

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**FARKLI İRRİGASYON SOLÜSYONLARININ ANTİFUNGAL VE
YUMUŞAK DOKUDAKİ HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. GULNARA ALİMZHANOVA-KOYLU

TEZ DANIŞMANI

PROF.DR. EMİN TÜRKÖZ

ANKARA

Şubat 2007

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DİŞ HASTALIKLARI VE TEDAVİSİ ANABİLİM DALI

**FARKLI İRRİGASYON SOLÜSYONLARININ ANTİFUNGAL VE
YUMUŞAK DOKUDAKİ HİSTOPATOLOJİK ETKİLERİNİN
İNCELENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Dt. Gulnara ALİMZHANOVA-KOYLU

TEZ DANIŞMANI:

PROF.DR. EMİN TÜRKÖZ

Bu tez Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 03/2005-13 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA

Şubat 2007

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

Kabul ve Onay

i

İçindekiler

ii

1. GİRİŞ ve AMAÇ

1

2. GENEL BİLGİLER

4

3. GEREÇ ve YÖNTEM

29

4. BULGULAR

41

5. TARTIŞMA

75

6. SONUÇ

92

7. ÖZET

95

8. SUMMARY

97

9. KAYNAKLAR

99

10. EKLER

10.1 Etik Kurul İzni

117

10.2 Teşekkürler

118

11. ÖZGEÇMİŞ

120

GİRİŞ ve AMAÇ

Başarılı bir endodontik tedavinin asıl amacı, kök kanal sisteminde bulunan organik ve inorganik materyallerin, periapikal dokular açısından enfeksiyon riski taşıyan tüm mikroorganizmaların ve toksik ürünlerin uzaklaştırılmasından sonra, ideal temizleme ve şekillendirme işlemlerinin gerçekleştirilerek kök kanalının hermetik olarak üç boyutlu bir şekilde doldurulmasıdır¹.

Kanalların temizlenebilmesi için yıkama solüsyonlarının (irrigan) kullanılmasına ihtiyaç vardır. Günümüze kadar konsantre asitler de dahil olmak üzere çok sayıda madde kök kanallarının yıkanmasında kullanılmıştır. Kök kanal tedavisi sırasında kullanılan yıkama solüsyonlarının ideal olarak kuvvetli antimikrobiyal etki göstermesi ve bununla beraber toksisitesinin de en az düzeyde olması beklenir. Kanal preparasyonunda çeşitli irriganlar kullanılmıştır. Saline, hidrojenperoksit (H_2O_2), alkol ve sodyum hipoklorit ($NaOCl$) bunlar arasındadır.

Modern tedavi uygulamalarında kök kanallarının yıkanması için sodyum hipoklorit'in çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri ya yalnız başına yada diğer kök kanal yıkayıcıları ve şelasyon ajanları ile birlikte kullanılır. Kullanılan solüsyonlar, periapikal dokuları irrite etmeden, kök kanal boşluğunda kalmış olan pulpa dokusu artıklarını, nekrotik debris ve bakterileri uzaklaştırmaya yardım etmelidir. "Kanaldan çıkarılanlar, kanal içine yerleştirilenlerden daha önemlidir"

hipotezi gereğince, daha temiz bir kanal sağlayan solüsyon veya solüsyon kombinasyonları daha büyük bir klinik başarı sağlayacaktır². Kök kanallarının genişletilmesi sırasında kanal duvarında bir “smear” tabakasının oluştuğu 1970’li yıllarda yapılan araştırmalarda gözlenmiştir³. Smear tabakasının incelenmeye başlamasından sonra, kök kanallarının temizlenmesi işlemlerinde amaç, bu tabakanın kaldırılarak dentin kanallarının ağzlarının açık hale getirilmesi olmuştur. Böylece, hem antiseptiklerin dentin içine daha kolay etki edebileceği ve hem de kanal dolgu maddelerinin dentin kanallarının içine girerek daha iyi tutunabilecekleri düşünülmüştür. Smear tabakasının kaldırılması amacı ile öncelikle NaOCl solüsyonlarının ve şelasyon ajanlarının kullanılması düşünülmüştür. Yapılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlardaki ve hacimlerdeki NaOCl solüsyonlarının, diğer kanal yıkama solüsyonlarının ve çeşitli şelasyon ajanlarının tek tek veya birlikte kullanılmalarının smear tabakası üzerine etkileri incelenmiştir^{4,5,6}. Araştırmacılar, “debris”in uzaklaştırılmasında çeşitli konsantrasyonlardaki NaOCl solüsyonlarının yüzeysel debris’i yok ettiğini, fakat kanal duvarlarının, dentin kanal ağzlarını tıkayan bir “smear tabakası” ile örtülü kaldığını açıklamışlardır. Bu durum araştırmacıları NaOCl’i destekleyici ve “smear” tabakasını kaldırmada etkili, aynı zamanda antibakteriyel özellik taşıyan yeni bir kök kanal temizleyici geliştirmeye yönlendirmiştir. Bir antibiyotik, asit ve deterjan karışımı olarak 2003 yılında literatüre giren MTAD, “BioPure” ticari ismi ile yeni kök kanal final temizleyici solüsyonu olarak piyasaya sürülmüştür⁷. Bu karışımda antibiyotik olarak tetrasiklin izomeri olan doksisisiklin, asit olarak sitrik asid, deterjan olarak ise Tween-80 kullanılmıştır. Bu madde ile yapılan

alışmalar, inatçı ve sekonder endodontik enfeksiyonlarda önemli rol oynayan mantarlara karşı etkisi konusunda yetersizdir. Bizim bir çalışmamızda da antibiyotik-asit-deterjan karışımı solüsyonların fungusidal etkisinin şüpheli olduğu ortaya ıkmıştır⁸.

Bu nedenle araştırmamızda, değişik kanal temizleyici solüsyonların antifungal etkileri ve doku reaksiyonları incelenmiştir.

GENEL BİLGİLER

Endodontik tedavinin başarısı kök kanallarının mekanik preparasyonu, irrigasyonu ve dezenfeksiyonunu takiben, sızdırmaz biçimde doldurulması gibi işlemlerin tam ve eksiksiz biçimde yerine getirilmesine bağlıdır. Kök kanallarının temizlenip şekillendirilmesinde, genişletme için enstrümanların kullanımı yanında, işlemin tamamlayıcı bir bölümü olarak irrigasyonun da yapılması gerekir.

İrrigasyon, endodontik tedavinin olmazsa olmaz bir safhasıdır ve yararları şu şekilde sıralanır^{1,9,10}:

- 1) Kanalin ıslatılması, enfekte materyal, yumuşak ve sert doku artıklarının fiziksel ve kimyasal olarak uzaklaştırılması
- 2) Kök kanal mikroorganizmaları üzerinde antimikrobik etki
- 3) Kök kanal sistemindeki artık organik materyallerin eritilmesi
- 4) Lubrikasyonla kanal aletlerinin çalışmalarının kolaylaştırılması
- 5) Smear tabakasının uzaklaştırılması
- 6) Mekanik preparasyon metodları ile ulaşılamayan alanların temizlenmesi ve
- 7) Yukarıdaki hususları gerçekleştirerek kanal dolgusunun daha çabuk, kolay ve emin bir şekilde uygulanabilmesidir.

İdeal bir irrigandan etkin bir dezenfeksiyon işlemi için beklenenler ise^{1,11,12};

- 1) Doku ve debrisleri eritebilmesi,
- 2) Dişin çevre dokularına antijenik, toksik ve karsinojenik etki göstermemesi,
- 3) Düşük yüzey gerilimi göstererek girilemeyen alanlara etki edebilmesi,
- 4) Lubrikasyon özelliği göstererek enstrümanların kanalda kaymalarını kolaylaştırması,
- 5) Dezenfektan özelliği taşıması ve bu özelliğini kullanım sonrası kök kanallarında bir süre daha devam ettirebilmesi,
- 6) Smear tabakasını kaldırabilmesi, dentin dokusuna olumsuz etkisinin olmaması,
- 7) Kanalda kolay nötralize olmaması,
- 8) Kanal dolgu maddesine olumsuz etkisinin olmaması,
- 9) Daimi kron restorasyonların pulpa odası duvarına bağlanma kuvvetine olumsuz etki göstermemesi,
- 10) Dişin rengini değiştirmemesi,
- 11) Uygulanmasının kolay olması,
- 12) Maliyetinin düşük olması,
- 13) Raf ömrünün uzun olması,
- 14) Kolay saklanabilmesi'dir.

Kök kanalının preparasyonunda sıklıkla kullanılan irrigasyon solüsyonları: serum fizyolojik, NaOCl, klorheksidin (CHX), MTAD, cetrexidine, kalsiyum hidroksit ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) ve şelasyon ajanları, asitler, lubrikantlar, dessikantlar gibi diğer ajanlardır.

NaOCl yıllardır endodontide irrigasyon solüsyonu olarak kullanılmaktadır. Kemomekanik preparasyon esnasında nekrotik ve canlı dokular için çözücü etkiye sahip olması^{10,13-15} ve antiseptik özelliğinin bulunması nedeniyle tavsiye edilmektedir. Ancak NaOCl'in periapikal dokulara taşırıldığında şiddetli doku reaksiyonlarına¹⁶⁻¹⁸ ve dayanılmaz ağrılara neden olduğu bildirilmiştir. Modern tedavi uygulamalarında kök kanallarının yıkanması için NaOCl'in çeşitli konsantrasyonlardaki çözeltileri, güçlü bir antimikrobiyal ajan olarak kullanılmaktadır. Ancak, smear tabakasının uzaklaştırılmasında yetersiz kalması ve inatçı *Enterococcus*, *Actinomyces* ve *Candida* türleri üzerinde etki gösteremediğinden, NaOCl'in birden fazla solüsyon ile bir arada kullanılması gündeme gelmiştir¹⁹.

Son yıllarda özellikle antibiyotik içeren yeni kök kanal irrigasyon solüsyonları geliştirilmiştir. Antibiyotiklerin bilinçsiz kullanılması sonucu dirençli bakteri türlerinin oluşması, bu irriganların kullanımında tartışmalara neden olmuştur. Lokal antibiyotiklerin pansuman ilacı olarak kullanılmasıyla konakçı duyarlılığındaki artış riskinin belli bir dereceye kadar önlendiği bildirilmiştir¹⁹.

Bunun nedeni, antibiyotiklerin canlı dokulara teması sınırlı olduğu için yüksek mikrobisit konsantrasyonlarda kullanılabilmesidir. Eritromisin, kloramfenikol, tetrasiklin ve vankomisin gibi bazı antibiyotiklerle Enterokoklara karşı başarılı olduğu tespit edilmiştir. Yapılan bir çalışmada araştırmacılar²⁰, farklı antibiyotiklerin mikrobiyal etkinliklerini *in vitro* olarak değerlendirmişler ve Enterokok suşlarının benzilpenisilin, klindomisin, metronidazol ve tetrasikline dirençli, ancak eritromisin ve vankomisine duyarlı olduklarını bildirmişlerdir.

MTAD (Dentsply-Tulsa) son yıllarda geliştirilen doksisisiklin, sitrik asit ve yüzey aktif deterjan (Tween-80) içeren bir irrigasyon solüsyonudur¹¹. Araştırmacılar bir seri *in vitro* çalışmalarında^{7,21-25}, MTAD'nın smear tabakasını uzaklaştırma potansiyeline sahip olduğunu bildirmişlerdir. MTAD'nın düşük konsantrasyonlu NaOCl ile birlikte kök kanal irrigantı olarak kullanıldığında, dentin kanalcıklarının yapısında kaydadeğer bir değişiklik yaratmadığı tespit edilmiştir. Araştırmacılar tükürükle kontamine kök kanallarının dezenfeksiyonunda MTAD'nın etkisini de incelemişler ve NaOCl ile karşılaştırmışlardır. MTAD'nın bakterileri ortadan kaldırmada % 5.25'lik NaOCl'den daha etkili olduğu gösterilmiştir. Ayrıca MİK (minimal inhibisyon konsantrasyonu) metodu kullanılarak antibakteriyel aktivite değerlendirildiğinde, MTAD'nın 200 kere dilue edilse dahi *Eschericia faecalis*'e karşı etkinliğini koruduğu gösterilmiştir. Ancak klinik yararlarını ve sekonder endodontik enfeksiyonlardan sorumlu olduğu ileri sürülen mantarlar üzerindeki etkisini

araştıran sadece bir araştırma bulunmaktadır ve bu tek araştırma doğal olarak yeterli değildir¹⁹.

ENDODONTİK ENFEKSİYONLARDA MANTARLARIN ROLÜ

Çeşitli kaynaklara göre doğada 250.000-1.500.000 mantar (“fungus”) türü bulunmasına karşılık, bunlardan sadece 150-300’ünün omurgalı hayvanlarda ve insanlarda hastalığa neden olduğu bilinmektedir.

Patojenik mantarların büyük çoğunluğu *Ascomycota*, *Basidiomycota*, *Zigomycota* ve *Deuteromycota* olarak sınıflandırılmaktadır (Tablo-1).

Tablo-1. Tıbbi önemi olan mantarların sınıflandırılması ve bazı özellikleri

Sınıf	Özellikler	İnsan patojenlerine örnek
Zygomycota (Zygomycetes)	a. Sporangiospor b. Zigospor c. Bölmesiz hifler	<i>Rhizopus</i> ve <i>Absidia</i> türleri
Ascomycota (Ascomycetes)	a. Konidyumlar b. Askospor c. Bölmeli hif	<i>Penicillium</i> türleri <i>Histoplasma capsulatum</i> <i>Aspergillus nidulans</i>
Basidiomycota (Basidiomycetes)	a. Bazidiyospor b. Bazidiyum	<i>Filobasidiella neoformans</i> (<i>Cryptococcus neoformans</i>)
Deuteromycota (Deuteromycetes)	a. Her cins için tipik çeşitli konidyumlar b. Bölmeli ve bölmesiz hifler Eşeyli üreme biçimi yoktur	<i>Candida</i> türleri <i>Blastomyces dermatitidis</i> <i>Sporothrix schenckii</i> <i>Microsporum</i> türleri

Fırsatçı fungal patojenlerin en sık karşılaşılan türleri her ikisi de *Deuteromycota* grubuna dahil olan *Candida* ve *Aspergillus* ailelerinin üyeleridir. *Candida* türleri insanda yüzeysel hastalıklardan, hayatı tehdit eden yaygın mukozitislere kadar çeşitli enfeksiyonlara neden olmaktadır. Patojenik mantarların çoğu ekzojendir, ancak mikozlar yüksek oranlarda normal insan florasında bulunan mantarlar ile de oluşmaktadır. *Candida* türleri sağlıklı insanlarda oral kavite, gastrointestinal sistem, anüs, inguinal bölge, vajinal kanal ve vulvada bulunur. Bu endojen mantarların çoğu fırsatçı patojendir ve enfeksiyon genellikle, geniş spektrumlu antibiyotiklerin kullanımı, immünosupresyon ve koruyucu bariyerlerin devamlılığın bozulması gibi normal florada dengesizlik oluşturan durumlarda gelişir. Mantar enfeksiyonları genellikle “hastalığın hastalığı” olarak bilinir ve konağın etkilenebilmesi için uygun ortam gereklidir^{26,27}.

Mantarlar oral floranın çok küçük bir kısmını oluşturur. Fungal floranın büyük kısmını ise *Candida*’lar oluşturmaktadır. *C. albicans* hem sağlıklı hem de hasta kişilerin oral kavitelerinde en sık tespit edilen mantar türüdür. *C. albicans*’ın görülme insidansı sağlıklı yetişkinlerde % 30-45, HIV ile infekte kişilerde % 95 oranında bulunmuştur. Dilin dorsumu *C. albicans*’ın primer oral habitatı olup, diğer alanlarda sekonder olarak kolonize olur. Bu alanlar, mukoza ve supragingiva, dentin, kök, subgingiva ve periodontal ceplerdir. Oral kaviteden izole edilen diğer mantarlar: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, *C. inconspicua*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis* ve *Saccharomyces* türleridir²⁶.

Periradiküler hastalıkların etiyolojisinde rol oynayan mikroorganizmalara karşı ilgi, endodontik enfeksiyonlarda mantarların gösterildiği çalışmalarla artmıştır.

Mantarların morfolojik karakterleri

Mantarlarlar kemoorganotrop ökaryotik mikroorganizmalar olup mikroform veya makroform iki temel yapı gösterirler. Mikroform mantarlar tek hücreli mayalar ve çok hücreli küfler olarak bulunurlar. Bazı mantarlar ise hem maya hem de küf biçiminde gelişme gösterebilirler ve dimorfik mantarlar olarak tanımlanırlar^{26,27}.

Küf mantarı: uzun dallanan 2-10 µm çapında ipliksi yapılar içerir. Bu tübüler yapıya **hif** denir. Hifler bir araya gelerek **miçel** yapısını oluştururlar. Bu vejetatif yapı **tallus** olarak da adlandırılmaktadır. Miçelin besiyerindeki görünümüne **koloni** denir. Hifde enine oluşan duvara **septa** denir. Septumun oluşumu, yüksek oranda kitin içeren flamen halkaların gözükmeleriyle başlar. Hifler septalı veya septasız olabilir. Septada “**por**” adı verilen tek veya çok sayıda delikler bulunur. Porlar sitoplazma akışını sağlar²⁶.

Maya mantarı: Tek hücreli ve tek nükleuslu olup eşeysiz olarak tomurcuklanma ve enine/ çapraz bölünmeyle veya eşeyli olarak spor oluşturarak çoğalırlar. Her bir tomurcuk, ana hücreden ayrılarak yeni bir maya oluşturur.

Genellikle maya hücresi bakteri hücresinden büyüktür (4-5µm, bazıları 24µm). Yuvarlak, uzamış, küresel şekillerde olabilir. Kolonileri opak, nemli, mukoid (kapsüllü türlerde) genellikle krem-beyaz renkte, bazı türlerde pembe, siyah pigmentli, 0,5-3 mm büyüklükte olup bakteri kolonilerine benzer²⁶.

Maya mantarlarında hücre bölünmesi genellikle ilerleyici şekilde olur. Yeni hücre ana hücrenin küçük ve yeni gelişen bir formudur. Tomurcuklanma ile çoğalmada, hücre duvarının bir noktasının lizize uğraması sonucu iç basıncı zayıflayan bu noktadan, duvar dışarı doğru balonlaşma yapar. Bu kısım şişerek genişler ve bunu takiben ana hücre nukleusu bölünür. Mitozla çoğalan kromozom tomurcuklanan kısma göç eder. Tomurcuk ve ana hücre arasındaki duvarlar birbirlerine yaklaşır ve tomurcuk (**blastokonidiyum veya blastospor**) kopar. Ana hücre duvarı onarılmasına rağmen doğum skarı denilen iz kalır. Bazı mayalarda blastokonidiyumlar ana hücreden ayrılmanın peşi sıra uzarlar ve yeni tomurcuklanma olayları birbirini takip eder, sonuçta oluşan yapıya **yalancı hif (psödohif)** denir. Psödohifler filamentöz hücre zincirleri olarak gözüken uzamış mantar hücreleridir²⁸. Psödohiflerin oluşumu polarize hücre bölünmesi ile olur. Yalancı hif gerçek hiften hücre duvarının birbirine paralel olmaması, boğumlar şeklinde bir yapı göstermesi ve uç kısımdaki hücrenin tam altındaki hücreden küçük veya eşit olması ile ayrılır. Gerçek hiflerde uç kısımdaki hücre bir önceki hücreden genellikle uzundur. *Candida* cinsinde üreme şartlarına bağlı olarak yalancı ve gerçek hif oluşabilmektedir. Mayalardaki gerçek hif oluşumunda hücrenin boğum oluşturmada apikal uzamasına “**germ tüpü**”

denir^{26,27}. Buna ek olarak bazı durumlarda *C. albicans*, yuvarlak refraktil sporları bulunan ve kalın hücre duvarlar içeren **klamidosporları** oluşturur. Bu morfolojik geçişler genelde fungusların çevresel değişikliklere verdiği bir yanıttır ve mantarın değişik alanlara uyum sağlamasına izin verir²⁶.

Hücre Yapısı

Mantarlar nukleer membranla çevrili bir çekirdeğe sahiptir. Hücre membranları lipit ve glikoprotein içerir. Mitokondri, golgi aygıtı, ribozomlar, endoplazmik retikulum içeren sitoplazma, sitoplazma zarı, dışta hücre duvarı ve bazı türlerde (*Cryptococcus neoformans*, *Trichosporon beigelii*, *Rhodotorula*) görülen kapsül ile çevrilidir²⁶.

a) Hücre duvarı: Fungal hücre duvarı yapısal olarak bitki hücre duvarına benzer, ancak kimyasal olarak farklıdır. Elektron mikroskopunda dış yüzeyi fibriller, iç yüzü düz yapıda görülür. Fibriller tabaka yaşlanmış hücrelerde kalınlaşır. Bu tabaka plastik yüzeylere ve diğer ökaryotik hücrelere tutunmayı sağlar. Hücre duvarının kuru ağırlığının %80-90'ı karbohidratlardan, %10-20'si protein ve glikoproteinden oluşur. Karbohidratları mannan, glukan, galaktan, kitin, kitozan polimerleri oluşturur. Ayrıca mantar hücre duvarında selüloz, lipid (%1-7), inorganik tuzlar ve pigmentler de bulunmaktadır. *C. albicans*'ta polisakkarit içeriğinin %35-40'ı mannan, %20-40'ı β -glukanlar, %1-2'si kitindir. Kitin, N-asetilglukozaminin polimer yapısındadır^{26,29}.

Bazı mantarlar hücre duvarında selüloz içerirler. Hücre duvarındaki kitin veya selüloz mikrofibrilleri şekilsiz bir matriks içinde gömülü olarak bulunur ve hücre duvarını sağlamlaştırır. Bazı mantarların duvarlarında ise kitin veya selülozun yerine glukanlar, mannanlar, galaktosanlar ve çitosanlar gibi diğer polisakkaritler bulunur.

Fungal hücre duvarı, hücrenin korunması ve sağlamlığı için oldukça önemli bir yapıdır. Aynı zamanda mantar enfeksiyonunun patogeneğinde de önemli olup, konak hücre yüzeyi ile ilişkiyi sağlar ve güçlü bir antijenik özellik gösterir. Son yıllarda yapılan çalışmalar özellikle *C. albicans* hücre duvarında, ısı şok proteinleri, glikolitik enzimler, laminin, fibronektin bağlayan proteinler, entaktin, vitronektin reseptörü, C3, C3b, C3d gibi kompleman komponentlerine karşı reseptör bulunduğunu ortaya koymuştur.

b) Hücre zarı: İki tabakalı bir zardır. Fosfolipid, sfingolipid, protein, glikoprotein ve sterol içerir. Mantarların hücre zarında bulunan sterol, memeli hücreindeki kolesterolden farklı olan ergosterol yapısındadır. Bu özellik polien grubu antifungal ilaçların başarılı bir şekilde kullanımını sağlar. Örneğin amfoterisin B, ergosterole kolesterolden daha çok ilgi gösterir. Lipidlerin patojenik mantarlarda virulansın ve dimorfizmin düzenlemesinde önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Hücre zarı sıvı ve besinlerin difüzyonunu, aminoasit ve şekerlerin enerjiye bağımlı veya bağımsız geçirgenliğini kontrol eder.

Sitoplazmayı korur. Kapsüllü mantarlarda hücre duvarı kapsüler materyalin sentezini de sağlar²⁶.

Fungal patojenitenin mekanizmaları

Fungusların, hastalık oluşturulmasında patojenitelerinin önemi büyüktür. Patogenezle ilişkili olduğu düşünülen mekanizmalar:

- 1) Çeşitli çevresel koşullara uyum sağlayabilme
 - 2) Çeşitli yüzeylere yapışabilme
 - 3) Hidrolitik enzimler üretme
 - 4) Morfolojik değişim
 - 5) Biyofilm oluşturma
 - 6) Konak savunmasını aşma ve immün sisteme uyum
- dur.

- 1) Değişik çevresel durumlara uyum sağlama

Candidalar içinde özellikle ***C. albicans*** çok yönlü bir patojendir ve üzerinde en çok çalışılan mantar türüdür. Bu çok yönlülüğün ana komponenti, her biri kendi çevresinde yaşayabilen anatomik olarak birbirinden uzak vücut alanlarında, kommensal olarak yaşayabilmedir. Örneğin: ***C. albicans*** pH değişimi gibi durumlara uyum sağlayabilmektedir. Bu özellik bu türlere, kan akımının nötral pH'sında veya vajinal dokuların asidik pH'sı gibi değişik durumlarda

yaşama ve büyüme şansı verir. Bu uyum çevresel değişimlere adaptasyonu sağlayan gen tanımı ile mümkün olur³⁰.

2) Çeşitli yüzeylere tutunma

Candida hücreleri spesifik (ligand-reseptör interaksyonlar) ve nonspesifik (elektrostatik şarj, Van der Waals kuvvetleri) mekanizmalar ile dentin dahil olmak üzere çeşitli doku tiplerine bağlanabilirler. *Candida* yüzeyinde, konak dokulara yapışmasını (adhezyon) sağlayan yüzey molekülleri bulunmaktadır. Bunlardan bir tanesi insan CR3 integrinine homoloji gösteren bir reseptördür ve bu reseptör ile C3bi, fibrinojen, fibronektin, laminin ve vitronektin üzerindeki RGD (arginin-glisin-aspartik asid) gruplarına bağlanır. İkincisi, epitelyal hücrelerin yüzeyindeki şekerlere bağlanan bir lektin, üçüncüsü ise konakçı hücreler ve dokulardaki lektin benzeri molekülleri bağlayan mannoz içeren proteinlerdir^{31,32}.

C. albicans' in extracellular matriks proteinlerine, tip I kollajene ve fibronektine bağlanması dentinde de çokça bulunan ekstrasellüler kalsiyum varlığına bağlıdır^{29,33}. Ayrıca *Candida* türleri bazı oral bakterilerle koagregasyon köprüleri oluşturmaktadırlar³⁴⁻⁴⁰. Mikroorganizmaların ağız-diş dokularına tutanabilmelerinin dışında birbirlerine tutunabilmelerine koagregasyon denir. Örneğin; *C. dubliniensis*, *Fusobacterium nucleatum* ile ve *C. tropicalis*, *Streptococcus gordonii* ile böyle köprüler oluştururlar^{37,38}. Grimaudo ve

arkadaşları³⁶ oral *actinomyces*'lerin çeşitli *C. albicans* zincirleri ile beraber bulunduğunu göstermiştir. Bu koagregasyonlar büyük olasılıkla *candida*'ların yüzeyindeki bir protein ile *aktinomiçes*'lerin yüzeyindeki karbonhidratlar ve karbonhidrat içeren moleküller arasında bağlanmayla olmaktadır. Grimaud ve Nessbit³⁵, *F. nucleatum*, *F. periodonticum* ve *Eubacterium sulci*'nin değişik derecelerde *C. albicans* ile birleştiğini göstermişlerdir. Başka araştırmacılar^{37,39} da *C. albicans*'ın *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus oralis* ve *Streptococcus anginosus* ile birleştiğini ancak *Streptococcus mutans* ve *Enterococcus faecalis* ile birleşmediğini göstermişlerdir. Bu etkileşimler belki de farklı mikrobiyal ortamların oluşmasına sebep olmaktadır. Diğer mikroorganizmalarla koagregasyon veya koaglutinasyon reaksiyonları, oral mukoza ve sert dokularda kolonizasyon^{34,36,39} ve *in vitro* ortamda *C. albicans*'ların total plak oluşumunda önemli bir artış sağlamasına neden olmaktadır^{40,41}.

3) Hidrolitik enzimlerin üretimi

C. albicans periradiküler dokuların hasarında rol oynayabilecek hidrolitik enzimler üretmektedir. Salgısal aspartil proteinaz (Sap), kollagenaz, aminopeptidaz, glukoaminidaz, asit ve alkalin fosfataz, hyaluronidaz ve kondroitin sülfataz gibi enzimlerin salgılanması ekstrasellüler matriks proteinleri üzerinde degradasyon etkisi yaratmaktadır^{30,42}. Bu fungal türler tarafından üretilen

kollajenolitik enzimlerin, insan dentin kollajenini degrade ettiği gsterilmiřtir⁴³. Fosfolipazlar konak hücrenin membranını hasara uğratırlar, fosfolipitlerin yıkımı ile membranın stabilizasyonunu bozar ve hücresel lizise neden olurlar. Fosfolipaz aktivitelerinin çoğunluğu doku invazyonu sırasında hif tepelerinde izlenmiřtir⁴⁴.

4) Morfolojik değişim

C. albicans blastospor ve hif formlarında bulunduğundan sıklıkla dimorfik bir mantar olarak tanımlanmaktadır. Aslında evresel koşullara bağlı olarak blastospor, germ tüpleri, gerçek hifler, psödohifler ve klamidosporlar gibi çeşitli morfolojik biçimlerde gelişebileceğinden polimorfik mantar olarak da dşnlebilir^{45,46}. Klamidosporlar dışında her tür birbirine dönüşür. Blastosporlardan hif formuna geçişin kommensal yaşamdan patojenik duruma geçişi gsterdiği bildirilmiştir^{47,48}. Ancak bu konseptin doğruluğu uzun süredir kabul grmemektedir⁴⁹. Büyüyen hifin özellikleri, konak dokularına invaze olma ve makrofajların fagositozundan kaçma şeklinde değişir. Mayadan hiflere dönüşüm önemli olmasına rağmen bu dönüşüm enfeksiyon için her zaman gerekli değildir. Buna rağmen *C. albicans* tarafından oluşturulan bir çok enfeksiyon hem mantar, hem de filamentöz morfolojik formlardan oluşmaktadır. Bu durum her ikisinin de hastalığın gelişimi ve ilerlemesinde rolü olduğunu gstermektedir. Mantar hücrelerinin konak hücreleri tarafından tanınan bazı proteinler de içerdiği gsterilmiřtir⁵⁰.

5) Biofilm oluşumu

Biofilm oluşumu, aynı türden gelen mikroorganizmaların, kendilerince oluşturulan bir yüzey altında kümelenmeleridir.

C. albicans değişik yüzeylerde biofilm oluşturma yeteneğine sahiptir. Bu özellik, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* gibi daha az biofilm oluşturma özelliğine sahip türlerden daha fazla patojen olmasının nedenlerinden birisidir. Donlan ve Costerton'a⁵¹ göre biofilm, bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak bağlanan mikroorganizma topluluğudur, ekzopolimerik matriks içerir ve diğerlerinden farklı fenotipik özellikler göstermektedir. Biofilm oluşumu topluluğa başka avantajlar da sağlamaktadır. Örneğin, potansiyel tehlikelere karşı korunma gibi. Biofilmlerde olduğu gibi sesil haldeki hücreler, antimikrobiyal ajanlara planktonik hücrelerde olan nomodik tiptekilerden daha dirençlidir. Biofilm içinde büyüyen *C. albicans* hücreleri “100 kat” fazla olabilir ve antifungal flukonazole daha dirençli olabilir. “20-30 kat” fazla olanlar antifungal amfoterisin B’ye planktonik hücrelerden daha dirençlidir.

6) Konak savunmasını aşma ve immünomodülasyon

C. albicans değişik mekanizmalar sonucunda konak savunmasından kaçabilir. Polimorfonükleer nötrofiller *C. albicans*’a karşı savunmada en önemli enflamatuvar hücrelerdir⁵². Bu türler polimorfonükleer nötrofil fonksiyonlarını, oksijen radikal üretimi, degranülasyon ve monositlerin

öldürülmesi yoluyla bloke eder. *Candida* türleri konak savunma moleküllerinden, IgG1, IgA1, IgA2 gibi immünoglobulinler ve degrade kompleman faktörleri gibi proteinazların üretimi yoluyla kaçarlar.

Glukan, kitin ve mannoproteinler gibi hücre duvarı içerikleri periradiküler lezyonların patogeneğinde indirekt bir mekanizma ile görev alırlar. *C. albicans*, proinflamatuvar sitokin sentezi ve makrofajların, endotelial hücrelerin ve fibroblastların salınımdan sorumludur.

Funguslar kompleman sistemini aktive ederler. Kompleman aktivasyonunun ürünleri vasküler permeabilitede değişimler yaratabilen C_{3a}, C_{4a}, C_{5a}'e, lökositlere kemotaktik olabilen C_{5a}'e, fagositozu kolaylaştıran C_{3b} gibi opsoninlere dönüşebilirler⁴. *C. albicans* enfeksiyonuna cevap olarak aktive olan kompleman sisteminin aktivasyonundan sorumlu en az 2 muhtemel mekanizma vardır. Bunlardan biri IgG antikorunu içerir. Bu *C. albicans* mannanına reaktif ve kompleman aktivasyonunun klasik yoldan olmasını sağlar. Diğer ise *C. albicans* yüzeyi için oldukça önemli olan mannani direkt etkiler. Serum-mannan bağlayıcı proteini lektindir ve sağlıklı erişkinlerinde yüksek konsantrasyonlarda bulunur. Serum-mannan bağlayıcı proteini yapısal olarak C1q'ya benzerdir. Bu C1'in alt komponentidir. IgG ve IgM antikorlarının Fc bölgelerininin uygun antijenle bağlanmasını sağlar ve kompleman sistemini klasik yoldan aktive eder. Serum-mannan bağlayıcı proteinlerinin karbonhidrat yapılarına bağlanması, kompleman aktivasyonunun lektin yoluyla olmasını sağlar²⁸.

Primer endodontik enfeksiyonlarda mantarların rolü

Mantarlar bugüne kadar primer endodontik enfeksiyonlarla ilişkili mikrobiota'nın bir üyesi olarak gösterilmemiştir⁵³. Ancak kültür, moleküler genetik metodlar ve *in situ* elektron mikroskobu kullanan bazı araştırmacılar varlıklarını göstermiştir. Möller ve arkadaşları⁵⁴ kronu sağlam nekrotik pulpalı dişlerden elde edilen 29 örneğin 1'inde *C. albicans*'a ait pozitif büyüme göstermiştir. Debelian ve arkadaşları⁵⁵ asemptomatik periradiküler lezyonlu 26 kökün 1'inde *Saccharomyces cerevisiae* izole etmişlerdir. Aynı zamanda bu fungal türleri endodontik tedavi gören hastaların kanlarında da tespit etmişlerdir. Lana ve arkadaşları⁵⁶ ilk defa enfekte olan kök kanallarına sahip 2 hastada *C. tropicalis*, 27 hastanın 1'sinde *Sacchoromyces cerevisiae* izole etmişlerdir. Baumgartner ve arkadaşları⁵⁷ 24 kök kanalının 5'inde PCR yöntemi ile *C. albicans* tespit etmişlerdir. Bunun aksine Siqueira ve arkadaşları⁵⁸ da PCR taramasını kullanarak 50 enfekte kanalın sadece 1'sinde fungus tespit etmişlerdir. Şen ve arkadaşları⁵⁹ periradiküler lezyonlarla ilişkili olarak çekilmiş 10 dişin 4'ünün kök kanallarında mantar bulmuşlardır. Örneklerin birinde hif yapıları izlenmiştir. Siquera ve arkadaşları⁶⁰ primer kök kanal enfeksiyonlarında mikrobiyal kolonizasyon şekillerini SEM ile incelemişler ve değerlendirdikleri 15 dişin birisinde mantara benzer hücreler bulmuşlardır. Bunlar üremeleri sırasında geniş koloniler oluşturmaktadır. Ek olarak, periapikal kök yüzeylerinin

rezorbsiyon alanlarında ve periradikular granülomalarda mantar hücreleri gösterilmiştir²⁸.

İnatçı ve sekonder endodontik enfeksiyonlarda mantarların rolü

Mayaların tedavi edilmemiş enfekte kök kanallarında sayıca az olmaları (%5.7) ve tekrarlayan kök kanal tedavilerinde sayıca çoğalmaları (%16) bu mikroorganizmaların kök kanal tedavisi sırasında ortama infiltre olabileceği savını güçlendirmektedir. Araştırmacılar^{34,39,59}, bunun nedenini daimi veya geçici kök kanal restorasyonlarına yada dentin kanalcıkları içine penetre olmuş *Candida* suşlarının çoğalması olarak görmektedirler.

Mantarların dentin kolonizasyonundaki rolü

Kök kanal sistemi enfeksiyonunda dentin kolonizasyonu önemli bir aşamadır. Kolonize olabilen mikroorganizmalar, kolonize olamayanlara göre yer ve besinden yararlanabilme açısından avantaj kazanırlar. Buna ek olarak, dentin kanalcıklarına invazyon, mikrobiyal hücreleri kanal içi işlemlerin etkilerinden korur ve inatçı kök kanal enfeksiyonlarının ortaya çıkmasında önemli rol oynar. Mantarlar ortalama 1-6µm, hifler ise genellikle 1,9-2,6µm çapındadırlar^{61,62}. Bu hücre çaplarına bakarak mantarların dentin kanalcıklarına yerleşebileceği düşünülebilir. Aslında bu öngörü bazı çalışmalarla da desteklemektedir; Şen ve

arkadaşları⁴⁶, insan radiküler dentini ile ilişkili olarak *C. albicans*'ın büyümesini incelemiş ve tüm örneklerde kök kanal duvarlarında blastospor ve hif yapıları gözlemlemişlerdir. Bu yapıların büyük çoğunluğu, özellikle psödohifler dentin kanalcıklarına penetre olmaktadır. *Candida*'ların hif yapılarındaki temas duyarlılığının (contact-sensing), tigmotropizm (hareket yeteneği taşıyan hücrenin, kendisine değen herhangi bir uyarıya gösterdiği yaklaşma hareketi)'den dolayı dentin invazyonunu kaçınılmaz hale getirdiği düşünülmektedir. Dentine olan bu invazyon afinitesinden dolayı *C. albicans*, dentinofilik bir mikroorganizma olarak tanımlanmaktadır. Başka bir çalışmada Şen ve arkadaşları⁴⁵ mine ve sementte de *C. albicans*'ın kolonize olduğu smear tabakası bulunması halinde, *candida* içeren kalın bir biofilm tabakası oluştuğunu göstermişlerdir. Bunun aksine, smear tabakasının olmadığı durumlarda ise biofilm tabakası izlenmemiş, uzak ve ayrı koloniler gözlenmiştir. Kolorimetrik bir çalışmada Şen ve arkadaşları⁶³ smear tabakasının *C. albicans*'ın dentine adhezyonunu artırdığını bildirmişlerdir. Artan adhezyonun dentindeki organik yapıyla ilişkili olduğu ve büyüme ve adhezyon için kalsiyum iyonlarının bir merkez oluşturduğu hipotezi öne sürülmüştür.

Bir *in vitro* çalışmada Waltimo ve arkadaşları⁶⁴, *C. albicans* hücrelerinin insan dentin kanalcıklarına penetrasyonunu incelemiş ve hem hif hem de mantar hücrelerinin hafif bir penetrasyonunu gözlemişlerdir. Çok az kanalcıkta invazyon görülmüş ve penetrasyon derinliği 60µm olarak tespit edilmiştir. Ancak, *C. albicans*'ın *in vivo* ortamda dentin kanalcıklarına invazyonu daha güçlüdür^{65,66}. *In vitro* ortamda daha az penetrasyon olmasının sebebi smear tabakasının

kaldırılması için kullanılan ajanlar olabilir. Genellikle smear tabakasının kaldırılması amacıyla NaOCl ve EDTA kullanılmaktadır. Bu işlem dentinin organik (özellikle kollajen) ve inorganik (özellikle Ca^{++}) içeriğinin azalmasına neden olur. Böylece dentin, daha az bağlanma ve penetrasyon gösteren *Candida* için uygun bir ortam olmaktan çıkar²⁸.

Siquiera ve arkadaşları⁶⁷ 5 fungal türün radiküler dentin kolonizasyonunu SEM ile incelemişlerdir; bunlar *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* ve *Saccharolitis cerevisiae* dir. Araştırmacılar bu türlerin her birinin diğerinden bağımsız, tek veya üremekte olan mantar hücreleri şeklindeki fungal formlar olduğunu bildirmişlerdir. Radiküler dentinde örneklerin çoğunda *C. albicans* kolonizasyonu görülürken, diğer dört türde çok az kolonizasyon görülmüş veya hiç izlenmemiştir. *C. albicans* dentin enfeksiyonunda değişik şekillerde gözlenmiştir. Bazı örneklerde dental yüzeylerde çok az kolonizasyon mevcutken, dentin kanalcıklarında kolonizasyon saptanmamıştır. Diğer örneklerde ise kök kanal duvarlarının bazı alanlarında geniş mantar kolonileri bulunmaktadır. Dentin kanalcıkları oldukça fazla enfektedir.

Mantarların antimikrobiyal endodontik ilaçlara direnci

Endodontistler uzun zamandır enfekte kök kanallarından fungusların eliminasyonunu sağlayabilecek doğru bir antimikrobiyal ajanın ihtiyacının farkındadır. Grossman'a göre⁶⁸: “endodontik tedavilerdeki problemlerden birisi de enfekte kök kanallarında *candida*’ların varlığıdır. Bu

organizmaların elimine edilmesi periapikal dokuların normal hale gelmesi ve sağlıklı olarak kalması için gereklidir” ve kanal içi ilaç olarak antifungal ajanların kullanılması gerekmektedir.

1950’lerden–1970’lere kadar antibiyotik preparatları, kanal içi ilaçlar olarak enfekte kök kanallarında kullanılmıştır. Bir çok antibiyotik patı, özellikle nistatin ve sodyum kaprilat gibi antifungal ajanlar içermiştir. Bu durum o dönemlerde de endodontik enfeksiyonlarda mantarların rolünün düşünüldüğünü göstermektedir.

Antifungal ilaçlar, kimyasal yapılarına göre polyenler, primidin türevleri ve azoller olmak üzere üç grupta incelenirler. Azoller son dönemlerde en geniş kullanılan ve çalışılan antifungal ajanlardır⁶⁹. Azoller, yapılarındaki azol halkasında bulunan nitrojen sayılarına göre iki sınıftan oluşurlar; iki nitrojen bulunduran imidazoller (mikonazol ve ketokonazol) ve üç nitrojen bulunduran triazoller (itrakonazol ve flukonazol)⁷⁰. Azol grubunda vorikonazol, posakonazol, ravukonazol gibi yeni geliştirilen antifungal bileşikler de bulunmaktadır⁷¹.

Azoller mantar plazma membranının ana bileşeni olan ergestrol sentezini engellerler, böylece hücre membran yapısı bozulur. Azollerin yüksek konsantrasyonlarında hücre zarının lipid yapıları üzerine de doğrudan etkileri vardır.

ENDODONTİK MATERYALLERİN BİYOLOJİK DEĞERLENDİRİLMESİ

Biyouyumluluk, bir maddenin, bir dokunun yada organizmanın yaşamını veya sağlığını kötü yönde etkilemeden kullanım amacına uygun fonksiyon göstermesidir. Modern diş hekimliğinde her materyal yada madde klinik uygulamadan önce biyouyumluluk açısından incelenmelidir⁷².

Endodontik materyallerin biyolojik değerlendirilmesini Uluslararası Standart Örgütü (ISO)⁷³ ve Türk Standartları Enstitüsü (TSE)⁷⁴ gibi standardizasyon kuruluşları standartlaştırmıştır^{75,76}.

I- Başlangıç Testleri

- a) Akut haldeki sistemik reaksiyon (oral yoldan)
- b) Akut sistemik toksisite testi
- c) İnhalasyon
- d) Hemoliz
- e) Sitotoksisite testleri

II- İkincil Testler

- a) Subkütanöz implantasyon
- b) Kemik içi implantasyon
- c) Sensitivite (duyarlılık)
- d) Oral mukoz membran irritasyonu

III- Kullanılan Test Materyalleri

- a) Restoratif materyaller için pulpa ve dentin testleri
- b) Pulpa kuafajı ve pulpotomide kullanılan materyaller
- c) Endodontik materyaller
- d) Endosseous implant materyalleri

Friend ve Browne'a⁷⁷ göre Rickert ve Dixon (1932) test materyallerini deney hayvanlarının yumuşak dokularına direkt implante etmeyi düşünmüşlerdir. Test materyalleri deney hayvanlarının yumuşak dokularına bir enjektör yardım ile direkt olarak uygulanmaktaydı⁷⁸. Doku ile temas eden materyalin geniş bir yüzeyi kaplayarak bütün yönlere yayılması ve buna bağlı olarak ilk reaksiyonun çok şiddetli olması ve kullanılan materyal miktarının da standardize edilememesinden dolayı bu yöntemin bazı sakıncaları bulunmaktadır. Daha sonra Gottlieb ve arkadaşları (1932), Dixon ve Rickert (1938), Sinder ve arkadaşları (1966) köpeklerin, Muruzabal ve arkadaşları (1966), Muruzabal ve Erausquin (1966) ratların ve Rowe (1967) kedilerin dişlerinde çalışmışlardır⁷⁷. Bu yol ideal gibi görünmesine rağmen, debrislerin kök kanallarından uzaklaştırılması, sterilizasyon ve kök kanallarının apekse kadar hermetik olarak tıkanması gibi endodontik tedavi aşamaları, deney hayvanlarında kolay uygulanamadığından bu çalışmaların geliştirilmesi yolu düşünülmüştür. Araştırmacılar, endodontiye “Hollow Tube” teorisini getirerek içi boş tüplerin yumuşak ve sert dokularda implantasyon materyali olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir^{75,77,79}. Torneck (1967), “Hollow Tube” teorisini geliştirerek, içi boş tüp yerine polietilen tüpü

implante ederek doku reaksiyon testlerini değişik bir metodla uygulamaya başlamıştır⁸⁰. Kasman ve Goldman⁸¹ (1977) ise Tufts Üniversitesinde yaptıkları *in vitro* çalışmalarda silikon tüp kullanabileceğini savunmuşlardır. Olsson B. ve arkadaşları⁷⁵ teflon tüpün endodontik materyallerin implantasyonunda en uyumlu materyal olduğunu bildirmişlerdir. Yapılan araştırmalarda doku reaksiyonu için seçilen sürenin önemli olduğu ve en uzun sürenin takriben 6 hafta olduğu çalışmalarda gözlenmiştir. Fakat son çalışmalarda hem kısa hem de uzun sürede reaksiyon alınabileceği ispatlanmıştır⁷⁷.

Diş hekimliğinde kanal irrigasyonu için kullanılan solüsyonlara, antibakteriyel özellik kazandırmak için çabalar harcanmış ve bunlar üzerinde birçok araştırma gerçekleştirilmiş olmasına rağmen, bu solüsyonların antifungal etkileri hakkında yeterli çalışmaların yapıldığı söylenemez. Nitekim diş hekimliği pratiğine yeni sunulan antibiyotik-asit-deterjan içerikli son preperatlarda bu özelliğin bulunmadığı gerçekleştirdiğimiz araştırmalarımızda^{8,82} ortaya çıkmıştır. Bu düşünceyle çalışmamızda, antibiyotik-asit-deterjan içerikli ve kanal preperasyonunda çok iyi sonuçlar verdiği ileri sürülen bu tür bir solüsyonun performansı, geleneksel irriganlarla kıyaslanırken antifungal madde ilave edildiğinde *C. albicans*'a karşı etkinliğinin ne olacağı araştırılmıştır.

Çalışma iki bölüm halinde planlanmıştır; birinci bölümde değişik irrigasyon solüsyonlarının kanal preperasyonundaki antifungal etkinlikleri kıyaslamalı olarak *in vitro* mikrobiyolojik deneylerle incelenmiş; ikinci bölümde

ise yukarıda bahsedilen antifungal etkinin elde edilebilmesi için hazırlanan deneysel solüsyonların klinik kullanılabilirliğine ışıık tutması amacıyla ve bu solüsyonların *in vivo* davranışlarını rutine girmiş solüsyonlarla karşılaştırmak ve biyouyumluluklarını araştırmak için hayvan deneyleri gerçekleştirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda antibiyotik, asit ve deterjan içeren bir solüsyon (Deneysel Solüsyon I) ve yine antibiyotik, asit ve deterjan ile birlikte antifungal ajan içeren bir solüsyon (Deneysel Solüsyon II)'nin antifungal etkisi *in vitro* mikrobiyolojik deney ve Tarama Elektron Mikroskop (SEM) incelemeleri ile EDTA ve NaOCl'li ve NaOCl'siz kombinasyonlarda MTAD (BioPure, Dentsply, ABD) ile kıyaslanırken, ratların subkütanoz dokularında histopatolojik incelemelerle biyolojik uyumluluk açısından yine MTAD ile karşılaştırılmıştır.

Mikrobiyolojik Deneyler

Araştırmanın bu bölümünde kök kanal dentin yüzeyine uygulanan 4 farklı irrigasyon solüsyonunun *C. albicans* üzerindeki etkileri SEM destekli *in vitro* mikrobiyolojik deneylerle incelendi.

Dentin örneklerinin hazırlanması:

Çalışmada, periodontal sorun veya ortodontik gereklilik nedeniyle çekilmiş 346 adet çürüksüz tek kanallı alt küçük azı kullanıldı. Dişlerin kök kanal morfolojilerinde varyasyonların bulunup bulunmadığı radyolojik olarak kontrol edildi ve varyasyonlu dişler çalışma dışı bırakıldı. Kök yüzeyindeki sert ve yumuşak artıklar bir küret (SG-GR 1-2 Northdent, ABD) yardımıyla

uzaklaştırıldı. % 0.5 NaOCl ile 24 saatlik yüzey dezenfeksiyonundan sonra dişler, kullanılıncaya kadar fosfat tampon çözeltisinde bekletildi. Apikal uç ve kuron, su soğutması altında elmas separe (DIAMOND DISC SUPERFLEX 910S/220 North Bel, İtalya) ile her bir dişin uzun eksenine dik olarak kesildi. Ardından, kök kanalı 6 numaralı Gates-Glidden frez ile standart çapa genişletildi. Kök sementi, bol su soğutması altında yüksek devirdeki bir elmas frez (801.204.021 Gota, İsviçre) aracılığıyla uzaklaştırıldı. Daha sonra kök kanal yüzeyinin orta 1/3'lük kısmından olacak şekilde 5 mm'lik bir bölüm, bir kumpas (Newman GmbH, Almanya) yardımı ile ölçülerek işaretlendi. İşaretlenen kısım enine kesilerek, her bir diştten 5 mm kalınlığında dentin silindiri elde edildi.

Dentin örneklerin smear ve debristen arındırılması:

Örnekler % 15'lik EDTA (Winzard, Rehber Kimya, Türkiye) çözeltisi içeren cam kaplar içinde ve 3 dakika süreyle ultrasonik banyoda bekletilerek smear tabakası uzaklaştırıldı. Ardından örnekler, içi fizyolojik salin (Eczacıbaşı-Baxter Hastane EK. ve Tic. A. Ş. Ayazağa, İstanbul) dolu banyoda 15 dakika süreyle durulandı. Daha sonra 20 ml % 5.25 NaOCl (Winzard, Rehber Kimya-Türkiye)içeren ultrasonik banyosunda 3 dakika süreyle bekletilmek suretiyle örnekler organik artıklardan arındırıp dezenfekte edildi. Son olarak yıkama amacıyla 2 saat steril salinde bekletildi. Bu aşamadan sonra iki örnek, smear tabakasının kaldırıldığından emin olmak amacıyla tarama elektron mikroskobu ile incelendi.

Deneyin bu aşamasından sonraki tüm basamakları steril ortam kurallarına uyularak gerçekleştirildi.

Mikrobiyolojik inceleme:

Mikrobiyolojik deneyler Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji merkez laboratuvarında gerçekleştirildi.

Örneklerin her biri, 20 dakika boyunca taze tiyoglikolatlı besiyeri (OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere) içeren kapaklı bir cam tüpe yerleştirilerek, tüpler içinde 121°C'deki otoklavda sterilize edildi. Sterilizasyon kontrolü için, tüpler bir hafta boyunca 37°C'de inkübe edildi ve bu sürenin sonunda tüplerden örnekler alınarak %5 koyun kanlı agar (OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere), eosine metilen blue agar (EMB) (OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere) ve Sabouraud dekstroza agar (SDA) (OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere) besiyerlerine aerob, anaerob (anaerob jar, OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere ve Gas Pack, BBL, İngiltere) ve mikroaerofil (%5-10 CO₂ içeren ortamda) şartlarda ekilerek 48-72 saat süreyle inkübe edildikten sonra kontaminasyon tespiti yapıldı. Rastgele seçilen 10 adet örnek negatif kontrol grubu olarak ayrıldı ve bu örneklerle hiçbir deney işlemi uygulanmadı.

Deney mikroorganizması olarak kök kanal enfeksiyonlarında tedaviye oldukça dirençli mikroorganizmalardan biri olan *C. albicans* (ATCC 10231, ABD) standart suşu seçildi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı kültür koleksiyonundan sağlanan bu suşun 35°C'deki SDA'da 24 saatlik aerobik kültürü yapıldı.

Üreyen ≥ 1 mm çapındaki kolonilerden beşi alınarak, 5 ml steril serum fizyolojik içinde süspansiyonu yapıldı. Vortekste 15 saniye karıştırılan süspansiyondaki *C. albicans*'ın hücre yoğunluğu spektrofotometrede (530 nm) ölçülerek ve 0.5 Mc Farland bulanıklık ölçüsü standardı esas alınarak ayarlandı. Böylece steril distile su içinde 1.5×10^6 maya/ml bulunacak şekilde stok mantar süspansiyonu hazırlandı. Tiyoglikolatlı besiyeri içindeki dentin silindirlerini içeren 334 adet vidalı kapaklı cam tüplerin her birinin içerisine hazırlanan bu mantar süspansiyonundan 0,1ml konulup ağzı kapatılarak örnekler 37°C'de inkübasyona bırakıldı. Tüplerdeki besiyeri 21 gün boyunca her 7 günde bir yenilendi ve kültürlerin saflığı her besiyeri değişiminde trypticase-soy agara (OXOID Ltd., BASINGSTOKE, Hampshire, İngiltere) ve SDA'a pasaj alınıp, 48-72 saat 37°C'da inkübe edilerek hücresel canlılık kontrol edildi.

Kontamine edilen örneklerden 4 tanesi SEM incelemesi için hazırlandı. Bu dört tüp içindeki dentin silindirleri, steril 0.1 M fosfat tampon çözeltisi (PBS) (pH 7.4) ile yıkandı ve 2 saat süreyle sodyum cacodylate tampon

özeltisi içerisinde %2.5 glutaraldehit ile sabitlendi. Daha sonra örnekler, 10 nM'lük CaCl_2 ve 0.2 M'lük sükrözla 0.2M'lük sodyum cacodylat tampon çözeltisi (pH 7.2) içinde sırayla üçer kez yıkandı. Silindirler %50'den başlayıp %10'luk artışlarla %100'e kadar varan konsantrasyonlardaki etanol ile kurutuldu. Örnekler her bir konsantrasyonda 10 dakika tutuldu. Daha sonra %100 aseton içeren cam kaplara aktarıldı ve 4°C'de bekletildi.

Örnekler, kurutma cihazı (Bio-Rad, E3000, Watford, İngiltere) ile CO'deki kritik noktalarına kadar dehidrate edildi ve vakum altında saçılmış altınla kaplandı. Daha sonra bütün örnekler hızlandırılmış 15kV'luk voltajla çalışan tarama elektron mikroskobu (JEOL, JSM, 6490LV, Tokyo, Japonya) ile incelendi.

İrrigasyon solüsyonlarının uygulaması:

Çalışmanın bu aşamasında 24. günün sonunda rastgele seçilen 10 adet dentin örneği pozitif kontrol grubu olarak belirlendi ve steril serum fizyolojik içeren tüpler içerisinde bir dakika bekletildi. Kalan 320 örneğin yarısı (n=160) % 1.3'lük NaOCl içeren tüpler içerisinde bir dakika bekletildi. Süre bitiminde steril distile su (Eczacıbaşı-Baxter Hastane EK. ve Tic. A. Ş. Ayazağa, İstanbul) içinde 30 saniye boyunca çalkalanarak 3 kere yıkandı. Daha sonra NaOCl uygulanmış bu örnekler ve NaOCl uygulanmamış diğer örnekler rastgele 4 er gruba ayrıldı:

NaOCl ile işlem görmüş örneklerden oluşan gruplardan (A),

Grup 1A'ya Biopure MTAD (Dentsply, Tulsa Dental, Johnson City, ABD) (n=40),

Grup 2A'ya taze hazırlanmış Deneysel Solüsyonu I (% 1'lik Doxycycline Hyclate (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD), % 10'luk Citric asit (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD), % 0.5'lik TWEEN-80 (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD) (n=40),

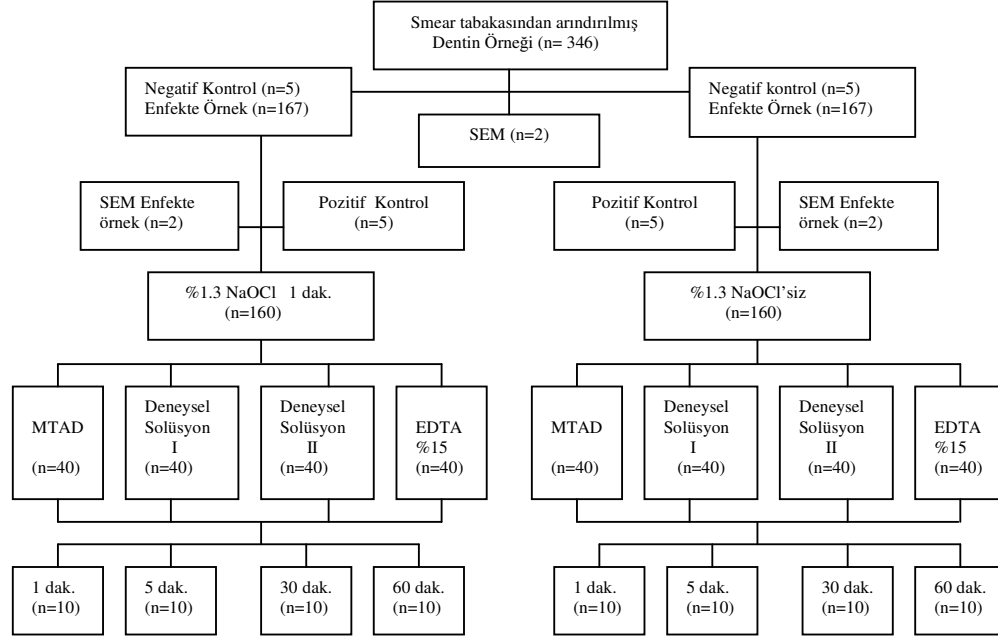
Grup 3A'ya taze hazırlanmış Deneysel Solüsyonu II (% 1'lik Doxycycline Hyclate (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD), % 10'luk Citric asit (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD), % 0.5'lik TWEEN-80 (SİGMA-ALDRICH Co., St. Louis, ABD), % 1'lik Fluconazole (Pfizer, ABD) (n=40),

Grup 4A'ya % 15'lik EDTA solüsyonu (Winzard, Rehber Kimya, Türkiye) (n=40) uygulandı.

NaOCl ile işlem yapılmayan örneklerden oluşan gruplardan (B),

Grup 1B, Grup 2B, Grup 3B ve Grup 4B'ye de grup numaraları dikkate alınarak aynı işlemler tekrarlandı.

Her örnek için ayrı bir tüp olmak üzere steril tüplere seçilen solüsyonlardan 3'er ml konuldu. Her grup kendi içinde 4 alt gruba ayrıldı (n=10) ve bu alt gruplara solüsyonlar 1, 5, 30 ve 60 dakikalık süreyle uygulandı. Deney aşamasında kullanılan örneklerin belirlenen sürelerde, seçilen solüsyonlar ile uygulama şekli Şekil 1'de ayrıca şematize edilmiştir.



Şekil 1: Tüm grupların deneysel akış şeması

Deneysel işlemin bitiminde her bir dentin örneği 3'er kere 30 saniye süreyle steril distile su ile çalkalandıktan sonra steril 5 ml taze tiyoglikolat besiyeri içeren vidalı kapaklı cam tüpler içerisine konularak 35°C'de 30 gün boyunca inkübasyona bırakıldı. Bu süre içinde her gün tüplerden TSA ve SDA'a ekim yapılarak üremenin tespiti için kültürü yapıldı ve üreme görülen plaklardaki koloniler sayıldı. Tüm uygulamalar bir laminar akım kabini içinde aseptik koşullar altında gerçekleştirildi.

Tek kör, rastgele, karşılaştırmalı olarak planlanan bu çalışmada kök kanal final temizleyicilerinin *C. albicans* üzerinde oluşturdıkları fungusidal ve/veya fungustatik etkileri canlı maya kolonisi sayımı yapılarak tek bir araştırmacı gözlemci tarafından değerlendirilmiş ve veriler kaydedilmiştir. Test süreleri olarak belirlenen 1., 5., 30. ve 60. dakikalardaki veriler Kruskal-Wallis, Mann Whitney U ve Wilcoxon testleri ile karşılaştırmalı olarak hesaplanmıştır.

Biyouyumluluk Deneyleri

Çalışmamın bu bölümünde T.C. Sağlık Bakanlığı Merkez Hıfzı-Sıhha Enstitüsü Serum Çiftliğ'in'den temin edilen 180-200 gr ağırlığında ve 60 günlük erkek 93 adet Wistar Albino cinsi rat kullanıldı. Hayvanlar deney ortamına uyum sağlayabilmeleri için deneye başlamadan önce laboratuvar şartlarında en az iki gün bekletildi. Deney süresince standard laboratuvar şartlarında standart pellet yem ve su, hayvanın normal beslenmede yiyip içebildiği miktarda verildi.

Hayvanlar yaklaşık 330x280x160 mm ebatlarındaki kafeslere, en az 4 en çok 5 adeti bir kafeste olacak şekilde konuldu. Hayvanların seçimi rastgele yapıldı. Deneylere başlamadan 24 saat önce hayvanlar aç bırakıldı, içtikleri su serbest bırakıldı (ad libitum). Deney öncesi ratlar eterli banyo kaplarında uyutuldu, daha sonra intraperitoneal olarak 50 mg/kg Ketalar (Ketamin baz (Ketamin hidroklorür)) (Eczacıbaşı İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş., İstanbul, Türkiye) ve 7 mg/kg Rompun (Xylasin %2) (Bayer Türk Kimya San. Ltd. Şti., İstanbul, Türkiye) verilerek anestezize edildiler. Anestezi verilen ratların sırtları sınırları belli şekilde tıraş bıçağı ile tıraşlandı. Ameliyat bölgesi Betadine (Kansuk Laboratuvarı Sanayi ve Tic. A. Ş., Türkiye) cilt dezenfektanı ile dezenfekte edildi. Aseptik şartlar altında dorsal interskapuler bölgesine ve columna vertebralis'e paralel olmak üzere bistüri yardım ile insizyon yapıldıktan sonra insizyon bölgesinden periost elevatörü ile girilerek 2 cm derinliğinde künt diseksiyonla deri altında subkütan bir cep oluşturuldu. Atravmatik çalışarak bölgede kanama oluşturulmamasına özen gösterildi.

İmplant Materyallerinin Uygulanması:

Deney materyalleri iç çapı 1,3 mm, dış çapı 2,1 ve 10 mm uzunluğundaki teflon intravenöz kateterlere (Mediflon, Eastern Medikit LTD., Hindistan) 2 cc'lik tek kullanımlık plastik enjektörler yardımıyla dolduruldu.

İmplantların subkütan ceplere yerleştirilmesinden sonra, kesi yerleri 0.4 atravmatik ipek sütür ile kapatıldı. Sütürlerin üzerine suya dayanıklı

film oluşturan, antibakteriyel Piyedif Aerosol Sprey (Doğu İlaç Veteriner Ürünleri A.Ş., İstanbul, Türkiye) sıkıldı.

Çalışmamızı 5 grup altında topladık:

1. grup: Biopure MTAD uygulaması (n=27)
2. grup: Taze hazırlanmış Deneysel Solüsyon I uygulaması (n=27)
3. grup: Taze hazırlanmış Deneysel Solüsyonu II uygulaması (n=27)
4. grup: NaOCl %2 (pozitif kontrol grubu) (n=6)
5. grup: Boş tüp (negatif kontrol grubu) (n=6)

Her gruptaki örnekler kendi içlerinde 3'e ayrılarak bunlardan ilk gruptakiler 48. saat, 2. gruptakiler 1. hafta ve 3. gruptakiler de 4. haftada 50 mg/kg Ketalar (Ketamin baz (Ketamin hidroklorür)) ve 7 mg/kg Rompun (Xylazin %2) ile anestezi yapıldıktan sonra 150 mg/kg tiyopentalsodyum (İstanbul İlaç San.Türk A.Ş.,İstanbul, Türkiye) intraperitonel olarak verilerek sakrifiye edildi. İmplant materyalleri çevre dokularla birlikte çıkarıldı. Alınan biyopsi örnekleri %10 tamponlanmış formol solüsyonunda tespit edilip, Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakóltesi Patoloji Laboratuarında otomatik doku takip cihazına (Shandon Citadel 1000,) alındı. Dokular sırasıyla birer kez 80°, 90°, 3

kez 96° alkollerden, izopropilalkolden, 2 kez ksilolden ve 2 kez sıcak parafinden geçirildi. Parafin bloklara gömülen dokulardan mikrotomda (Leica SM 2000 R) 5-6 mikronluk histolojik kesitler elde edildi. Kesitler rutin hematoksilen & eozin boyası ve histokimyasal olarak mast hücre boyası (Unna mast boyası) ile boyandı. Tüm değerlendirmeler ışık mikroskobunda (Nikon Eclipse E 600, Japonya) yapıldı. Işık mikroskobunda kesitler, dermal ve subdermal açıdan değerlendirildi. Dermiste, epitel-bağ dokusu hücre proliferasyonu, inflamasyon, yabancı cisim reaksiyonu, mast hücrelerinin infiltrasyonu, vasküler yapılar değerlendirildi. Subdermal incelemede ise bunlara ilaveten kas yapılarının durumları incelendi.

İnflamasyon skorlaması, subkutan bölgede ışık mikroskobunda x100'lük büyütme alanında tüpün yerleştirildiği boşluğun çevresindeki bağ dokusunda yapılmıştır. Dokunun %10'nundan azında mononükleer inflamataur infiltrat görülüyorsa- hafif, %10-50 arasında ise orta, dokunun yüzde %50'sinden fazlasında inflamatuar infiltrat görülüyorsa yoğun olarak değerlendirilerek skorlama yapılmıştır (Tablo-2).

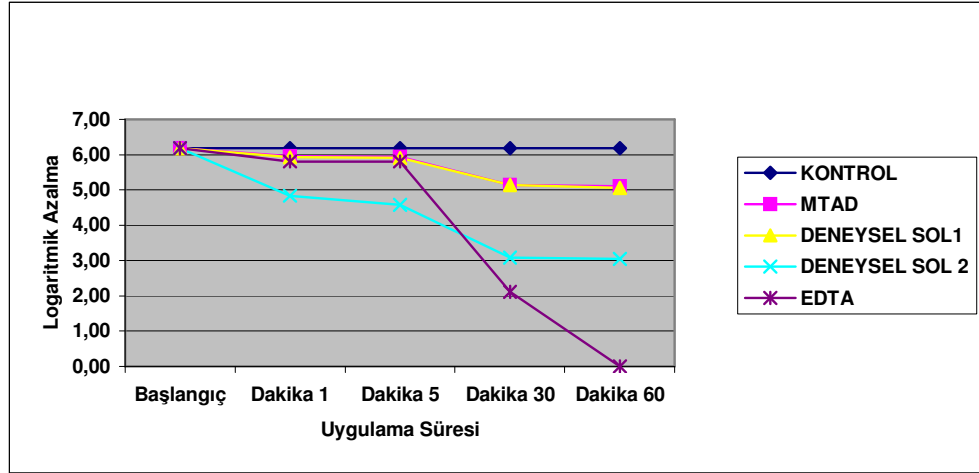
Tablo-2. İnflamatuar etki skorlaması

	SKORLAR				
	YOK	< % 10	% 10-50	% 50-100	APSE
İNFLAMASYON DERECEŚİ	YOK	HAFİF	ORTA	YOĞUN	APSE

UNNO boyası ile mast hücre varlığı tespit edilmiş ve ışık mikroskobunda x200 büyütmede 1 mm²'lik doku alanına düşen mast hücre sayısı hesaplanmıştır. Elde edilen veriler Kruskal-Wallis, Mann Whitney U ve Wilcoxon testleri ile kıyaslanmıştır.

BULGULAR

MTAD, Deneysel Solüsyonu I, Deneysel Solüsyonu II ve %15'lik EDTA'nın antifungal etkinliğinin *in vitro* olarak değerlendirilmesiyle elde edilen sonuçlar Tablo 3, Şekil 2 ve Şekil 3'de gösterilmiştir.



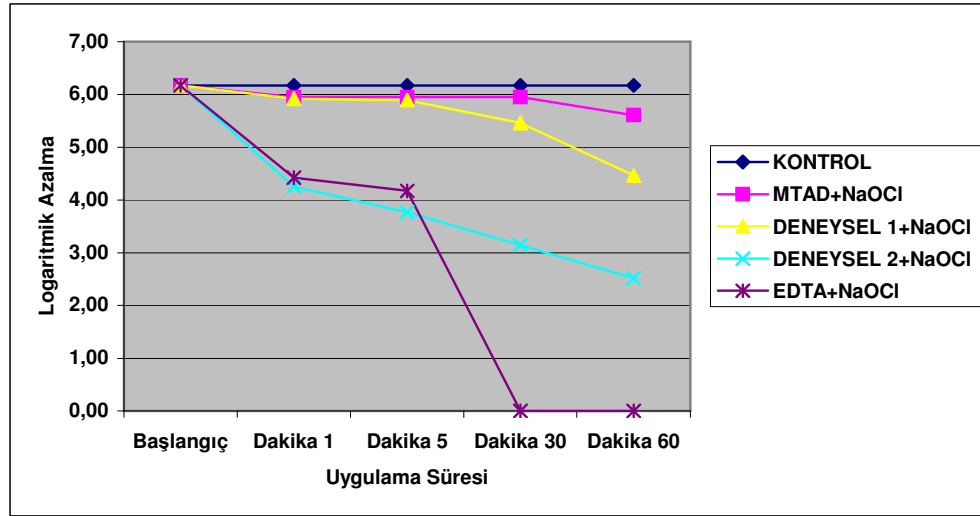
Şekil 2. İrrigasyon solüsyonlarının NaOCl'siz uygulanması sonucu *C. albicans* koloni sayılarında (cfu/ml) görülen azalma.

Kruskal-Wallis analizine göre bütün solüsyonlar için 1 dakika süreyle %1.3 konsantrasyonda NaOCl uygulanması ile uygulanmaması arasındaki farklar anlamlı bulunmuştur ($p<0,05$). NaOCl uygulanan bütün gruptaki koloni sayıları 1. dakikadan itibaren anlamlı bir düşüş göstermiştir.

Gruplarda elde edilen üreme göstermiş örnek sayıları Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 3: Gruplara göre zamana bağılı olarak üreme görülen örnek sayısı

		MTAD (n=10)				DENEYSEL SOLÜSYON I (n=10)				DENEYSEL SOLÜSYON II (n=10)				%15 EDTA (n=10)				Kontrol (+)	Kontrol (-)
Uygulama Süresi	Üreme Zamanı	1-3	4-10	11-20	21-30	1-3	4-10	11-20	21-30	1-3	4-10	11-20	21-30	1-3	4-10	11-20	21-30	1-3	1-30
1 dk.	NaOCl'siz	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	0
	NaOCl'li	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	0
5 dk.	NaOCl'siz	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	0
	NaOCl'li	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	5	0
30 dk.	NaOCl'siz	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	4	4	4	4	5	0
	NaOCl'li	10	10	10	10	10	10	10	10	7	7	7	7	0	0	0	0	5	0
60 dk.	NaOCl'siz	10	10	10	10	10	10	10	10	8	8	8	8	0	0	0	0	5	0
	NaOCl'li	0	0	4	6	0	0	3	7	6	6	6	6	0	0	0	0	5	0



Şekil 3. Irrigasyon solüsyonlarının NaOCl’li uygulanması sonucu *C. albicans* koloni sayılarında (cfu/ml) görülen azalma.

Bütün gruplar arasındaki farkı tespit edebilmek için uygulanan Mann Whitney U testi sonucunda MTAD grubu ile Deneysel Solüsyonu I grubu arasında tüm uygulama süreleri için istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). MTAD+NaOCl grubu ile Deneysel Solüsyon I+NaOCl grubu arasında 1. ve 5. dakikalarda anlamlı bir fark oluşmazken ($p>0,05$), 30. ve 60. dakikalarda istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu belirlenmiştir ($p<0,05$). Diğer bütün gruplar arasındaki fark ise istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Her gruptaki uygulama süreleri arasındaki farklılıkların araştırılması Wilcoxon testi ile yapılmıştır. İncelenen bütün irrigasyon solüsyonlarının başlangıçtaki koloni sayıları 1. dakikadan itibaren anlamlı

derecede düşüş göstermiştir ($p<0,05$). Pozitif kontrol grubunda ise başlangıç değerlerine göre anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p>0,05$).

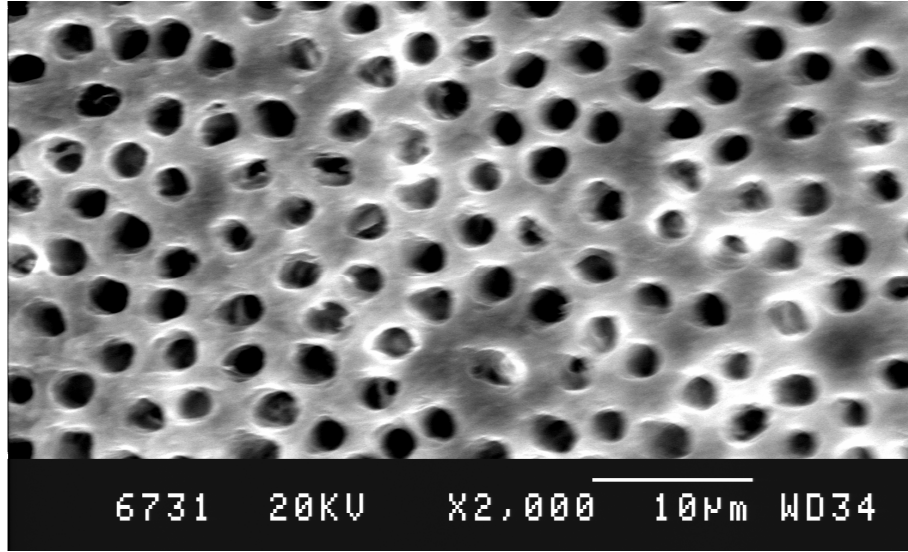
Tarama Elektron Mikroskop görüntüleri

Araştırmada kullanılan deneysel solüsyonların *C. albicans*'ın morfolojik yapısında ve dental dokuya adezyon özelliğindeki değişikliklerin belirlenebilmesi amacıyla örnekler SEM ile de incelenmiştir.

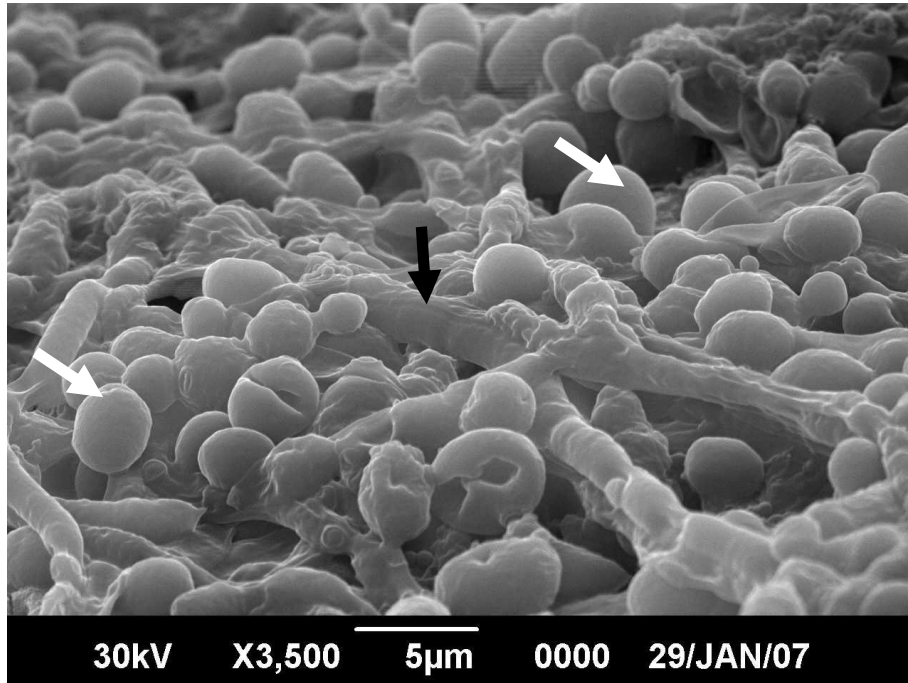
Kontrol grubunda dentin yüzeyini tamamen kaplayan, çok sayıda irili ufaklı Candida hücreleri ve pseudohifleri belirgin olarak gözlenmektedir.

EDTA ile işlem görmüş yüzeylerde *C. albicans* ve ilgili yapılara ait görüntü bulunmazken diğer bütün örneklerde kontrol grubuna göre çok azalma olsa da *C. albicans* hücreleri ve psödohifler gibi yapılar izlenmiştir.

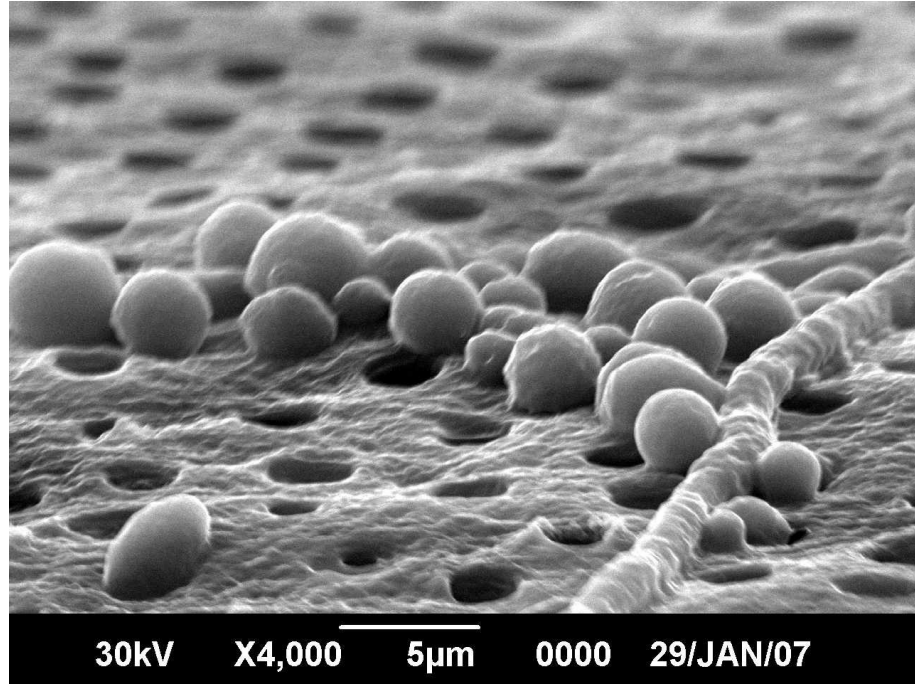
Örneklerden elde edilen SEM görüntüleri aşağıdaki fotoğraflarda verilmiştir (Şekil 4-14).



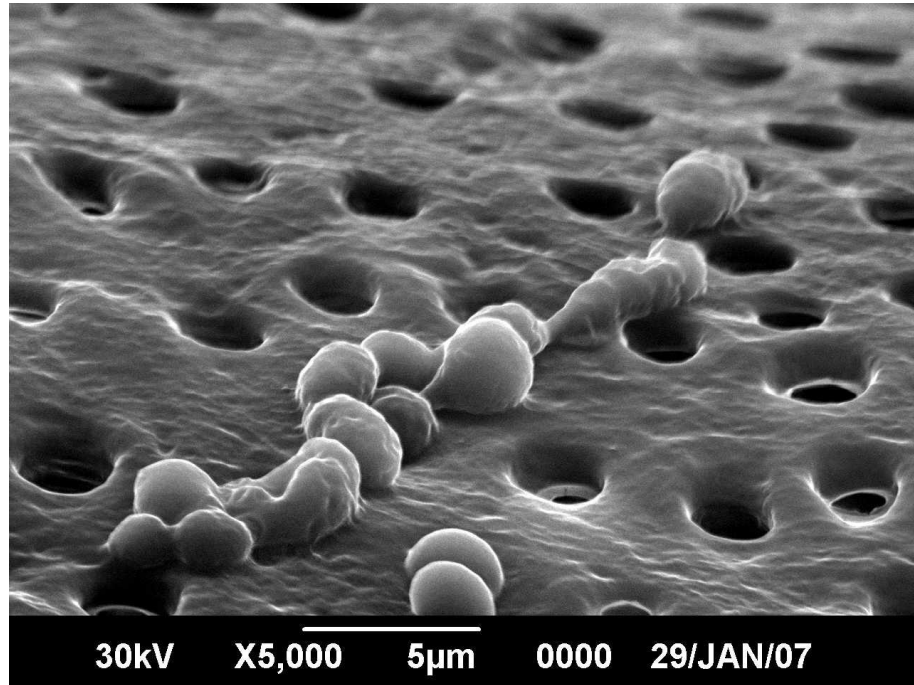
Şekil 4: Smear tabakası uzaklaştırılmış dentin örneği



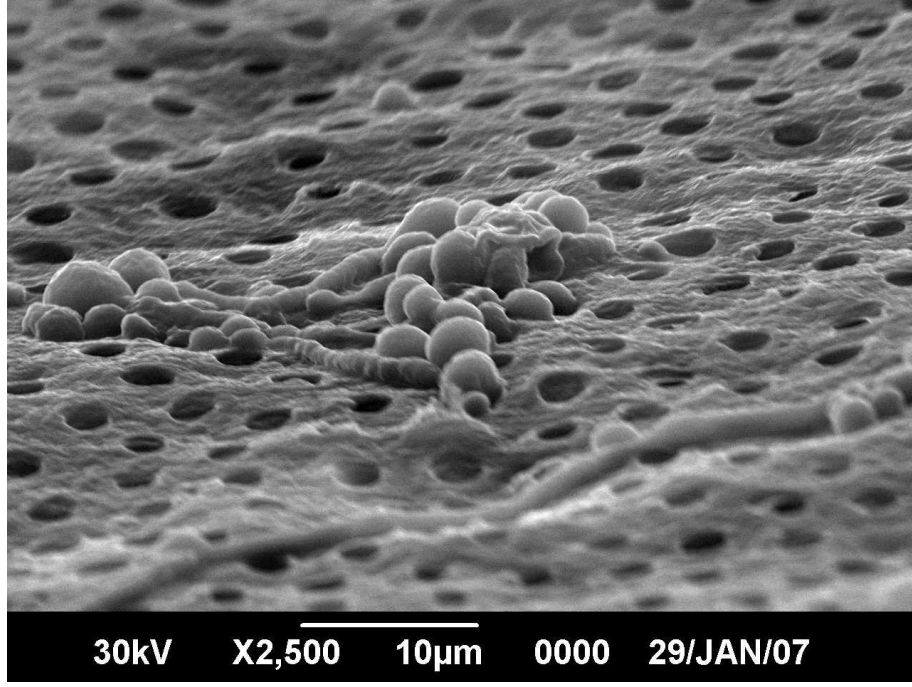
Şekil 5: Pozitif kontrol grubundan *C. albicans*'la enfekte dentin örneği (siyah ok: pseudohifleri, beyaz ok: ise blastokonidyumları göstermektedir)



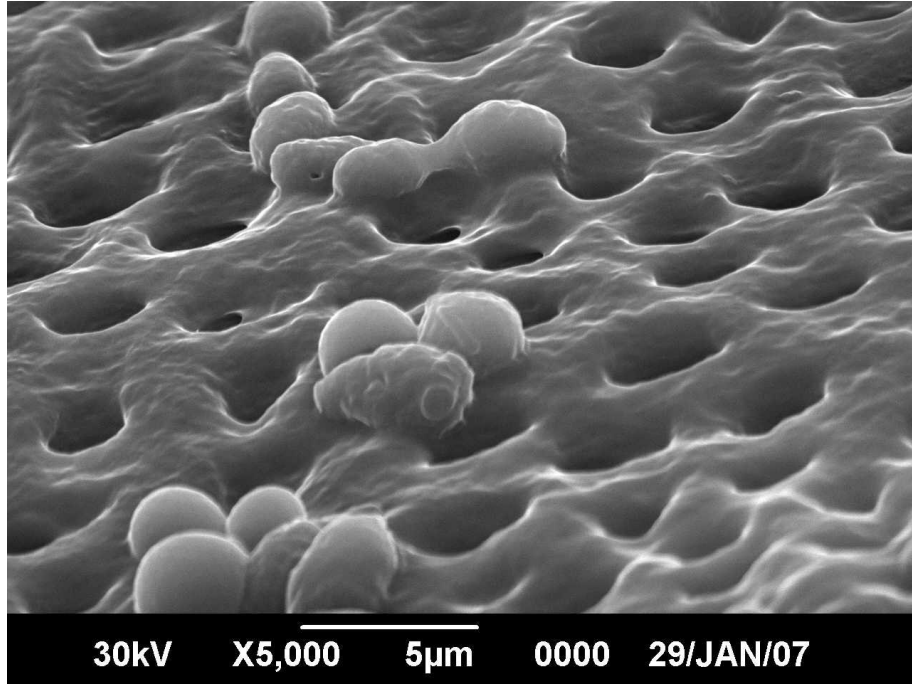
Şekil 6: 5 dakika MTAD uygulanmış örnek



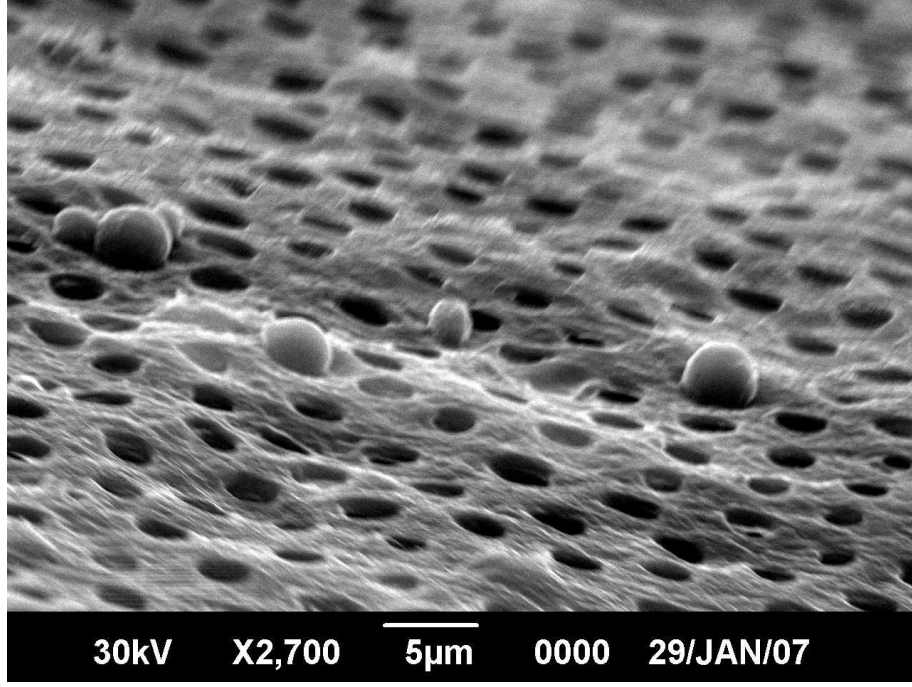
Şekil 7: 5 dakika Deneysel Solüsyon II uygulanmış örnek



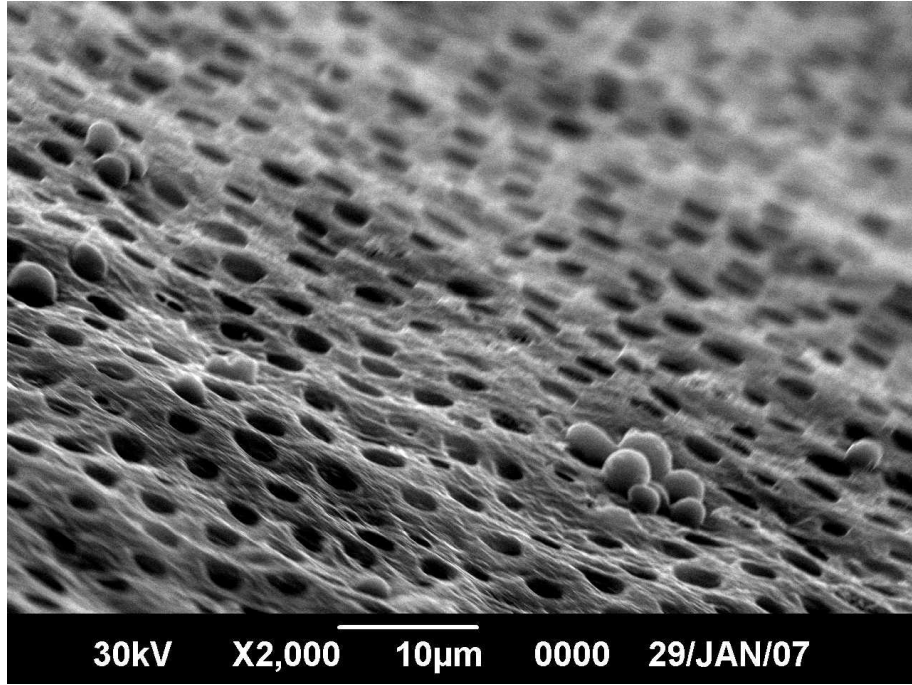
Şekil 8: NaOCl'li 60 dakikalık MTAD uygulanmış örnek



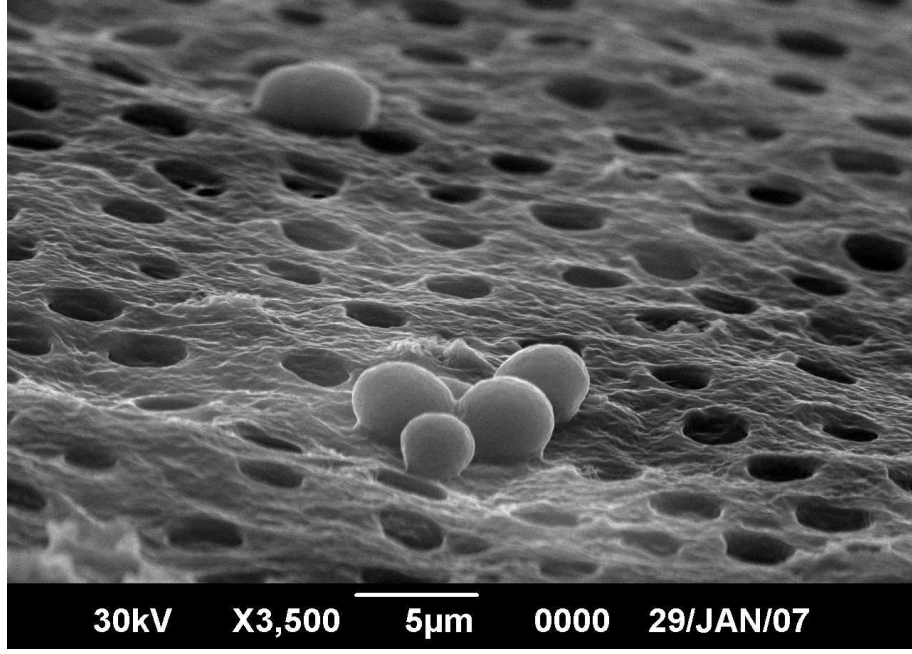
Şekil 9: 60 dakikalık Deneysel Solüsyon II uygulanmış örnek



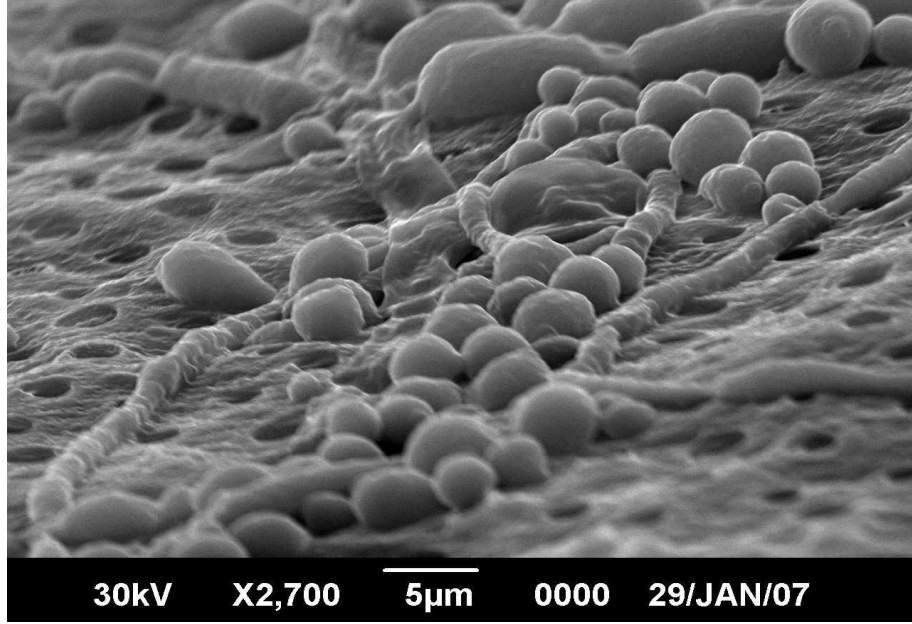
Şekil 10: 30 dakikalık %15'lik EDTA uygulamasına ait örnek



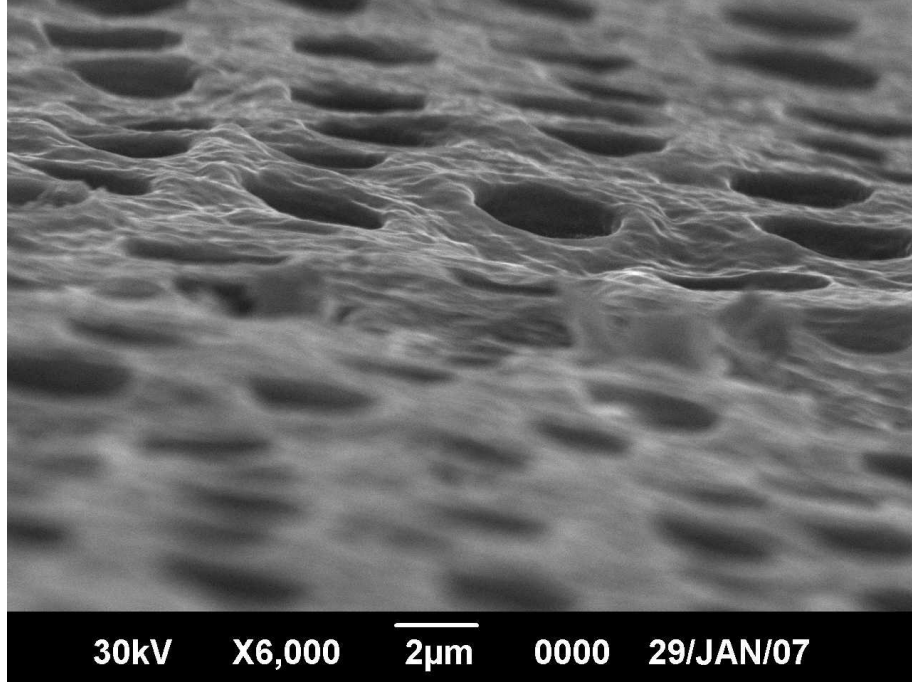
Şekil 11: Deneysel Solüsyon I'nin etkilerine ait örnek (60 dakika uygulama)



Şekil 12: NaOCl'li 60 dakikalık Deneysel Solüsyon II'nin uygulamasına ait örnek



Şekil 13: 60 dakikalık MTAD uygulanmasına ait örneğindeki görüntü



Şekil 14: NaOCl’li 30 dakikalık %15’lik EDTA uygulamasından sonraki dentin yüzeyinin görüntüsü

Histopatolojik inceleme bulguları:

Grupların histopatolojik olarak incelenmesi sonucunda elde edilen skarlara ait değerler Tablo-4 ve Tablo-5’te, gözlem sonuçları ise aşağıda verilmiştir.

Tablo 4: Kontrol grubuna ait inflamasyon sonuçları

Örnek sayısı	Negatif Kontrol Grubu			Pozitif Kontrol Grubu		
	48. saat	1. hafta	4. hafta	48. saat	1. hafta	4. Hafta
1	orta	yoğun	-	hafif	yoğun	Orta
2	orta	yoğun	-	hafif	yoğun	Orta

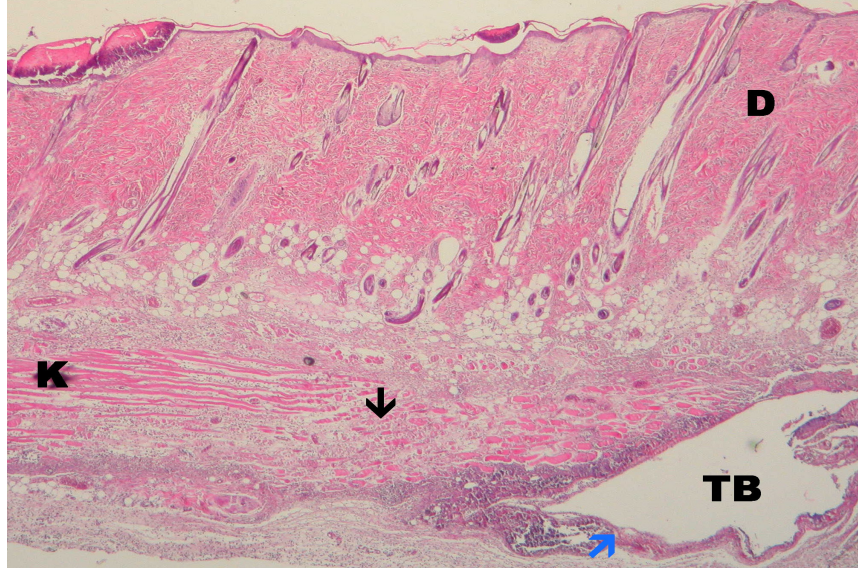
Tablo 5: Deney gruplarına ait inflamasyon sonuçları

Örnek sayısı	MTAD			Deneysel Solüsyon I			Deneysel Solüsyon II		
	48. saat	1. hafta	4. hafta	48. saat	1. hafta	4.hafta	48. saat	1. hafta	4.hafta
1	hafif	orta	-	Hafif	orta	hafif	yoğun	orta	Hafif
2	orta	orta	orta	Yoğun	yoğun	hafif	yoğun	yoğun	Orta
3	orta	orta	-	Yoğun	yoğun	hafif	yoğun	yoğun	Hafif
4	yoğun	orta	-	Yoğun	yoğun	hafif	yoğun	yoğun	-
5	yoğun	yoğun	-	Orta	orta	hafif	orta	yoğun	Hafif
6	orta	yoğun	-	Orta	yoğun	orta	orta	orta	Hafif
7	orta	orta	hafif	Yoğun	orta	-	yoğun	yoğun	-
8	orta	orta	orta	Orta	orta	-	yoğun	orta	Hafif
9	yoğun	yoğun	hafif	Yoğun	orta	-	orta	yoğun	-

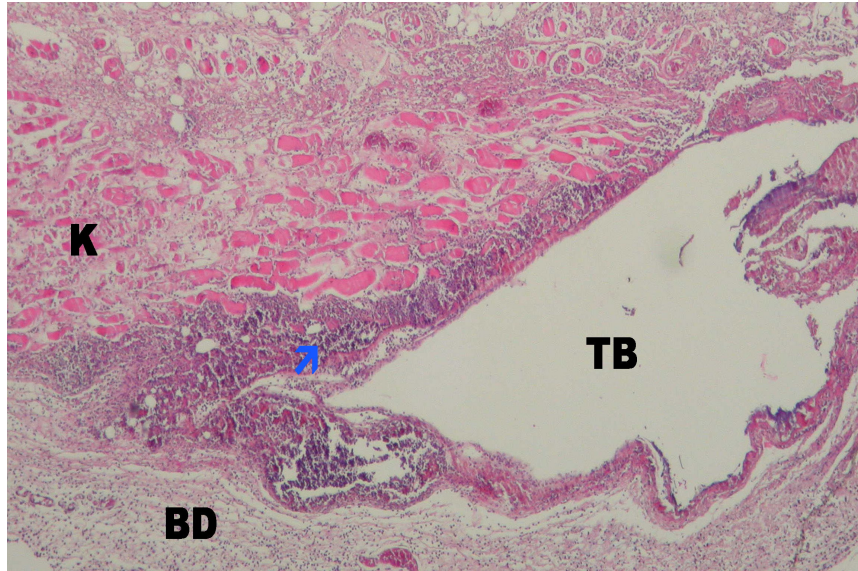
MTAD grubuna ait bulgular

48 saatlik döneme ait bulgular:

Dokuz örneğin üçünde epidermiste ülserasyon izlenmiştir. Dermis genellikle orta derece selüler kollajenize görünümde olup, yüzeyde yer yer hafif, yer yer orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve örneklerin yarısından fazlasında (9 örneğin 5' inde) dermiste apse formasyonu mevcuttur. Dermisteki inflamasyona bağlı olarak bazı örneklerde deri eklerinde kayıplar bulunmaktadır. Bazı örneklerde kas yapılarında da dejenerasyon ve kayıp, makrofajların da eşlik ettiği mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve vasküler yapıda granülasyon dokusu izlenmektedir. Örneklerin tümünde subkutan olarak yerleştirilmiş olan materyal boşluğunda apse odakları, çevrelerinde köpüksü histiyositler ve bu alanları sınırlayan, mikst tipte inflamatuvar hücrelerden zengin bir bant görünümünde fibrin ve kollajen yapısı bulunmaktadır. Boşluk çevresindeki bağ dokusu ince fibriler kollajenden oluşmakta, yoğun inflamatuvar hücre infiltrasyonu ile vasküler yapılar ve serbest kanama alanları içermektedir. Örneklerin 2/3'ünde nekroz ve 1 örnekte ise yabancı cisim bulunmaktadır(Şekil 15a,b.)



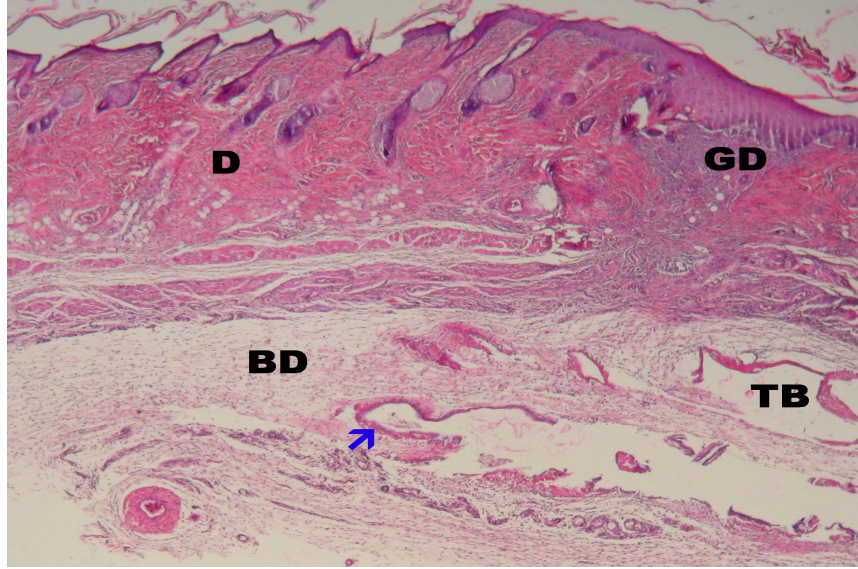
Şekil 15a: MTAD grubuna ait iki günlük epidermis, dermis ve subdermal dokularda iyileşme (D- dermis, K- kas demetleri, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, Siyah Ok-dejenere kas demetleri, Mavi Ok- tüpün etrafındaki fibrin ve mikst tipte inflamatuvar infiltrat birikimi), H.E. x 20



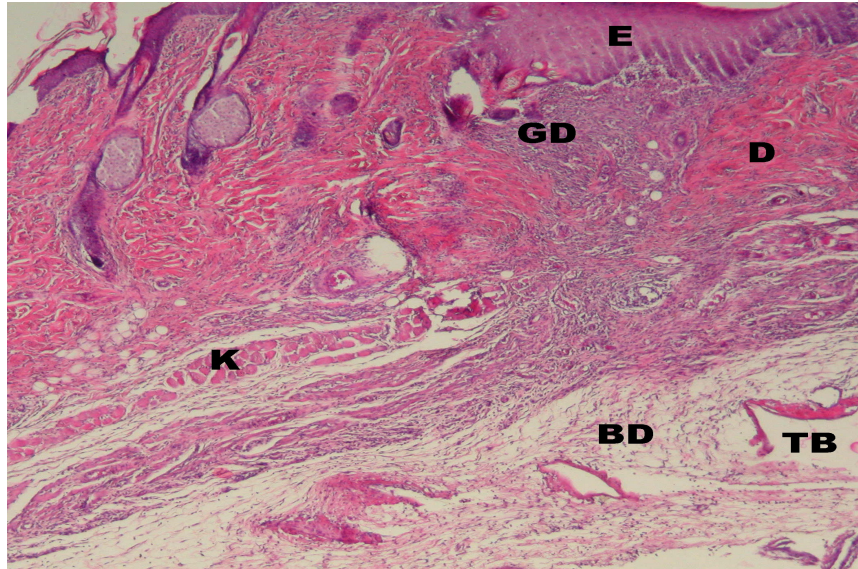
Şekil 15b: Tüpün etrafındaki fibrin birikimi, gevşek ödemli bağ dokusu, kas demetleri içerisinde infiltrat girişleri (K- dejenere kas demetleri, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, BD- bağ dokusu, Mavi Ok- tüpün etrafındaki fibrin ve mikst tipte inflamatuvar infiltrat birikimi) , H.E. x 100

Bir haftalık döneme ait bulgular:

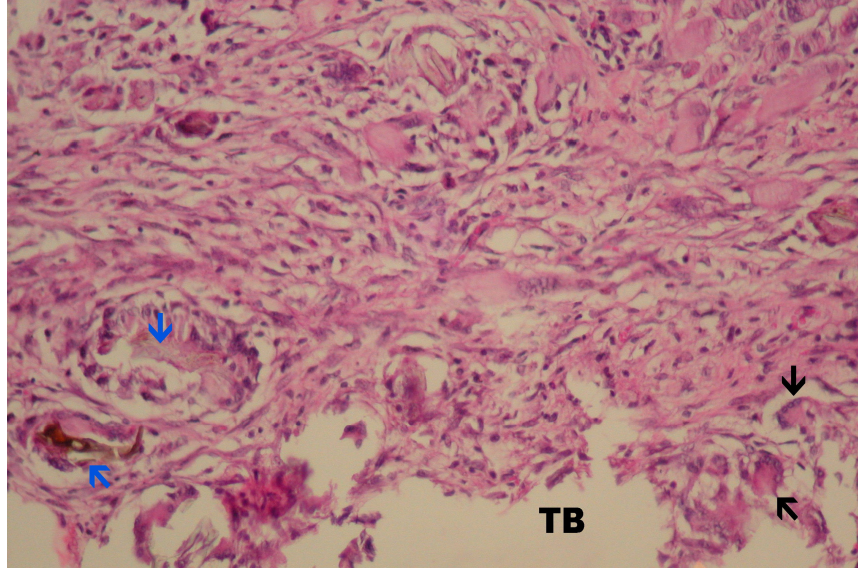
Epidermis normal görünümde olup kesitlerin yarısında dermiste fibrohistiyositik hücrelerden oluşan granülasyon dokusu kas yapılarına kadar uzanmaktadır (Şekil 16b). Kesitlerin tümünde subepitelyal alanda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu izlenirken sadece 1/3'ünde (9 örneğin 3 adetinde) tüm dermiste infiltrasyon yaygın halde bulunmaktadır. Tüm örneklerde kaslarda kayıpların yanı sıra orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve hafif dejenerasyon tespit edilmektedir. Tüpün bulunduğu boşluğu döşeyen kapsül ince fibriler yapıdaki kollajen yapısı ile karakterlidir. Kapsül çevresindeki bağ dokusu, yer yer gevşek ödemli yapıda olup, fibromiksoid karakterdedir. Fibrohistiyositik hücrelerle karakterli bağ dokusunda makrofajlar, lenfosit ve plazma hücrelerinden oluşan mikst tipte inflamatuvar infiltrat, serbest kanama alanları, fibrin ve belirgin vasküler yapılar yer almaktadır. Örneklerin 1/4'ünde (9 örneğin 2 adetinde) apse odakları, yarısında (9 örneğin 5 adetinde) yabancı cisim materyali ve dev hücreler, 1/3'ünde (9 örneğin 3 adetinde) ise nekroz odakları bulunmaktadır (Şekil 16a,c).



Şekil 16a: MTAD grubunda bir haftalık iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü (D- dermis, BD- bağ dokusu, GD- granülasyon dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, Mavi Ok- tüpün etrafındaki fibrin ve mikst tipte inflamatuvar infiltrat birikimi), H.E. x 20



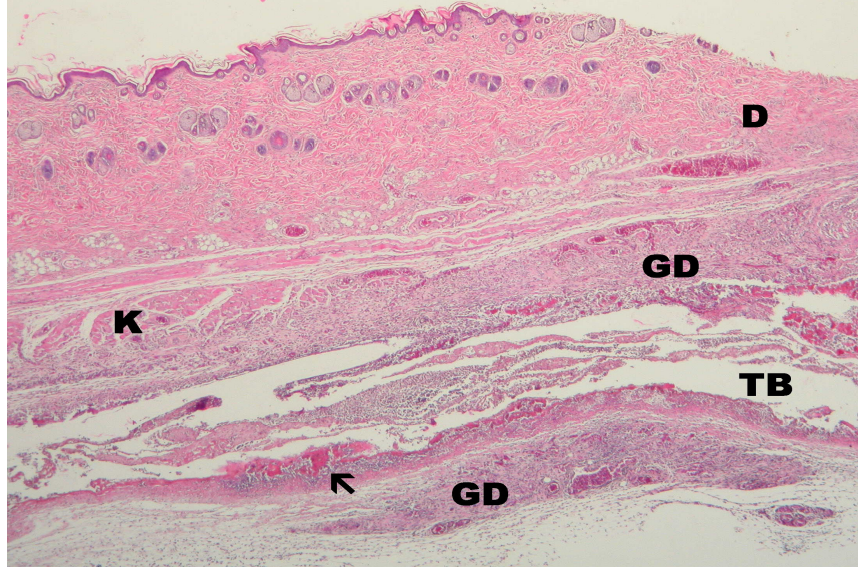
Şekil 16b: Epidermisten perikapsüler gevşek bağ dokusuna kadar iyileşme (E- epidermis, D- dermis, K- kas demetleri, BD- bağ dokusu, GD- granülasyon dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk) , H.E. x 100



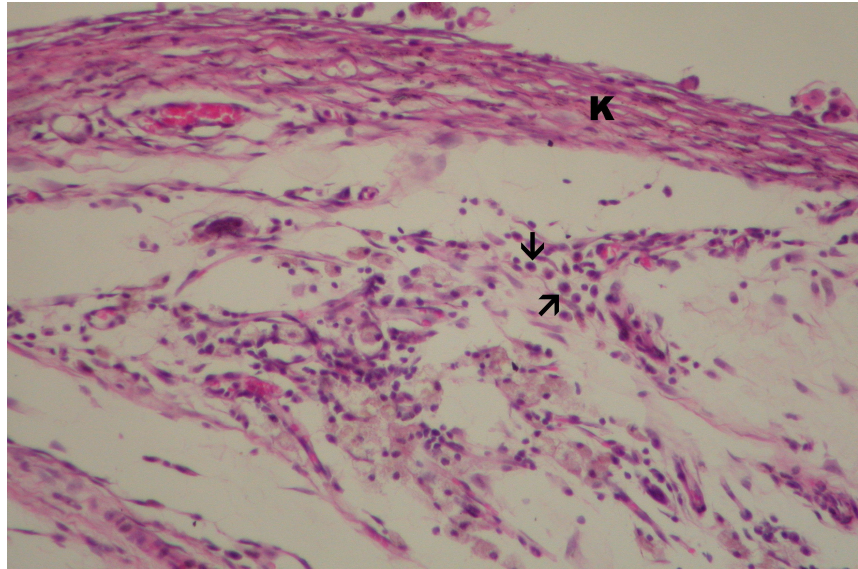
Şekil 16c: Granulasyon dokusunda yabancı cisim ve dev hücrelerin görünümü (TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, Siyah Ok-dev hücreleri, Mavi Ok- yabancı cisim) , H.E. x 200

Dört haftalık döneme ait bulgular:

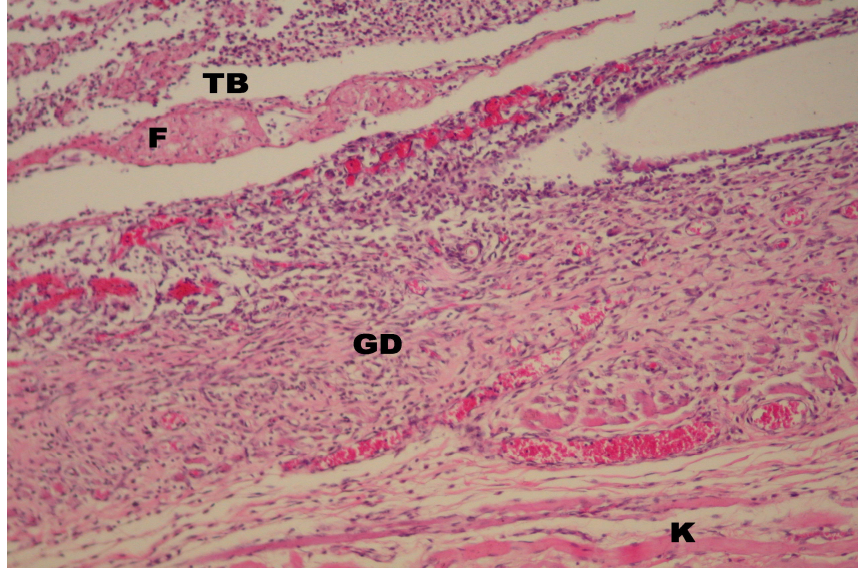
Bu döneme ait tüm kesitlerde epidermis ve dermis normal olup yarısında ise insizyon yerinde epidermisten başlayıp, subkutan dokuya kadar uzanan fibröz granülasyon dokusu bulunmaktadır. Kas yapılarının yerini fibröz yapıda granülasyon dokusu almıştır. Tüpün bulunduğu boşlukta tüm örneklerde ince, yer yer kalın fibroelüler yapıda kapsül oluşmuştur (Şekil 17a). Kapsül etrafındaki yer yer kollajenize, yer yer fibromiksoid yapıdaki bağ dokusu şişkin görünümlü aktif fibroblastlardan meydana gelmiş olup, vaskülarizasyon kapsül yakınlarında yer almaktadır. Örneklerin yarısında hafif düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu bulunmaktadır (Şekil 17b,c).



Şekil 17a: MTAD grubunda dört haftalık iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü (D- dermis, K- kas demetleri, GD- fibrovasküler granulasyon dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, Siyah Ok- kapsül), H.E. x 20



Şekil 17b: Fibroz kapsül ve plazma hücrelerinden zengin inflamatuvar infiltrat (K-fibroz kapsül, Siyah Ok- plazma hücreleri), H.E. x 100



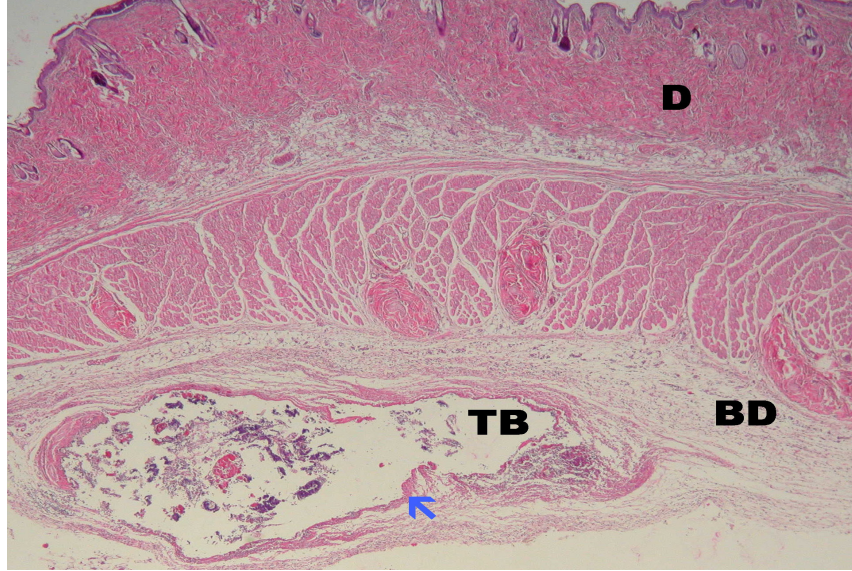
Şekil 17c: Perikapsüler iltihabi granulasyon dokusu (F- fibrin eksuda, GD- granulasyon dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk), H.E. x 100

Deneysel Solüsyon I grubuna ait bulgular

48 saatlik döneme ait bulgular:

Örneklerin 1/3'ünde (9 örneğin 3 adetinde) epidermiste ülserasyon izlenmiştir. Dermis genellikle orta derece selüler kollajenize görünümde, dermiste ülserasyon alanlarının çevresinde yoğun olmak üzere, yüzeyde yer yer hafif, yer yer orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu tespit edilmektedir. Bazı örneklerde deri ekleri çevresinde mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kayıplar mevcuttur. Ayrıca örneklerin 1/4'ünde (9 örneğin 2 adetinde) dermis içerisinde apse odakları vardır. Kas yapılarında hafif düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve yer yer dejeneratif değişiklikler bulunmaktadır.

Örneklerin tümünde subkutan olarak yerleştirilmiş materyal boşluğunun çevresinde kapsül yapısında hücresiz, kalın kollajen birikimi, serbest kanama alanları ve fibrin birikimi izlenmektedir. Örneklerin yarısından fazlasında (9 örneğin 5 adetinde) az sayıda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve az sayıda vasküler yapı eşlik etmektedir. Kalan 4 örnekte ise fokal apse odakları, nekroz ve mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulunmaktadır (Şekil 18).

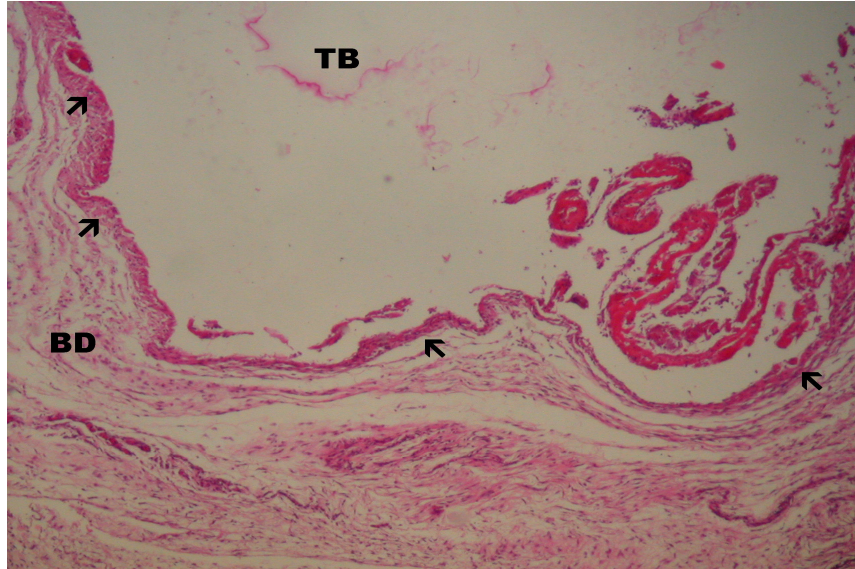


Şekil 18: Deneyel solüsyon I grubunda 48 saatlik iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü (D- dermis, BD- bağ dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk, Mavi Ok- tüpün etrafındaki fibrin ve mikst tipte inflamatuvar infiltrat birikimi), H.E. x 20

Bir haftalık döneme ait bulgular:

Epidermis normal görünümde olup kesitlerin 1/3'ünde dermiste fibrohistiyositik hücrelerden oluşan granülasyon dokusu mevcuttur. Tüm

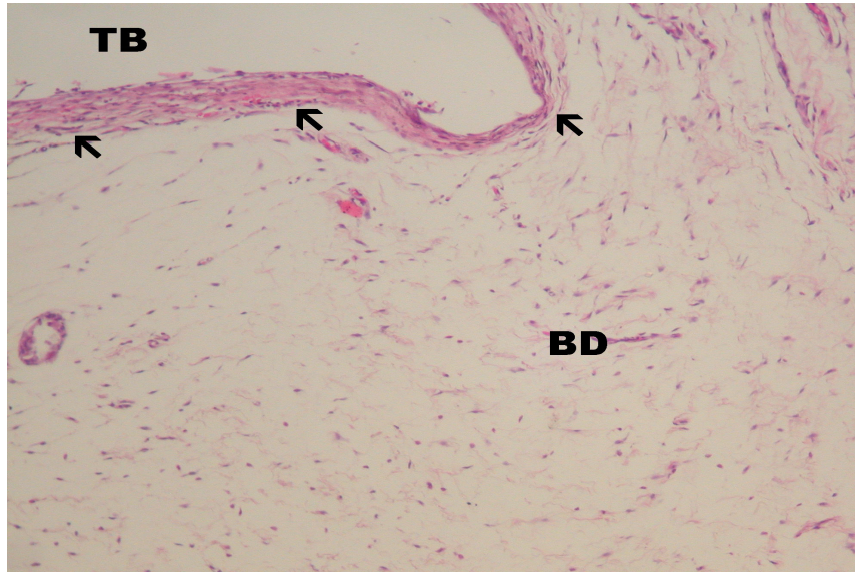
kesitlerde subepitelyal alanda mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kaslarda hafif düzeyde dejenerasyon ile kayıplar mevcuttur. Subkutan yerleştirilmiş materyal boşluğu ince, kollajen demetlerden oluşan kapsül ile çevrelenmiştir. Etrafında vasküler granülasyon dokusu tipinde bağ dokusu ile yer yer fibrin eksuda bulunmaktadır. Bir örnekte nekroz ve lenfosit agregat mevcutken hiçbir örnekte dev hücreye ve yabancı cisim materyaline rastlanmamıştır. Tüpün çevresindeki bağ dokusu gevşek, ödemli yapıda fibromiksoid zemininin üzerinde fibrohistiyositik hücreler, plazma ve lenfositlerden zengin orta derecede mononükleer inflamatuvar infiltrat içermektedir (Şekil 19).



Şekil 19: Bir haftalık Deneysel Solüsyon I grubuna ait tüp boşluluğu (TB) etrafındaki fibroselüler kapsül (Siyah Ok) ve gevşek ince kollajenize fibriler bağ dokusu (BD), H.E. x 100

Dört haftalık döneme ait bulgular:

Örneklerin hepsinde epidermis ve dermis normal olup iki örnekte kesi yerinde epidermisten başlayıp, subkutan dokuya kadar uzanan fibröz granülasyon dokusu bulunmaktadır. Kas yapılarının yerini fibröz yapıda granülasyon dokusu almıştır. Örneklerin hepsinde tüpün bulunduğu boşluk çevresinde kapsül yapısı mevcuttur. Kapsül formasyonu genellikle ince, yer yer kalın fibrozelüler yapıda olup, içerisinde inflamatuvar hücrelerin girişleri bulunmaktadır. Kapsülün çevresindeki bağ dokusu gevşek, ödemli yapıda olup, örneklerin çoğunda orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve kapsül komşuluğunda belirgin vasküler yapılar mevcuttur. Örneklerin 1/3'ünde ise inflamatuvar infiltrat bulunmamaktadır. Bağ dokusundaki vasküler yapılar kapsül komşuluğunda görüldü (Şekil 20).

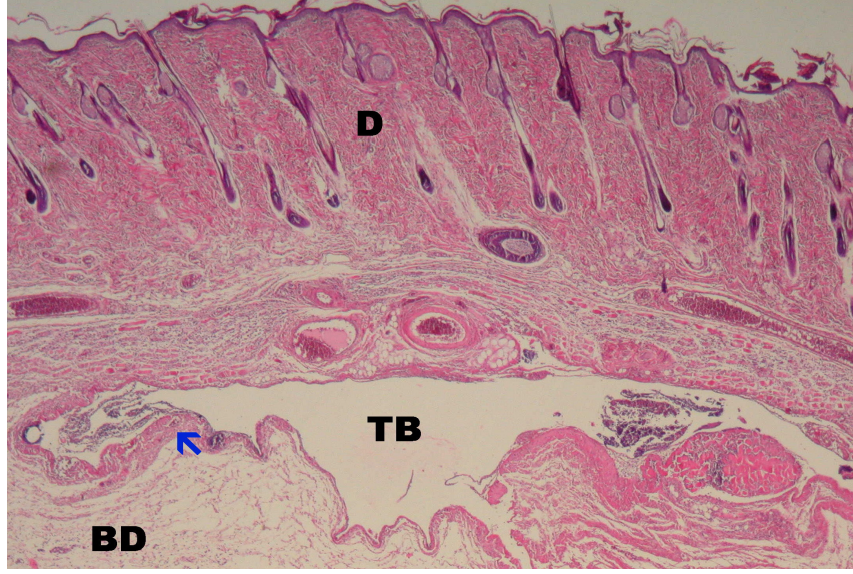


Şekil 20: Deneysel solüsyon I'in dört haftalık iyileşmesinde fibroz kapsül (Siyah Ok) ve çevresindeki gevşek hafif inflamatuvar infiltrat içeren bağ dokusu (BD- bağ dokusu, TB –tüp boşluğu,), H.E. x 200

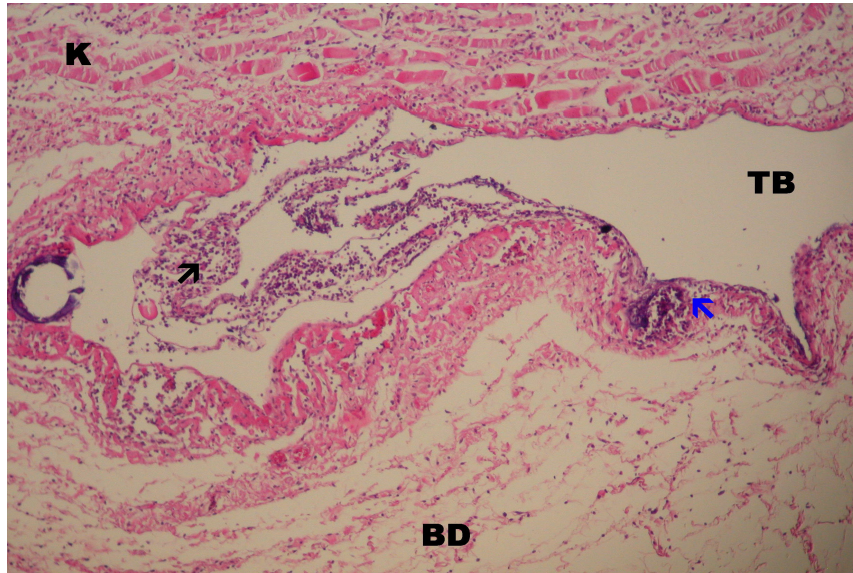
Deneysel Solüsyon II grubuna ait bulgular

48 saatlik döneme ait bulgular:

Bu döneme ait kesitlerin yarısından fazlasında (9 örneğin 5' inde) epidermiste ülserasyon bulunmaktadır. Dermis genellikle hiposelüler yapıda olup, yüzeyde ülserasyon alanlarının çevresinde yoğun olmak üzere yer yer deri ekleri çevresindeki alanlarda orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu mevcuttur. Kas yapılarında mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu, buna bağlı olarak dejenerasyonlar ve kayıplar izlenmektedir. Tüm kesitlerde subkutan yerleştirilmiş materyal boşluğunun çevresinde fibrin birikimi ve apse formasyonu bulunmaktadır. Çevre bağ dokusu fibromiksoid yapıdadır; orta düzeyden şiddetliye doğru değişen mononükleer inflamatuvar hücrelerden zengin mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve içleri kanla dolu vasküler yapılar içermektedir. Örneklerin hemen hemen hepsinde yabancı cisim ve serbest kanama alanları bulunmaktadır (Şekil 21a,b).



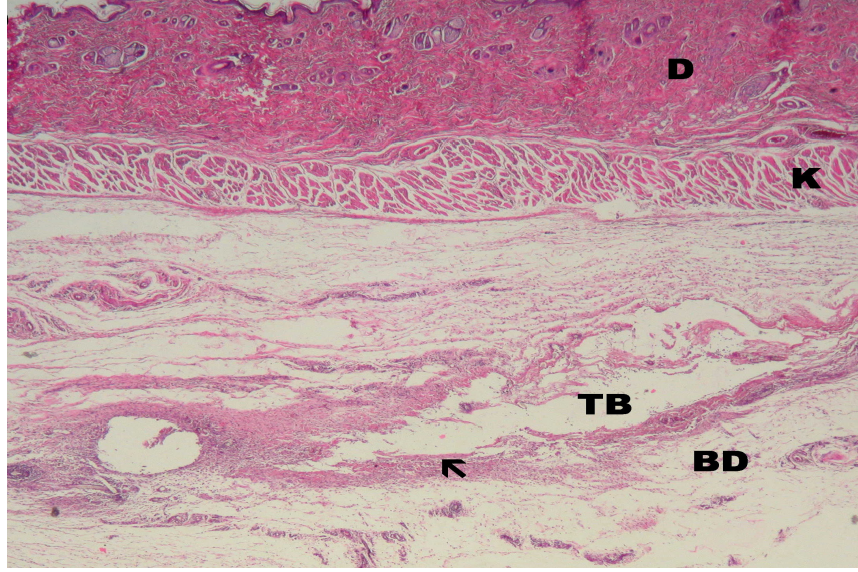
Şekil 21a: Deneyssel Solüsyon II'ye ait 48 saatlik iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü. (D-dermis, BD-bağ dokusu, TB- tüp boşluğu, Mavi OK- tüp boşluğun etrafındaki fibrin), H.E:x20



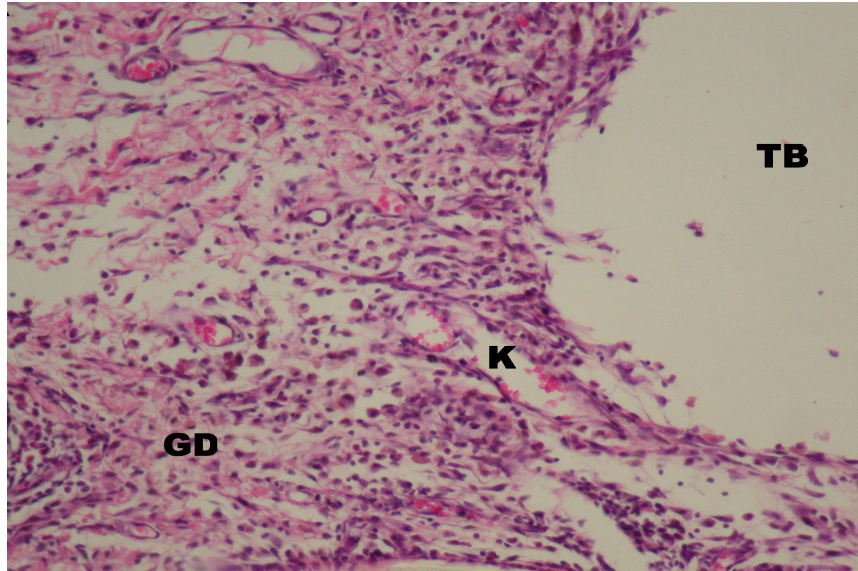
Şekil 21b: Deneyssel Solüsyon II'nin 48 saatlik kesitinde tüp boşluğu etrafındaki fibrin ve gevşek ödemli bağ doku ve kas demetleri içerisine giren mikst tipte inflamatuvar infiltrat (K- kas, BD-bağ dokusu, TB- tüp boşluğu, Mavi Ok- inflamatuvar infiltrat, Siyah Ok- Tüp boşluğuna dokülmüş nötrofilden zengin inflamatuvar infiltrat.) H.E.x100

Bir haftalık döneme ait bulgular:

Örneklerin hepsinde epidermis ve dermis normal görünümündedir ve subepitelyal alanda minimal düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermektedir. Örneklerin 1/3'ünde kas yapılarında dejenerasyon ve kayıpların yanı sıra orta düzeyde mononükleer inflamatuvar hücreler ve zengin vasküler yapıların eşlik ettiği iltihabi granülasyon dokusu bulunmaktadır. Tüpün yerleştiği boşluk ince /kalın kollajenin oluşturduğu kapsül ile çevrilidir. Kapsül içine lenfositlerin de eşlik ettiği, mononükleer inflamatuvar hücrelerin girişleri mevcuttur. Örneklerin 1'inde yabancı cisim dev hücreleri izlenirken, diğer örneklerde nekroz yoktur (Şekil 22a,b).



Şekil 22a: Deneysel Solüsyon II'ye ait bir haftalık iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü. (D-dermis, BD-bağ dokusu, TB- tüp boşluğu, Mavi OK- tüp boşluğun etrafındaki fibrin), H.E:x40



Şekil 22b: Deneysel Solüsyon II'ye ait bir haftalık iyileşmede perikapsüler plazma hücrelerinden zengin iltihabi granülasyon dokusu (GD- granülasyon dokusu, TB –tüpün yerleştiği kas altında boşluk), H.E. x 200

Dört haftalık döneme ait bulgular:

Örneklerin hepsinde epidermis ve dermis normal olup 1/3'ünde kesi yerinde epidermisten başlayıp, subkutan dokuya kadar uzanan fibröz granülasyon dokusu bulunmaktadır. Kas yapıların yerini fibröz yapıda granülasyon dokusu almıştır. Tüpün bulunduğu alan çevresinde kollajenize yapıda kapsül vardır. Çevresindeki bağ dokusu yer yer ince, yer yer ise kalın kollajen demetlerinden olup, daha çok kapsül yakınında yoğun vaskülarizasyon bulunmaktadır. Örneklerin 1/3'ünde (9 örneğin 3 adetinde) inflamasyon bulgusu görülmemiştir. Diğer örneklerde hafif düzeyde mononükleer inflamataur hücre infiltrasyonu bulunmaktadır (Şekil 23).

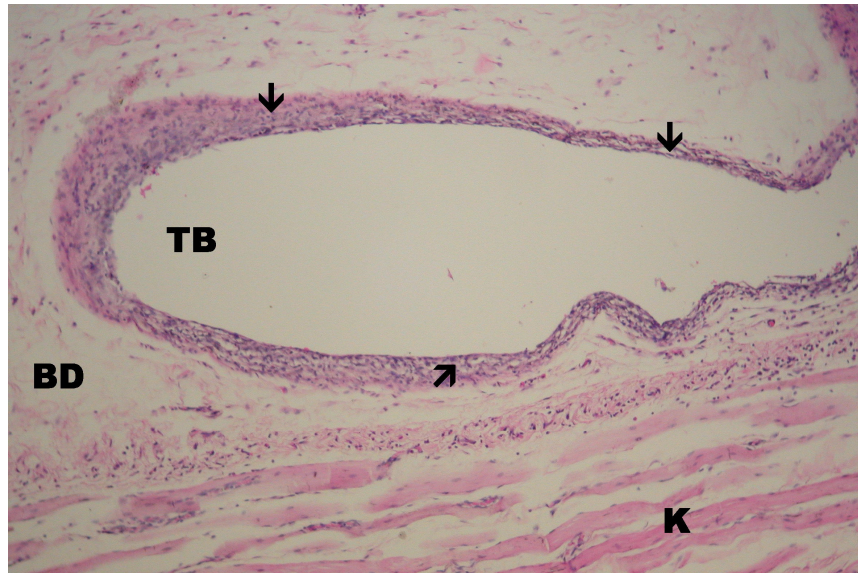


Şekil 23: Deneysel Solüsyon II'ye ait dört haftalık iyileşmenin kutan ve subkutan dokuya ait panoramik görünümü. (D-dermis, K-kas demetleri, BD-bağ dokusu, TB- tüp boşluğu), H.E.:x40

Pozitif kontrol grubuna ait bulgular

48 saatlik döneme ait bulgular:

Epidermiste geniş bir ülserasyon alanı bulunmaktadır. Dermis normal görünümündedir. Subkutan alanda kas demetleri arasında saçılmış olarak hafif düzeyde mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulunmaktadır, dejenerasyon mevcut değildir. Tüpün bulunduğu boşluğun çevresinde ince yer yer kalın yapıda fibrinden oluşan kapsül ve çevresinde ödemli ince fibriler kollajenden oluşan bağ dokusu görülmektedir. Bağ dokusu orta yoğunlukta mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu, serbest kanama alanları içermektedir. Yabancı cisim dev hücre, apse, nekroz bulunmamaktadır(Şekil 24).



Şekil 24: Pozitif kontrol grubuna ait bir örnek görüntüsü (K-kas demetleri, BD-bağ dokusu, TB- tüp boşluğu, Siyah Ok- kapsül), H.E.x100

Bir haftalık döneme ait bulgular:

Epidermis normal görünümde olup dermiste fibrohistiyositik hücrelerden oluşan granülasyon dokusu mevcuttur ve bu granülasyon dokusunun kas yapılarına kadar uzandığı görülmektedir. Ayrıca dermis içerisinde orta/yoğun düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve bir alanda bağ dokusunda apse formasyonu bulunmaktadır. Deri eklerinde apse formasyonunun görüldüğü ve lenfositik infiltrasyonun şiddetinin arttığı alanlarda deri eklerinde kayıplar mevcuttur. Subkutan olarak kas yapıları normal görünümde olup minimal düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermektedir. Tüpün bulunduğu boşluğun çevresinde fibrohistiyositik hücrelerin oluşturduğu fibroblastik kapsül formasyonu mevcuttur. Kapsül çevresindeki bağ dokusu fibromiksoid yapıda olup yoğun plazma hücresinden zengin mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve fokal alanlarda apse formasyonu, nekroz odakları içermektedir.

Dört haftalık döneme ait bulgular:

Epidermis ve dermis normal görünümündedir. Kas dejenerasyonu bulunmamaktadır. Tüpün yerleşmiş olduğu boşluğun etrafında subkutan dokuda fibroblastik kapsül gelişimi mevcuttur. Kapsülün çevresindeki bağ dokusu bazı alanlarda gevşek, bazı alanlarda ise ödemle karakterli fibrovasküler bağ dokusu yapısında ve orta düzeyde eozinofillerin de eşlik ettiği mononükleer inflamatuvar

hücre infiltrasyonu bulunmaktadır. Nekroz, dev hücre, apse yapıları izlenmemiştir.

Negatif kontrol grubuna ait bulgular

48 saatlik döneme ait bulgular:

Epidermiste fokal bir alanda ülserasyon bulunmaktadır. Dermis normal görünümündedir. Hemen altındaki bağ dokusunda lenfositlerden zengin mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulunmaktadır ve bu alanda yoğunluk göstermek üzere çevreye doğru saçılmış haldedir. Kas demetlerinde dejenerasyon, kayıp mevcuttur ve orta derecede mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermektedir. Tüpün bulunduğu boşluğun çevresinde kalın yapıda fibrinden oluşan kapsül görünümü mevcuttur. Kapsül çevresindeki bağ dokusu ödemli, ince fibriler kollajenden oluşmaktadır ve orta derece mikst tipte inflamatuvar hücre infiltrasyonu içermektedir. Bağ dokusu geniş, yer yer daha küçük boyutta içleri kanla dolu vasküler yapılardan oldukça zengin görünümündedir. Yabancı cisim dev hücre, apse, nekroz bulunmamaktadır.

Bir haftalık döneme ait bulgular:

Epidermis ve dermis normal görünümündedir. Dermiste bir alanda fibroblastik bağ dokusu, dermisin ortalarına kadar inmiş görünümündedir. Kas

demetlerinde dejerasyon hafif düzeydedir ve minimal düzeyde mononükleer inflamatuvar hücre infiltrasyonu bulunmaktadır. Subkutan dokuda tüpün bulunduğu boşluğun çevresinde yer yer ince, yer yer kalın kollajenden oluşan kapsül formasyonu bulunmaktadır. Kapsül çevresindeki fibromiksoid yapıdaki bağ dokusunda yoğun lenfositik infiltrasyon, irili ufaklı içleri kanla dolu prolifer vasküler yapılar ve serbest kanama alanları içermektedir. Yabancı cisim dev hücre, apse, nekroz bulunmamaktadır.

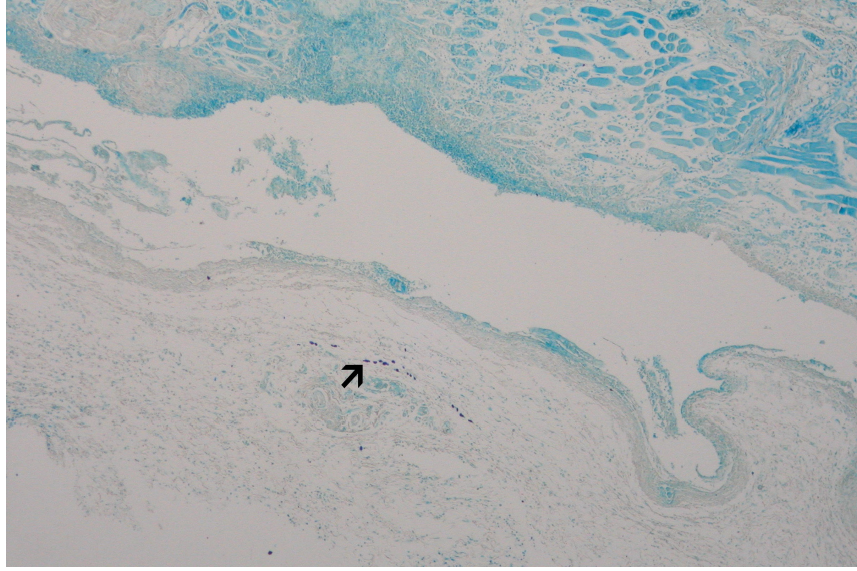
Dört haftalık döneme ait bulgular:

Epidermis ve dermis normal görünümündedir. Kas dejenerasyonu bulunmamaktadır. Tüpün yerleşmiş olduğu boşluğun etrafında subkutan dokuda kalın kollajenize kapsül gelişimi mevcuttur. Kapsülün çevresindeki bağ dokusu bazı alanlarda gevşek, bazı alanlarda ise ince fibriler kollajenize yapıdadır. İnflamatuvar hücre infiltrasyonu, nekroz, yabancı cisim dev hücre izlenmemiştir.

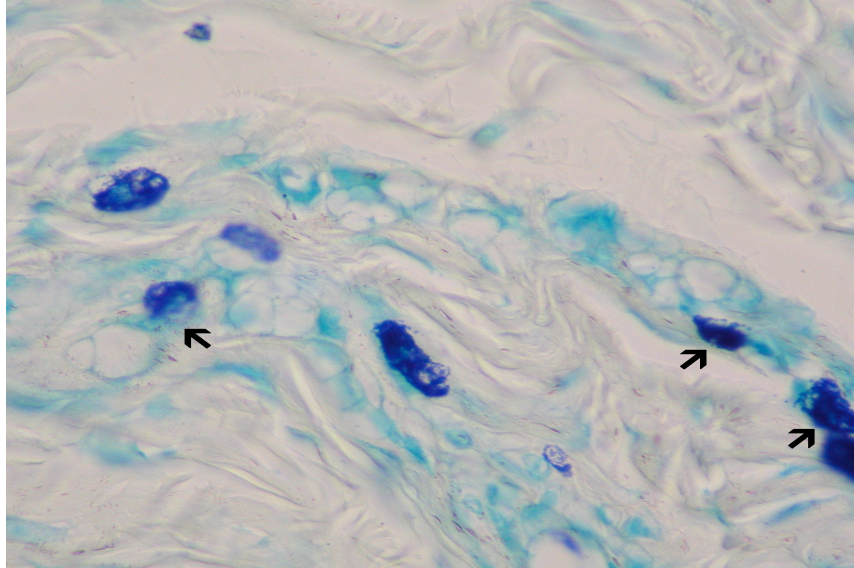
Mast Hücrelerine Ait Bulgular

Mast hücreleri daha çok dermiste, perivasküler alanlarda yerleşmiş olup, dejenere kas demetleri arasında belirginleşmiştir. Tüpün yerleştiği alanın etrafında subkutan bağ dokusunda daha az sayıda mast hücresi bulunmaktadır

(Şekil 25a). Bütün örneklerde mast hücreleri morfolojik olarak granüle ve degranüle formda bulunmaktadır (Şekil 25b).



Şekil 25a: Tüp boşluğu etrafında mast hücrelerinin görüntüsü (ok), UNNOx40



Şekil 25b: Mast hücrelerinin büyük büyütmede görüntüsü (ok), UNNOx400

Gruplarda 48 saat, 1 hafta ve 4 hafta sonunda elde edilen mast hücre sayıları ve istatistiki veriler Tablo 6, Tablo 7 ve Tablo 8’de verilmiştir.

Tablo 6. Deney ve kontrol gruplarına ait mast hücre sayısı oranı

			Mast ortalaması	Degranüle mast ortalaması
48 SAAT	MTAD	N	9	9
		Ortalama	27,7778	6,3611
		Ortanca	28,5000	5,0000
		Standart sapma	7,36805	4,10052
	Deneyssel solüsyon I	N	9	9
		Ortalama	29,0000	7,1667
		Ortanca	29,0000	5,0000
		Standart sapma	10,86781	5,32829
	Deneyssel solüsyon II	N	9	9
		Ortalama	35,8056	11,8611
		Ortanca	33,7500	8,5000
		Standart sapma	14,33733	7,30059
	Pozitif kontrol	N	2	2
		Ortalama	27,5000	7,6250
		Ortanca	27,5000	7,6250
		Standart sapma	12,72792	3,35876
	Negatif kontrol	N	2	2
		Ortalama	42,0000	6,3750
		Ortanca	42,0000	6,3750
		Standart sapma	6,36396	3,00520

Tablo 7. Deney ve kontrol gruplarına ait mast hücre sayısı oranı

1 HAFTA	MTAD		Mast ortalaması	Degranüle mast ortalaması
		N	9	9
		Ortalama	28,9756	7,2222
		Ortanca	29,0000	5,0000
		Standart sapma	10,80748	5,30543
	Deneysel solüsyon I	N	9	9
		Ortalama	39,0000	18,1667
		Ortanca	42,7500	14,2500
		Standart sapma	12,36426	10,19957
	Deneysel solüsyon II	N	9	9
		Ortalama	50,1111	24,4722
		Ortanca	53,7500	23,2500
		Standart sapma	12,19574	10,96190
	Pozitif kontrol	N	2	2
		Ortalama	52,2500	30,1250
		Ortanca	52,2500	30,1250
		Standart sapma	,70711	3,71231
	Negatif kontrol	N	2	2
		Ortalama	58,1250	26,8750
		Ortanca	58,1250	26,8750
		Standart sapma	18,20800	3,71231

Tablo 8. Deney ve kontrol gruplarına ait mast hücre sayısı oranı

28 GÜN	MTAD		Mast ortalaması	Degranüle mast ortalaması
		N	9	9
		Ortalama	35,8056	11,8611
		Ortanca	33,7500	8,5000
		Standart sapma	14,33733	7,30059
	Deneysel solüsyon I	N	9	9
		Ortalama	33,2778	22,6667
		Ortanca	31,2500	24,5000
		Standart sapma	20,58574	12,91620
	Deneysel solüsyon II	N	9	9
		Ortalama	41,4444	20,5000
		Ortanca	44,7500	23,5000
		Standart sapma	8,41017	8,18249
	Pozitif kontrol	N	2	2
		Ortalama	42,1250	10,2500
		Ortanca	42,1250	10,2500
		Standart sapma	3,00520	3,18198
	Negatif kontrol	N	2	2
		Ortalama	40,0000	15,8750
		Ortanca	40,0000	15,8750
		Standart sapma	3,88909	,17678

Bütün gruptaki iyileşme sürelerinin mast hücre sayılarından yararlanılarak Kruskal-Wallis analiziyle yapılan karşılaştırmasında, 48 saatlik ve 4 haftalık iyileşmelerde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p>0,05$). Ancak bir haftalık iyileşmedeki farklılık istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

Bir haftalık iyileşmenin solüsyonlar arasındaki farklılığını irdelemek için Mann Whitney U ve Wilcoxon testleri ile yapılan değerlendirmede; MTAD grubu ile Deneysel solüsyon I grubu ve MTAD grubu ile negatif kontrol grubu arasında anlamlı bir fark oluşmazken ($p>0,05$), diğer bütün gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır ($p<0,05$).

TARTIşMA

Kök kanal tedavisinin esas amacı; hastalıklı dokunun uzaklaştırılması, kanallar ve dentin kanalcıklarındaki mikroorganizmaların eliminasyonunun sağlanması ve tedavi sonrasında yeniden kontaminasyonunun önlenmesidir. Birçok çalışma endodontik enfeksiyonların, anaerobik suşların önemli rol oynadığı polimikrobiyal enfeksiyonlar olduğunu göstermektedir^{53,54,83-88}. Araştırmamızda deney mikroorganizması olarak mantar türünün seçilmesinin nedeni son yıllarda özellikle inatçı endodontik enfeksiyonların oluşumunda mantarların neden olduğunun rapor edilmesi^{59,62,89,90}; kullanılagelmekte olan irrigasyon solüsyonlarının antibakteriyel özelliklerinin yeterince araştırılmış ve bunların anibakteriyel etki yönünden hayli geliştirilmiş olmasına rağmen, antifungal etkiye yeterince önem verilmediğine inanmamızdır. Mantarlar periradiküler lezyonlarla birlikte seyreden, inatçı ve sekonder enfeksiyonlarla ilişkili olduğu için, endodontik ilaçların ve irriganların bu mikroorganizmalara da etkili olması gerektiği açıktır. Böylece antifungal etkinliği olan ilaçlar sayesinde mantarlar tarafından oluşturulan inatçı ve sekonder endodontik enfeksiyonların tedavisinde başarılı olunabilir. Son zamanlarda literatüre giren ve piyasaya arz edilmiş olan antibiyotik, asit ve deterjan içerikli preparatların sunumunda da özellikle vurgulanan, antibakteriyel etkileri ve bunların NaOCl'le birlikte kullanılmaları durumunda elde edilecek kazanımlardır. Bu preparatların da antifungal etkilerine yeterince önem verilmemiş ve daha önce tarafımızdan yapılmış çalışmalarda^{8,82} da antibiyotik-asit-deterjan içerikli bu tür solüsyonların

mantarlara etkili olmadığı gösterilmiştir. Bu nedenledir ki bu çalışma, klinik kullanıma yeni sunulmuş bir preparatın (Bio Pure), bu preparata benzer niteliklerde hazırlanmış bir deneysel solüsyonun (Deneysel Solüsyon I) ve böyle bir solüsyona antifungal bir madde (fluconazole) eklendiğinde (Deneysel Solüsyon II) ortaya çıkacak performanslarını, antifungal etki açısından irdelerken yumuşak dokulardaki histopatolojik etkilerini de incelemek üzere planlanmıştır.

Mantarlar primer kök kanal enfeksiyonlarında nadiren görülürler, ancak tedavinin başarısız olduğu olgularda, genellikle sebep olarak daha sık izlenirler.

Nair ve arkadaşları⁹⁰ endodontik tedavi sonrasında gelişen periradiküler lezyonlardan aldıkları 9 örnekten 2'sinde mantar gözlemişlerdir.

Waltimo ve arkadaşları⁶² saf kültürlü veya bakteri içeren inatçı endodontik enfeksiyonlu 692 vakanın 47'sinde fungi varlığını gözlemişler ve *C. albicans*' ın en fazla izole edilen tür olduğunu tespit etmişlerdir. İzole edilen diğer türler: *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. inconspicua* ve *Geotrichum candidum*'dur.

Sundqvist ve arkadaşları⁹¹ başarısız endodontik tedavili dişlerin 24 kanalının 2'sinde *C. albicans* izole etmişlerdir. Benzer koşullar altında Molander

ve arkadaşları⁸⁹ 68 örneğin 3'ünde; Peciuliene ve arkadaşları⁹² periradiküler lezyonlara bağlı kök kanal tedavisi görmüş 33 dişin 6'sında *C. albicans* bulmuşlardır.

Hancock ve arkadaşları⁹³ kronik periradiküler lezyonlu ve kök kanal dolgulu 34 dişin 1'inde belirgin mikrobiyal büyüme gösteren *C. albicans* tespit etmişlerdir.

Cheung ve Ho⁹⁴ başarısızlıkla sonuçlanan kök-kanal tedavisi bulunan Güney Çin'li 12 hastanın 2'sinde fungal türler izole etmişlerdir.

Brezilyada başarısız tedavileri inceleyen Pinheiro ve arkadaşları⁹⁵ 51 hastanın 2'sinde *Candida* türleri tespit etmişlerdir.

Siqueira ve Roças⁹⁶ ise PSR ile 22 hastanın 2'sinde *C. albicans* tespit etmişlerdir.

Tüm bu çalışmalardaki ortak görüş, fungusların kök-kanal sistemine endodontik tedavi sırasında yerleştiği ve periradiküler lezyonların oluşumunda etkili olduğu şeklindedir^{97,98}. Kök kanalında kullanılan yıkama solüsyonlarına dirençli olduğu ve kanal tedavisindeki başarısızlıklarda oynadığı rol bu tür çalışmalarla ortaya konmuş olduğu için deney mikroorganizması olarak çalışmamızda *C. albicans* seçilmiştir.

Endodontik tedavi sırasında kök kanal sisteminin tamamen dezenfekte edilebilmesi için bazı faktörlere dikkat edilmelidir: İnsan dışında kök kanal morfolojisi komplekstir. Dar, kör kanallar, kanallarda vadiler, kanallar arası birleşmeler, ek kanal ve yan dallanmalar gibi varyasyonların bulunabilme olasılığı oldukça yüksektir. Pulpal ve periradiküler hastalıkların gelişiminin ana etkeni olarak gösterilen mikroorganizmalar ve ürünleri sadece bu düzensizliklerden yararlanmakla kalmayıp aynı zamanda değişik derinliklerde dentin kanalcıklarında da bulunabilir^{45,46,99-101}.

Mekanik preparasyon sırasında kullanılan mevcut teknikler, kök kanal sistemindeki birçok alanı enstrümanlar tarafından dokunulmamış olarak bırakmaktadır¹⁰². Ayrıca enstrümanların kesici etkisi ile oluşan smear tabakası da dezenfektan solüsyonların kanalcıkların içine penetre olmasını engellemektedir^{12,103-105}. Smear tabakasının incelenmeye başlanmasından sonra, kök kanallarının temizlenmesi işlemindeki amaçlardan biri, bu tabakanın kaldırılarak dentin kanallarının ağzlarının açık hale getirilmesi ve kanalcık derinliklerine ulaşabilmek olmuştur. Torabinejad ve arkadaşları⁷ yaptıkları bir çalışmada, MTAD'nın smear tabakasını kaldırabilme yeteneğini SEM yardımıyla göstermişlerdir. MTAD'nın, düşük konsantrasyonlu NaOCl ile birlikte kök kanal irrigantı olarak kullanılması halinde, dentin kanalcıklarının yapısında kayda değer bir değişiklik yaratmadan²⁴ birçok ilaca dirençli olan *E.faecalis*'i etkili bir şekilde elimine ettiği gösterilmiştir^{22,23,25}. Çalışmamızda kullandığımız Deneysel

Solüsyon I ve Deneysel solüsyon II'nin hem smear tabakasını kaldırmada hem de *E. faecalis*'e karşı aynı şekilde ve düzeyde etkili olduğu daha önceki çalışmalarımızda^{8,82,106} gösterildiğinden, antifungal etkileri açısından da antibiyotik-asit-deterjan karışımlı preparatlar grubuyla kıyaslama yapmanın yanlış olmayacağı düşüncesiyle bu araştırma gerçekleştirilmiştir.

Deney tüplerindeki mikrobiyolojik protokoller insan dişlerindeki durumu doğru bir şekilde yansıtamamaktadır. Çünkü yeni çalışmalar dentin ve komponentlerinin, kök kanal irriganları ve ilaçlarının antibakteriyel etkinliğini olumsuz yönde etkilediğini göstermektedir^{107,108}. Bu nedenle bir çok araştırmada, kök kanal irrigasyon solüsyonlarının ve ilaçlarının dentini dezenfekte etme yeteneğini belirleyebilmek amacıyla, sığırdan elde edilen enfekte dentin örnekleri kullanılmıştır. Sığır ve insan dentini arasındaki benzerliklere rağmen, sığır dentinindeki kanalcık boyutu insan dentinine oranla oldukça büyük ve geniştir. Bu nedenle deneylerimizde insan dişi tercih edilmiş ve Ørstavik ve Haapasalo¹⁰⁹'nın geliştirdiği dentin kanallarının enfeksiyon ve dezenfeksiyonunda kullanılan *in vitro* test metodu kullanılmıştır.

Mikrobiyolojik deneyler sırasında ekim yapılmayan negatif kontrol grubunda bir üreme olmamıştır. Başlangıçta ekim yapıp sadece serum fizyolojikle işlem gören pozitif kontrol grubunda ise başlangıç değerleriyle son değerler arasında bir fark görülmemiştir. Bu durumun deney şartlarımızın

güvenilirliğini ve deney gruplarında elde edilen sonuçların sadece incelenen solüsyonlara bağlı olduğunu gösterdiği inancındayız.

Mikrobiyolojik deneyler NaOCl uygulamasının, incelenen bütün solüsyonlarda sonucu olumlu yönde etkilediğini göstermiştir. Bir başka deyişle bütün solüsyonların, NaOCl ile birlikte uygulanmaları durumunda *C. albicans* üzerinde daha etkili oldukları gözlenmiştir. Bu durum NaOCl'in antifungal etkiye sahip olduğunu belirtmiş olan Şen ve arkadaşların¹¹⁰ bulgularıyla aynıdır.

MTAD ve Deneysel solüsyon I'in NaOCl ile birlikte olsun veya olmasın bütün örneklerdeki etkisi açısından, 1. ve 5. dakikada aralarında bir fark bulunmamaktadır. Bu uygulama sürelerinde pozitif kontrol grubuna göre hafifçe bir azalma gözlenirse de bu gruptakine yakın bir üreme gözlenmektedir. Etki 5. dakikadan itibaren artmakta ve pozitif kontrol grubuyla aralarında belirginleşen bir fark ortaya çıkmaktadır. 1. ve 5. dakikalarda etkili olmayan bu iki solüsyonun hafifte olsa bir azalmaya sebep olmaları, içeriklerinden değil de deneyler sırasındaki yıkama işlemlerinden kaynaklanıyor olabilir. Ancak 30 ve 60 dakikalık uygulamalardan sonra ortaya çıkan fark barizdir ve içeriklerinden kaynaklanan bir azalmadan söz etmek gerekmektedir. Her iki solüsyonun NaOCl'siz uygulamalarında, bütün süreler için paralel bir doğru oluşturmalarının yanında, 30 ve 60 dakikalık uygulamalardan sonraki azalma için grafikte (Şekil 2) takip ettikleri çizginin de aynı olması ilginçtir. Ancak bu iki solüsyonun NaOCl'li 30 ve 60 dakikalık uygulamalarında aynı paralellik görünmemektedir (Şekil 3).

Bu durum MTAD ile bizim hazırladığımız Deneysel Solüsyon I içindeki maddelerin konsantrasyon farkına bağlı olmalıdır. Burada aynı solüsyonlar NaOCl'siz uygulamada neden benzer bir farklılık yaratmadı sorusu akla gelebilir; bu durum endodontinin yaygın ve geleneksel irrigasyon solüsyonu olan NaOCl ile ilgili olmalıdır ve konuyla ilgili daha başka araştırmaların da yapılması gerektiği sonucunu ortaya çıkarmaktadır. Bir başka ifadeyle NaOCl'in bu solüsyonların içeriklerinde bulunan maddelerle girdiği reaksiyonlar ve bu reaksiyonlardan ortaya çıkan ve çıkabilecek ürünler bu küçük farka sebep olabilir. Çünkü MTAD ile bizim hazırladığımız Deneysel Solüsyon I'in içerikleri aynı olsa da miktarlarında fark vardır. Belki, deneylerimizde nötralizasyon işlemleri yapılmış olmasına rağmen, deneyin kontrol edilemeyen şartlarına bağlı olarak dentin kanalcıklarında kalması muhtemel NaOCl bu farkın ortaya çıkmasına sebep olmuş olabilir. Bu küçük ayrıntı da çalışma sonunda ayrıca araştırılması gereken bir konu olarak dikkati çekmiştir. Her ne kadar MTAD ve Deneysel Solüsyon I için NaOCl ile birlikte olsun veya olmasın, birinde az diğerinde fazla şeklinde 30 ve 60 dakikalık uygulamaları takiben bir koloni azalması görülmüş olsa da *C. albicans*'a karşı bu düzeyde bir etkinin yeterli olmadığı açıktır. Yani bu maddeler 30 dakika 60 dakika gibi klinik anlamı olmayan uzun sürelerle uygulanmış olmasına rağmen ortamdaki mantar varlığı devam etmektedir. Esasen bu maddelerin mantarlara karşı etkili olmadığı daha önceki çalışmamızda^{8,82} ortaya çıktığı gibi, Ruff ve arkadaşlarının¹¹¹ MTAD ile yaptıkları çalışmada da bulunan antifungal etkinin yeterli düzeyde olmadığı bildirilmiştir. Smith ve Wayman¹¹² da sitrik asidin ve NaOCl'in antimikrobiyal etkilerini

değerlendirmişler ve *C. albicans*'ın *E. faecalis* veya *Bacillus* türlerinden daha dirençli olduğunu bildirmişlerdir. Ayrıca, sitrik asitin NaOCl kadar etkili olmadığını vurgulamışlardır. Bu sonuçlar, çalışmamızda kullanılan MTAD ve Deneysel Solüsyon I içerisinde bulunan etken maddelerden biri olan sitrik asidin antifungal etkisinin olmadığını göstergeleridir.

Tetrasiklin hidroklorit kollagenazı, kemik rezorpsiyonunu inhibe etme^{113,114} ve kök yüzeylerine fibroblastik ataşmanı artırma^{115,116} gibi özelliklerinden dolayı özellikle periodontal hastalıkların tedavisinde kullanılmakta olan geniş spektrumlu bakteriyostatik etkili bir antibiyotiktir. Bakteriostatik etkilerini tRNA'nın 30S ribozomuna bağlanmasını engellemek yoluyla, bakteriyel protein sentezini inhibe ederek göstermektedir¹¹⁷. Sistemik tetrasiklin kullanımı ile ilişkili çeşitli dezavantajların (fotosensitivite, şelatör özelliğini taşıyarak kalsiyum ve diğer iyonları bağlaması, ayrıca kısa serum yarılanma ömrü nedeniyle günde 4 kere alınması gereği gibi) bulunması minosiklin ve doksisisiklin gibi yeni tetrasiklin izomerlerinin geliştirilmesine neden olmuştur. Bu şekilde serum yarılanma ömrü uzatılarak ve iyon etkileşimi azaltılarak dezavantajlar ortadan kaldırılmıştır.

MTAD ve Deneysel Solüsyon I'in etken maddelerinden olan doksisisiklin de primer olarak bakteriyostatik bir antibiyotiktir ve 30S bakteriyel ribozoma bağlanarak bakteriyel protein sentezini inhibe etmektedir. Geniş spektrumlu gram pozitif ve gram negatif organizmalara etkili olup, mantarlara

etkili değildir¹¹⁸. Bu ilacın diğer antibiyotiklerle beraber kullanımının normal floradaki dengeyi değiştirip mantarların büyümesine yardımcı olduğu bildirilmiştir¹¹⁹. MacNeill ve arkadaşları¹²⁰ ise tetrasiklin hidroklorit kullanımıyla ortaya çıkan düşük pH'ın bakteriosidal bir etkiye sebep olduğunu¹²¹ ve böylece kompetitiv bakterilerin miktarını azaltarak *C. albicans* büyümesine uygun ortam sağladığını bildirmişlerdir. Diğer taraftan Rams ve arkadaşları¹²² da bakteriyostatik konsantrasyonlardaki doksisisiklinin sistemik olarak verilmesi ile derin periodontal ceplerde *C. albicans* büyümesine neden olduğunu rapor etmişlerdir.

Çeşitli Candida türlerini birbirinden ayırmada ve ayrıca iyi sporlanma sağladığı için küf mantarlarının mikroskoptaki yapılarını inceleme için yapılan lam ekinlerinde Mısırunu-Tween-80 agar kullanılır. Burada Tween-80, lipit yapıda bir deterjandır ve *candida*'ların çoğalmalarını sağlamaktadır¹²³⁻¹²⁵.

MTAD'de ve tarafımızdan hazırlanan Deneysel Solüsyon I de bütün bu maddeler bulunmaktadır ve dolayısıyla antifungal bir etkinin oluşmaması normaldir.

C. albicans ile enfekte edilen dental disklerde denenen irriganlardan biri olan %15'lik EDTA solüsyonunun, tek başına 1. ve 5. dakikalık uygulamalarındaki etkisi bütün örneklerde MTAD ve Deneysel Solüsyon I ile aynı iken Deneysel Solüsyon II'den daha azdır. NaOCl'siz EDTA uygulaması 30.

dakikada 6 örnekte, 60. dakikada ise bütün örneklerde tamamen etkili bulunmuştur. EDTA'nın NaOCl ile birlikte uygulanması durumunda, bütün örneklerde 1. ve 5. dakikalarda MTAD ve Deneysel Solüsyon I'e göre 2 Log'luk daha fazla bir azalma sağlanırken, Deneysel Solüsyon II ile 5.dakikaya kadar daha iyi bir sonuç elde edildiği, ancak 30. dakikalık uygulama ile bütün örneklerde EDTA'nın tam bir antifungal etki gösterdiği bulgulanmıştır. Denenen solüsyonlar arasında en iyi sonuçlar, NaOCl ile birlikte uygulanırsa 30 dakika, NaOCl'siz uygulanırsa 60 dakikalık uygulamadan sonra EDTA ile elde edilmiştir. Ne var ki EDTA'nın dentin dokusunda bu denli uzun süre tutulması, yüzeyde bozulmalar yaratacağı için olanaksızdır. Nitekim SEM incelemelerinde de bu doğrulanmış ve dentin yüzeyinde flulaşma şeklinde (Şekil 14) kendini göstermiştir. EDTA'nın antifungal etkileri açısından elde ettiğimiz sonuçlar, daha önce yapılan bir çalışmanın sonuçlarıyla benzerdir. Şen ve arkadaşları¹²⁶ da bir çalışmalarında, EDTA'nın *C. albicans* üzerindeki antifungal etkisini agar difüzyon deneyi kullanarak bazı dezenfektanlar ve rutin antifungal ajanlarla kıyaslamışlar ve sonuçta EDTA'nın en etkili antifungal ajan olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer yandan Ruff ve arkadaşları¹¹¹ MTAD ile EDTA'nın *C. albicans* üzerindeki etkilerini inceledikleri çalışmalarında, bu mantar türünün her iki maddeyle de yok edilemediğini ancak MTAD ile elde edilen bulguların göreceli olarak daha iyi olduğunu saptamışlardır. Bu araştırmada böyle bir sonucun elde edilmesi metodolojiye ve uygulama sürelerine bağlı olabilir. Her şeye rağmen EDTA'nın diş yüzeyinde yukarıda da bahsedilen etkileri de dikkate alınırsa konu üzerinde yeni araştırmalara da ihtiyaç olduğu açıktır.

Deneysel Solüsyon II deneyde kullanılan bütün solüsyonlara göre bütün örneklerde NaOCl ile birlikte veya tek başına 1. dakikadan itibaren belirgin bir antifungal etki göstererek bu etkisini 60. dakikaya kadar artarak sürdürmüştür. Denenen solüsyonlar arasında 1. ve 5. dakikalık uygulamalarla en etkili solüsyondur. 30. dakika tek başına uygulandığında 2 örnekte, NaOCl'le birlikte uygulandığında ise 3 örnekte, 60. dakikada ise tek başına 2 örnekte, NaOCl'li uygulamada da 4 örnekte tam antifungal etki kaydedilmesine rağmen 30 ve 60 dakikalık uygulamalardaki etkisi EDTA kadar başarılı bulunmamıştır. Deneysel Solüsyon II'nin MTAD ve Deneysel Solüsyon I'e göre fazla olan bu antifungal etkinliği şüphesiz ki içeriğine eklenen antifungal ajana (flukonazole) bağlıdır. Gerek daha önceki çalışmalarımızda⁸ ortaya çıkan gerekse bu araştırmamızla da vurgulanan sonuç odur ki antibiyotik-asit-deterjan karışımları antifungal etkiye sahip değildirler ve mantarlara da etkili olmaları için içeriklerine bu tür bir madde eklenmelidir. Deneylerimiz sonucunda bu yolla antifungal etki sağlandığı anlaşılmış olsa da yukarıda belirtildiği üzere hala canlı mantar kolonileri kalmaktadır. Bu nedenle bu karışımlara eklenecek antifungal ajan tür ve miktarı üzerinde yeni çalışmalar yapılmalıdır. NaOCl uygulamasının, antifungal ajan içeren Deneysel Solüsyon II ile elde edilen sonuçları da olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Bu bulgu Şen ve arkadaşları'nın¹¹⁰ % 0,12 chlorhexidine, %1'lik NaOCl ve %5'lik NaOCl'in antifugal özelliklerini inceledikleri ve smear tabakası olmadığında NaOCl'in 30 dakikadan sonra başlayan bir antifungal etki gösterdiği sonucuna vardıkları çalışmalarıyla desteklenmektedir.

Yukarıda tartışılan veriler üreme görülen örneklerdeki toplam koloni sayılarından elde ettiğimiz verilerle ilgilidir. Ancak asıl ilginç bir bulgu gruplarda zamana bağlı olarak üreme görülen örnek sayılarında ortaya çıkmaktadır. İlginç olan, Tablo 3 incelendiğinde 60 dakikalık uygulama sonrasında bütün değerlerin 1-3 gün ile 21-30 günlük değerleri arasında fark olmamasına rağmen, MTAD ile Deneysel Solüsyon I'ın NaOCl'li uygulamasında her iki solüsyonun 60 dakikalık uygulamasından sonra 4-10. günde sıfıra düşmüş olan üreme görülen örnek sayısının, günler geçtikçe tekrar artı değer kazanması ve daha ilginç giderek artmasıdır. Bu durum her halde yukarıda bahsedilen içerikteki maddelerle ilgili olmalıdır. Öyle görünüyor ki özellikle Tween-80 gibi mantar besisi yeri özellikli deterjan madde, bu özelliği nedeniyle tekrar üremeye sebep olmaktadır. Ancak tabiki sadece bu maddeyi sorumlu tutmak bu aşamada mümkün değildir ve tez çalışmasının konusu bu olmadığı için konu üzerinde daha fazla tartışma yapmadan bunun da ayrıca incelenmesi gereken ilginç bir bulgu olduğu belirtilmelidir. Bu kadar uzun zaman aralığında mikroorganizmaların yeniden canlanmasının sebebi dentin kanalcıkları içine yerleşip kanalcıklar içinde endodontik ilaçların letal etkisinden korunması da olabilir. Nitekim Haapasalo H. ve arkadaşlarının¹⁰⁷ da bu yönde bir bulguları vardır.

Çalışmamızda gerçekleştirilen SEM incelemeleri mikrobiyolojik deneylerle elde edilen sonuçlarla benzer sonuçları görüntü olarak vermiştir. Bir

başka ifadeyle, mikrobiyolojik deneylerde numerik olarak elde edilen sonuçlar, SEM incelemelerinde de görüntü olarak karşımıza çıkmıştır.

Dental materyallerin ağızda kullanılmadan önce deney hayvanlarında genel toksisite deneyleri ve kas ve subkutan dokular içine implantasyon yoluyla denenmesi ve incelenmesi gereklidir. Bir maddenin veya bir tekniğin insanda *in vivo* olarak denenmesi şüphesiz ki en doğru sonucu verecektir. Ancak bu durum bilinen bir çok nedenle mümkün değildir ve bunun yerine öncelikle hayvan deneylerinin gerçekleştirilmesi gereklidir. İnsan deneyleri genellikle tehlikeli, pahalı ve etik olmadığı için, yerine hayvanlar kullanılmıştır. İlk çalışmaların birçoğu ratlar üzerinde yapılmış, ileri uygulamalar için ön bilgi edinilmeye çalışılmıştır. Genelde ratların tercih edilmesinin sebebi çeşitli yöntemlerin denenmesine imkan vermesi, asistan olmaksızın anestezi ve operasyon yapabilme imkanı sağlamasıdır. Bir başka deyimle teknik çalışmada daha kolay ve kısa bir yol oluşudur. Bu nedenlerle biz de antibiyotik-asit-deterjan karışımı maddelere antifungal madde eklenerek hazırlanacak yeni bir solüsyonun olası toksisite ve irritasyonel etkilerini irdelemek için hayvan deneyleri uygulamaya ve bu deneyleri ratlar üzerinde yapmaya, bunu yaparken ratlar üzerindeki etkilerini rutin ve rutine girmek üzere olan maddelerle kıyaslamaya karar verdik.

Bağ dokusu, tüm vücudu saran ve karşılaştırmalı çalışmalara esas olan retiküler fibriller, benzer elemanlar, hücreler, elastik lif ve fibrilleri içeren bir

sistemdir¹²⁷. Bağ dokusunda yapılacak incelemeler periapikal dokularda oluşabilecek reaksiyonlara benzer sonuçları vereceğinden doku reaksiyonları bu şekilde tespit edilmeye çalışılmıştır.

Başta kalp-damar cerrahisi olmak üzere doku içinde, damar içinde rahatlıkla kullanılabilmelerinden dolayı teflon tüpler, çalışmamızdaki materyallerin dokuya uygulanması için uygun görüldü. Bu materyallerin ağızdaki kullanımlarındaki etki, dişin apikaline sızma şeklinde olacağından bir anlamda teflon tüpler dişin dublikasyonu olarak değerlendirildi. Direkt enjeksiyon yöntemini tercih etmememizin bir sebebi de belli zaman periyodundan sonra enjekte edilen maddelerinin doku içinde tespit edilememesi ve verilen miktarın standardize edilememesi gibi dezavantajlar oldu.

Teflon tüpler tüm gruplarda subkutan olarak yerleştirilmiştir. Negatif kontrol grubunda yerleştirilen boş tüpe ait 48 saatlik bulgularda kalın yapıda fibrin kapsül oluşumu tespit edilirken, ilerleyen zamanlarda fibrosellüler kapsül gelişimi ve 4. haftada kollajenize bir kapsül oluşumu izlenmektedir. Benzer sonuçları Hussain ve arkadaşları¹²⁸ ve Olsson ve arkadaşların⁷⁵,ın çalışmalarında da görmekteyiz. Pozitif ve negatif kontrol gruplarında nekroz ve yabancı cisim dev hücrelerinin görülmemesi, diğer grupların aksine akut faz inflamatuvar reaksiyonunun gelişmediğini göstermektedir. NaOCl'le uygulanan pozitif kontrol grubunda başlangıçta (48 saat) negatif kontrol grubuyla aynı sonucun elde edilmesinin sebebi konsantrasyonunun düşük dozda olmasına bağlı

olabilir. Ancak dördüncü haftada orta düzeyde eosinofil varlığı görülmüştür. Bu, %2'lik NaOCl'e karşı bir hipersensitivite (aşırı duyarlılık) reaksiyonunun geliştiğinin bir göstergesidir. Eosinofillerin varlığı Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonlarında (anaflaktik tip), viral ve fungal enfeksiyonlarda izlenmektedir¹²⁹. Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonu daha önce duyarlanmış ve IgE tipi antikor üretmiş organizmaların bir antijenle yeniden karşılaşması sonucu meydana gelir. Eosinofillerin dördüncü haftada görülmesi lokal geç faz anaflaktik reaksiyonla uyumludur. Anaflaktik reaksiyon sistemik veya lokal olabilir. Lokal anaflaksi çok defa, 5-30 dakika içinde gelişen ve 1 saat süren erken faz ve 2-8 saat sonra başlayıp birkaç gün devam eden geç faz reaksiyonları şeklinde görülür. Geç faz reaksiyonun özelliği nötrofil, eosinofil ve diğer lökositlerin katılımıyla inflamatuvar karakter göstermesidir⁷⁹.

MTAD, Deneysel Solüsyon I ve Deneysel Solüsyon II'ye karşı oluşan cevaplar incelendiğinde, 48 saatlik bulgulara apse formasyonu ve yer yer nekroz izlenirken, birinci ve dördüncü haftalarda bu histopatolojik değişikliklerin görünmemesi; kullandığımız malzemelerin oluşturdukları akut inflamatuvar reaksiyonu kronik iltihabın takip ettiği ve normal bir iyileşme dönemiyle bunun tamamlandığını göstermektedir. Erken dönemde aşırı akut inflamatuvar reaksiyon gözlenirken, bunu uzun süreçte bir kronik iltihap ve sonuçta doku uyumluluğu yönünde seyretme olarak değerlendirebiliriz.

Uyarılma sonrası aktive olan mast hücrelerinin, enflamatuvar fazın başlatılması ve modülasyonu, hücresel elementlerin proliferasyonu ve yeni oluşan bağ dokusu matriksinin yeniden şekillenmesi gibi iyileşme fazlarının önemli olaylarını kontrol ettiği belirtilmiştir. Mast hücresinin iyileşme sürecinin düzenlenmesindeki önemi mast hücrelerinden degranüle olan biyolojik mediatörlerin fazla olmasının veya eksikliğinin, aşırı granülasyon dokusu oluşumu ile karakterize bozulmuş tamire, geciken iyileşmeye ve enflamatuvar fazın kronikleşmesine neden olmasıdır¹³⁰. Çalışmamız sonucunda, denenen solüsyonlar arasında biyouyumluluk açısından istatistiksel tek fark birinci hafta sonunda elde edilen bulgulardadır. MTAD, Deneysel Solüsyon I ve Deneysel Solüsyon II'ye karşı 48 saatlik erken dönemde benzer reaksiyonlar ortaya çıkarken, MTAD ve Deneysel Solüsyon I'e karşı iyileşme 1 haftada tamamlanmakta, Deneysel Solüsyon II tarafından oluşturulan reaksiyonların iyileşmesi daha geç olmaktadır. Burada tek fark Deneysel Solüsyon II içinde fluconazole bulunması olduğuna göre, 1. haftadaki bu fark bu maddeye bağlı olmalıdır. Ancak dördüncü hafta incelemelerinde gözlenen iyileşmenin ne zaman gerçekleştiği, gerçekleşmiş olan bu iyileşmenin ne zaman tamamlandığı ayrıca incelenmelidir. Zira 1 ile 4.hafta arasındaki zaman dilimi oldukça uzundur. Bir başka ifadeyle 1.hafta incelemelerinde görülmeyen iyileşme örneğin 8-10 günde tamamlanıyorsa aradaki fark çok önemli değildir denilebilir; ama daha sonra gerçekleşiyorsa tabi ki bu önemli bir fark olabilir. Bu nedenle fluconazole'lü preparatlarla oluşan doku reaksiyonları için daha kısa zaman aralıklı yeni çalışmalar gereklidir. Sonuç olarak MTAD ve Deneysel Solüsyon I ve II'nin aynı reaksiyonlara sebep olduğu

fakat MTAD ve Deneysel Solüsyon I'e karşı iyileşmenin daha çabuk gerçekleştiği fakat Deneysel Solüsyon II ile ortaya çıkan reaksiyonun da sonuçta iyileştiği söylenebilir. Burada ortaya çıkan bir husus, Deneysel Solüsyon I in MTAD ile aynı davranışları göstermesidir. Bu durumun deneyi kurgularken MTAD davranışlarını taklit etmek için Deneysel Solüsyonları hazırlamanın yanlış olmadığını gösterdiği inancındayız.

SONUÇLAR

Çalışmamızdan elde edilen bulgular aşağıdaki maddeler halinde özetlenebilir.

1. Antibiyotik-asit-deterjan karışımı bir preparat olarak piyasaya sunulan MTAD (BioPure) ve bu maddenin davranışlarını irdelemek üzere aynı içeriklerle hazırlanan Deneysel Solüsyon I, 1 ve 5 dakikalık uygulamalarla *C. albicans* üzerinde her hangi bir etki oluşturmamaktadır. 30 ve 60 dakikalık uygulamalar sonunda elde edilen ve süre uzadıkça artan *candida* azalması ise klinik olarak bir anlam ifade etmeyeceği için bu maddelerin antifungal etkilerinin olduğu şeklinde yorumlanamamıştır.

2. Hem MTAD'in hem Deneysel Solüsyon I'in NaOCl ile birlikte kullanılması *C. albicans* üzerindeki etkilerini arttırmaktadır. Bu maddelerin NaOCl ile birlikte 60 dakika uygulanması sonrasında tüm örneklerdeki *C. albicans* kolonileri 10. güne kadar yok olsa da bazı örneklerde tekrar üreme görülmesi ve bu sayının giderek artması, her iki solüsyonun içeriğindeki maddelerin ve özellikle Tween-80'in yok etme bir yana, üreme için uygun bir ortam yaratabileceği kuşkusu yaratmaktadır.

3. Antibiyotik-asit-deterjan karışımı bu yeni nesil preparatlara antifungal bir madde (fluconazole) eklendiğinde davranışın ne olacağını araştırmak üzere hazırlanan Deneysel Solüsyon II, 1 ve 5 dakika gibi klinik uygulama açısından en uygun sürelerde, deneylerde kullanılan MTAD, Deneysel Solüsyon I ve EDTA'ya göre *C. albicans* üzerinde çok daha etkili olmakla beraber kolonilerin tamamını yok edememektedir.

4. *C. albicans*'ın tam yok edilmesi için NaOCl'siz 60 dakika, NaOCl'le birlikte 30 dakika EDTA uygulanması gerektiği anlaşılmıştır. Ancak bu kadar uzun süre gerektiren uygulama, EDTA'nın dentin dokusu üzerinde yaratacağı diğer etkiler de dikkate alındığında, klinik olarak bir anlam ifade etmemektedir.

5. Antibiyotik-asit-deterjan karışım olan ticari preparat BioPure (MTAD), bu preparata benzer olarak hazırlanan Deneysel Solüsyon I ve Deneysel Solüsyon I'e fluconazole ilavesiyle hazırlanan Deneysel Solüsyon II'ye karşı oluşan doku reaksiyonları bir birine benzerdir. Kısa dönemde (48 saat) ortaya çıkan histopatolojik reaksiyonlar her üç madde için eş değerdedir. Ancak MTAD ve Deneysel Solüsyon I ile ortaya çıkan reaksiyonlar daha kısa sürede (1 hafta) iyileşirken, Deneysel Solüsyon II karşısında oluşan reaksiyonların iyileşmesi için daha uzun zaman gerekmektedir.

6. Fluconazole ilave edilmesi *C. albicans* riskini azaltmakla beraber tam olarak ortadan kaldıramamaktadır. Yine bu maddenin ilave edilmesi antibiyotik-asit-deterjan içerikli preparata biyouyumluluk yönünden olumsuz bir etki yaratmamaktadır.

ÖZET

Kök kanallarının kemomekanik preparasyonunda irrigasyon solüsyonlarının büyük önemi vardır. MTAD solüsyonu, endodontik tedaviler için yeni geliştirilmiş antibiyotik-asit-deterjan karışımı bir kök kanal temizleyicisidir. Bu solüsyonun antifungal etkisi yeterince araştırılmamıştır.

Bu araştırmada MTAD içindeki maddelerle hazırlanmış bir deneysel solüsyonla, bu deneysel solüsyona fluconazole eklenerek hazırlanmış bir başka solüsyonun mikrobiyolojik ve histopatolojik davranışları NaOCl'li ve tek başlarına olarak MTAD ve EDTA'le kıyaslanmıştır.

Mikrobiyolojik deneylerde Ørstavik & Haapasalo'nun geliştirdiği, *in vitro* model 346 diş üzerinde uygulanmıştır. MTAD, Deneysel Solüsyon I, Deneysel Solüsyon II ve EDTA'nın *C. albicans* üzerindeki etkileri tek başlarına ve NaOCl ile birlikte 1, 5, 30 ve 60 dakikalık uygulamalarla araştırılmıştır. *C. albicans* kolonilerinin tam yok olması NaOCl+EDTA'nın 30 dakika veya sadece EDTA'nın 60 dakika uygulamasıyla sağlanmıştır. Bu süreler klinik olarak anlamlı değildir. Makul süreler olan 1 ve 5 dakikalık uygulamalarda *C. albicans*

zerindeki en anlamlı etki, fluconazole ekleyerek hazırladığımız Deneysel Solüsyon II ile elde edilmiştir. MTAD ve bu maddenin içerdiği maddelerle tarafımızdan hazırlanan Deneysel Solüsyon I ile elde edilen etkiler aşağı yukarı bir diğerinin aynıdır.

Deneysel Solüsyon II'nın kullarımdaki solüsyonlar gibi kullanılıp kullanılamayacağını araştırmak üzere ratlarla yapılan biyouyumluluk deneylerinde bütün maddelere karşı 48 saat içinde benzer bir akut inflamatuvar cevabın oluştuğu, 1. ve 4. haftalarda inflamasyonun yerini fibrotik aktivasyonun, yani iyileşmenin aldığı grlmştir. Deneysel Solüsyon II'ye karşı oluşan reaksiyonun iyileşmesi için MTAD ve Deneysel Solüsyon I'e göre biraz daha uzun bir sre gerekmiştir.

SUMMARY

“Evaluation of the antifungal and histopathological effects of various final irrigation solutions”

MTAD is a new root canal final cleansing solution. Its antifungal activity has not been evaluated.

In this study, an experimental solution similar to MTAD in composition (Experimental solution I), and another experimental solution also similar to MTAD, but added fluconazole (Experimental solution II) have been evaluated for their antifungal effects and their biocompatibility. These experimental solutions and MTAD, used together with NaOCl or alone, were compared with MTAD and EDTA.

For the microbiological part of the study, the model developed by Ørstavik and Haapasalo was adopted and applied on 346 human dentinal samples. Experimental solution I, Experimental solution II, MTAD and EDTA, either alone

or in combination with NaOCl, were tested for their antifungal activities on *C. albicans* at 1, 5, 30 and 60 minute applications.

NaOCl+EDTA and EDTA effectively disinfected the samples in 30 and 60 minutes, respectively. These durations were not found clinically acceptable. Clinically acceptable duration of effectiveness, which are 1 and 5 minutes, has been most satisfactorily attained with the use of the Experimental solution II. The antifungal effectiveness attained by MTAD and the Experimental solution I was similar to each other.

In order to evaluate whether the experimental solutions could be used clinically as safely as the conventional solutions, biocompatibility tests were performed on rats. In 48 hours post-operatively, similar inflammatory responses were found in the histopathological sections of all tested materials. At 1 and 4-weeks post-operatively, the acute inflammatory reaction was substituted with fibrotic activation (healing). It took longer for the Experimental solution II to heal than Experimental solution I and MTAD.

KAYNAKLAR

1. Alaçam T. Endodonti. Bölüm 12, Ankara : Barış Yayınları; 2000
2. Goldman M, Goldman LB, Cavaleri R, Bogis J, Lin PS. The efficacy of several endodontic irrigation solutions: a scanning electron microscopic study: part 2. J Endod 1982; 8: 487-92.
3. Kennedy WA, Walker WA 3rd, Gough RW. Smear layer removal effects on apical leakage. J Endod 1986; 12: 21-7.
4. Küçükay I. Smear tabakasının varlığında veya yokluğunda apikal sızıntının incelenmesi. Doktora Tezi. İstanbul: 1990.
5. Zaimoğlu L. Kök kanalında smear tabakasının scanning electron mikroskobu (SEM) ile incelenmesi (I), A.Ü. Diş Hek. Fak. Derg. 1985; 12: 333-44.
6. Zaimoğlu L, Gür G. Seyreltik bir organik asit ile kavite duvarındaki smear tabakasının uzaklaştırılması: SEM çalışması. A.Ü. Diş Hek. Fak. Derg. 1988; 15: 203-8.

7. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. J Endod 2003; 29: 170-5.
8. Türköz E, Alimzhanova G, Bala O, Akça G, Deniz H, Sultan N. Deneysel bir irrigasyon solüsyonunun farklı konsantrasyonlarının antimikrobiyal etkisinin incelenmesi (pilot çalışma). Türk Endodon. Dern. 9. Uluslararası Bilimsel Kongresi, İstanbul; 2004. Ab.108.
9. Chow TW. Mechanical effectiveness of root canal irrigation. J Endod 1983; 9: 475-9.
10. Sundqvist G, Figdor D. Endodontic treatment of apical periodontitis. In: Ørstavik D and Pitt Ford TR, editors. Essential Endodontology. Oxford: Blackwell Science; 1998.
11. Öztürk B, Özer F. Effect of NaOCl on bond strengths of bonding agents pulp chamber lateral walls. J Endod 2004; 30: 362-4.
12. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics. a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodon 2002; 94: 658-66.
13. Grossman LT, Meiman BW. Solution of pulp tissue by chemical agents. In: *In vitro* antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. (Sena NT, Gomes BPFA, Vianna ME, Berber

VB, Zaia AA, Ferraz CCR & Souza-Filho FJ. Int Endod J 2006; 39: 878-85.

JADA 1941; 28: 223-5.

14. Kaufman A.Y, Greenberg I. Comparative study of the configuration and cleanliness level of root canals prepared with the aid of sodium hypochlorite and bis-dequalinium-acetate solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1986; 62: 191-7.

15. Wesselink P, Bergenholtz G. Treatment of the necrotic pulp. In: Bergenholtz G, et al. Editors. Text Book of Endodontology. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003.

16. Becking AG. Complications in the use of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Report of three cases. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1991; 71: 346-8.

17. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2001; 92: 446-50.

18. Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: *in vivo* study. J Endod 2004; 30: 84-7.

20. Dahlén G, Samuelsson W, Molander A, Reit C. Identification and antimicrobial susceptibility of enterococci isolated from the root canal. Oral Microbiol Immunol 2000; 15: 309-12.

19. Cohen S, Hargreaves KM. Pathways of The Pulp. 7 th ed. St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Madrid, Philadelphia, Sidney, Toronto: Mosby; 2006. p. 290-357
21. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. J Endod 2003; 29: 334-7.
22. Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. *In vitro* antimicrobial efficacy of MTAD and sodium hypochlorite. J Endod 2003; 29: 450-2.
23. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. J Endod 2003; 29: 576-9.
24. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. J Endod 2003; 29: 233-9.
25. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. J Endod 2003; 29: 400-3.
26. Cengiz AT. Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji. Güneş Kitabevi, Ankara; 2004.
27. Ustaçelebi Ş. Temel ve klinik mikrobiyoloji. Bölüm 5. Ankara: Güneş Kitabevi Ltd. Şti.; 1999.

28. Siqueira JF Jr and Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2004; 97: 632-41.
29. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Mikrobiol Mol Biol Rev* 1998; 62: 130-80.
30. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001; 9: 327-35.
31. Calderone RA, Braun PC. Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol Rev* 1991; 55: 1-20.
32. Senet JM. Candida adherence phenomena, from commensalism to pathogenicity. *Int Microbiol* 1998; 1: 117-22.
33. Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 1994; 7: 29-42.
34. Bagg J, Silverwood RW. Coagglutination reactions between *Candida albicans* and oral bacteria. *J Med Microbiol* 1986; 22: 165-9.
35. Grimaudo NJ, Nesbitt WE. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Fusobacterium* species. *Oral Microbiol Immunol* 1997; 12: 168-73.
36. Grimaudo NJ, Nesbitt WE, Clark WB. Coaggregation of *Candida albicans* with oral *Actinomyces* species. *Oral Microbiol Immunol* 1996; 11: 59-61.

37. Holmes AR, Gopal PK, Jenkinson HF. Adherence of *Candida albicans* to a cell surface polysaccharide receptor on *Streptococcus gordonii*. Infect Immun 1995; 63: 1827-34.
38. Jabra-Rizk MA, Falkler WA Jr, Merz WG, Kelley JL, Baqui AA, Meiller TF. Coaggregation of *Candida dubliniensis* with *Fusobacterium nucleatum*. J Clin Microbiol 1999; 37: 1464-8.
39. Jenkinson HF, Lala HC, Shepherd MG. Coaggregation of *Streptococcus sanguis* and other *Streptococci* with *Candida albicans*. Infect Immun 1990; 58: 1429-36.
40. Parsons JC Jr, Miller CH. Plaque formation by mixed cultures of non primary plaque- forming microorganisms. J Dent Res 1974; 53: 825- 31.
41. Miller CH, Kleinman JL. Effect of microbial interactions on *in vitro* plaque formation by *Streptococcus mutans*. J Dent Res 1974; 53: 427-34.
42. Haynes K. Virulence in *Candida* species. Trends Microbiol 2001; 9: 591-6.
43. Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by the yeast *Candida albicans*. Arch Oral Biol 1988; 33: 617-9.
44. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. Clin Microbiol Rev 2001; 13: 122-43.

45. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. Arch Oral Biol 1997; 42: 513- 20.
46. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 1997; 84: 68- 73.
47. Phan QT, Belanger PH, Filler SG. Role of hyphal formation in interactions of *Candida albicans* with endothelial cells. Infect Immun 2000; 68: 3485-90.
48. San-Blas G, Travassos LR, Fries BC, Goldman DL, Casadevall A, Carmona AK, Barros TF, Puccia R, Hostetter MK, Shanks SG, Copping VM, Knox Y, Gow NA. Fungal morphogenesis and virulence. Med Mycol 2000; 38: 79-86.
49. Cotter G, Kavanagh K. Adherence mechanisms of *Candida albicans*. Br J Biomed Sci 2000; 57: 241-9.
50. Calderone R, Suzuki S, Cannon R, Cho T, Boyd D, Calera J, Chibana H, Herman D, Holmes A, Jeng HW, Kaminishi H, Matsumoto T, Mikami T, O'sullivan JM, Sudoh M, Suzuki M, Nakashima Y, Tanaka T, Tompkins GR, Watanabe T. *Candida albicans*: adherence, signaling and virulence. Med Mycol 2000; 38: 125-37.
51. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev 2002; 15: 167-93.

52. Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. Microbiol Rev 1995; 59: 646-72.
53. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1994; 78: 522-30.
54. Möller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Heyden G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys, Scand J Dent Res 1981; 89: 475-84.
55. Debelian GJ, Olsen I, Tronstad L. Observation of *Saccharomyces cerevisiae* in blood of patient undergoing root canal treatment. Int Endod J 1997; 30: 313-7
56. Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garia GD, Silva BK, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MA, Farias L De M. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Immunol 2001; 16: 100-5.
57. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. J Endod 2000; 26: 695-8.
58. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Moraes SR, Santos KR. Direct amplification of rRNA gene sequences for identification of selected oral pathogens in root canal infections. Int Endod J 2002; 35: 345-51.

59. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. J Endod Dent Traumatol 1995; 11: 6-9.
60. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP. Patterns of microbial colonization in primary root canal infection. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2002; 93: 174-8.
61. Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: Review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 80-96.
62. Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endod J 1997; 30: 96-101.
63. Sen 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 Endod 2003; 96: 201- 6.
64. Waltimo TM, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. *In vitro* yeast infection of human dentin, J Endod 2000; 26: 207-9.
65. Damm DD, Neville BW, Geissler RH. Jr, White DK, Drummond JF, Ferretti GA. Dentinal candidiasis in cancer patients. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 1988; 65: 56-60.
66. Kinirons MJ. Candidal invasion of dentine complicating hypodontia. Br Dent J 1983; 154: 400-1.

67. Siqueira José F, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002; 28: 770-3.
68. Grossman L. Evaluation of antifungal agents for endodontic use. *J Dent Res* 1967; 46: 215-7.
69. Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM. Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 40-79.
70. Maertens JA. History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* 2004; 10: 1-10.
71. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill patients. *Lancet Infect Dis* 2003; 3: 772-85.
72. Hauman CH, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 2003; 36: 75-85.
73. International Organization For Standardization: "Dentistry – preclinical evolution of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test dental materials", 1997; Methods for ISO/CD 7405, 1997
74. Türk Standartları Enstitüsü. Diş hekimliğinde kullanılan malzemeler için biyolojik deney metotları. Ankara, 1998; TSE 8227-8229
75. Olsson B, Sliwowski A, Langeland K. Subcutaneous implantation for the biological evaluation of endodontic materials. *J Endod* 1981; 7: 355-69.

76. Polyzois GL, Dahl JE, Hensten-Pettersen A. Biological testing of dental materials: development of national and international standards. J Biomater Appl 1995; 9: 355-62.
77. Friend LA, Browne RM. Tissue reaction to some root filling materials. Br Dent J 1968; 125: 291-7.
78. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiswal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. Endod Dent Traumatol 1991; 7: 181-5.
79. Rowe AHR. Treatment with N₂ root canal sealer. Br Dent J 1964; 7: 27-30.
80. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants, Oral Surg Med Path 1967; 24(5): 674-83.
81. Kasman IG, Goldman M. Tissue response to silicone rubber when used as a root canal filling. Oral Surg Med Path 1977; 43: 607-14.
82. Türköz E, Alimzhanova G, Bala O, Akça G, Deniz H, Sultan N. Geliştirilmiş deneysel bir irrigasyon solüsyonunun farklı konsantrasyonlarının antifungal etkisinin incelenmesi (pilot çalışma). Türk Endodon. Dern. 9. Uluslararası Bilimsel Kongresi. İstanbul, 2004. Ab. 107
83. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy 1974; 25: 347-58.

84. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 321-8.
85. Kantz WE, Henry CA. Isolation and classification of anaerobic bacteria from intact chambers of non-vital teeth in man. *Arch Oral Bio* 1974; 19: 91-6.
86. Sundqvist G.: Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol and Immunol* 1992; 7: 257-62.
87. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endodon* 1992; 18: 427-9.
88. Wasfy MO, McMahon KT, Minah GE & Falkler WA. Microbial evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol and Immunol* 1992; 7: 100-5.
89. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31: 1-7.
90. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long- term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16: 580-8.
91. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren 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.

92. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429-34.
93. Hancock HH III, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J. Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a north american population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001;91: 579-86.
94. Cheung GS, Ho MW. Microbial flora of root canal-treated teeth associated with asymptomatic periapical radiolucent lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2001; 16: 332-7.
95. Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 2003; 36: 1-11.
96. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod* 2004; 97: 85-94.
97. Sirén EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30: 91-5.
98. Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003;14: 128-37.

99. Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J* 1990; 23: 20-7.
100. Armitage GC, Ryder MI, Wilcox SE. Cemental changes in teeth with heavily infected root canals. *J Endod* 1983; 9: 127-30,
101. Waltimo TM, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32: 421-9.
102. Davis SR, Brayton SM, Goldman M. The morphology of the prepared root Canal: A study utilizing injectable silicone. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972; 34: 642-8.
103. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18: 35-40.
104. Haapasalo MP, Ørstavik D. *In vitro* infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66: 1375-9.
105. Yang SE, Bae KS. Scanning electron microscopy study of the adhesion of *prevotella nigrescens* to the dentin prepared root canals. *J Endodon* 2002; 28: 433-7.
106. Türköz E, Alimzhanova G, Bala O, Deniz H, Değim T. Deneysel bir irrigasyon solüsyonunun farklı konsantrasyonlarının smear tabakasını

kaldırmadaki etkisinin incelenmesi (pilot çalışma). Türk Endodon. Dern. 9. Uluslararası Bilimsel Kongresi. İstanbul, 2004. ab.109.

107. Haapasalo H, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentin: *in vitro* study. Int Endod J 2000; 33: 126-31.

108. Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo MP. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *E. faecalis* by dentin, dentin matrix, type-1 collagen, and heat-killed microbial whole cells. J Endod 2002; 28: 634-7.

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

110. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Antifungal effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. J Endod 1999; 25: 235-8.

111. Ruff ML, McClanaban SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. J Endod 2006; 32: 331-3.

112. Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as root canal irrigant. J Endodon 1986; 12: 54-8.

113. Golub LM, Ciancio SG, Ramamurthy NS, Leung M, McNamara TF. Low-dose doxycycline therapy: effect on gingival and crevicular fluid collagenase activity in humans. *J Periodontal Res* 1990; 25: 321-30.
114. Golub LM, Goodson JM, Lee HM, Vidal AM, McNamara TF & Ramamurthy NS. Tetracyclines inhibit tissue collagenases: effects of ingested low-dose and local delivery systems. *J Periodontol* 1985; 56: 93-7.
115. Terranova VP, Franzetti LC, Hic S, Difflorio RM, Lyall RM, Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment of dentin promotes fibroblast adhesion and growth. *J Periodon. Res* 1986; 21: 330-7.
116. Wikesjö UM, Baker PJ, Christersson LA, Genco RJ, Lyall RM, Hic S, Difflorio RM, Terranova VP. A biochemical approach to periodontal regeneration: tetracycline treatment conditions dentin surfaces. *J Periodon Res* 1986; 21: 322-9.
117. Requa- Clark BS, Holroyd SV. Antiinfective agents. In: Requa- Clark BS & Holroyd SV, editors. *Applied pharmacology for the dental hygienist*. 3 rd ed, St. Louis: Mosby Yearbook, Inc.; 1995.
118. Chambers H.F. Antimicrobial agents: Protein synthesis inhibitors and miscellaneous antibacterial agents. In: Hardman JG, Limbird LE, editors. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 10 th ed. New York: The McGraw-Hill Co.; 2001. p. 1240-6

119. Edwards JE, Jr. *Candida Species*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. *Principles and practice of infectious diseases*. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. Vol. 2, p. 2938-57.
120. MacNeill S, Rindler E, Walker A, Brown AR, Cobb CM. Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *J Clin Periodontol* 1997; 24: 753-60.
121. Walker CB. Selected antimicrobial agents: mechanisms of action, side effects and drug interactions. *Periodontology* 2000 1996; 10: 12-28.
122. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Subgingival occurrence of enteric rods, yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. *Oral Microbiol and Immunol* 1990; 5: 166-8.
123. de Hoog GS, Guarro J. General Techniques. In: *Atlas of Clinical Fungi*, CBS (the Netherlands)/ Universitat Rovira i Virgili, Reus, Spain, 1995, p.37
124. Fisher F, Cook NB. Yeasts and yeast like organisms. In: *Fundamentals of diagnostic mycology*. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. SAUNDERS Company; 1998. Vol. 7, p. 196-230.
125. Tümbay E. *Pratik Tıp Mikolojisi*. 1.Baskı, Bornova, İzmir: Bilgehan Basımevi; 1983.

126. Sen BH, Akdeniz BG, Denizci AA. The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on *Candida albicans*. Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2000; 90: 651-5.
127. Block MR, Lewis RD, Hirsch J, Coffey J, Langeland K. Distribution of N₂ paste containing ¹⁴C paraformaldehyde following root canal therapy in dogs. Oral Surg Med Path 1980; 50: 350-60.
128. Hussain A.Gazi, Nayak RG, Bhat KS. Tissue-irritation potential of dilute formocresol, Oral Surg 1981; 51: 74-85.
129. Kumar V, Abbas AK, Fusto N. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo W.B. Saunders Company; 2006.
130. Noli C, Mioli A. The mast cell in wound healing. Vet Dermatol 2001; 12: 303-13.

TEŞEKKÜRLER

Doktora eğitimimde ve tez çalışmalarım boyunca bilgi ve deneyimleri ile bana her zaman destek olan hoşgörüsünü eksik etmeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. EMİN TÜRKÖZ'e,

Doktora eğitimim boyunca benim Endodonti alanında yetişmeme olanak sağlayan ve moral veren sayın Prof.Dr. TAYFUN ALAÇAM a,

Araştırmanın şekillenmesindeki ve gelişimindeki desteği ve eşsiz yardımları ile sayın Prof. Dr. OYA BALA'ya,

Mikrobiyolojik deneylerin gerçekleşmesindeki yardımları ve her türlü desteğini esirgemeyen G.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji AD başkanı Prof. Dr. NEDİM SULTAN'a,

Çalışmalarımın her dönemimde sonsuz ilgi ve büyük katkıları olan, hakkını hiçbir zaman ödeyemeyeceğim değerli Öğr. Görv. Dr. GÜLÇİN AKÇA'ya,

Tez çalışmalarımda emeği olan G.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmasötik Teknoloji AD öğretim üyesi sayın Doç. Dr. TUNCER DEĞİM'e,

Araştırmanın hayvan deney aşamasındaki yardımlarından dolayı
G.Ü. Eczacılık Fakültesi Farmokognozi AD öğretim üyesi sayın Yrd. Doç. Dr.
ESRA KÜPELİ'ye,

Patolojik değerlendirmelerin gerçekleşmesini sağlayan ve
desteğini her zaman hissettiren G.Ü. Diş Hekimliği Fakültesi Patoloji Bilim Dalı
öğretim üyesi sayın Doç.Dr. S. ELİF GÜLTEKİN ve araştırma görevlisi
Dt. DEFNE AKPINAR'a,

Tarama Elektron Mikroskop çalışmalarında büyük katkıları olan
ve yardımını esirgemeyen sayın ABDULLAH ÖNER'e,

Araştırmamda kullanılan “Fluconazole” isimli etken madde
temininde gösterdikleri anlayış ve yardımlarından dolayı “Pfizer” İlaçları Ltd. Sti.
Yetkililerine,

Doktora eğitimim boyunca maddi ve manevi desteklerinden dolayı
sevgili eşim VOLKAN KOYLU'ya ve bugünlere gelmemi sağlayan değerli
aileme,

Saygılarımı ve teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZGEÇMİŞ

1973 yılında Almatı'da doğdum. İlk, orta ve lise öğrenimimi Almatı'da tamamladım. 1994 yılında girdiğim Hacettepe Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nden 2000 yılında mezun oldum. 2001 yılında Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı'nda doktora eğitimime başladım.

Evliyim.