştırmacılar çalışmalarında her eğe arasında NaOCl ile irrigasyon yaparak kök kanallarını prepare etmişler ve smear tabakasını uzaklaştırmamışlardır. Bakteriler ile inkübasyon öncesinde ise dentin örneklerini PBS ile yıkamışlardır. Bu koşullarda jelatinazın öneminin ortaya konmadığının belirtildiği bu çalışmadan elde edilen bulgular aslında çalışmamızın bulgularını destekler niteliktedir. Çünkü çalışmamızın PBS grubunda jelatinaz üreten *E. faecalis* suşu jelatinaz üretemeyen *E. faecalis* suşuna kıyasla dentin yüzeyine daha fazla adezyon göstermiştir ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Endodonti literatüründe son yıllarda yapılan jelatinaz üretimi baz alınmadan *E. faecalis* ile dentin adezyonu arasındaki ilişkinin değerlendirildiği çalışmalara bakacak olduğumuzda; Jaramillo ve ark (2012) çekilmiş tek köklü insan dişlerinden elde ettikleri dentin disklerini benzalkonyum klorür, %1 NaOCl veya kontrol grubu olarak PBS ile muamele etmişler ve ardından dentin yüzeyine *E. faecalis* adezyonunu incelemişlerdir. Sonuç olarak benzalkonyum klorür ve NaOCl'nin önemli ölçüde bakteriyel adezyonu azalttığını belirtmişlerdir.

Li ve ark (2012) *E. faecalis*'in sahip olduğu ekstrasellüler dekstran ve eDNA'nın bu bakteri türünün dentin adezyonunu olumsuz etkilediğini belirtmişlerdir. Çekilmiş yirmi yaş dişlerinden elde edilen dentin yüzeylerinin dekstranaz ve DNAaz enzimleri ile muamele edilmesi bakteri adezyonunu ve biyofilm oluşumunu önemli ölçüde azaltmıştır. Ancak adezyona engel olan bu mekanizmanın nasıl gerçekleştiği konusunda kesin bir bilgi vermemişlerdir.

Kishen ve ark (2008) çekilmiş tek köklü insan dişlerinin köklerine uyguladıkları farklı irrigasyon solüsyonlarının dentinin fizikokimyasal yapısını değiştirdiğini ve *E. faecalis*'in dentine adezyonunu etkilediğini belirtmişlerdir.

Özdemir ve ark (2010) genç veya yaşlı hastalardan çekilen dişlerin kök kanallarının farklı irrigasyon solüsyonları ile yıkanması sonrası *E. faecalis*'in dentine adezyonunu değerlendirmişlerdir. Sonuç olarak yaşlı dişlerde daha fazla bakteriyel adezyonun gerçekleştiğini ileri sürmüşlerdir.

Chivatxaranukul ve ark (2008) çekilmiş insan premolar dişlerinden elde ettikleri dentin örneklerine *E. faecalis* adezyonunu değerlendirdikleri çalışmalarının sonucunda dentinin mineral yapısının adezyonda etkili olduğunu ve bakterilerin sahip olduğu virülans faktörlerinin adezyonda önemli rol oynayabileceğini rapor etmişlerdir.

George ve Kishen (2007) insan dişlerinden elde ettikleri dentin örneklerinin farklı doku sıvılarıyla muamele edilmesinin ardından *E. faecalis*'in dentin adezyonu ve hidrofobisitesini araştırmışlardır. Elde ettikleri bulgulara göre dentin yüzeyi tükürükle kaplandığında ve ortamda besin yokluğunda *E. faecalis*'in dentin adezyonunun önemli derecede artış gösterdiğini bildirmişlerdir.

Yang ve ark (2006) CHX ile irrigasyonun ve smear tabakasının *E. faecalis*'in adezyonuna olan etkisini sığır dişleri kullanarak SEM görüntüleriyle değerlendirmişlerdir. Smear tabakasının adezyonu artırdığını CHX'in ise adezyonu azalttığını belirtmişlerdir.

Sum ve ark (2008) kök kanal tedavisinde sıklıkla kullanılan kimyasalların tip I kollajende meydana getirdiği değişiklikler ile *E. faecalis*'in adezyonu arasındaki ilişkiyi incelemişler ve kalsiyum hidroksitin *E. faecalis*'in dentin yapısındaki tip 1 kollajene adezyonunda artışa neden olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Çalışmamız bulgularına göre *E. faecalis*'in jelatinaz üreten ve üretmeyen her iki suşu da tüm deney grupları içersinde %2,5 NaOCl ile muamele edilen dentine en yüksek adezyon değerlerini gösterdi. Ancak iki bakteri suşu kıyaslanacak olduğunda

dentin yüzeyinde bulunan jelatinaz üreten *E. faecalis*'in OD değerinin üretemeyen suşun OD değerine göre yaklaşık iki katından daha fazla olduğu bulundu. Bu durumda NaOCl ile muamele edilen dentine *E. faecalis*'in adezyonunda jelatinaz enziminin önemli bir etkisinin olduğu söylenebilir. Dentin organik kısmının büyük çoğunluğunu oluşturan tip I kollajenin yapısındaki peptit zincirleri NaOCl tarafından geri dönüşümsüz bir şekilde hasara uğratılmakta ve tip I kollajenin hasarıyla jelatin ortaya çıkmaktadır (Currey ve ark 2004, Sim ve ark 2001, Marending ve ark 2007). Okada ve Ikada 1992) Çalışmamızda jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşunun jelatinaz üretemeyen suşa göre özellikle NaOCl ile muamele edilmiş dentine çok daha fazla adezyonda bulunmasının nedeni kollajen hasarıyla ortaya çıkan jelatin olabilir. Elde edilen bu bulgu kollajen yapısındaki jelatinin jelatinaz enzimi üreten bakteriler için bir besin kaynağı olabileceği fikrini güçlendirmektedir.

Kishen ve ark (2008) çalışmamız bulgularına paralel olarak NaOCl uygulanmış dentin yüzeylerinde *E. faecalis*'in artmış adezyonundan bahsetmektedir. Öte yandan Jaramillo ve ark (2012) çalışma bulgularımızdan farklı olarak %1 NaOCl'nin dentin yüzeyine bakteri adezyonunu azalttığını ileri sürmüşlerdir. Çalışmalarında test ettikleri NaOCl solüsyonunun daha düşük konsantrasyonda oluşu, NaOCl'nin dentinle 1 saat süre gibi daha fazla muamele edilmesi, dentin yüzeyine NaOCl uygulaması sonrası rezidüel etkinin azaltılması için herhangi bir nötralizasyon ajanı kullanılmaması ve ayrıca farklı *E. faecalis* suşları kullanımının iki çalışma arasındaki farklı bulguların nedenleri olarak düşünülebilir.

Dentinin kalsiyum hidroksit gibi alkalen maddelere maruz bırakılması sonrası kollajen pH'sının yükseldiği ve hafif pH değişimlerinin bile *E. faecalis*'in dentin kollajenine adezyonda artışa neden olduğu ileri sürülmüştür (Kayaoğlu ve ark 2005). Çalışmamızda her iki *E. faecalis* suşunun NaOCl ile muamele edilen dentin örneklerine en yüksek adezyon değerlerine ulaşmasının bir nedeni alkalen yapıya sahip NaOCl'nin dentin pH'sını yükseltmesi olabilir.

NaOCl grubunda gözlenen yüksek adezyonun bir başka sebebi ise NaOCl ile irrigasyon sonrası dentin örneğinden salınan kalsiyum iyonu ile ilişkili olabilir. Çalışmamızda SEM-EDX analizi sonucunda en fazla kalsiyum iyonunun %2,5 NaOCl ile muamele edilen dentin yüzeyinde olduğu gözlenmiştir ve yapılan bir

çalışmada kalsiyumun streptokoklar arasında metalik iyon köprüleri oluşumuna ve biyofilm gelişimine yardımcı olduğu belirtilmiştir (Rose 2000).

Çalışma sonuçlarına göre CHX grubu, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubu ve EDTA+CHX+EDTA gruplarında her iki bakteri suşunun da dentin yüzeyine minimum adezyon gerçekleştirdiği ve gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı şeklindedir. Bu üç grupta jelatinaz üreten *E. faecalis* suşunun dentine yaptığı bakteriyel adezyonun üretemeyen suşa göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da daha yüksek olduğu bulunmuştur.

Literatürde CHX'in *E. faecalis*'in dentine adezyonunu engellediğini belirten birçok çalışma mevcuttur (Yang ark 2006, Sum ve ark 2008, Kishen ve ark 2008, Mohammadi ve Abbott 2009, Baca ve ark 2012). Çalışmamız bulgularına benzer şekilde Sum ve ark (2008) NaOCl ile kıyaslandığında CHX ile muamele edilen örneklere *E. faecalis*'in daha az adezyonda bulunduğunu rapor etmişlerdir. Yine benzer şekilde Kishen ve ark (2008) CHX'in bakteri adezyonunu EDTA ve NaOCl ile kıyasladıklarında önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir.

CHX gruplarında gözlediğimiz düşük OD değerlerinin bir sebebi CHX'in 48-72 saat süreyle devam ettirebildiği rezidüel etkisinin deney süresince devam ederek bakteri adezyonunu engellemesi olabilir (Yang ve ark 2006). Dentin örnekleri yerine doğrudan hidroksiapatit üzerine uygulanan düşük konsantrasyonlu CHX solüsyonu sonrası *E. faecalis*'in adezyonunun 6 gün boyunca engellenebildiği belirtilmiştir (de Souza ve ark 2011).

CHX'in *E. faecalis*'in dentin adezyonunu engellediğini bildiren Baca ve ark (2012) %2,5 NaOCl + %2 CHX kombinasyonu veya %17 EDTA + %2 CHX kombinasyonu ile irrige edilen dentin yüzeylerine bakteriyel adezyonun kaç gün süreyle engellenebildiğini araştırmışlardır. Jelatinaz enzimi üretmediği bilinen ATCC 29212 *E. faecalis* suşunu kullandıkları çalışmalarında kollajenin uzaklaştırıldığı %2,5 NaOCl + %2 CHX grubunda ortalama 49 gün boyunca; kollajenin uzaklaştırılmadığı %17 EDTA + %2 CHX grubunda ise ortalama 58 gün boyunca bakteriyel adezyonunun gözlenmediğini bildirmişlerdir. Araştırmacılar gruplar

arasında gözlenen bu farkın sebebi olarak CHX'in dentin yüzeyindeki kollajene bağlanarak daha uzun süre rezidüel etki gösterebilmesi şeklinde düşünmüştür.

Çalışmamızda ise kollajenin uzaklaştırılmadığını düşündüğümüz EDTA+CHX+EDTA grubu ile kollajenin uzaklaştırıldığını düşündüğümüz NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grubu arasında her iki bakteri türünün de dentine gerçekleştirdiği adezyon açısından önemli bir fark gözlenmemiştir. Üstelik Baca ve ark'ın (2012) çalışmasında uzun bir süre hiç gözlemedikleri bakteriyel adezyonun aksine çalışmamızda 48 saatin sonunda düşük miktarda da olsa dentin yüzeyinde bakteriyel adezyonun gerçekleştiği hem spektrofotometrik analizle hem de alınan SEM görüntüleriyle ortaya konmuştur. Elde edilen farklı bulgular çalışmalarda kullanılan *E. faecalis* suşlarının, bakteri besiyerlerinin ve dentin örneklerinin enfeksiyonu süresince kullanılan bakteri süspansiyonu hacminin farklılığından kaynaklanıyor olabilir. Her ne kadar kollajenin bırakılması CHX'in uzun süre etki göstermesi açısından bir avantaj gibi görünse de CHX'in etkisini kaybettiğinde dentin yüzeyindeki kollajenin bakterilerin yüzeye adezyonunu artırıcı bir neden olabileceği unutulmamalıdır. Çalışmamızda final irrigasyon solüsyonu olarak CHX'in kullanıldığı gruplardan hangisinin bakteriyel adezyonu daha uzun süre engelleyebildiğini ve jelatinaz enzimi üreten ve üretemeyen *E. faecalis* suşlarından hangisinin daha önce adezyon gerçekleştirebildiğini anlayabilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Kim ve ark (2012) dentinin demineralizasyonuyla açığa çıkan proteaz ve MMP enzim sistemi aktivasyonunun CHX ile durdurulabildiğini belirtmişlerdir. Yine benzer şekilde Gendron ve ark (1999) konak tarafından salgılanan ve periodontitis oluşumuna katkı sağlayan MMP-2 ve MMP-9 (jelatinaz) enzim aktivitesinin CHX kullanımıyla doğrudan inhibe edildiğini bildirmiştir. Bu nedenle çalışmamızda bakterilerin jelatinaz aktivitesinin CHX tarafından önlenmesi ile bakteriyel adezyonunun önüne geçilmiş olabilir.

Çalışmamızdan elde edilen bulgulara göre NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda kontrol grubu olan serum fizyolojik grubuna göre her iki bakteri suşu da anlamlı derecede daha yüksek bakteriyel adezyon gerçekleştirmiştir. Ancak gerçekleşen bu adezyon miktarı NaOCl grubu ve EDTA+NaOCl+EDTA grubunda gözlenen

bakteriyel adezyon kadar yüksek bulunmamıştır. NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşu jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşundan istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla bakteriyel adezyonda bulunmuştur.

Mevcut çalışmaya göre her iki bakteri suşu için EDTA+NaOCl+EDTA grubu NaOCl grubunda olduğu gibi oldukça yüksek adezyon değerleri göstermiş olup aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. Ayrıca NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda olduğu gibi jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşu jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşundan istatistiksel olarak anlamlı derecede dentine daha fazla adezyonda bulunmuştur.

Bulduğumuz sonuçlarla uyumlu olarak Kishen ve ark (2008) son yıkamanın EDTA ile yapıldığı gruplarda son yıkamanın NaOCl ile yapıldığı gruplara göre daha fazla bakteri adezyonu tespit etmişlerdir. Çalışmalarında dentin yüzeyi ile yüzeye tutunan bakteri arasındaki adezyon kuvvetini atomik kuvvet mikroskobu ile incelemişler ve son yıkamanın EDTA ile yapıldığı gruplarda demineralize dentin yüzeyi ile *E. faecalis* arasında diğer gruplara göre daha güçlü adezyon kuvvetinin bulunduğunu bildirmişlerdir. Son yıkamanın NaOCl ile bitirildiği gruplarda daha düşük adezyon kuvvetinin bulunmasına sebep olarak NaOCl'nin yalnızca deproteinizasyon etkisinin bulunması ve yalnızca organik kısmın uzaklaştırabilmesi ileri sürülmüştür.

Geçmişte yapılan çalışmalar smear tabakasının çıkarılması için final irrigasyon solüsyonu olarak EDTA'nın kullanımının kollajen ve organik dokuları açığa çıkardığını ve ortamdan uzaklaştırılamadığını kanıtlamıştır (Goldman ve ark 1982, Niu ve ark 2002, Sum ve ark 2008, Kishen ve ark 2008). *E. faecalis*'in açığa çıkan kollajenlere duyarlı oluşu (Love 2001, Hubble ve ark 2003, Kayaoğlu ve ark 2009) EDTA'nın final irrigasyon solüsyonu olarak kullanıldığı EDTA+NaOCl+EDTA grubunda gözlenen artmış bakteriyel adezyonu açıklayabilir.

NaOCl'nin final irrigasyon solüsyonu olarak kullanıldığı NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda ise EDTA ile irrigasyon sonrası açığa çıkan kollajenin NaOCl ile tekrar ortamdan uzaklaştırılması (Kishen ve ark 2008) bu

grupta gözlenen bakteriyel adezyonun EDTA+NaOCl+EDTA grubuna kıyasla daha düşük gerçekleşmesinin sebebi olabilir.

Çalışmamızda QMix grubunda irrigasyon protokolü üretici firmanın tavsiyesi üzerine uygulanmıştır. Bu protokole göre başlangıçta %5,25 NaOCl ile irrigasyon ardından serum fizyolojik ve son olarak QMix ile final irrigasyon yapılması tavsiye edilmektedir. Yine üretici firmanın ısrarlı tavsiyelerine uyarak dentin örneklerini QMix solüsyonu ile 90 sn muamele ettik. Ancak %5,25 NaOCl ve serum fizyolojik irrigasyonunun süresi belirtilmemiştir. Diğer gruplarla standardizasyonu sağlayabilmek için dentin örneklerini bu iki irrigasyon solüsyonunda 5'er dakika bekletmeyi uygun gördük.

QMix ile ilgili çalışma sayısı oldukça az olup genellikle bu solüsyonun antimikrobiyal etkinliği ve smear tabakasını uzaklaştırma yeteneği üzerinde durulmuştur (Dai ve ark 2011, Ma ve ark 2011, Stojicic ve ark 2012, Wang ve ark 2012, Aranda-Garcia ve ark 2013, Ordinola-Zapata ve ark 2013). Literatürde şimdiye kadar QMix solüsyonunun bakteriyel adezyona etkisini ve dentinin mineral içeriğindeki değişimini araştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Bu çalışma bulgularına göre jelatinaz enzimi üretebilen ve üretemeyen *E. faecalis* suşlarının QMix solüsyonu ile muamele edilen dentine göstermiş olduğu adezyon ile kontrol grubu olan serum fizyolojik grubunda gösterdiği adezyon değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak benzerlik göstermektedir. Her iki suşun bakteriyel adezyonunun önlenmesinde ise EDTA+CHX+EDTA grubu kadar başarılı bulunmamış ve aralarındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu belirlenmiştir. Bu fark QMix solüsyonu içindeki EDTA ve CHX'in konsantrasyonları, pH'ları, oranları ve ayrıca içeriğindeki deterjandan kaynaklanıyor olabilir.

Endodonti literatüründe OCT'in antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirildiği çok az çalışma bulunmakla beraber (Tandjung ve ark 2007, Tiralı ve ark 2009, Tiralı ve ark 2010, Tiralı ve ark 2012, de Lucena ve ark 2013) bildiğimiz kadarıyla OCT'in dentin yüzeyinde gerçekleşen bakteriyel adezyona etkisini araştıran bir çalışma henüz yoktur.

Düşük konsantrasyonlu OCT'in antibakteriyel etkinliğinin CHX'ten daha üstün olduğu ve bakterilere karşı oldukça hızlı etki gösterebildiği ileri sürülmüştür (Sedlock ve Bailey 1985). Yine bir başka çalışmada OCT'in planktonik veya biyofilm yapısındaki bakterileri CHX'ten daha etkili bir şekilde ortadan kaldırdığı belirtilmiştir (Decker ve ark 2003). Üstelik Zehnder ve Paque (2011) endodontide ileride CHX'in alternatifi olarak OCT'in kullanım alanı kazanabileceğini bildirmişlerdir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz bulgulara göre jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşu OCT ile muamale edilen dentin yüzeyine NaOCl, NaOCl+EDTA+NaOCl ve EDTA+NaOCl+EDTA gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede daha az adezyonda bulunmuştur. Ancak CHX, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX ve EDTA+CHX+EDTA grupları ile kıyaslandığında OCT grubunda istatistiksel olarak anlamlı derecede daha fazla bakteriyel adezyonun gerçekleştiği tespit edilmiştir. OCT+EDTA+OCT grubu ise bakteriyel adezyonun önlenmesinde OCT grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha etkili bulunmuştur.

Öte yandan jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşu OCT ve OCT+EDTA+OCT grupları ile muamele edilen dentin yüzeyine CHX, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX ve EDTA+CHX+EDTA grupları ile istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmayacak şekilde minimum adezyon gerçekleştirmiştir.

Endodontide OCT'in bakteriyel adezyonu ne ölçüde engelleyebildiği ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Ancak Decker ve ark (2003) plak oluşumunun önlenmesinde OCT'in CHX'ten daha başarılı olduğunu ileri sürmüşlerdir. Kısacası OCT'in antimikrobiyal substantivitesi hakkında kesin bir bilgi bulunmamakla beraber OCT'in bakteriyel adezyonu önlemesinde hangi mekanizmaların rol oynadığını netleştirebilmek için ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

PBS; sodyum klorit, sodyum fosfat ve potasyum fosfat içerikli olup hücre içi ve dışındaki osmotik basıncı dengede tutan bir tuz solüsyonudur. İzotonik bir solüsyon olması ve canlı hücrelere herhangi bir toksik etkisinin bulunmaması nedeniyle hücre kültürü ve mikrobiyoloji çalışmalarında geniş kullanım alanına sahiptir. Doku sıvılarına oldukça benzer özellikler göstermesinden ötürü (Sarkar ve

ark 2005) *in vivo* koşulların sağlanması amacıyla çalışmamızın çeşitli aşamalarında dentin örnekleri PBS ile muamele edilmiştir. Bu sebeple her ne kadar PBS endodontide kullanılan bir irrigasyon solüsyonu olmasa da çalışmamızda deney gruplarına bu solüsyonun da ilave edilmesi uygun görüldü. Böylece deney aşamasında PBS'in dentine olası etkilerini ve neticede yol açabileceği bakteriyel adezyondaki değişiklikleri değerlendirmiş olduk.

George ve Kishen (2007) yapmış oldukları çalışmada PBS ile muamele edilen dentin örneklerinin serum fizyolojik ile muamele edilen dentin örneklerine göre daha yüksek hidrofobisiteye sahip olduğunu ancak beklenenin aksine PBS grubunda serum grubuna göre daha az *E. faecalis* adezyonu gerçekleştiğini belirtmişlerdir. Çalışmamızda ise PBS ile muamele edilen dentin örneklerinde serum fizyolojik ile muamele edilen dentin örneklerine göre daha fazla bakteriyel adezyon gerçekleşmiştir. Ancak aradaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Çalışmamızda serum fizyolojik kontrol grubu olarak ele alınmıştır. Zira standart ve nötral bir solüsyon olan serum fizyolojiğin dentin yapısına etkisinin oldukça az olduğu bilinmektedir (Waters 1980). Serum fizyolojiğin dentin yüzeyinde bakteriyel adezyona olan etkisi değerlendirildiğinde yapısal olarak benzer olan PBS solüsyonundan elde edilen bulgular ile paralellik gösterdiği bulunmuştur. Üstelik *E. faecalis*'in ürettiği jelatinaz enziminin serum fizyolojik ile muamele edilen dentin yüzeyinde gözlenen bakteriyel adezyona herhangi bir etkisinin bulunmadığı tespit edilmiştir.

Baumgartner ve Mader (1987) güçlü bir organik doku eritici olan NaOCl'nin kanal preparasyonu esnasında ortaya çıkan debrisi temizlemesine rağmen, enstrümantasyon sonrası kanal duvarlarında oluşan smear tabakasını ortadan kaldıramadığını belirtmiştir. Garberoglia ve Becce (1994) SEM ile elde ettikleri görüntülerde smear tabakası oluşturulmuş kök kanallarının %5 NaOCl solüsyonu ile irrigasyonuna rağmen dentin tübül ağızlarının tümüyle debrisle kaplı olduğunu bildirmişlerdir. Daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına benzer şekilde çalışmamızda da NaOCl tek başına smear tabakasını uzaklaştıramamıştır (Niu ve ark 2002, Tay ve ark 2007).

Çalışmamızda elde ettiğimiz SEM görüntülerine göre NaOCl+EDTA+NaOCl grubunda smear tabakası tümüyle ortadan kaldırılamamıştır. Buna sebep olarak çalışmamızda kullanılan dişlerin sklerotik dentin oluşumuna maruz kalmayan gömülü yirmi yaş dişlerinin kullanımının olacağı ileri sürülebilir. Özdemir ve ark (2012) yaptıkları çalışmada yaşla beraber kollajenden yoksun ve mineralden zengin yapıdaki sklerotik dentinin şelasyon ajanlarından daha fazla etkilendiğini ortaya koymuşlardır. Bulgularımıza benzer şekilde EDTA ile yapılan irrigasyon sonrası smear tabakasının tümüyle uzaklaştırılamadığını ve dentin tübül ağızlarının kısmen smear tabakası ile kaplı olduğunu bildirmişlerdir.

Çalışmamızda final irrigasyon solüsyonu olarak EDTA'nın kullanıldığı EDTA+NaOCl+EDTA grubunda smear tabakasının tümüyle uzaklaştırılmasının yanı sıra dentinde şiddetli erozyon gözlenmiştir. Bu grupta gözlenen şiddetli erozyonun sebebi ise şu şekilde açıklanabilir. EDTA'nın tek başına kullanımında dentin yüzeyinde biriken organik matriks EDTA'nın inorganik çözücü etkinliğini kısıtlamaktadır. Ancak EDTA'nın ardından uygulanan NaOCl yüzeydeki organik kısmın uzaklaştırılmasını sağlayarak inorganik kısmın açığa çıkmasını sağlamaktadır. Final irrigasyon solüsyonu olarak uygulanan EDTA yüzeyden inorganik kısmın da uzaklaştırılmasına neden olmakta ve böylece yüzeyde şiddetli erozyon gözlenebilmektedir (Doğan ve Çalt 2001, Niu ve ark 2002). Yine çalışmamızın bulgularına benzer şekilde Tay ve ark (2007) EDTA+NaOCl veya NaOCl+EDTA kullanımında smear tabakasının uzaklaştırıldığını ve ayrıca dentinde erozyon bulguları olduğunu belirtmişlerdir.

CHX'in smear tabakası ve debrisi uzaklaştırma etkinliğinin %5,25 NaOCl ve serum fizyolojik solüsyonlarından daha yüksek ancak %17 EDTA'dan oldukça zayıf olduğu ileri sürülmüştür (Gürbüz ve ark 2008). Klorheksidinin %2 jel formunun %17 EDTA ile kombine kullanımının smear tabakasına olan etkisini araştıran Carvalho ve ark (2008) bu kombinasyonun %2,5 NaOCl ve %17 EDTA kombinasyonu kadar başarılı olmadığını rapor etmişlerdir. Karunakaran ve ark (2012) %2 CHX irrigasyonu sonrasında dentin yüzeyinde düzensiz şekil ve boyutlarda smear tabakası ve debrisin bulunduğunu ve dentin tübül ağızlarının görünmediğini bildirmişlerdir. Çalışmamızda da benzer şekilde CHX ve NaOCl+Serum fizyolojik+CHX gruplarında smear tabakası ve debrisin uzaklaştırılamadığı gözlenmiştir.

EDTA+CHX+EDTA grubunda ise smear tabakası önemli ölçüde uzaklaştırılmıştır ve ayrıca erozyon bulgularına rastlanmıştır. Ancak gözlenen erozyon EDTA+NaOCl+EDTA grubunda olduğu kadar şiddetli bulunmamıştır.

QMix'in smear tabakasını uzaklaştırma etkinliğini inceleyen Dai ve ark'ın (2011) çalışmalarında SEM görüntülerinden elde ettikleri bulgulara göre kök kanal duvarlarından smear tabakasının uzaklaştırılmasında NaOCl ile irrigasyon sonrası kullanılan QMix ve %17 EDTA arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Yine benzer şekilde Aranda-Garcia ve ark (2013) final yıkama solüsyonu olarak QMix ve %17 EDTA solüsyonlarının kullanımının smear tabakası ve debrisi benzer oranlarda uzaklaştırdığını ileri sürmüşlerdir. Stojicic ve ark (2012) beş dakika süreyle uygulanan QMix ve %17 EDTA'nın smear tabakasını uzaklaştırma etkinliklerinin benzer olduğunu ancak her iki grupta da bazı dentin tübül ağızlarının kısmen de olsa debrisle kaplı olduğunu belirtmişlerdir.

Bu bulgulara benzer şekilde çalışmamızda QMix ile irrigasyon sonrası dentin yüzeyinde erozyon oluşmadan smear tabakasının ve debrisin kısmen ortadan kaldırılabildiği ancak dentin tübül ağızları etrafından debrisin tümüyle uzaklaştırılamadığı gözlenmiştir. Smear tabakası ve debris NaOCl+EDTA+NaOCl ile irrigasyon grubuna benzer şekilde ortamdan uzaklaştırılabilmektedir. Üstelik final irrigasyon solüsyonu olarak %17 EDTA'nın kullanıldığı EDTA+NaOCl+EDTA ve EDTA+CHX+EDTA gruplarında gözlenen şiddetli erozyon bulgusuna rastlanmamıştır.

OCT'in smear tabakasını çıkarma etkinliği ile ilgili yapılan bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Mevcut çalışmada alınan SEM görüntülerine göre OCT dentin yüzeyindeki smear tabakasını ve debrisi uzaklaştırmada başarısız olmuştur. OCT+EDTA+OCT grubunda ise smear tabakası ve debrisin kısmen uzaklaştırılmasında EDTA'nın rolü olduğu düşünülmektedir.

Mevcut çalışmada dentin örneklerinin PBS ile yıkanmasının ardından yüzeyden smear tabakası ve debrisin uzaklaştırılamadığı gözlenmiştir. Çalışmamız bulgularına benzer şekilde Amireddy ve ark (2011) PBS ile muamele edilen dentin yüzeyinde dentin tübüllerinin smear ve debris ile kaplı olduğunu belirtmişlerdir.

Alınan SEM görüntüleri ile kontrol grubu olan serum fizyolojiğin smear tabakası ve debris üzerine herhangi bir etkisinin olmadığı gözlenmiştir. Yapılan çalışmalar bulgularımızı destekler niteliktedir (Chivatxaranukul ve ark 2008, Gürbüz ve ark 2008).

Smear tabakasının kök kanal tedavisine olan etkisi günümüze kadar yapılan pek çok çalışma ile ortaya konmuştur (Dippel ve ark 1984, Ørstavik ve Haapasalo 1990, Safavi ve ark 1990, Nissan ve ark 1995, Yang ve ark 2006). Bazı araştırmacılar smear tabakasının kendisinin enfekte olabileceği ve ayrıca uygulanan irrigasyon solüsyonları ve kanal içi medikamentlerin antimikrobiyal etkilerine engel olabileceği ihtimaliyle smear tabakasının ısrarla kaldırılması gerektiği yönünde görüş belirtmektedir (Ørstavik ve Haapasalo 1990). Bakterilerin dentin tübüllerine invazyonunu önleyebileceği düşüncesiyle smear tabakasının uzaklaştırılmaması gerektiğini belirten çalışmalar da mevcuttur (Dippel ve ark 1984, Safavi ve ark 1990, Perez ve ark 1996). Ancak çalışmamızda smear tabakasının varlığı ile bakteriyel adezyon arasındaki ilişki hakkında net bir bulguya ulaşılamamıştır. Örneğin CHX, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX ve OCT gruplarında smear tabakası mevcutken bile oldukça düşük bakteri adezyonu gerçekleşirken yine smear tabakasının mevcut olduğu NaOCl grubunda ise tüm deney grupları arasındaki en yüksek bakteri adezyonu gözlenmiştir.

Smear tabakasının kaldırıldığı gruplarda da bakteriler dentine yüksek adezyonda bulunabilmekte ve üstelik dentin tübülleri içine kolaylıkla penetre olabilmektedir. Örneğin EDTA+NaOCl+EDTA ve NaOCl+EDTA+NaOCl gruplarında smear tabakası uzaklaştırılmış ve bakteri adezyonunda maksimum değerler gözlenmiştir. Öte yandan smear tabakasının etkili bir şekilde ortadan kaldırıldığı EDTA+CHX+EDTA grubunda ve kısmen uzaklaştırılabildiği OCT+EDTA+OCT gruplarında ise bakteri adezyonunda minimum değerler elde edilmiştir.

Smear tabakasının uzaklaştırılmasıyla ortaya çıkan dentin tübülleri yüzeyde retantif alanlar oluşturmakta ve buna bağlı olarak yüzey alanında bir artış söz konusu olmaktadır (Tay ve ark 2007). Dolayısıyla smear tabakasının uzaklaştırıldığı gruplarda dentin örneklerinin artan yüzey alanından dolayı bakteriyel adezyonda bir

artış beklenmektedir. Ancak çalışmamız bulgularına göre smear tabakasının kalkmasıyla dentin yüzeyinde gerçekleşen yüzey alanı artışının bakteriyel adezyona olumlu bir katkısının olmadığı gözlenmektedir. Örneğin OCT grubunda smear tabakası uzaklaştırılamamışken OCT+EDTA+OCT grubunda ise smear tabakası kısmen kaldırılmış ve dentin tübülleri kısmen ortaya çıkmıştır. Ancak dentin tübüllerinin ortaya çıkışından ötürü dentin yüzeyinde retantif alanların arttığı OCT+EDTA+OCT grubunda beklenen yüksek bakteriyel adezyona karşın JEL(+) *E. faecalis* suşu OCT grubu ile kıyaslandığında OCT+EDTA+OCT grubundaki dentin örneklerine daha az adezyonda bulunmuştur. Yine benzer şekilde smear tabakasının mevcut olduğu CHX grubu ile smear tabakasının tümüyle uzaklaştırıldığı ve buna bağlı olarak yüzey alanında önemli ölçüde artışın olduğu EDTA+CHX+EDTA grubu arasında bakteriyel adezyon açısından bir fark bulunmamıştır.

Elde ettiğimiz bulgular sonucunda smear tabakasının ortadan kaldırıp kaldırılmadığı dikkate alınmaksızın final irrigasyon solüsyonunun bakteri adezyonunda önemli bir role sahip olduğu söylenebilir. Yang ve ark (2006) smear tabakasının kaldırılması ve dentinin final irrigasyon solüsyonu olarak CHX ile muamele edilmesinin ardından *E. faecalis*'in yüzeye adezyonunun minimum olduğunu belirtmişlerdir. Chivatxaranukul ve ark (2008) ise smear tabakası varlığının *E. faecalis*'in dentine adezyonunda tek başına önemli bir faktör olmadığını ve esas olarak *E. faecalis*'in sahip olduğu virülans faktörlerinin adezyona büyük katkıda bulunabileceğini belirtmişlerdir. Kısacası çalışmamız bulgularına göre smear tabakasının varlığı bakteriyel adezyon için tek başına önemli bir faktör değildir. Smear tabakasının kaldırılıp kaldırılmaması yönünde net bir görüş belirtebilmek için kanal içinde yol açabileceği sızıntı ve kanal dolgularının dentine adaptasyonuna etkisi gibi smear tabakasının farklı etkilerini de göz önünde bulundurmak gerekir.

Farklı irrigasyon solüsyonu ve kombinasyonlarının dentin yüzeyine uygulanması sonrasında dentinin kimyasal ve yapısal içeriği etkilenmekte ve böylece dentinin geçirgenliği de değişmektedir (Doğan ve Çalt 2001, Marending ve ark 2007, Sayın ve ark 2007, Hu ve ark 2010). Dentinde meydana gelen değişikliklerin mikroorganizmaların dentin yüzeyine adezyonunda etkili olduğu daha önce yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur (Chivatxaranukul ve ark 2008).

Çalışmamızda NaOCl ile irrigasyon sonrasında dentin yüzeyindeki kalsiyum ve fosfor miktarının distile suda bekletilen kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı bir değişikliğe yol açmadığı gözlenmiştir. NaOCl'nin dentinin organik kısmını çözmesi ve dentin yüzeyinde mineralden zengin smear tabakasının bulunması (Baumgartner ve Mader 1987) NaOCl grubunda değişmeyen kalsiyum miktarının sebeplerinden biri olabilir. Bulgularımıza benzer şekilde Arı ve Erdemir (2005) 15 dakika süreyle uygulanan %5,25 NaOCl sonrası kalsiyum ve fosfor miktarında önemli bir değişimin gözlenmediğini belirtmişlerdir. Çalışmamız bulgularına paralel olarak Marending ve ark (2007) NaOCl'nin dentindeki karbon miktarında anlamlı bir düşüşe neden olduğunu ileri sürmüşlerdir. Elde ettiğimiz bulgulara göre NaOCl sodyum, magnezyum ve oksijen değerlerinde anlamlı bir değişikliğe yol açmamıştır. Arı ve Erdemir (2005)'in yaptıkları çalışmada %2,5 NaOCl ile muamele edilen örneklerde magnezyum değerlerinin değişmeyişi bulgularımızı destekler niteliktedir.

Mevcut çalışmada CHX ve NaOCl+Serum fizyolojik+CHX uygulaması sonrası dentindeki kalsiyum ve fosfor miktarında herhangi bir farklılık görülmemiştir. Yine benzer şekilde Sayın ve ark (2009) CHX ve kontrol grubu olan distile su ile muamele edilen örneklerdeki kalsiyum iyonu salınımında anlamlı bir farkın bulunmadığını belirtmişlerdir. Ancak çalışmamız bulgularına göre CHX'in tek başına kullanımı NaOCl+Serum fizyolojik+CHX uygulamasına göre anlamlı derecede yüksek kalsiyum ve fosfor kaybına yol açmıştır. Öte yandan CHX ve NaOCl+Serum fizyolojik+CHX grupları çalışmamızda sodyum miktarında kontrol grubuna kıyasla anlamlı bir düşüşe yol açmışlardır.

Çalışmamızda OCT+EDTA+OCT grubu hariç diğer EDTA içeren tüm deney gruplarında dentininin önemli ölçüde kalsiyum iyonlarını kaybettiği gözlenmiştir. EDTA+NaOCl+EDTA grubu diğer tüm gruplara kıyasla en fazla mineral değişimine yol açan grup olmuştur. Dentin içeriğindeki kalsiyum, fosfor ve sodyum iyonlarında diğer tüm gruplara göre anlamlı derecede ciddi düşüşlere yola açan EDTA+NaOCl+EDTA grubu karbon iyonunda ise oldukça fazla miktarda artışa yol açmıştır. Çalışmamız bulgularına paralel olarak Sayın ve ark (2007) %17 EDTA+%2,5 NaOCl ile yapılan irrigasyon neticesinde dentinden yüksek miktarda kalsiyum iyonu uzaklaştığını bildirmişlerdir. Benzer şekilde EDTA'nın dentin

yüzeyinde önemli ölçüde mineral değişimine yol açtığını destekleyen pek çok çalışma mevcuttur (Doğan ve Çalt 2001, Arı ve Erdemir 2005, Çobankara ve ark 2011). Mevcut çalışmada EDTA içeren gruplar arasında yalnızca OCT+EDTA+OCT grubu kalsiyum ve fosfor iyonlarında herhangi bir değişikliğe yol açmamıştır.

OCT'in dentinin mineral içeriğinde yol açtığı değişiklikleri inceleyen bir çalışma literatürde rastlanmamıştır. Çalışmamız bulgularına göre OCT dentinden kalsiyum salımına yol açarken fosfor miktarında NaOCl bulgularına benzer şekilde bir miktar artışa yol açmaktadır. Öte yandan test edilen diğer minerallerin miktarında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir.

QMix solüsyonunun dentinin mineral yapısına olan etkisi ile ilgili bir çalışma henüz bulunmamakla beraber mevcut çalışmaya göre test edilen irrigasyon solüsyonu ve kombinasyonları arasından QMix solüsyonunun dentinin mineral yapısına etkisinin minimum olduğu gözlenmiştir. Yalnızca sodyum miktarında anlamlı bir düşüşe yol açan QMix'in diğer minerallere etkisi anlamsız bulunmuştur.

Yapılan SEM-EDX analizi bulgularına göre PBS ile serum fizyolojiğin dentin yüzeyinde yol açtıkları kalsiyum, fosfor, karbon, sodyum, oksijen ve magnezyum değişim oranlarının birbirlerine oldukça yakın olduğu gözlenmiştir. Serum fizyolojik kontrol grubu olan distile su ile kıyaslandığında dentindeki kalsiyum, fosfor, karbon, oksijen ve magnezyum miktarında önemli bir değişiklik yaratmamıştır. Ancak serum fizyolojik ve PBS ile muamele edilen dentin yüzeyinde sodyum miktarında anlamlı bir düşüş gözlenmiştir.

Günümüz tıp alanında biyofilm oluşumunda rol alan moleküler mekanizmaların açıklığa kavuşturulması ve *in vivo* olarak biyofilm oluşumunu önleyecek töropatik ajanların geliştirilmesi yönünde çalışmalar devam etmektedir (Carniol ve Gilmore 2004). Örneğin tümör oluşumunun önlenmesinde ve virüslere bağlı immün yetmezlik enfeksiyonlarında proteaz inhibitörlerinin etkili antiretroviral özellikte olduğu kanıtlanmıştır (Jung ve ark 2012). Şarbon tedavisinde proteaz inhibitörlerinin antibiyotiklerle beraber kullanımı da güncellik kazanmaktadır (Li ve ark 2012).

Aynı bakış açısıyla kök kanal dentinine adezyonda bulunmuş *E. faecalis*'in uzaklaştırılması yönünde çaba harcamak yerine bakterilerin dentin yüzeyine adezyonunu önleyebilmek gelecekte kök kanal tedavilerinin başarısını artıracak etkili bir yaklaşım olabilir. Bu nedenle diğer pek çok virülans faktörlerinin araştırılarak biyofilm oluşumunun ilk aşaması olan bakteri adezyonuna katkısının belirlenmesi ve sonrasında doğrudan bu virülans faktörleri inhibe edebilecek ajanların araştırılması bu amaç doğrultusunda atılacak önemli adımlar olabilir. Bu nedenle jelatinazın hangi mekanizmaları kullanarak bakteriyel adezyonu artırabildiğini araştıran ileri dönem çalışmalar normal ağız florasının bir üyesi olmayan *E. faecalis*'in neden kök kanallarından izole ediliyor oluşuna açıklık kazandırabilir. Bununla birlikte endodonti pratiğinde yer alan kanal içi medikamentlerin, lazer uygulamalarının, ultrasoniklerin ve kök kanal dolgu patlarının dentin yüzeyindeki mikrobiyal adezyona olan etkisini değerlendirecek ileri çalışmalara ihtiyaç bulunmaktadır.

Çalışmamız bulgularından yola çıkarak kök kanal tedavisinin başarısızlıklarında büyük rol oynadığı düşünülen *E. faecalis*'in üretmiş olduğu jelatinaz enziminin bu bakterinin dentine adezyonunda yardımcı bir faktör olduğu ileri sürülebilir. Ancak çalışmamızda tek bir mikroorganizma türü ele alınmış olup başarısız kök kanal tedavilerinin mikrobiyal florasının çeşitliliği göz önünde bulundurularak farklı mikroorganizma türleri ile çalışmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda dentin disklerinden elde ettiğimiz bulgular kök kanal anatomisinin düzensizliklerinden dolayı tam olarak klinik koşulları yansıtamayabilir. Ancak bu *ex vivo* çalışmadan elde edilen bulgular ve bu bulgulara dayanarak elde edilen ön bilgiler klinisyenlere endodontide kullanılan irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının bakteriyel adezyona katkısı ve dentin yapısına olumlu veya olumsuz sonuçları hakkında bilgi vermesi bakımından yararlı olabilir.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu *ex vivo* çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular ve çalışmanın sınırları dahilinde yapılan sonuç ve öneriler aşağıda sunulmuştur:

1- Çalışmamızda bakteriyel adezyon miktarının belirlenmesi amacıyla hücre kültürü çalışmalarında kullanılan ve örnek sayısının çok olduğu çalışmalarda oldukça pratik bir yöntem olan XTT yöntemi kullanılmıştır. Elde edilen değerlerin alınan SEM görüntüleri ile doğrulanmasından yola çıkılarak bu yöntemin bakteriyel adezyon çalışmalarında güvenilir bir yöntem olduğu ileri sürülebilir.

2- Jelatinaz enzimi üretebilen *E. faecalis* suşu jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşundan daha fazla dentin adezyonunda bulunmuştur. Bu nedenle *E. faecalis*'in üretmiş olduğu jelatinaz enziminin dentin yüzeyinde gerçekleşen bakteriyel adezyona önemli bir katkısının olduğu söylenebilir.

3- Mevcut çalışmada test edilen irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının *E. faecalis*'in dentin yüzeyine adezyonunu önemli ölçüde etkilediği gözlenmiştir.

4- Deneyde kullanılan her iki *E. faecalis* suşunun gerçekleştirdiği en yüksek adezyon değerleri %2,5 NaOCl ve %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA ile muamele edilen dentin örneklerinde gözlenmiştir.

5- Deneyde kullanılan her iki *E. faecalis* suşunun gerçekleştirdiği en düşük adezyon değerleri %2 CHX, %2,5 NaOCl+Serum fizyolojik+%2 CHX ve %17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA ile muamele edilen dentin örneklerinde gözlenmiştir. Bu bulgudan yola çıkarak ilk seans kanal tedavilerinde irrigasyon solüsyonu protokolünde CHX'e yer verilmesi seans arasında koronal sızıntı yoluyla gerçekleşebilecek olası bakteriyel adezyon riskine karşı koruyucu bir önlem olarak önerilebilir.

6- Son yıkamanın EDTA ile bitirildiği %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA irrigasyonu sonrası dentin yüzeyinde gerçekleşen bakteriyel adezyon NaOCl ile

bitirilen %2,5 NaOCl+%17 EDTA+%2,5 NaOCl irrigasyonuna göre daha fazla gerçekleşmiştir.

7- Endodontide yeni bir irrigasyon solüsyonu olan ve içeriğinde EDTA ve CHX barındıran QMix solüsyonunun antiadeziv etkisi ile ilgili herhangi bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Araştırmamız sonuçlarına göre QMix dentin yüzeyine bakteriyel adezyonu önlemekte %17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA irrigasyonu kadar başarılı olamamıştır. Öte yandan kontrol grubu olan serum fizyolojik ile kıyaslandığında QMix'in en azından bakteriyel adezyonun artışına yol açmadığı ileri sürülebilir.

8- Sahip olduğu antibakteriyel özellikleriyle tıpta kullanımı giderek artan antiseptik OCT solüsyonu ile bakteriyel adezyon arasındaki ilişkiyi araştıran bir çalışma endodonti alanında henüz mevcut değildir. Çalışmamıza göre OCT ile muamele edilen dentin örneklerinde jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşunun gerçekleştirdiği bakteriyel adezyon %2,5 NaOCl; %2,5 NaOCl+%17 EDTA+%2,5 NaOCl ve %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA ile muamele edilen dentin örneklerine kıyasla daha düşük bulunmuştur. Ancak OCT'in göstermiş olduğu bu antiadeziv etki %2 CHX; %2,5 NaOCl+Serum fizyolojik+%2 CHX ve %17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA gruplarında olduğu kadar güçlü bulunmamıştır.

9- Araştırmamız bulgularına göre OCT jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşunun dentine adezyonunun önlenmesinde daha başarılı olmuştur. Öyle ki OCT ve OCT+%17 EDTA+OCT gruplarının göstermiş olduğu antiadeziv etki en az %2 CHX; %2,5 NaOCl+Serum fizyolojik+%2 CHX ve %17 EDTA+%2 CHX+%17 EDTA grupları kadar yüksek bulunmuştur.

10- OCT ile muamele edilen dentin örneklerine adezyonda bulunan bakteri sayısının QMix grubuna göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Ancak kök kanal tedavisinde OCT'in rutin klinik kullanımı önerilmeden önce daha çok çalışmaya ihtiyaç duyulduğu belirtilmelidir.

11- Çalışmamızda elde edilen SEM görüntülerine göre %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA grubu smear tabakası ve debrisi tümüyle ortadan kaldırırken dentin yüzeyinde oldukça şiddetli erozyona yol açmıştır.

12- QMix solüsyonu üretici firmanın tavsiye ettiği irrigasyon protokolü ile kullanımı sonrasında dentin yüzeyinde erozyona yol açmadan smear tabakasını kısmen kaldırılabilmiştir.

13- OCT'in dentin yüzeyindeki smear tabakası üzerine etkinliğini araştıran bir çalışma henüz bulunmamaktadır. Araştırmamız bulgularına göre OCT dentin yüzeyindeki smear tabakasını ve debrisi uzaklaştırmada etkili olamamıştır. Ancak EDTA ile kombine kullanımında smear tabakası ve debris kısmen uzaklaştırılabilmiştir.

14- Çalışmamız bulguları doğrultusunda dentin yüzeyinde bulunan smear tabakası ile bakterilerin adezyonu arasında bir ilişki kurulamamıştır. Bakteriyel adezyonun önlenmesinde smear tabakasının varlığından ziyade irrigasyon protokolünde bulunan final irrigasyon solüsyonunun esas etkiye sahip olduğu söylenebilir. Ancak irrigasyon solüsyonlarının ortaya koyduğu bakteriyel adezyonu önleme etkinliğinin ne kadar süre korunabildiğini ortaya koymak için uzun dönem çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

15- Çalışmada %17 EDTA+%2,5 NaOCl+%17 EDTA irrigasyon protokolünün dentinin mineral yapısını en çok etkileyen grup olduğu gözlenmiştir. Bu grup ile yapılan irrigasyon sonrası dentin yapısında kalsiyum, fosfor ve sodyum iyonlarında ciddi düşüş gözlenirken karbon miktarında ise anlamlı bir artış söz konusu olmuştur.

16- QMix solüsyonunun diğer gruplar ile kıyaslandığında dentinin mineral yapısına etkisinin oldukça az olduğu gözlenmiştir.

6. ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İşlem Görmüş Dentin Kollajenine *Enterococcus Faecalis*'in Adezyonunda Jelatinaz Enziminin Etkisi

Mehmet Burak GÜNEŞER
Endodonti Anabilim Dalı
DOKTORA TEZİ/KONYA-2013

Bu araştırmanın amacı; *Enterococcus faecalis*'in jelatinaz üretebilme yeteneğinin farklı irrigasyon solüsyonları ve kombinasyonları ile muamele edilen dentin yüzeyine adezyonuna katkısının araştırılması ve irrigasyon solüsyonları gruplarının dentin yüzeyindeki ultramorfolojik ve kimyasal etkilerini SEM-EDX analiz yöntemi yardımıyla değerlendirilmesidir.

Çekilmiş çürüksüz insan üçüncü molar dişlerinden standardize dentin diskleri hazırlandı ve steril edildi. Diskler tedavi prosedürlerine göre rastgele 11 gruba (n=20) ayrıldı: I- %2,5 sodyum hipoklorit (NaOCl), II- %2 klorheksidin (CHX), III- NaOCl+Serum fizyolojik+CHX, IV-NaOCl+%17 Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)+NaOCl, V-EDTA+NaOCl+EDTA, VI- EDTA+CHX+EDTA, VII- QMix, VIII- Oktenidin hidroklorit (OCT), IX- OCT+EDTA+OCT, X- Tamponlanmış fosfat çözeltisi (PBS), XI- Serum fizyolojik (kontrol grubu). Dentin disklerinin 5 mL test irrigasyon solüsyonunda 15 dakika süreyle bekletilmesinin ardından örnekler distile su ile yıkandı. Her grup kullanılan bakteri suşuna göre kendi içerisinde 2 alt gruba (n=10) ayrıldı; jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşu (581301) ve jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşu (599427). Dentin diskleri 37°C'de aerobik koşullar altında 48 saat süreyle *E. faecalis* ile enfekte edildi. Ardından tetrazolyum tuzlarının kullanıldığı XTT test yöntemi ile bakteriyel adezyon değerlendirildi. Verilerin istatistiksel analizi ANOVA ve Tukey HSD testleri kullanılarak yapıldı (p=0,05). Her test irrigasyon solüsyonu grubundan 4 örnek Tarayıcı Elektron Mikroskobu (SEM) ve Enerji Dağılımlı X-ışını Analizi (EDX) yardımıyla her bir örneğin yüzeyindeki kalsiyum, fosfor, karbon, sodyum, magnezyum ve oksijen içeriği % ağırlık olarak ölçüldü.

Jelatinaz enzimi üreten *E. faecalis* suşu tüm test gruplarındaki örnkelerin dentin yüzeyine jelatinaz enzimi üretemeyen *E. faecalis* suşuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek adezyonda bulunmuştur ($p<0,05$). NaOCl, EDTA+NaOCl+EDTA ve NaOCl+EDTA+NaOCl grupları bakteriyel adezyonu artırırken CHX, NaOCl+Serum fizyolojik+CHX, EDTA+CHX+EDTA ve OCT+EDTA+OCT grupları bakteriyel adezyonu düşürmüştür. QMix solüsyonu bakteriyel adezyonun önlenmesinde EDTA+CHX+EDTA grubuna göre daha düşük etkide bulunmuştur. QMix solüsyonu ile serum fizyolojik (kontrol) grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. SEM-EDX analizi sonuçları kalsiyum miktarının EDTA+NaOCl+EDTA, EDTA+CHX+EDTA ve OCT gruplarında önemli ölçüde düştüğünü göstermiştir. Karbon miktarı NaOCl, QMix ve serum fizyolojik grubu hariç diğer tüm gruplarda istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha yüksek bulunmuştur. Magnezyum değerleri herhangi bir irrigasyon grubundan etkilenmezken oksijen miktarı EDTA+NaOCl+EDTA grubunda önemli ölçüde düşmüştür.

Yapılan bu *ex vivo* çalışmanın bulgularına göre, *E. faecalis*'in dentine adezyonunda jelatinaz enzimi üretiminin önemli bir role sahip olacağı söylenebilir. İrrigasyon solüsyonlarının tek başına veya kombine kullanımları *E. faecalis*'in dentine adezyonunu etkileyebilmektedir. Dentinin mineral yapısına QMix ve serum fizyolojik solüsyonları en düşük etkide bulunan gruplar olurken EDTA+NaOCl+EDTA kombinasyonu dentin yapısına en olumsuz etkisi olan grup olarak bulundu.

Anahtar sözcükler: Bakteriyel adezyon; dentin; *Enterococcus faecalis*; jelatinaz enzimi; irrigasyon solüsyonları

7. SUMMARY

The effect of gelatinase production by *Enterococcus* faecalis on adhesion to treated dentine

The aim of this study was to evaluate whether the gelatinase production ability of *Enterococcus faecalis* provide any advantage on adhesion of this bacterium to dentine surface that treated with irrigants alone and their combinations and also to investigate the ultramorphological and chemical effects of irrigation groups on dentin by using SEM-EDX analysis.

Standardized dentine discs were prepared from extracted non-carious human third molar teeth and autoclaved. The discs were randomly assigned to 11 groups (n=20) according to dentine treatment procedure: I- 2,5% sodium hypochlorite (NaOCl), II- 2% chlorhexidine(CHX), III- NaOCl+Saline+CHX, IV- NaOCl+17% Ethylendiamine tetraacedic acid (EDTA)+NaOCl, V- EDTA+NaOCl+EDTA, VI- EDTA+CHX+EDTA, VII- QMix, VIII- Octenidine hydrochloride (OCT), IX- OCT+EDTA+OCT, X- Phosphate-buffered saline solution (PBS), XI-Saline (positive control). After the incubation of dentine discs in 5 mL of test irrigation solutions for 15 minutes, discs were rinsed with distilled water. Each group were then divided into 2 subgroups (n=10) according to the bacterial strains used; a gelatinase-producing strain *E. faecalis* (581301) and its gelatinase-negative derivative *E. faecalis* (599427). Dentin discs were incubated at 37°C with *E. faecalis* aerobically for 48 h. After incubation, the bacterial adherence assay was conducted by using tetrazolium salt (XTT) assay. Data were statistically analyzed by using ANOVA and Tukey HSD tests (p=0,05). The specimens (n=4) for each irrigation test group were subjected to scanning electron microscopic (SEM) and energy dispersive X-ray (EDX) spectrometric analysis to determine calcium, phosphorus, carbon, sodium, magnesium and oxygen content in % weight of each specimen surface. No treated dentin was used as a control group.

Gelatinase-producing strain of *E. faecalis* adhered to dentine statistically higher than its gelatinase-negative derivative in all test groups ($p<0,05$). Statistically significant increase in adherence was observed in NaOCl; EDTA+NaOCl+EDTA and NaOCl+EDTA+NaOCl groups whereas NaOCl+Saline+CHX, EDTA+CHX+EDTA, CHX and OCT+EDTA+OCT groups reduced it. QMix solution was found less effective on prevention of bacterial adhesion to dentine than EDTA+CHX+EDTA group while there was no statistical significant difference between QMix and saline (control) group. The SEM-EDX results showed that calcium content was significantly decreased in EDTA+NaOCl+EDTA, EDTA+CHX+EDTA, OCT groups. Significantly higher carbon content was detected in all test groups except in NaOCl, QMix and Saline groups. No differences were observed in magnesium content of any of the groups while oxygen content was significantly decreased in EDTA+NaOCl+EDTA group.

On the basis of this *ex vivo* study, it could be indicated that the gelatinase production might play an important role in the adherence of *E. faecalis* to dentine. The present study also showed that irrigants alone and their combinations may influence bacterial adhesion to dentine. QMix and saline solutions caused the minimal effect on mineral content of dentin whereas EDTA+NaOCl+EDTA combination had the worst effect on dentin.

Key Words: Bacterial adhesion; dentin; *Enterococcus faecalis*; gelatinase; irrigation solutions

8. KAYNAKLAR

1. Aamdal Scheie A, Petersen FC. The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2004;15:4–12.

2. Accorsi-Mendonça T, Paiva KB, Zambuzzi WF, Cestari TM, Lara VS, Sogayar MC, Taga R, Granjeiro JM. Expression of matrix metalloproteinases-2 and -9 and RECK during alveolar bone regeneration in rat. J Mol Histol. 2008;39:201-8.

3. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. J Endod. 2010;36:847-50.

4. Aktener BO, Bilkay U. Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. J Endod. 1993;195:228-31.

5. Alacam T. Kök kanallarının irrigasyonu, 'Endodonti' II. Baskı. Ankara, Barış Yayınları, Şafak Matbaacılık 2000;289-312.

6. Al-Doori Z, Goroncy-Bermes P, Gemmell CG, Morrison D. Low-level exposure of MRSA to octenidine dihydrochloride does not select for resistance. J Antimicrob Chemother. 2007;59:1280-1.

7. Amalaradjou MA, Norris CE, Venkitanarayanan K. Effect of octenidine hydrochloride on planktonic cells and biofilms of Listeria monocytogenes. Appl Environ Microbiol. 2009;75:4089-92.

8. Amireddy R, Rangarao S, Lavu V, Madapusi BT. Efficacy of a root conditioning agent on fibrin network formation in periodontal regeneration: A SEM evaluation. J Indian Soc Periodontol. 2011;15:228-34.

9. Aranda-Garcia AJ, Kuga MC, Vitorino KR, Chávez-Andrade GM, Duarte MA, Bonetti-Filho I, Faria G, Só MV. Effect of the root canal final rinse protocols on the debris and smear layer removal and on the push-out strength of an epoxy-based sealer. Microsc Res Tech. 2013;76:533-7.

10. Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;30:792-5.

11. Ari H, Erdemir A. Effects of endodontic irrigation solutions on mineral content of root canal dentin using ICP-AES technique. J Endod. 2005;31:187-9.

12. Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, González-Rodríguez MP, Valderrama MJ, Baca P. Eradication of Enterococcus faecalis biofilms by cetrimide and chlorhexidine. J Endod. 2010;36:87-90.

13. Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. Aust Dent J. 2007;52:S64-82.

14. Blackburn CW, McCarthy JD. Modifications to methods for the enumeration and detection of injured Escherichia coli O157:H7 in foods. Int J Food Microbiol. 2000;55:285-90.

15. Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, Castillo F, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. J Endod. 2012;38:927-30.

16. Barrette WC Jr, Hannum DM, Wheeler WD, Hurst JK. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. Biochemistry 1989;28:9172–8.

17. Baumgartner JC, Mader CL. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. J Endod. 1987;13:147-57.

18. Bowden GH, Hardie JM, McKee AS, Marsh PD, Fillery ED, Slack GL. The microflora associated with developing carious lesions of the distal surfaces of the upper first premolars in 13–14 year old children. In: Stiles HM, Loesche WJ, O'Brien TC, eds. Microbial Aspects of Dental Caries. Washington, DC: Information Retrieval. 1976;233–41.

19. Brändle N, Zehnder M, Weiger R, Waltimo T. Impact of growth conditions on susceptibility of five microbial species to alkaline stres. J Endod 2008;34:579 –582.

20. Breeuwer P, Abee T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. Int J Food Microbiol. 2000;55:193-200.

21. Brill F, Goroncy-Bermes P, Sand W. Influence of growth media on the sensitivity of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa to cationic biocides. Int J Hyg Environ Health. 2006;209:89-95.

22. Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng YL, Pratten J, Gulabivala K. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single- and dual-species biofilms. J Endod. 2009;35:1243-8.

23. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. J Endod. 2008;34:181-5.

24. Buschner JH, van der Mei HC. Initial microbial adhesion events: mechanisms and implications. In: Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M, eds. Community Structure and Co-Operation in Biofilms. Cambridge: Cambridge University Pres. 2000;25–36.

25. Bührer C, Bahr S, Siebert J, Wettstein R, Geffers C, Obladen M. Use of 2% 2 phenoxyethanol and 0.1% octenidine as antiseptic in premature newborn infants of 23-26 weeks gestation. J Hosp Infect. 2002;51:305-7.

26. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1983;55:307-12.

27. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. Int Endod J. 1985;18:35-40.

28. Cameron JA. The use of ultrasound for the removal of the smear layer. The effect of sodium hypochlorite concentration; SEM study. Aust Dent J. 1988;33: 193-200.

29. Carniol K, Gilmore MS. Signal transduction, quorum-sensing, and extracellular protease activity in Enterococcus faecalis biofilm formation. J Bacteriol. 2004;186:8161-3.

30. Carr GB, Schwartz RS, Schaudinn C, Gorur A, Costerton JW. Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure. J Endod. 2009;35:1303-9.

31. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. J Endod. 1984;10:359-63.

32. Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. J Endod. 2008;34:1396-400.

33. Cerca N, Martins S, Cerca F, Jefferson KK, Pier GB, Oliveira R, Azeredo J. Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus

planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. J Antimicrob Chemother. 2005;56:331-6.

34. Chandrasekhar V, Amulya V, Rani VS, Prakash TJ, Ranjani AS, Gayathri Ch. Evaluation of biocompatibility of a new root canal irrigant Q Mix™ 2 in 1- An in vivo study. J Conserv Dent. 2013;16:36-40.

35. Chavez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. J Endod. 2007;33:652-62.

36. Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. Food Chem Toxicol. 1991;29:119 –24.

37. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. J Endod. 2010;36:70-7.

38. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2008;41:873-82.

39. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. J Endod. 2006;32:434-7.

40. Cobankara FK, Erdogan H, Hamurcu M. Effects of chelating agents on the mineral content of root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2011;112:e149-54.

41. Costerton JW, Stewart P, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. Science 1999;284:1318–1322.

42. Coque TM, Patterson JE, Steckelberg JM, Murray BE. Incidence of hemolysin, gelatinase, and aggregation substance among enterococci isolated from patients with endocarditis and other infections and from feces of hospitalized and communitybased persons. J Infect Dis. 1995;171:1223–9.

43. Cowan MM, Taylor KG, Doyle RJ. Energetics of the initial phase of adhesion of Streptococcus sanguis to hydroxylapatite. J Bacteriol. 1987;169:2995-3000.

44. Currey JD, Brear K, Zioupos P. Dependence of mechanical properties on fibre angle in narwhal tusk, a highly oriented biological composite. J Biomech. 1994;27:885-97.

45. Cvitkovitch DG, Li Y-H, Ellen R. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. J Clin Invest. 2003;112:1626–1632.

46. Çalışkan MK. Endodontide Tanı ve Tedaviler. Bölüm 11. Nobel Tıp Kitapevi; 2006.

47. Çalt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. J Endod. 2002;28:17–9.

48. Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. J Endod. 2011;37:80-4.

49. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brecx M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on Streptococcus sanguinis. Eur J of Oral Sci. 2003;111:144-8.

50. De-Deus G, Canabarro A, Alves G, Linhares A, Senne MI, Granjeiro JM. Optimal cytocompatibility of a bioceramic nanoparticulate cement in primary human mesenchymal cells. J Endod. 2009;35:1387-90.

51. Dippel HW, Borggreven JM, Hoppenbrouwers PM. Morphology and permeability of the dentinal smear layer. J Prosthet Dent. 1984;525:657-62.

52. Di Rosa R, Creti R, Venditti M, D'Amelio R, Arciola CR, Montanaro L, Baldassarri L. Relationship between biofilm formation, the enterococcal surface protein (Esp) and gelatinase in clinical isolates of Enterococcus faecalis and Enterococcus faecium. FEMS Microbiol Lett. 2006;256:145-50.

53. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. J Endod. 2002;28:689 –93.

54. Doğan H, Calt S. Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root canal dentin. J Endod. 2001;27:578-80.

55. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. J Endod. 2006;32:527-31.

56. Eick JD, Wilko RA, Anderson CH, Sorensen SE. Scanning electron microscopy of cut tooth surfaces and identification of debris by use of the electron microprobe. Dent Res. 1970;49(6):Suppl:1359-68.

57. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. J Endod. 2005;31:107-10.

58. Engström B. The significance of *Enterococci* in root canal treatment. Odontol Revy 1964;15:87–106.

59. Estrela C, Sydney GB, Figueiredo JA, Estrela CR. Antibacterial efficacy of intracanal medicaments on bacterial biofilm: a critical review. J Appl Oral Sci. 2009;17:1-7.

60. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. Int Endod J. 2002;35:221– 8.

61. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. Oral Microbiol Immunol. 2003;18:234 –9.

62. Foulkes DM. Some toxicological observations on chlorhexidine. J Periodontal Res Suppl. 1973;12:55-60.

63. Frais S, Ng YL, Gulabivala K. Some factors affecting the concentration of available chlorine in commercial sources of sodium hypochlorite. Int Endod. 2001;34:206 –15.

64. Fuji R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistent apical periodontitis lesions. Oral Microbiol Immunol. 2009; 24(6):502-5.

65. Garberoglio R, Becce C. Smear layer removal by root canal irrigants. A comparative scanning electron microscopic study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994;78:359-67.

66. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Núñez SC, Jorge AO, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. Lasers Surg Med. 2007;39:59-66.

67. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999;6:437-9.

68. George S, Kishen A. Effect of tissue fluids on hydrophobicity and adherence of Enterococcus faecalis to dentin. J Endod. 2007;33:1421-5.

69. Gilboe DB, Svare CW, Thayer KE, Drennon DG. Dentinal smearing: an investigation of the phenomenon. J Prost Dent.1980;44:310-316.

70. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. Toxicol In Vitro. 2008;22:308-17.

71. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against Enterococcus faecalis biofilm. J Endod. 2007;33:852-5.

72. Gilmore MS. The *Enterococci*: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. Washington: ASM Press, 2002.

73. Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: Part 2. J. Endod. 1982;8:487-92.

74. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. Int Endod J. 2001;34:424-8.

75. Grandini S, Balleri P, Ferrari M. Evaluation of Glyde File Prep in combination with sodium hypochlorite as a root canal irrigant. J Endod. 2002;28:300–303.

76. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. Int Endod J. 2003;36:411-7.

77. Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA. Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. Int Endod J. 2004;37:624-31.

78. Gurbuz T, Ozdemir Y, Kara N, Zehir C, Kurudirek M. Evaluation of root canal dentin after Nd:YAG laser irradiation and treatment with five different irrigation solutions: a preliminary study. J Endod. 2008;34:318-21.

79. Gutmann JL. Adaptation of injected thermoplasticized gutta-percha in the absence of dentinal smear layer. Int Endod J. 1993;26:87-92.

80. Gutschik E, Möller S, Christensen N. Experimental endocarditis in rabbits. 3. Significance of the proteolytic capacity of the infecting strains of *Streptococcus faecalis*. Acta Pathol Microbiol Scand. 1979;87:353– 62.

81. Haapasalo M, Orstravik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987;66:1375-9.

82. Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endod Topics. 2005;10:71-102.

83. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. Dent Clin North Am. 2010;54:291-312.

84. Hancock LE, Perego M. The Enterococcus faecalis fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. J Bacteriol. 2004;186:5629–39.

85. Harke HP. Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent. Zentralbl Hyg Umweltmed. 1989;188:188-93.

86. Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. Int Endod J. 1998;31:8-14.

87. Hiraishi N, Yiu CKY, King NM, Tay FR. Strengths and nanoleakage of luting cements. J Dent. 2009;37:440-448.

88. Hu X, Peng Y, Sum CP, Ling J. Effects of concentrations and exposure times of sodium hypochlorite on dentin deproteination: attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy study. J Endod. 2010;36:2008-11.

89. Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie M. Influence of Enterococcus faecalis proteases and the collagen-binding protein, ACE, on adhesion to dentin. Oral Microbiol Immunol 2003;18:121–6.

90. Huth KC, Quirling M, Maier S, Kamereck K, Alkhayer M, Paschos E, Welsch U, Miethke T, Brand K, Hickel R. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. Int Endod J. 2009;42:3-13.

91. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. Int Endod J. 2003;36:810-830.

92. Jaramillo DE, Arriola A, Safavi K, Chávez de Paz LE. Decreased bacterial adherence and biofilm growth on surfaces coated with a solution of benzalkonium chloride. J Endod. 2012;38:821-5.

93. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod. 1994;20:276-8.

94. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of *Enterococci*. Clin Microbiol Rev. 1994;7:462–78.

95. Jodaikin A, Austin JC. Smear layer removal with chealating agents after cavity preparation. J Prosth Dent. 1981;46:171-174.

96. Joux F, Lebaron P. Use of fluorescent probes to assess physiological functions of bacteria at single cell level. Microbes Infect. 2000;2:1523–35.

97. Jung N, Lehmann C, Knispel M, Meuer EK, Fischer J, Fätkenheuer G, Hartmann P, Taubert D. Long-term beneficial effect of protease inhibitors on the intrinsic apoptosis of peripheral blood mononuclear cells in HIV-infected patients. HIV Med. 2012;13:469-78.

98. Kakehashi S, Stanley Hr, Fitzgerald Rj. The Effects Of Surgical Exposures Of Dental Pulps In Germ-Free And Conventional Laboratory Rats. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1965;20:340-9.

99. Karjalainen S, Söderling E. Dentino-pulpal collagen and the incorporation of 3H-proline by sound and carious human teeth in vitro. J Biol Buccale. 1984;12:309-16.

100. Karunakaran JV, Kumar SS, Kumar M, Chandrasekhar S, Namitha D. The effects of various irrigating solutions on intra-radicular dentinal surface: A SEM analysis. J Pharm Bioallied Sci. 2012;4(Suppl 2):125-30.

101. Kaufman B, Spangberg L, Barry J, Fouad AF. Enterococcus spp. in endodontically treated teeth with and without periradicular lesions. J Endod. 2005;31:851–6.

102. Kawasaki K, Ruben J, Tsuda H, Huysmans M, Takagi O. Relationship between mineral distributions in dentine lesions and subsequent remineralization in vitro. Caries Res. 2000;34:395–403.

103. Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases Enterococcus faecalis adhesion to collagen. Int Endod J. 2005;38:389-96.

104. Kayaoglu G, Erten H, Bodrumlu E, Ørstavik D. The Resistance of Collagen-associated, Planktonic Cells of Enterococcus faecalis to Calcium Hydroxide. J Endod. 2009;35:46-9.

105. Kell DB, Kaprelyants AS, Weichart DH, Harwood CR, Barer MR. Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issues. Antonie Van Leeuwenhoek. 1998;73:169–87.

106. Khedmat S, Shokouhinejad N. Comparison of the efficacy of three chelating agents in smear layer removal. J Endod. 2008;34:599–602. Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. J Dent. 2011;39:855-62.

107. Kim DS, Kim J, Choi KK, Kim SY. The influence of chlorhexidine on the remineralization of demineralized dentine. J Dent. 2011;39:855-62.

108. Kishen A, Sum CP, Mathew S, Lim CT. Influence of irrigation regimens on the adherence of Enterococcus faecalis to root canal dentin. J Endod. 2008;34:850-4.

109. Koban I, Matthes R, Hübner NO, Welk A, Sietmann R, Lademann J, Kramer A, Kocher T. XTT assay of ex vivo saliva biofilms to test antimicrobial influences. GMS Krankenhhyg Interdiszip. 2012;7:Doc06.

110. Koch S, Hufnagel M, Theilacker C, Huebner J. Enterococcal infections: host response, therapeutic, and prophylactic possibilities. Vaccine 2004;22:822–30.

111. Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Egland PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among oral bacteria. Microbiol Mol Biol Rev. 2002;66:486–505.

112. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. J Endod. 2010;36:1154-7.

113. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. J Endod 1998;24:472– 6.

114. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of Streptococcus mutans biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. Infect Immun. 1996;64:1035-1038.

115. Lee W, Lim S, Son H, Bae K. Sonicated extract of *Enterococcus faecalis* induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. J Endod. 2004;30:209–12.

116. Leow N, Abbott P, Castro Salgado J, Firth L. Evaluation of smear layer removal by bicarbonate soda, ethylenediamine tetraacetic acid with cetrimide and sodium hypochlorite with a new model. Aust Endod J. 2012;38:107-12.

117. Leuko S, Legat A, Fendrihan S, Stan-Lotter H. Evaluation of the LIVE/DEAD BacLight kit for detection of extremophilic archaea and visualization of microorganisms in environmental hypersaline samples. Appl Environ Microbiol. 2004;70:6884–6.

118. Lewis K. Riddle of biofilm resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:999-1007.

119. Li W, Liu H, Xu Q. Extracellular dextran and DNA affect the formation of Enterococcus faecalis biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. J Endod. 2012;38:894-8.

120. Li F, Chvyrkova I, Terzyan S, Wakeham N, Turner R, Ghosh AK, Zhang XC, Tang J. Inhibition of anthrax lethal factor: lability of hydroxamate as a chelating group. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;94:1041-9.

121. Love R. Enterococcus faecalis: a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001;34:399–405.

122. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. Crit Rev Oral Biol Med. 2002;13:171-83.

123. de Lucena JM, Decker EM, Walter C, Boeira LS, Löst C, Weiger R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on Enterococcus faecalis: chlorhexidine versus octenidine. Int Endod J. 2013;46:53-61.

124. Luis Chávez de Paz. Redefining the Persistent Infection in Root Canals: Possible Role of Biofilm Communities J Endod. 2007; 33:652– 662.

125. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. J Endod. 2011;37:1380-5.

126. Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD. Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. J Endod. 1984;10:477-483.

127. Makinen PL, Clewell DB, An F, Makinen KK. Purification and substrate specificity of a strongly hydrophobic extracellular metalloendopeptidase (‘‘gelatinase’’) from Streptococcus faecalis (strain oG1–10). J Biol Chem. 1989;264:3325–34.

128. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. Int Endod J. 2007;40:786-93.

129. Marshall NJ, Goodwin CJ, Holt SJ. A critical assessment of the use of microculture tetrazolium assays to measure cell growth and function. Growth Regul. 1995;5:69-84.

130. Mc Comb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopy study of root canals after endodontic procedures. J Endod. 1975;1:238-242.

131. McKenna SM, Davies KJA. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Biochem J. 1988;254:685–92.

132. Miron J, Ben-Ghedalia D, Morrison M. Invited review: adhesion mechanisms of rumen cellulolytic bacteria. J Dairy Sci. 2001;84:1294-309.

133. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. Int Dent J. 2008;58:329-41.

134. Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. Int Endod J. 2009;42:288-302.

135. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998;31:1-7.

136. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. Int Endod J. 1982;15:187-196.

137. Moter A, Gobel UB. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. J Microbiol Methods. 2000;41:85–112.

138. Murray PE, Farber RM, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. Evaluation of Morinda citrifolia as an endodontic irrigant. J Endod. 2008;34:66-70.

139. Naenni N, Thoma K, Zehnder M.Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. J Endod. 2004;30:785-7.

140. Nair P. Light and electron microscopic studies on root canal flora and periapical lesions. J Endod 1987;13:29 –39.

141. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:231–52.

142. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. Int Endod J. 2006;39:249-81.

143. Nakayama J, Kariyama R, Kumon H. Description of a 23.9-kilobase chromosomal deletion containing a region encoding fsr genes which mainly determines the gelatinase-negative phenotype of clinical isolates of Enterococcus faecalis in urine. Appl Environ Microbiol. 2002;68:3152-5.

144. Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. Enterococcus faecalis adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. Infect Immun. 2000;68:5218-24.

145. Nissan R, Segal H, Pashley D, Stevens R, Trowbridge H. Ability of bacterial endotoxin to diffuse through human dentin. J Endod. 1995;21:62-4.

146. Ning Y, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H, Peng Z. Candida albicans survival and biofilm formation under starvation conditions. Int Endod J. 2013;46:62-70.

147. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. Int Endod J. 2002;35:934-9.

148. Nyström T. Not quite dead enough: on bacterial life, culturability, senescence, and death. Arch Microbiol. 2001;176:159–64.

149. O'Connell MS, Morgan LA, Beeler WJ, Baumgartner JC. A comparative study of smear layer removal using different salts of EDTA. J Endod. 2000;26:739–43.

150. Okada T, Ikada Y. In vitro and in vivo digestion of collagen covalently immobilized onto the silicone surface. J Biomed Mater Res. 1992;26:1569-81.

151. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Brandão Garcia R, Bombarda de Andrade F, Bernardineli N, Gomes de Moraes I, Duarte MA. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. Acta Odontol Scand. 2013;71:424-31

152. O'Toole GA, Kolter R. Initiation of biofilm formation in Pseudomonas fluorescens WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. Mol Microbiol. 1998;28:449–461.

153. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on Enterococcusfaecalis biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. J Endod. 2010;36:842-6.

154. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Cehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. J Endod. 2012;38:204-8.

155. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Endod Dent Traumatol. 1990;6:142-9.

156. Panighi M, G'Sell C. Influence of calcium concentration on the dentin wettability by an adhesive. J Biomed Mater Res. 1992;26:1081-9.

157. Parsell DE, Stewart BM, Barker JR, Nick TG, Karns L, Johnson RB. The effect of steam sterilization on the physical properties and perceived cutting characteristics of extracted teeth. J Dent Educ. 1998;62:260-3.

158. Perez F, Calas P, Rochd T. Effect of dentin treatment on in vitro root tubule bacterial invasion. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1996;82:446-51.

159. Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. J Hosp Inf. 2003;55: 108-15.

160. Portenier I, Haapasalo H, Orstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against Enterococcus faecalis by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod. 2002;28:634-7.

161. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. The susceptibility of starved stationary phase, and growing cells of Enterococcus faecalis to endodontic medicaments. J Endod. 2005;31:380–6.

162. Poulsen LK, Ballard G, Stahl DA. Use of rRNA fluorescence in situ hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. Appl Environ Microbiol. 1993;59:1354–60.

163. Ramamurthy NS, Xu JW, Bird J. Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease. J Periodont Res. 2002;37: 1–7.

164. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. J Endod. 2008;34:1521-3.

165. Razavi A, Gmür R, Imfeld T, Zehnder M. Recovery of Enterococcus faecalis from cheese in the oral cavity of healthy subjects. Oral Microbiol Immunol. 2007;22:248-51.

166. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. J Endod. 2004;30:315–20.

167. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. J Endod. 2011;37:143-50.

168. Rose RK. The role of calcium in oral streptococcal aggregation and the implications for biofilm formation and retention. Biochim Biophys Acta. 2000;1475:76-82.

169. Rossi-Fedele G, Doğramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. J Endod. 2012;38:426-31.

170. Russell AD, Hugo WB, Ayliffe GAJ. Principles of antimicrobial activity. In: Disinfection, Sterilization and Preservation. 4th ed. Oxford, UK: Wiley Blackwell; 1991.

171. Safavi KE, Spangberg LSW, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod. 1990;16:207-210.

172. Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Malganji G, Lotfi M, Dadresanfar B, Saghiri AM, Dadvand S. A study of the relation between erosion and microhardness of root canal dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009;108:e29-34.

173. Saito K, Webb TD, Imamura GM, Goodell GG. Effect of shortened irrigation times with 17% ethylene diamine tetra-acetic acid on smear layer removal after rotary canal instrumentation. J Endod. 2008;34:1011-4.

174. Saleh AA, Ettman WM. Effect of endodontic irrigation solutions on microhardness of root canal dentine. J Dent. 1999;27:43– 6.

175. Santos MC, Souza AP, Gerlach RF, Tabchoury CM, Line SR. Inhibition of human gelatinases (matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9) activity by zinc oxide: a possible mechanism to enhance wound healing. Br J Dermatol. 2001;145:854-5.

176. Sarkar NK, Caicedo R, Ritwik P, Moiseyeva R, Kawashima I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. J Endod. 2005;31:97–100.

177. Sassone LM, Fidel RA, Murad CF, Fidel SR, Hirata R Jr. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine by two different tests. Aust Endod J. 2008;34:19-24.

178. Saunders WP, Saunders EM. Coronal leakage as a cause of failure in root-canal therapy: a review. Endod Dent Traumatol. 1994;10:105-8.

179. Sayin TC, Serper A, Cehreli ZC, Kalayci S. Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. J Endod. 2007;33:581-4.

180. Sayin TC, Cehreli ZC, Deniz D, Akcay A, Tuncel B, Dagli F, Gozukara H, Kalayci S. Time-dependent decalcifying effects of endodontic irrigants with antibacterial properties. J Endod. 2009;35:280-3.

181. Scelza MZ, Linhares AB, da Silva LE, Granjeiro JM, Alves GG. A multiparametric assay to compare the cytotoxicity of endodontic sealers with primary human osteoblasts. Int Endod J. 2012;45:12-8.

182. Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB. Prevalence, phenotype, and genotype of oral *Enterococci*. Oral Microbiol Immunol 2004;19:95–101.

183. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. Int Endod J. 2005;38:735-42.

184. Sedgley C, Nagel A, Shelburne C, Clewell D, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral Enterococcus faecalis in humans. Arch Oral Biol. 2005:50:575–583.

185. Sedgley CM. The influence of root canal sealer on extended intracanal survival of Enterococcus faecalis with and without gelatinase production ability in obturated root canals. J Endod. 2007;33:561-6.

186. Sedlock DM, Bailey DM. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis[pyridine] germicidal agent. Antimicrob Agents Chemother. 1985;28:786-90.

187. Serper A, Calt S. The demineralizing effects of EDTA at different concentrations and pH. J Endod. 2002;28:501-2.

188. Shani S, Friedman M, Steinberg D. The anticariogenic effect of amine fluorides on Streptococcus sobrinus and glucosyltransferase in biofilms. Caries Res. 2000;34:260 –7.

189. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. J Endod. 2002;28:313-5.

190. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. Int Endod J. 2001;34:120-32.

191. Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of Enterococcus faecalis in a mouse peritonitis model. J Infect Dis. 1998;178:1416-20.

192. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Abad EC, Castro AJ, Gahyva SM. Bacterial leakage in coronally unsealed root canals obturated with 3 different techniques. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2000;90:647-50.

193. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. J Endod. 2000;26:331-4.

194. Siqueira JF Jr, Rôças IN Optimising single-visit disinfection with supplementary approaches: a quest for predictability. Aust Endod J. 2011;37:92-8.

195. Sjogren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Int Endod J. 1991;24:119–25.

196. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1997;30:297-306.

197. Slee AM, O'Connor JR. In vitro antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. Antimicrob Agents Chemother. 1983;23:379-84.

198. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. J Endod. 2004;30:880-2.

199. de Souza CA, Colombo AP, Souto RM, Silva-Boghossian CM, Granjeiro JM, Alves GG, Rossi AM, Rocha-Leão MH. Adsorption of chlorhexidine on synthetic hydroxyapatite and in vitro biological activity. Colloids Surf B Biointerfaces. 2011;87:310-8.

200. Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials:3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1973;36:856 –71.

201. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. J Endod. 2010;36:1558-62.

202. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. Int Endod J. 2012;45:363-71.

203. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. Annu Rev Microbiol. 2002;56:187-209.

204. van Strijp AJ, van Steenbergen TJ, ten Cate JM. Effects of chlorhexidine on the bacterial colonization and degradation of dentin and completely demineralized dentin in situ. Eur J Oral Sci. 1997;105:27-35.

205. Stuart CH, Schwartz AS, Beeson TJ, Owatz CB. Enterococcus faecalis: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. J Endod. 2006;32:93-8.

206. Subramanian K, Mickel AK. Molecular analysis of persistent periradicular lesions and root ends reveals a diverse microbial profile. J Endod. 2009;35:950-7.

207. Sum C, Mohanty S, Gupta PK, Kishen A. Influence of endodontic chemical treatment on Enterococcus faecalis adherence to collagen studied with laser scanning confocal microscopy and optical tweezers: a preliminary study. J Biomed Opt. 2008;13:044017.

208. Sunde PT, Olsen I, Gobel UB, et al. Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of bacteria in periapical lesions of asymptomatic root-filled teeth. Microbiology. 2003;149:1095–102.

209. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic trteatment of apical periodontitis. In: Orstavik D and Pıtt Ford TR, editors. Essential Endodontology. Oxford: Blackwell Science; 1998.

210. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85:86 –93.

211. Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. Endod Topics. 2004;9:27–36.

212. Şen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of *Candida albicans* to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2003;96:201-6.

213. Takeda FH, Harashima T, Kimura Y, Matsumoto K.. A comparative study of the removal of smear layer by three endodontic irrigants and two types of laser. Int Endod J. 1999;32:32–9.

214. Tandjung L, Waltimo T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R. Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. Int Endod J. 2007;40:845-51.

215. Tay FR, Gutmann JL, Pashley DH. Microporous, demineralized collagen matrices in intact radicular dentin created by commonly used calcium-depleting endodontic irrigants. J Endod. 2007:33:1086-90.

216. Tay FR, Pashley DH. Biomimetic remineralization of resin-bonded acid-etched dentin. J Dent Res. 2009;88:719-24.

217. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic *Enterococci*: new developments in the 21st century. Cell Mol Life Sci 2003;60:2622–36.

218. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. Regulation of autolysis-dependent extracellular DNA release by Enterococcus faecalis extracellular proteases influences biofilm development. J Bacteriol. 2008;190:5690-8.

219. Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. 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. 2009;108:117-20.

220. Tirali RE, Bodur H, Ece G. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite, chlorhexidine gluconate and octenidine dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2012;17:e517-22.

221. Tronstad L, Barnett F, Cervone F. Periapical bacterial plaque in teeth refractory to endodontic treatment. Endod Dent Traumatol. 1990;6:73.

222. Türkün M, Gökay N, Özdemir N. Farklı endodontik yıkama solüsyonlarının toksik ve nekrotik doku çözücü etkilerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi. İ.Ü. Dişhekimliği Fak. Derg. 1998;32:87-94.

223. Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. Int Endod J. 2010;43:2-15.

224. Vollenweider M, Brunner TJ, Knecht S, et al. Remineralization of human dentin using ultrafine bioactive glass particles. Acta Biomater. 2007;3:936-43.

225. Wagner KH, Jürss A, Zarembach B, Elmadfa I. Impact of antiseptics on radical metabolism, antioxidant status and genotoxic stress in blood cells: povidone-iodine versus octenidine dihydrochloride. Toxicol In Vitro. 2004;18:411-8.

226. Wang L, Dong M, Zheng J, Song Q. Relationship of Biofilm Formation and gelE Gene Expression in Enterococcus faecalis Recovered from Root Canals in Patients Requiring Endodontic Retreatment. J Endod. 2011;37:631–636.

227. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. J Endod. 2012;38:1376-9.

228. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal uncultured inhabitants of a well-studied thermal community. FEMS Microbiol Rev 1990;6:105–15.

229. Waters NE 1980. Some mechanical and physical properties of teeth. In: Vincent JFK, Curry JD eds. The Mechanical Properties of Biological Materials. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 108.

230. Waters CM, Antiporta MH, Murray BE, Dunny GM. Role of the Enterococcus faecalis GelE protease in determination of cellular chain length, supernatant pheromone levels, and degradation of fibrin and misfolded surface proteins. J Bacteriol. 2003;185:3613-23.

231. Wayman BE, Kopp WM, Pinero G J, Lazzari EP. Citric and lactic acids as root canal irrigants in vitro. J Endod. 1979;5:258-65.

232. Wells OC, Gignac LM, Murray CE, Frye A, Bruley J. Use of backscattered electron detector arrays for forming backscattered electron images in the scanning electron microscope. Scanning. 2006;28:27-31.

233. White JM, Goodis HE, Marshall SJ, Marshall GW. Sterilization of teeth by gamma radiation. J Dent Res. 1994;73:1560-7.

234. Xu HS, Roberts N, Singleton FL, Attwell RW, Grimes DJ, Colwell RR. Survival and viability of non-culturable *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* in the estuarine and marine environment. Microbial Ecol. 1982;8:313–23.

235. Yang SE, Cha JH, Kim ES, Kum KY, Lee CY, Jung IY. Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of Enterococcus faecalis to bovine dentin. J Endod. 2006;32:663-7.

236. Zamany A, Safavi K, Spångberg LS.The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003;96:578-81.

237. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. J Endod. 2005;31:817–20.

238. Zehnder M. Root canal irrigants J Endod. 2006;32:389-98.

239. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. Int Endod J. 2009;42:277-87.

240. Zehnder M, Wegehaupt FJ, Attin T. A first study on the usefulness of matrix metalloproteinase 9 from dentinal fluid to indicate pulp inflammation. J Endod. 2011;37:17-20.

241. Zehnder M, Paque F. Disinfection of the root canal system during root canal re-treatment. Endod Topics. 2011;19:58-73.

242. Zhu X, Wang Q, Zhang C, Cheung GS, Shen Y. Prevalence, phenotype, and genotype of Enterococcus faecalis isolated from saliva and root canals in patients with persistent apical periodontitis. J Endod. 2010;36:1950-5.

243. Zoletti GO, Pereira EM, Schuenck RP, Teixeira LM, Siqueira JF Jr, dos Santos KR. Characterization of virulence factors and clonal diversity of Enterococcus faecalis isolates from treated dental root canals. Res Microbiol. 2011;162:151-8.

244. Zumtobel M, Assadian O, Leonhard M, Stadler M, Schneider B. The antimicrobial effect of Octenidine-dihydrochloride coated polymer tracheotomy tubes on Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa colonisation. BMC Microbiology 2009;9:150.

245. Zvab U, Marušič MB, Stangar UL. Microplate-based assays for the evaluation of antibacterial effects of photocatalytic coatings. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;96:1341-5.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR
DEĞERLENDİRME KOMİSYONU

Toplantı sayısı : 2011/02	Toplantı tarihi : 08.02.2011

Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalından Doç.Dr.Ayçe ÜNVERDİ ELDENİZ ve aynı Anabilim Dalından Araştırma Görevlisi Dt.Mehmet Burak GÜNEŞER tarafından sunulan **" Endodontik olarak işlem görmüş dentin kollejenine *Enterococcus faecalis*'in adezyonunda bu bakterinin ürettiği jelatinaz enziminin etkisi"** başlıklı araştırma projesi 11 üyenin katılımı ile değerlendirildi.

Değerlendirme sonucunda, Projenin, Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Yönergesi İlkelerine uygun olduğundan **"kabulüne"** oybirliği ile karar verildi.

Prof.Dr.Faruk Ayhan BAŞÇİFTÇİ
Başkan

Prof.Dr.Mihtikar GÜRSEL
Üye

Prof.Dr.Nimet ÜNLÜ
Üye

Prof.Dr.Doğan DOLANMAZ
Üye

Prof.Dr.Duygu FINDIK
Üye

Prof.Dr.A.Nilgün ÖZTÜRK
Üye

Prof.Dr.Ender ERDOĞAN
katılmadı

Doç.Dr.Abdullah DEMİR
Üye

Doç.Dr.Yağmur ŞENER
katılmadı

Doç.Dr.Funda KONT ÇOBANKARA
Üye

Yrd.Doç.Dr.Füsun YAŞAR
Raportör

Yrd.Doç.Dr.Hüsamettin VATANSEV
Üye

Yrd.Doç.Dr.Fatih KARA
Üye

10. ÖZGEÇMİŞ

17 Nisan 1985 tarihinde Kırıkkale'de doğdu. İlköğrenimini Kırıkkale Mustafa Necati İlköğretim Okulu, orta ve lise öğrenimini Kırıkkale Anadolu Lisesinde tamamladı. 2003 yılında girmeye hak kazandığı Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Selçuk Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim dalında doktora öğrenimine başladı.