



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKLORÖZ ASİDİN SİTOTOKSİSİTESİNİN VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ:
IN VITRO ÇALIŞMA**

GÖZDEM BAYRAKTAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAFİZE ÖZTÜRK ÖZENER
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2023



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPOKLORÖZ ASİDİN SİTOTOKSİSİTESİNİN VE
ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ:
IN VITRO ÇALIŞMA**

GÖZDEM BAYRAKTAR
DOKTORA TEZİ

DANIŞMAN
DR. ÖĞR. ÜYESİ HAFİZE ÖZTÜRK ÖZENER
PERİODONTOLOJİ DOKTORA PROGRAMI

İSTANBUL- 2023

BEYAN

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

Gözdem Bayraktar



TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince bilgi, birikim ve tecrübesiyle bana içtenlikle yol gösteren, yaşadığım her zorlukta yardımını hissettiğim, mesleki ve akademik eğitimimde büyük katkıları olan sevgili ve kıymetli danışman hocam Dr. Öğr. Üyesi Hafize ÖZTÜRK ÖZENER'e,

Eğitimim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, bilgi ve tecrübeleriyle her türlü konuda bana yol gösteren değerli hocalarım Prof. Dr. Leyla KURU, Prof. Dr. Başak DOĞAN, Doç. Dr. Ömer Birkan AĞRALI, Dr. Öğr. Üyesi Kemal Naci KÖSE ve Dr. Öğr. Üyesi Selin YILDIRIM'a,

Tez çalışmamda büyük emek harcayarak katkıda bulunan ve çalışma sürecimde fikir ve bilgisini benden esirgemeyen değerli hocalarım Dr. Öğr. Gör. Ayşe Mine YILMAZ GÖLER ve Dr. Öğr. Üyesi Burak AKSU'ya,

Doktora eğitimim ve tez çalışmam boyunca motivasyonumu sağlayan, bana güç ve huzur veren, her zaman sevgi ve desteklerini en derinlerde hissettiğim sevgili arkadaşlarım Dt. Gizem GÜNDÜZ ve Dt. Gülce Nil VARLIHAN'a,

Doktora eğitimimi sıcak ve samimi bir ortamda keyifle geçirmemi sağlayan, ne zaman ihtiyacım olsa yanımda olan kıymetli yol arkadaşlarım Dt. Ezgi AKÇE, Dt. Elif VAR ODABAŞ, Dt. Aslı AKTAN ve Dt. Selçuk KIRMACI'ya,

Fakültede bulunduğum süre içerisinde kendileriyle çalışmaktan oldukça keyif aldığım eski ve yeni tüm çalışma arkadaşlarıma ve Periodontoloji Anabilim Dalı personeline,

Birlikte çalışmaktan çok keyif aldığım ve doktora eğitimim boyunca desteklerini her zaman hissettiğim sevgili İstanbul İmplantoloji ailesine,

Bana dostluğun ne demek olduğunu öğreten, iyi ve kötü her anımda yanımda hissettiğim kıymetli dostlarım Dr. Dt. Hilal USLU ve Dr. Öğr. Üyesi Bilge ERSÖZ'e,

Bugünlere gelmemde en büyük paya sahip, hayatı birlikte öğrendiğim, en sıkıntılı anlarımda bile koşulsuz yanımda olan, beni benden daha çok düşünen biricik ablam Özlem BAYRAKTAR YILDIRIMER'e ve kıymetli ağabeyim Akın YILDIRIMER'e,

Koşulsuz sevgi ve fedakarlıklarıyla yanımda olan, tüm kararlarımda bana güvenen ve beni destekleyen, güçlü olmamı sağlayan, kızları olmaktan gurur duyduğum annem Emine BAYRAKTAR, babam Niyazi BAYRAKTAR ve teyzem Hatice BAYRAKTAR olmak üzere tüm aileme

En içten teşekkürlerimi sunarım...

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından “Hipokloröz asidin sitotoksitesinin ve antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi: in vitro” başlıklı ve TDK-2021-10281 numaralı proje ile desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ.....	i
ŞEKİL LİSTESİ	iii
TABLO LİSTESİ	vi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1. Periodonsiyum	5
4.1.1. Diş eti	5
4.1.2. Periodontal ligament	6
4.1.3. Sement.....	7
4.1.4. Alveol kemiği.....	8
4.2. Diş Eti Fibroblastları.....	9
4.3. Periodontal Hastalıklar.....	10
4.4. Periodontal Patojenler	15
4.4.1. <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	15
4.4.2. <i>Candida albicans</i>	18
4.5. Periodontal Hastalıkların Tedavisi.....	21
4.6. Antimikrobiyal Tedavi ve Kimyasal Ajanlar.....	23
4.7. Klorheksidin.....	27
4.8. Hipokloröz Asit.....	33
4.9. Sitotoksisite Testleri.....	39
4.9.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür hücre canlılık testi.....	40
4.9.2. Laktat dehidrogenaz sitotoksisite testi	41
4.10. Antimikrobiyal Aktivite Testleri.....	42
4.10.1. Zamana bağlı öldürme yöntemi	43
5. GEREÇ ve YÖNTEM	44
5.1. Solüsyonların Hazırlanması	44
5.2. Sitotoksik Aktivite Deneyleri	45
5.2.1. Hücrelerin çözülmesi, pasajlanması, çoğaltılması ve sayılması	45
5.2.2. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür testinin uygulanması	47
5.2.3. Laktat dehidrogenaz testinin uygulanması	52
5.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri	55

5.3.1 Mikroorganizmaların kültürü	56
5.3.2. <i>A. actinomycetemcomitans</i> 'a karşı antimikrobiyal etkinliğin saptanması	56
5.3.3. <i>C. albicans</i> 'a karşı antimikrobiyal etkinliğinin saptanması.....	58
5.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz	59
6. BULGULAR	60
6.1. Sitotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi	60
6.1.1. Solüsyonların insan diş eti fibroblast hücreleri üzerine canlılık etkileri.....	60
6.1.2. Solüsyonların insan diş eti fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri	63
6.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi	67
6.2.1. <i>A. actinomycetemcomitans</i> 'a karşı antimikrobiyal etkinlik	67
6.2.2. <i>C. albicans</i> 'a karşı antimikrobiyal etkinlik	70
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	73
8. KAYNAKLAR.....	86
9. ÖZGEÇMİŞ	117
10. BİLİMSEL FAALİYETLER	118

KISALTMA VE SİMGELER LİSTESİ

%	:	Yüzde
°C	:	Santigrat derece
AD	:	Absorbans değeri
Cl ⁻	:	Klorür
Dk	:	Dakika
DMEM	:	Dulbecco's Modified Eagles Medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
FTS	:	Fosfat tamponlu salin
H ⁺	:	Hidrojen
H ₂ O ₂	:	Hidrojen peroksit
HDM	:	Hücre dışı matriks
HOCl	:	Hipokloröz asit
İDF	:	İnsan diş eti fibroblastları
KAK	:	Klinik ataşman kaybı
kDA	:	kilo Dalton
KH	:	Klorheksidin
KOB	:	Koloni oluşturan birim
LDH	:	Laktat dehidrogenaz
µL	:	Mikrolitre
MDP	:	Mikrobiyal dental plak
mg	:	Miligram
mL	:	Mililitre
MTT	:	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür
NAD	:	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	:	Nikotinamid adenin dinukleotid hydrid
NADPH	:	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaOCl	:	Sodyum hipoklorit
nm	:	Nanometre
O ₂ ⁻	:	Süperoksit
OCl ⁻	:	Hipoklorit
Ort	:	Aritmetik ortalama
ppm	:	Parts per million

sa : Saat
sn : Saniye
SS : Standart sapma



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa Numarası

Şekil 1. Periodonsiyumun yapısı (Schroeder, 1986'dan yararlanılarak hazırlanmıştır).....	5
Şekil 2. İnsan çene kemiğinden bir kesit (Fiorellini ve ark., 2015'ten yararlanılarak hazırlanmıştır).....	8
Şekil 3. <i>In vitro</i> koşullarda insan diş eti fibroblast hücrelerinin ışık mikroskobu görüntüsü...	10
Şekil 4. Dental plak biyofilm kaynaklı gingivitis vakası	11
Şekil 5. Eritem ve deskuamasyon ile karakterize pemfigus vulgaris vakası.....	11
Şekil 6. Tedavi edilmiş bir periodontitis hastasında azalmış periodonsiyumda gingivitis vakası	12
Şekil 7. Periodontitis vakası	13
Şekil 8. Klorheksidinin kimyasal yapısı (Greenstein ve ark., 1986).....	27
Şekil 9. Nötrofil tarafından patojenin fagositozu ve sonrasında oksidatif patlama sürecinde HOCl üretimi ile patojenin sindirimi (Armstrong ve ark., 2015 ve Wang ve ark., 2007'den yararlanılarak hazırlanmıştır)	34
Şekil 10. <i>In vitro</i> koşullarda HOCl sentezi (Huang ve ark., 2008'den yararlanılarak hazırlanmıştır).....	37
Şekil 11. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi (Kamiologlu ve ark., 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır)	41
Şekil 12. LDH sitotoksikite testinin mekanizması.....	42
Şekil 13. a. Test solüsyonları b. Test solüsyonlarının son konsantrasyonları	44
Şekil 14. a. İDF hücre dizini, b. DMEM, c. Besiyeri.....	45
Şekil 15. a. Santrifüj cihazı, b. Hücre ekimi, c. İnkübatör.....	46
Şekil 16. İDF hücrelerinin, a. Başlangıç, b. %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra mikroskopik görüntüsü	46
Şekil 17. a. Thoma lamı üzerinde tripan mavisi ile boyanan hücreler, b. Işık mikroskobu, c. Hücrelerin 10× büyütmede sayılması	47
Şekil 18. a. Flasklara ekimi yapılan İDF hücreleri, b. İnkübasyon sonrası mikroskopik görüntüsü	47
Şekil 19. İDF hücreleri üzerine 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl, %0,2 KH solüsyonları ve kontrol grubu olarak da sadece besiyeri eklenmesi sonrası a. 30 sn, b. 2 dk, c. 1 sa, d. 24 sa görüntüsü.....	48
Şekil 20. <i>Thiazolyl blue tetrazolium bromide</i>	49

Şekil 21. İDF hücrelerinin bulunduğu 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl, %0,2 KH, kontrol ve hücresiz (blank) kuyucukların üzerine MTT ilavesi sonrası 3 saat inkubasyonun ardından a. 30 sn, b. 2 dk, c. 1 sa, d. 24 sa gruplarının görüntüsü	50
Şekil 22. a. İDF hücrelerin üzerine DMSO ilave edilmesi, b. Karıştırıcıda 10 dk beklendi. ..	51
Şekil 23. 96 kuyucuklu plakalara eklenen örnekler	51
Şekil 24. a. PerkinElmer Enspire multimode plaka okuyucu, b. Plakaların okutulması sonucu elde edilen absorbans değerleri	52
Şekil 25. Flasklara ekimi yapılan İDF hücreleri a. 30 sn, b. 2 dk, c. 1 sa, d. 24 sa grupları ...	53
Şekil 26. a. Örneklerden toplanan süpernatantların aktarıldığı mikrotüpler, b. LDH Reaksiyon Karışımı eklenerek örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarılması	54
Şekil 27. a. 96 kuyucuklu plakalara aktarılan örnekler, b. Karanlık ortamda 30 dk inkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakalar içindeki örnekler	54
Şekil 28. Yöntem akış şeması	55
Şekil 29 a. Beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerine ekilen <i>A. actinomycetemcomitans</i> , b. Sabouraud dekstrozs sıvı besiyerine ekilen <i>C. albicans</i> mikroorganizmaları	56
Şekil 30. <i>A.actinomycetemcomitans</i> için %0,2 KH antimikrobiyal aktivite testi	57
Şekil 31. <i>A.actinomycetemcomitans</i> için 50 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi	57
Şekil 32. <i>A.actinomycetemcomitans</i> için 200 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi	57
Şekil 33. <i>C. albicans</i> için %0,2 KH antimikrobiyal aktivite testi	58
Şekil 34. <i>C. albicans</i> için 50 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi	58
Şekil 35. <i>C. albicans</i> için 200 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi	59
Şekil 36. Kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen canlılık değerlerinin zaman içindeki değişimi.	62
Şekil 37. Kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerindeki canlılık değerlerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması	63
Şekil 38. Triton X-100 (Kontrol), %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen sitotoksosite değerlerinin zaman içindeki değişimi	65
Şekil 39. Triton X-100 (Kontrol), %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerindeki sitotoksosite değerlerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması	66
Şekil 40. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının <i>A. actinomycetemcomitans</i> mikroorganizmaları üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa	

uygulanması sonucu tespit edilen antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin zaman içindeki değişimi.	68
Şekil 41. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının <i>A. actinomycetemcomitans</i> mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması.	69
Şekil 42. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının <i>C. albicans</i> mikroorganizmaları üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin zaman içindeki değişimi	71
Şekil 43. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının <i>C. albicans</i> mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması.	72



TABLO LİSTESİ

Sayfa Numarası

Tablo 1. Plak kontrolünün sağlanması amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanlar	27
Tablo 2. Hücre canlılığı/sitotoksosite belirleme yöntemleri.....	40
Tablo 3. Antimikrobiyal aktivite değerlendirme yöntemleri	42
Tablo 4. Solüsyon gruplarının İDF hücreleri üzerine MTT testi ile ölçülen canlılık değerlerinin (%) çoklu ve ikili karşılaştırmaları.....	61
Tablo 5. Solüsyon gruplarının İDF hücreleri üzerindeki LDH testi ile ölçülen sitotoksosite değerlerinin (%) çoklu ve ikili karşılaştırmaları.....	64
Tablo 6. Solüsyonların uygulanması sonrası, gruplardaki <i>A. actinomycetemcomitans</i> mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı	67
Tablo 7. Solüsyonların uygulanması sonrası, gruplardaki <i>C. albicans</i> mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı	70

1. ÖZET

Tezin başlığı: Hipokloröz Asidin Sitotoksitesinin ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi: *In Vitro* Çalışma

Öğrencinin Adı Soyadı: Gözdem Bayraktar

Danışman Adı Soyadı: Dr. Öğr. Üyesi Hafize Öztürk Özener

Programın Adı: Periodontoloji Doktora Programı

Amaç: Bu *in vitro* çalışmada, hipokloröz asidin (HOCl) ve klorheksidinin (KH) insan diş eti fibroblastları (İDF) hücre dizinleri üzerindeki sitotoksik etkinlikleri ile *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırılarak araştırıldı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda, nötr pH değerlerine sahip, 50 ppm ve 200 ppm olmak üzere HOCl'nin iki farklı derişimi ile %0,2'lik KH solüsyonunun 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa olarak belirlenen zaman aralıklarında, İDF hücre dizinleri üzerindeki hücre canlılığı 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) analizi ve sitotoksitesi Laktat dehidrogenaz (LDH) testi kullanılarak değerlendirildi. Solüsyonların antimikrobiyal etkilerinin değerlendirilmesi için *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans* mikroorganizmalarına zamana bağlı öldürme yöntemi uygulandı. Verilerin istatistiksel analizleri GraphPad Prism 8.0.2 programı kullanılarak değerlendirildi ($p<0,05$).

Bulgular: MTT analizi sonuçlarına göre 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl ve %0,2 KH ile karşılaştırıldığında en yüksek hücre canlılığını gösterirken, en düşük hücre canlılığı KH uygulaması sonrası görüldü ($p<0,05$). LDH testine göre 50 ppm ve 200 ppm HOCl grupları, İDF üzerine %0,2 KH'den daha az sitotoksik etki gösterirken ($p<0,05$), birbirleri ile benzerdi ($p>0,05$). 50 ppm ve 200 ppm HOCl grupları, *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans*'a karşı %0,2 KH'den daha güçlü antimikrobiyal etkinlik gösterdi ($p<0,05$).

Sonuç: Bu *in vitro* çalışmanın sınırları dahilinde, HOCl solüsyonlarının (50 ppm ve 200 ppm) İDF üzerindeki sitotoksik aktivitesinin %0,2 KH'ye kıyasla daha düşük olduğu, antimikrobiyal etkinliğinin ise daha yüksek olduğu ortaya koyulmuştur.

Anahtar kelimeler: Hipokloröz asit, klorheksidin, fibroblast, sitotoksiste, *in vitro*

2. SUMMARY

Title of Thesis: Evaluation of Cytotoxicity and Antimicrobial Effects of Hypochlorous Acid: An *In Vitro* Study

Student Name, Surname: Gözdem Bayraktar

Supervisor Name: Dr. Öğr. Üyesi Hafize Öztürk Özener

Program Name: Periodontology PhD Program

Objective: This in vitro study aimed to compare the cytotoxic effects of hypochlorous acid (HOCl) and chlorhexidine (CHX) on human gingival fibroblast (HGF) cell lines and their antimicrobial efficacy against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Candida albicans* microorganisms.

Materials and Methods: In this study, two different concentrations of HOCl (50 ppm and 200 ppm) and 0.2% CHX solutions with neutral pH values were evaluated for their effect on cell viability of HGF using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay and cytotoxicity using the lactate dehydrogenase (LDH) assay. The procedures were performed at selected time points of 30 s, 2 min, 1 h, and 24 h. The time-kill method was applied to assess the antimicrobial effects of the solutions against *A. actinomycetemcomitans* and *C. albicans* microorganisms. Statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 8.0.2 program ($p < 0.05$).

Results: According to the MTT assay results, 50 ppm HOCl showed the highest cell viability compared to 200 ppm HOCl and 0.2% CHX, while CHX showed the lowest ($p < 0.05$). The cytotoxic effects of 50 ppm and 200 ppm HOCl groups on HGF were similar ($p > 0.05$) and less than 0.2% CHX ($p < 0.05$) according to the LDH assay. The 50 ppm and 200 ppm HOCl groups demonstrated stronger antimicrobial efficacy against *A. actinomycetemcomitans* and *C. albicans* than 0.2% CHX ($p < 0.05$).

Conclusion: Within the limitations of this in vitro study, it was demonstrated that the cytotoxic activity of HOCl solutions (50 ppm and 200 ppm) on HGF was lower than that of 0.2% CHX, and their antimicrobial efficacy was higher.

Keywords: Hypochlorous acid, chlorhexidine, fibroblasts, cytotoxicity, *in vitro*

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Antimikrobiyal ajanlar diş hekimliğinde, özellikle de periodontolojide, dental plak kontrolü ve diş eti iltihabının tedavisinde ve ayrıca implant ya da diş çekimi gibi oral ve periodontal cerrahi işlemleri öncesi ve sonrasında yardımcı ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Drisko, 2001; Fives-Taylor ve ark., 1999; Petersilka ve ark., 2002; Quirynen ve ark., 2002). Aynı zamanda, ağız kuruluğu veya proteze bağlı gelişen kandida enfeksiyonlarında, hiperplazi, mukozitis varlığında, bakteriyemi ve ağız enfeksiyonları riski taşıyan hastalarda koruyucu ve tedavi edici ajan olarak antimikrobiyallerin kullanımı önerilmektedir (Coelho ve ark., 2020; Muller ve ark., 2017).

Klorheksidin (KH), diş hekimliğinde, ağız boşluğunda dental plak oluşumunun engellenmesinde, diş eti iltihabı ve periodontitiste mekanik periodontal tedaviye yardımcı olarak, cerrahi operasyonlardan sonra gelişebilecek enfeksiyonların ve diğer oral enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılan etkili bir oral antimikrobiyal ajandır (Fardal & Turnbull, 1986). Gram pozitiflerde daha etkili olmak üzere hem gram pozitif hem de gram negatif aerob ve anaerob bakterilere, mantarlara, dermofitlere ve bazı lipofilik virüslere karşı etkin geniş bir spektruma sahiptir (Hennessey, 1973; Russell, 1990). KH, mikrobiyal dental plak (MDP) üzerindeki önemli etkinliğinden dolayı diş hekimliğinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Neely, 2012). Bununla birlikte, uzun süreli kullanıldığında yan etki olarak dişlerde, dilde ve ağız içi restorasyonlarda sarı-kahverengi renklenmelere neden olduğu, diş taşı oluşumunu artırdığı, tat bozukluğuna yol açtığı ve oral mukozada yanma hissi oluşturduğu literatürde gösterilmiştir (Tartaglia ve ark., 2019; Zanatta ve ark., 2010). KH kullanımı; doku nekrozu, enflamatuvar reaksiyonlar ve rejenerasyon inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Coelho ve ark., 2020). Özellikle iyileşme süresince dokular üzerindeki olumsuz etkileri gözönüne alındığında, KH'nin etkin bir tedavi amacıyla antiseptik ve antimikrobiyal ajan olarak güvenle kullanılabilirliği sorgulanmaktadır.

Hipokloröz asit (HOCl), fagositoz sırasında nötrofil tarafından sentezlenen ve tüm mikroorganizmaların yok edilmesinde aktif rol oynayan fizyolojik bir moleküldür (Pullar ve ark., 2000). *In vitro* koşullarda, sodyum hipoklorit ve hidrojen peroksitin tersiner reaksiyonu ile üretilen antiseptik bir solüsyondur (Levine, 2013). Çok çeşitli bakteriyel, viral ve fungal patojenlere karşı oldukça etkili olduğu gösterilmiştir (Armstrong ve ark., 2015). Yapılan çalışmalarda, HOCl solüsyonunun konsantrasyona bağlı olarak enflamatuvar yanıtı modüle edebildiği, fibroblastlar ve keratinositlerin hasarlı alana göçünü etkilediği, düşük

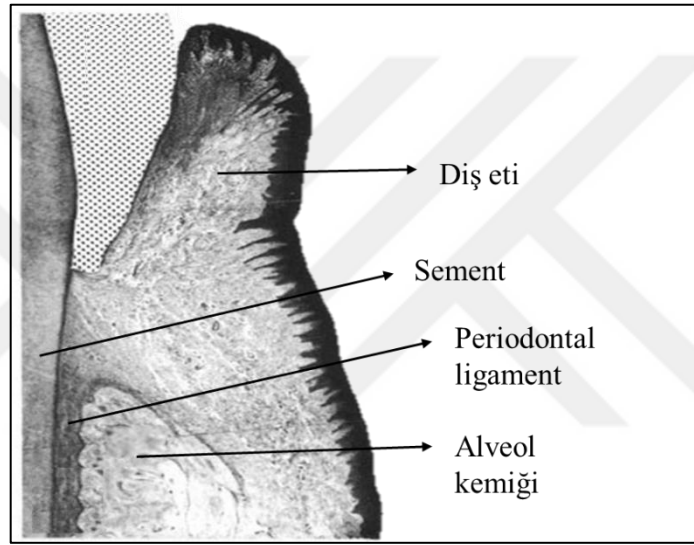
konsantrasyonlarda bile bakterisit etki gösterdiği ve biyofilmi eretike ettiği gösterilmiştir (Sakarya ve ark., 2014; Sam & Lu, 2009). Tıbbın birçok alanında; açık yaraların temizlenmesi ve debridmanında, mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında, kronik yaralarda, diyabetik ayak ülserlerinde, cerrahi yaralarda, ağız-burun-boğaz ve dudak ülserlerinde ve nazal ve boğaz enfeksiyonlarında yara bakım solüsyonu olarak kullanılmaktadır (Armstrong ve ark., 2015). Tıpta ideal bir yara bakım solüsyonu olarak kullanılması, ağız içerisinde bir biyofilm enfeksiyonu olan periodontal enfeksiyonlarda da kullanılabileceği görüşünü doğurmuştur. HOCl'nin sistemik ve gastrointestinal etkilerini değerlendirmek ve gargara olarak kullanıldığında istemeden yutulması durumunda ne olacağını araştırmak için bir hayvan çalışması yapılmıştır (Morita ve ark., 2011). Farelere içme suyu olarak HOCl suyu verilmiş ve ardından ağız boşluğunun görsel muayenesinde, histopatolojik ve sistemik değerlendirmelerde anormal bulgular saptanmadığı belirtilmiştir. Literatürde KH ile kıyaslandığı klinik bir çalışmada (Kim & Nam, 2018), hastalara 1 dk boyunca ağız gargarası olarak 10-30 ppm HOCl, %0.005'lik KH kullanırılmış ve bakılan klinik parametrelerde (halitosis, dental çürük aktivitesi ve bakteri türleri ve hareketliliği) HOCl kullanan grup lehine sonuçlar elde edilmiştir. Veriler doğrultusunda HOCl kullanımının ağız hastalıklarının nlenmesine katkı sağlayabileceği ileri sürülmüştür.

Çalışmamızda, hipokloröz asidin antimikrobiyal ve sağlığı koruyucu bir ajan olarak ağız içerisinde kullanılabilişliğinin aydınlatılması amacıyla farklı konsantrasyonlardaki HOCl solüsyonlarının (50 ve 200 ppm) insan diş eti fibroblastları (İDF) zerindeki sitotoksik etkilerinin ve ağız içi hastalıklarında aktif rol oynayan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve *Candida albicans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin 30 s, 2 dk, 1 sa ve 24 sa olarak belirlenen zamanlarda KH ile kıyaslanarak incelenmesi hedeflendi.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Periodonsiyum

Periodonsiyum; diş eti, periodontal ligament, sement ve alveol kemiğinden oluşan dişlerin etrafında yer alan destekleyici dokulardır (Şekil 1). Periodonsiyum, dişlerin çene kemiğine sabitlenmesi, çiğneme işlevi esnasında diş üzerine gelen basınçlara direnç gösterme, diş çevresinde biriken mikroorganizmaların derin dokulara ulaşmasının engellenmesi gibi önemli işlevlere sahiptir (Schroeder, 1986).



Şekil 1. Periodonsiyumun yapısı (Schroeder, 1986'dan yararlanılarak hazırlanmıştır)

4.1.1. Diş eti

Diş etinin yapısı, dişleri mikroorganizma ve zararlı ajanlara karşı korumak üzerine kurulmuştur. Diş eti kenarı, yapışık diş eti ve interdental diş eti olmak üzere üç bölümden oluşmaktadır (Ainamo & Talari, 1976). Sağlıklı diş eti, alveoler kemiği ve dişlerin kök yüzeyini mine-sement birleşiminin koronali hizasına kadar örten, tıkHz formda bir yapıdır. Histolojik olarak çok katlı yassı epitel ve altındaki *lamina propria* adı verilen bağ dokusundan oluşmaktadır (Lindhe ve ark., 2015).

Diş eti epiteli, ağız ortamı ile derin dokular arasında yarı geçirgen bir bariyer görevi görür. Temel hücreleri keratinositler olmakla birlikte, yapısında Langerhans hücreleri, Merkel hücreleri ve melanositleri de bulundurur (Schroeder & Theilade, 1966). Diş eti epiteli, bağ

dokusuna bazal lamina ile bağlanmaktadır. Bazal lamina, lamina lusida ve lamina densa olmak üzere iki bölümden oluşur. Lamina lusida, epitel hücrelerinin hemidesmozomlar ile bazal laminaya bağlandığı bölgedir ve laminin glikoproteinleri açısından zengindir. Lamina densa ise bazal laminanın bağ dokusuna bakan kısmıdır, tip IV kolajen açısından zengindir. Kolajen lifler, diş eti epiteli ile bağ dokusu arasındaki bağlantının sağlanmasında rol oynar (Fiorellini & Stathopoulou, 2015; Romanos & Bernimoulin, 1990).

Lamina propria temel olarak, kolajen lifler (%60), damarlar ve sinirler (%35), fibroblastlar (%5) ve hücre dışı matriksden (HDM) oluşmaktadır. Esas hücreleri ise fibroblastlardır (Lindhe ve ark., 2015). HDM, bağ dokusu hücrelerinin gömülü olduğu ortamdır ve bağ dokusunun normal fonksiyonunun sürdürülmesi için esastır. Ana bileşenleri, glikozaminoglikanlar, proteoglikanlar ve glikoproteinlerdir. Suyun, elektrolitlerin, besinlerin ve metabolitlerin hücrelere taşınması, hücre göçü ve hücre-hücre etkileşimleri gibi temel olayları düzenler (Lindhe ve ark., 2015). HDM içinde kolajen, retiküler ve elastik bağ dokusu lifleri bulunmaktadır, en sık görülen kolajenler tip I ve tip III'tür. Tip I kolajen, *lamina propria* hacminin çoğunu oluşturur ve diş etinde gerilme kuvvetlerine karşı dayanıklılık sağlar (Mariotti, 1993).

4.1.2. Periodontal ligament

Periodontal ligament, sement ile alveol kemiğini birbirine bağlayan, fibröz bağ dokusu yapısında olan, hücresel açıdan zengin bir dokudur. Kolajen lifleri ile diş alveol kemiğine bağlayıcı temel destek işlevinin yanı sıra, yine bu lifler aracılığıyla dişe gelen kuvvetlerin oluşturduğu şoku absorbe edebilme özelliği taşımaktadır (Fiorellini & Stathopoulou, 2015; McKee ve ark., 1996).

Periodontal ligamentin esas yapısını periodontal lifler oluşturur. Temel olarak tip I, daha az olarak tip III ve XII kolajen liflerden oluşan periodontal lifler, anatomik yerleşimlerine göre alt gruplara ayrılır; transseptal lifler, alveolar kret lifleri, horizontal lifler, oblik lifler, apikal lifler, interradiküler lifler (Lindhe ve ark., 2015). Aynı zamanda, alveol kemiği ile sement arasında uzanan, kemik tarafında sement tarafına göre daha kalın ve kalsifiye olan *Sharpey* lifleri de bulunur. Periodontal ligament, alveol kemiğine komşu distal yüzeyine yeni kemik yığılması ve bağ dokusu liflerinin yenilenmesi ile sürekli olarak yeniden biçimlenir (Fiorellini & Stathopoulou, 2015).

Periodontal ligament, bağ dokusu hücreleri, epitelyal kalıntı hücreleri, immün sistem hücreleri ve nörovasküler sistemle ilgili hücreleri içerir (Berkovitz & Shore, 1982). Esas hücrelerini fibroblastlar oluştururken, osteoblast, osteoklast, sementoblast, odontoklast, nötrofil, lenfosit,

makrofaj, farklılaşmamış bağ dokusu hücreleri ve Malessez epitel artıklarını da içermektedir (Fiorellini & Stathopoulou, 2015). Enflamasyon, tamir ve rejenerasyon durumlarında bu hücreler sement ve alveol kemiğinin yapım/yıkım mekanizmasında önemli rol oynar (Benatti ve ark., 2007). Zengin vasküler yapısı sayesinde diş ve çevresindeki dokuların beslenmesine katkıda bulunur (McCulloch & Melcher, 1983). İçeriğindeki kök hücreler, çoğunlukla perivasküler yerleşimlidir ve rejeneratif tıp yaklaşımları için büyük umut vaatmektedir (Rincon ve ark., 2006).

4.1.3. Sement

Sement, dişlerin anatomik kök yüzeyini kaplayan, kalsifiye yapıda, özelleşmiş mineralize bir dokudur. Yaklaşık olarak %50'si hidroksiapatit ve diğer %50'si kolajen ve kolajen olmayan proteinlerden oluşur. Olgun sementin protein salgıları, İDF'lerin ve periodontal ligament hücrelerinin yapışmasını ve göçünü artırır, protein sentezini uyarır (Saygin ve ark., 2000). Pürüzlü yüzey yapısı ile periodontal ligament fibrillerinin kök yüzeyine sıkı bir şekilde yapışmasını sağlar ve diş destekler. Ayrıca, kök yüzeyinde hasar oluşması sonrası tamir mekanizmasını başlatır (Lindhe ve ark., 2015).

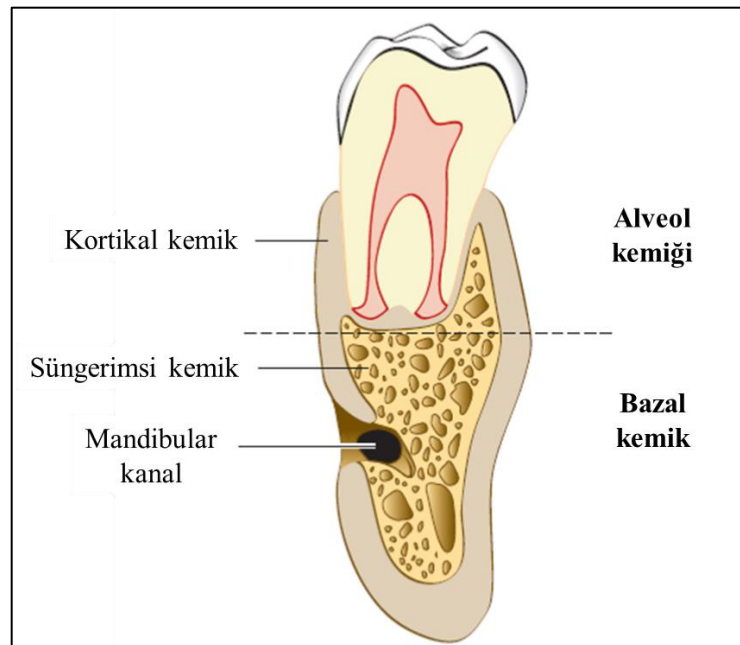
Kalsifiye interfibriller matriks, kolajen fibriller ve diğer organik maddelerden oluşan, hücreli sement ve hücresiz sement olmak üzere iki tip sement dokusu bulunmaktadır (Fiorellini & Stathopoulou, 2015). Hücresiz sement, ilk oluşan sementtir; kökün yaklaşık olarak servikal 2/3'ünü kaplar ve hücre içermez. *Sharpey* lifleri, hücresiz sementin çoğunu oluşturur ve diş desteklemede temel rol oynar (Simpson, 1965). Hücreli sement, diş okluzal seviyeye ulaştıktan sonra oluşur ve sementosit hücrelerini içerir. Hücreli sement, hücresiz sementten daha az kalsifiye yapıdadır ve daha az *Sharpey* lifi içerir (Selvig, 1965). *Sharpey* lifleri, sementin organik matriksi içerisine gömülü bulunan *ekstrinsik* kolajen fibrillerinin ana kaynağıdır ve *intrinsik* kolajen fibrilleri ise sement dokusunu oluşturan sementoblastlar tarafından sentezlenir. Bu fibriller, sementin dayanıklılığına ve esnekliğine katkıda bulunur. Sementoblastlar ayrıca proteoglikanlar, glikoproteinler ve fosfoproteinler gibi interfibriller temel maddenin kolajen dışı bileşenlerini oluştururlar (Fiorellini & Stathopoulou, 2015).

Sement, kemik dokusu gibi kan damarı, lenf damarı veya sinir içermez. Ayrıca, sement normalde fizyolojik rezorpsiyon veya remodeling sürecine girmez. Bunun yerine, hayat boyu devam eden bir depozisyon sürecine sahiptir (Colard ve ark., 2016; Lindhe ve ark., 2015).

4.1.4. Alveol kemiği

Maksilla ve mandibulada, dişlerin köklerini çevreleyen ve destekleyen kısım alveolar proses veya alveol kemiği olarak bilinir. Alveol kemiği, çenelerde bazal kemiğin uzantısı olarak devam eder ve dişlerin gelişimi ve sürmesi ile şekillenir (şekil 2). Ana fonksiyonu, sement ve periodontal ligament ile birlikte diş-çene kemiği bağlantısını sağlamak ve dişler üzerine gelen kuvvetleri karşılayıp dağıtmaktır (Sodek & McKee, 2000).

Alveol kemiği; alveol soket kemiği ve destek kemik olmak üzere iki bölümden oluşur. Alveol soket kemiği, dişlerin soketini çevreleyen ince kortikal kemik tabakasıdır. Periodontal liflerin bağlanmasını ve nörovasküler demetlerin alveol kemiğinin merkezine (süngerimsi kemiğe) ulaşımını sağlayan, kribriform tabaka olarak adlandırılan, delikli bir yapıdadır. Radyolojik görüntüsü radyoopak çizgi şeklindedir ve *lamina dura* olarak adlandırılır. Destek kemik, alveolar soket kemiğini çevreler ve sokete destek sağlar. Bukkal ve lingual kortikal kemik ve arasında kalan süngerimsi kemikten oluşmaktadır. Kortikal kemik ve alveol soket kemiği, kompakt lameller ve havers sistemleri (osteonlar) içerir. Osteonların ortasında bulunan havers kanalları, kemik matriksi boyunca uzanır ve içinde nörovasküler yapıları bulundurur (Fiorellini & Stathopoulou, 2015).



şekil 2. İnsan ene kemiğinden bir kesit (Fiorellini ve ark., 2015'ten yararlanılarak hazırlanmıştır)

Alveol kemiğinin yapısının yaklaşık 2/3'ü inorganik, 1/3'ü organik madde ve sudan oluşmaktadır. İnorganik madde esas olarak kalsiyum ve fosfat mineralleri ile hidroksil, karbonat, sitrat ve sodyum, magnezyum ve flor gibi elementler içerir. Mineral tuzları, ultra mikroskopik boyutta hidroksiapatit kristalleri şeklindedir ve yaklaşık olarak kemik yapısının üçte ikisini oluşturur (Glimcher, 1987). Organik madde, büyük ölçüde tip I kolajen (%90) ile birlikte az miktarda osteokalsin, osteonektin, kemik morfogenetik proteini, fosfoproteinler ve proteoglikanlar gibi kolajen dışı proteinlerden oluşur (Miller, 1984).

Alveol kemiği, osteoblast, osteoklast, osteosit ve osteoprogenitör gibi özelleşmiş hücre tipleri içerir. Osteoprogenitör hücreler, mezenkimal kökenlidir ve embriyolojik gelişim sürecinde farklılaşarak osteoblastlara dönüşürler. Osteoblastlar, kalsiyum ve diğer mineralleri içeren organik matriksi sentezleyerek kemik oluşumunu sağlarlar, daha sonra lakunalar içine yerleşerek osteositlere dönüşürler (Fiorellini & Stathopoulou, 2015). Alveol kemiği dokusu, fonksiyonel ihtiyaçlara göre, yaşam boyu kemik oluşumu ve rezorpsiyon olaylarının devam ettiği dinamik bir dokudur. Kemiğin rezorpsiyonu, kemik iliği kökenli çok çekirdekli büyük hücreler olan osteoklastlar tarafından gerçekleştirilir. Kemikte rezorpsiyon ve apozisyon dengesinde hem lokal hem de hormonal (örn; paratiroid hormonu, kalsitonin, D3 vitamini) faktörler rol oynar (Sodek & McKee, 2000; Wiesmann ve ark., 2005).

4.2. Diş Eti Fibroblastları

IDF, diş eti bağ dokusu ve periodontal ligamentin temel hücreleridir ve fonksiyonları ve farklılaşma kabiliyetleri ile periodonsiyumun tamir ve rejenerasyonunda önemli rol oynar (Naruishi ve ark., 1999). Kolajen gibi HDM bileşenlerinin salgılanması ve parçalanması yoluyla bağ dokusunun homeostazını korur (Birkedal-Hansen, 1993b). Fibroblastlar, kolajen ve elastik liflerin yanı sıra, hücre büyümesi ve farklılaşmasını etkileyen büyüme faktörlerini, esas madde ve HDM glikoproteinlerini ve glikozaminoglikanlarını sentezler. Aynı zamanda, fagositoz ve proteazlar ile kolajenazların salgılanması yoluyla, HDM ve kemik kolajen matriksinin yıkımını düzenler (Fiorellini & Stathopoulou, 2015)

Fibroblastlar, mezenkimal kökenlidir ve mikroskobik olarak genellikle küresel ve merkezde konumlanmış çekirdekleri olan, içsi veya ince uzun formda gözlenen hücrelerdir. Sitoplazmaları genellikle mitokondri, vakuol ve vezikül açısından zengindir (Bartold ve ark., 2000). Aktiviteleriyle orantılı olarak (özellikle HDM bileşenlerini ve lifleri ürettiği, büyüme süreci veya yara iyileşmesi gibi durumlarda) belirgin Golgi aygıtı ve granüllü endoplazmik retikulum keseleri olduğu gözlenir (Bartold ve ark., 2000; Gartner & Hiatt, 2001). Hücre içi mikrofilamentler, hareketli olmayan fibroblastlarda seyrek, ancak hücre göçünün

aktivasyonu üzerine belirgin hale gelir. Canlı organizmalarda (*in vivo*), fibroblastlar birbirleriyle nadiren temas halinde görülürler; bunun yerine HDM kolajen ve diğer glikoproteinlere bağlı olarak izole halde bulunurlar. *In vitro* koşullarda, bu hücreler genellikle görünüşleri açısından biraz farklılık gösterirler ve intrasellüler mikrofilamentlerin ve liflerin ekspresyonunun artması ile birlikte geçit bağlantıları (*gap junctionlar*) aracılığıyla yakın hücre-hücre teması görülür (Pinto da Silva & Gilula, 1972) (Şekil 3).



Şekil 3. İnsan diş eti fibroblast hücrelerinin *in vitro* koşullarda ışık mikroskobu görüntüsü

Fibroblastlar çevrelerine çok duyarlı hücrelerdir ve özellikle HDM, büyüme faktörleri veya sitokinlerdeki değişikliklere karşı son derece hassastırlar. Bu hücreler, parakrin sinyallere yanıt vermelerinin yanı sıra, otonom bir şekilde hücre aktivitesini belirleyen bir dizi büyüme faktörü, sitokin ve metabolik ürün sentezleyip salgılayabilirler. Fibroblastların düzenleyici mekanizmaları bir nedenden dolayı bozulursa, bağ dokusunun net kazancı veya kaybı sonucunda aşırı büyüme veya doku yıkımı meydana gelebilir (Bartold ve ark., 2000).

4.3. Periodontal Hastalıklar

Periodontal hastalıklar; diş yüzeyinde patojen mikroorganizmaların kolonize olması, çevre dokulara invazyonu ve bunlara bağlı olarak periodontal dokularda gelişen enflamasyon ve yıkım ile karakterize, çok faktörlü hastalıklardır (Albandar, 2011; Armitage, 1999; Ship & Beck, 1996).

Periodontal hastalıkların, uluslararası kabul görmüş en son sınıflandırması, 2018 yılında Amerikan Periodontoloji Akademisi ve Avrupa Periodontoloji Federasyonu tarafından yayınlanmıştır (Caton ve ark., 2018). Bu sınıflandırmaya göre, diş eti hastalıkları; dental plak biyofilm kaynaklı gingivitis (Şekil 4) ve dental plak biyofilm kaynaklı olmayan diş eti hastalıkları (Şekil 5) olmak üzere iki kategoride incelenebilir. Dental plak biyofilm kaynaklı olmayan diş eti hastalıkları; plak tarafından oluşturulmayan ve genellikle plağın kaldırılmasından sonra çözülmeyen çeşitli durumları ifade eder. Bu lezyonlar, sistemik bir durumun belirtisi veya sadece ağız boşluğunda lokalize olan hastalıklar olabilir (Holmstrup ve ark., 2018). Dental plak biyofilmi kaynaklı olmayan diş eti hastalıkları, plak biyofilminden kaynaklanmasa da, klinik belirtilerin şiddeti genellikle plağın birikmesi ve ardından gingivitis gelişmesi ile ilişkilidir (Stone ve ark., 2015).



Şekil 4. Dental plak biyofilm kaynaklı gingivitis vakası



Şekil 5. Eritem ve deskuamasyon ile karakterize pemfigus vulgaris vakası

Gingivitis, dental plak biyofilmi ile konak immün-enflamatuvar yanıtının etkileşiminden kaynaklanan bir enflamatuvar lezyondur. Bu lezyon diş eti ile sınırlı kalır ve periodontal ataşmana (sement, periodontal ligament ve alveol kemiği) yayılmaz. Bu şekilde diş eti sınırlarında kalan ve mukogingival sınırın ötesine yayılmayan enflamasyonların, supra ve subgingival alandaki dental plak miktarının azaltılması sonucu dokudaki iyileşme ile geri dönebildiği görülmektedir (Chapple ve ark., 2018).

Dental plak biyofilmine bağlı olarak gelişen gingival enflamasyonun, diş çevresindeki sağlıklı veya azalmış periodonsiyumda veya periodontitis teşhisi konulmuş hastalarda meydana gelip gelmediğine göre sınıflandırılabilirliği belirtilmektedir (Chapple ve ark., 2018):

- a. Sağlıklı periodonsiyumda gingivitis
- b. Periodontitis olmayan bir hastada azalmış periodonsiyumda gingivitis (Örn: Diş eti çekilmesi, kron boyu uzatma operasyonu sonrası)
- c. Başarıyla tedavi edilmiş bir periodontitis hastasında azalmış periodonsiyumda gingivitis

Diş eti çekilmesi olan veya aktif periodontal tedaviyi takip eden destekleyici periodontal bakım tedavisi altındaki hastalarda, bağ dokusu ataşmanında ve alveol kemiği yüksekliğinde azalma gözlenirken klinik olarak herhangi bir enflamasyon belirtisi görülmeyebilir. Bu durum azalmış periodonsiyumda klinik gingival sağlık olarak tanımlanır. Azalmış periodonsiyumda gingivitis ise, bu hastalarda diş etinde plağa bağlı enflamasyonun tekrar oluşması ile karakterizedir ancak ilerleyici ataşman kaybı görülmez (American Academy of Periodontology, 2015) (Şekil 6).



Şekil 6. Tedavi edilmiş bir periodontitis hastasında azalmış periodonsiyumda gingivitis vakası

En yaygın periodontal hastalık formu olarak görülen gingivitis, enflamatuvar sürecin periodonsiyuma ilerlemesi ile periodontitise dönüşebilir. Gingivitis, periodontitis gelişimi için bir ön koşul ve ana risk faktörüdür. Periodontitis, destek alveol kemiğinin ve bağ dokusu ataşmanının ilerleyici yıkımı ile karakterize, periodontal cep varlığı ve diş eti kanaması ile kendini gösteren, kompleks subgingival mikrobiyal plağın sebep olduğu, kronik iltihabi bir hastalıktır (Anderegg ve ark., 1995; Papapanou ve ark., 2018) (Şekil 7). Tedavi edilmezse diş kaybına yol açabilir, ancak çoğu durumda önlenabilir ve tedavi edilebilir.



Şekil 7. Periodontitis vakası

Enflamasyon nedeniyle periodontal doku desteğinin kaybı, periodontitisin birincil özelliğidir. Bir hastanın periodontitis vakası olarak tanımlanabilmesi için; iki ya da daha fazla bitişik olmayan dişte interproksimal klinik ataşman kaybı (KAK) ölçümü ≥ 2 mm olmalı veya en az iki dişte bukkal ya da oral yüzeylerde ≥ 3 mm cep oluşumu ile birlikte ≥ 3 mm KAK gözlenmelidir. Ancak gözlemlenen KAK aşağıdaki nedenlerle oluşmuşsa periodontitis ile ilişkilendirilmemelidir (Holtfreter ve ark., 2015):

- Travma kökenli diş eti çekilmesi,
- Dişin servikal bölgesine kadar uzanan diş çürüğü,
- İkinci moların distalinde, üçüncü moların malpozisyonu veya çekimi ile ilişkili KAK varlığı,
- Marjinal periodonsiyumdan drene olan endodontik bir lezyon,
- Vertikal kök kırığı varlığı.

En son yayınlanan periodontal hastalık sınıflamasında, patofizyoloji temel alınarak, üç farklı periodontitis formu tanımlanmıştır (Caton ve ark., 2018):

- a. Nekrotizan periodontal hastalıklar
- b. Sistemik hastalıkların belirtisi olan periodontitis
- c. Periodontitis

Periodontitis vakaları, evreleme (evre I, II, III, IV) ve derecelendirme (derece A, B, C) sistemine dayalı olarak sınıflandırılmıştır (Tonetti ve ark., 2018). Evreleme, hastalığın şiddeti ve karmaşıklığı ile ilişkilidir ve ayrıca dentisyon içinde hastalığın yaygınlığı ve dağılımını tanımlar. Dereceleme ise, periodontitis ilerleme hızının geçmişe dayalı analizi ve bununla birlikte, ilerleme riskinin değerlendirilmesi, tedavinin olası kötü sonuçlarının analizi ve hastalığın veya tedavisinin hastanın genel sağlığını olumsuz etkileme riskinin değerlendirilmesi gibi hastalığın biyolojik özellikleri hakkında ek bilgi sağlar .

Periodontitis, insanların en yaygın kronik enflamatuvar bulaşıcı olmayan hastalığıdır. *Global Burden of Disease* 2010 çalışmasına göre, şiddetli periodontitisin yaşa göre standardize edilmiş küresel prevalansı 1990–2010 yılları arasında %11,2 olarak (Kassebaum ve ark., 2014) ve 2015 çalışmasında ise şiddetli periodontitis prevalansı %7,4 olarak gösterilmiştir (Kassebaum ve ark., 2017). Periodontitisin daha hafif formlarının prevalansı ise %50'ye kadar çıkabilmektedir (Billings ve ark., 2018). Periodontitis, yüksek yaygınlığı nedeniyle önemli bir halk sağlığı sorunudur. Diş kaybı ile birlikte çiğneme fonksiyonunu ve estetiği olumsuz yönde etkileyerek bireyin yaşam kalitesini önemli ölçüde bozar (Tonetti ve ark., 2017). Ayrıca periodontitis, diyabet (Sanz ve ark., 2018), kardiyovasküler hastalıklar (Tonetti ve ark., 2013) ve prematüre ölüm dahil olmak üzere istenmeyen gebelik sonuçları (Sanz ve ark., 2013) gibi bir dizi sistemik hastalık ile ilişkilidir.

Periodontal hastalıkların etiyolojisi oldukça karmaşıktır. MDP ve ağız boşluğunda bulunan patojen mikroorganizmalar, periodontal dokularda hastalığa neden olan başlıca etiyolojik faktörler olarak kabul edilir (Sanz ve ark., 2020; Socransky & Haffajee, 1992). Periodontal ceplere yerleşen mikroorganizmalar periodontitis gelişiminden sorumlu olmakla birlikte, konağın mikrobiyal yüke karşı verdiği immün yanıt, çevresel, genetik ve kazanılmış risk faktörleri, hastalığın şiddetinin ve hızının belirlenmesinde büyük öneme sahiptir. Bu faktörler arasında sigara kullanımı ve diyabet başta olmak üzere, genetik yatkınlık, hormonal değişiklikler, stres ve bazı ilaçlar sayılabilir (Ebersole ve ark., 2013; Han ve ark., 2007; Page & Kornman, 1997). Sigara kullanımının günde 10 adet veya daha fazla olması ve diyabet

hastalarında hemoglobin A1c (HbA1c) seviyesinin $\geq 7,0$ olması, hastalığın derecelendirilmesinde bir belirteçtir (Tonetti ve ark., 2018).

4.4. Periodontal Patojenler

Periodontal hastalıkların mikrobiyolojisini tam olarak tanımlamak zor olsa da, yapılan çalışmalar bazı patojenlerin önemine işaret etmektedir (Slots & Rams, 1991; Socransky & Haffajee, 1992; Socransky ve ark., 2002; Wolff ve ark., 1994).

A. actinomycetemcomitans, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* ve *Porphyromonas gingivalis* patojenlerinin periodontal hastalıkta primer etiyolojik ajan olduğu, bu patojenlerin hastalığın durumu, ilerleyişi ve tedavi başarısı ile güçlü ilişki içinde olduğu kabul edilmiştir (Socransky ve ark., 1998).

Prevotella intermedia, *Prevotella nigrescens*, *Camphylobacter rectus*, *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum*, *Eubacterium nodatum* ve diğer çeşitli spiroketler de önemli olduğu düşünülen ikinci mikroorganizma grubudur, yeterli sayıda bulunduklarında periodontal hastalık etiyolojisinde rol oynadıkları görülmüştür (Socransky ve ark., 1998).

Periodontal hastalık etiyolojisindeki rollerine dair kanıtların elde edildiği diğer mikroorganizmalar arasında ise *Eikenella corrodens*, enterik basiller, pseudomonaslar, selenomonaslar, stafilokoklar, özellikle *C. albicans* olmak üzere bazı mantarlar ve herpesvirüsler bulunur (Contreras & Slots, 2000; Haffajee & Socransky, 1994).

Periodontal patojenler diş yüzeyine, periodonsiyum bileşenlerine ve bu yüzeylere tutunmuş diğer mikroorganizmalara tutunarak kolonize olmakta ve biyofilm formasyonu oluşturmaktadır (Costerton ve ark., 1995). Bu periodontopatojenler, proteolitik enzimleri ile veya enzim ve lipopolisakkaritler gibi virülans faktörleri aracılığıyla uyardıkları konak hücrelerinden doku yıkım enzimlerinin salınmasına sebep olarak doku yıkımına neden olurlar. Ayrıca, periodonsiyumun savunması olan enflamasyon sırasında harekete geçen lenfosit ve makrofaj gibi bağışıklık sistemi hücrelerinden salınan sitokinler bir süre sonra doku yıkımlarını beraberinde getirir (Birkedal-Hansen, 1993a; Lindhe ve ark., 1966; Loe ve ark., 1978).

4.4.1. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

A. actinomycetemcomitans, fakültatif anaerobik, kapnofilik ve mikroaerofilik olarak tarif edilen, tek başına veya gruplar halinde büyüeyebilen, hareketsiz, ufak, gram negatif kokobasildir (Henderson ve ark., 2010). Amorf yüzeyi ve yüzey uzantıları sayesinde, komşu hücrelere bağlanabilen ve bukkal epitel hücrelerinde kolonize olabilen bir özellik göstermektedir

(Zambon, 1985). Eskiden *Actinobacillus actinomycetemcomitans* olarak adlandırılmakta iken daha sonra *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* olarak yeniden isimlendirilmiştir (Norskov-Lauritsen & Kilian, 2006).

A. actinomycetemcomitans'ın suşları arasında görülen fenotipik varyasyonlar, patogeneze farklılığa yol açabilmektedir. Bilinen yedi tip serotipi (serotip a-g) tanımlanmıştır ve halen serotip-spesifik polisakkarit antijen ekspresyonu olmadığı için serotiplendirilemeyen suşları bulunmaktadır (Takada ve ark., 2010; Zambon, Slots, ve ark., 1983). *A. actinomycetemcomitans* serotiplerinin dağılımı, bireylerin coğrafi konumuna ve etnik kökenine göre değişkenlik gösterebilmektedir. Serotip c, Asya ve Amerikan halkında en sık rastlanılan gruptur ve hem sağlık hem de hastalıkla ilişkili bulunmuştur. Finlandiya vakalarında serotip a ve b sıklıkla periodontal hastalık durumunda izole edilirken, serotip c periodontal olarak sağlıklı vakalarda izole edilir (Asikainen, Lai, ve ark., 1991). Bununla birlikte bu serotip paterni Kore ve Japonya vakalarında gözlenmezken, aksine serotip c'ye sıklıkla periodontal patoloji bulunan örneklerde rastlanmıştır (Chung ve ark., 1989; Saito ve ark., 1993; Yoshida ve ark., 2003). Serotip d, e ve f; serotip a, b ve c'ye kıyasla daha az sıklıkla gözlenmektedir (Dogan ve ark., 1999; Mombelli ve ark., 1999). Örneğin; serotip d, e ve f'ye Brezilya popülasyonunda ve 35 yaşından küçük bireylerde farklı periodontitis formlarına sahip Tayvan vakalarında rastlanmamıştır (Teixeira ve ark., 2006; Yang ve ark., 2004). Serotip b ise, Avrupada en sık rastlanılan ve genel olarak hastalıklı bölgelerde en çok saptanılan tiptir. Literatüre bakıldığında, çoğunlukla serotip b, c ve e'nin hastalıkla, serotip a'nın ise sağlıkla ilişkili olduğu söylenebilir (Asikainen, Lai, ve ark., 1991; Cortelli ve ark., 2012; Dogan ve ark., 2003; Kaplan ve ark., 2001; T. S. Kim ve ark., 2009; Mekalanos, 1992). *A. actinomycetemcomitans* serotipleri doğada klonal olarak bulunur ve virülans klonal tipleri hastalık prevalansını etkilemektedir (Kachlany, 2010; Kilian ve ark., 2006). Afrika kökenli Amerikalılar ve Faslı bireylerde yapılan çalışmalarda, serotip b JP2 klonunun lökotoxin üretimini yüksek miktarda artırdığı gözlenmiştir. Plakta JP2 klonunun bulunması ile lokalize agresif periodontitis görülme riski arasında güçlü bir ilişki bulunmuştur (Ennibi ve ark., 2012; Haubek ve ark., 1996; Kilian ve ark., 2006). Cortelli ve ark. (2005)'ın yaptığı bir çalışma ile *A. actinomycetemcomitans*'nın lökotosik suşlarının agresif periodontitiste kronik periodontitise oranla daha fazla görüldüğü Brezilya popülasyonunda doğrulanmıştır (Cortelli ve ark., 2005). Aynı zamanda, *A. actinomycetemcomitans*'ın tüm serotiplerinde hücre yüzeylerinden salınan 64 kDa ağırlığında antijenik GroEL proteini (ısı şok proteini) üretilir. GroEL proteininin osteoklastları aktive ederek kemik yıkımına neden olduğu gösterilmiştir (Kirby ve ark., 1995). Ağız ortamında, birden fazla serotip aynı anda bulunabilir ve *A. actinomycetemcomitans* suşlarının aynı aile bireyleri arasında geçiş yapabileceği gösterilmiştir (Asikainen ve ark., 1996; Dogan ve ark., 2008; Saarela ve ark., 1999).

A. actinomycetemcomitans'ın temel virölans faktörü lökotoksin, immünodominant antijeni ise lipopolisakkarittir. Diğer virölans faktörleri arasında endotoksin, bakteriosin, fimbrialar, immünsüpresif faktörler, kolajenaz ve kemotaktik inhibisyon faktörleri sayılabilir (Page ve ark., 1991). *A. actinomycetemcomitans* ilk olarak oral epitel yüzeyine tutunarak kolonize olur (Fine ve ark., 2006). 6,5 kDa protein üreterek fimbriaları ile diş yüzeyine tutunup, bukkal epitel hücrelerden supragingival plağa hareket ettiği düşünülmektedir. Fimbriaları, *A. actinomycetemcomitans*'ın ürettiği ekstraselüler yüzey polisakkaridi olan *polyglutamic acid* ile birlikte sert yüzeylere yapışır (Fine ve ark., 2006). *A. actinomycetemcomitans* aynı zamanda, diğer bakteri türlerinin kolonizasyonuna da agrege olabilir (Periasamy & Kolenbrander, 2009). Sonuç olarak *A. actinomycetemcomitans*, konak dokusu içine invazyon ve hücre adezyonu özelliği ile bağ dokusuna invaze olabilmekte, dil ve bukkal mukoza ile birlikte periodontal yumuşak dokulara yerleşebilmekte ve kemik yüzeyine kadar ilerleyebilmektedir (Asikainen, Alaluusua, ve ark., 1991; Saglie ve ark., 1988). *A. actinomycetemcomitans*'ın, aynı zamanda damar duvarlarında da bulunabildiği tespit edilmiş ve aterom plağından kültür edilmiştir (Kozarov ve ark., 2005; Marques da Silva ve ark., 2005). Ağız boşluğundan yayılarak endokardite sebep olabileceği ortaya konulmuştur (Paturel ve ark., 2004). *A. actinomycetemcomitans*'ın lökotoksin ve sitoletal yayılma toksini de içeren potansiyel yıkıcı metabolit üreterek hastalığa sebep olduğu bilinmektedir (Baehni ve ark., 1979; Saiki ve ark., 2001; Shenker ve ark., 2001). Lökotoksin ile polimorfonükleer lökositleri, monositleri ve daha yavaş olmak kaydıyla lenfositleri öldürebildiği gösterilmiştir (Mangan ve ark., 1991; Rabie ve ark., 1988; Taichman ve ark., 1991). Ayrıca, lökotoksinin bakterilerin fagositler tarafından alınmasını ve buna bağlı olarak bakteriyel öldürme süreçlerini bloke edebildiği ortaya konmuştur (Johansson ve ark., 2003; Venketaraman ve ark., 2008). Apoptotik hücre ölümünü indükleyerek lökosit ölümüne neden olduğu gösterilmiştir (Arakawa ve ark., 2000; Kato ve ark., 2000).

Periodontal hastalıklardan agresif periodontitis genellikle ergenlikte başlar, ailesel geçiş söz konusudur ve hızlı ataşman kaybı ile karakterizedir (Armitage, 1999). Generalize ve lokalize olmak üzere iki formu tanımlanmıştır. Lokalize agresif periodontitis, özellikle kesici dişler ve birinci molarlar bölgesinde belirgin alveol kemiği yıkımı ile görülür. Generalize formda ise pek çok diş etkilenmektedir (Albandar, 2014). *A. actinomycetemcomitans*, bulunma sıklığı ve sayısı yüksek olduğundan, lokalize agresif periodontitisin primer etiyolojik ajanı olarak ilişkilendirilmiştir (Fine ve ark., 2007). Ancak günümüzde bu bilgi tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda, lokalize agresif periodontitis hastalarında periodontal lezyonların %97'sinde ve diş eti dokusunda yıkım olmuş veya yıkımın devam ettiği bölgelerde yüksek *A. actinomycetemcomitans* seviyeleri tespit edilirken, bazı çalışmalarda ise lokalize agresif

periodontitis hastalarında *A. actinomycetemcomitans*'a hiç rastlanmadığı veya az miktarda da olsa sağlıklı bölgelerden de izole edildiği tespit edilmiştir (Albandar ve ark., 1997; Dogan ve ark., 2003; Faveri ve ark., 2008; Lopez ve ark., 2011). *A. actinomycetemcomitans* aynı zamanda erişkinlerde görülen şiddetli kronik periodontitis vakalarından da izole edilmektedir, inatçı periodontitisli ve erken başlayan periodontitisli hastaların etiyolojisinde rol oynadığı kanıtlanmıştır (Rodenburg ve ark., 1990; Slots ve ark., 1990; Zambon ve ark., 1996). Daha önce "kronik" veya "agresif" olarak tanımlanan hastalık biçimlerinin, 2018'de, artık tek bir kategori (periodontitis) altında gruplandırıldığı yeni bir periodontitis sınıflandırılması benimsenmiştir (Papapanou ve ark., 2018; Tonetti ve ark., 2018). Patofizyolojisi ve tedavi ihtiyacı açısından periodontitisten farklı olarak sınıflandırılabilmesi için yeterli bilgi ve kanıt olmadığı ileri sürülmüştür (Fine ve ark., 2018; Needleman ve ark., 2018; Tonetti ve ark., 2018). Periodontal tedavinin başarısı ortamdaki mevcut *A. actinomycetemcomitans* miktarının azaltılması veya tamamen elimine edilmesi ile ilişkilidir (Fives-Taylor ve ark., 1999). Van Winkelhoff ve ark. (1992), 50 adet şiddetli generalize periodontitisli erişkin vakayı ve 40 adet *A. actinomycetemcomitans* kültürü pozitif olan inatçı periodontitisli vakayı; supra ve subgingival enstrümantasyon ve sistemik olarak amoksisilin + metronidazol ile destekleyerek tedavi etmişlerdir (van Winkelhoff ve ark., 1992). 90 vakanın sadece birinde tedaviden sonraki 3-9 ayda *A. actinomycetemcomitans* kültürü pozitif çıkmıştır ve 2 yıllık takibi yapılabilen 48 vakanın aynı şekilde sadece birinde *A. actinomycetemcomitans* kültürü pozitif olarak tespit edilmiştir (Pavicic ve ark., 1994). Neredeyse bütün hastalarda tedavi sonrası cep derinliğinde azalma ve ataşman seviyesinde anlamlı kazanımlar görülmüştür. Bahsedilen verilere ek olarak, *A. actinomycetemcomitans*'a aynı zamanda periodontal olarak sağlıklı kişilerde ve bölgelerde de rastlanmaktadır (Henderson ve ark., 2003; Zambon, Christersson, ve ark., 1983).

A. actinomycetemcomitans ile ilişkili periodontitisin tedavisinde, supra ve subgingival enstrümantasyon tek başına her zaman yeterli olmaz; *A. actinomycetemcomitans*'ın konağa invazyonu enstrümantasyon sonrası re-infeksiyon için uygun ortam oluşturur, hücreden hücreye geçişi kolaylaştırarak bakterinin hızla çoğalmasını sağlar ve bu şekilde de yaygın doku yıkımı gerçekleşir. Tedavinin topikal antibiyotik ve antiseptiklerle veya sistemik antibiyotiklerle desteklenmesi gerekebilir (Rams & Slots, 1996).

4.4.2. *Candida albicans*

Kandidalar, tek hücreli, tomurcuklanma yöntemi ile çoğalan ve hif oluşturabilen, oval veya yuvarlak şekilli maya morfolojisinde mantarlardır. Mantarlar aleminin *Deuteromycota* bölümü, *Blastomycetes* sınıfı ve *Cryptococcaceae* familyasına mensupturlar (Hazen & Howell, 2007). Kandidalar, tomurcuklanarak üreyerek blastokonidya (blastospor) meydana getirirler.

Blastokonidyalar, büyüyerek oluşturdıkları yapıya göre gerçek veya yalancı hif formu oluştururlar (Seneviratne ve ark., 2008). Blastosporlardan gelişen ve apikal yönde uzayan hiflere ise “germ tüp” yani “çimlenme borusu” denir (Almeida & Scully, 2002). Kandidaların hayatta kalabilmek için, ortamda besin azlığı görüldüğünde besin depoları olarak oluşturdıkları yapıya da klamidospore denir. Yaklaşık 200 adet kandida türü olduğu bilinmekle beraber, bunlardan *C. albicans* başta olmak üzere, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei* ve *Candida guilliermondii* türleri en sık rastlanan, tıbbi öneme sahip patojenler olarak sayılabilmektedir (Temiz ve ark., 2015). *C. albicans* ve *C. dubliniensis*, diğer türlerden farklı olarak çimlenme borusu oluşturabilir ve çimlenme borusu testi ile kolaylıkla ayırt edilebilir (Poulain, 2015). Aynı şekilde klamidospore yapısı, *C. albicans* ve *C. dubliniensis*’in en belirgin özelliklerindendir ve diğer kandida türlerinde nadir olarak görülür. Bu oluşumlar olumsuz koşullarda kandidaların ortama adapte olarak hayatta kalmalarını sağlar (Williams & Lewis, 2000; Yücel & Kantarcioglu, 1999). Kandida türleri, normal floranın bir parçası olup, immün yetersizlik gibi uygun koşulların varlığı ile patojenik hale gelebilir ve fırsatçı fungal enfeksiyona neden olurlar (Calderone, 2004).

C. albicans, fakültatif anaerob, dimorfik ve bifazik mantardır. Diğer kandidalar gibi konağa girmeden önce tek hücrelidir ve maya fazındadır, buna Y fazı (*yeast phase*, saprofit faz) denir. Konak dokuya temas ettikten bir süre sonra psödemiyumlar geliştirerek hastalık yapan fazına, M fazına (*mycelial phase*) geçerler (Mısırlıgil, 2004). Maya-hif dönüşümü gösterdiği ve bazı hidrolitik enzimleri ürettiği için kandida türleri arasında en yüksek virülansa sahip olanıdır. A ve B olarak adlandırılan 2 serotipi vardır (Gleiznys ve ark., 2015; Tintelnor ve ark., 2000). *C. albicans*, diğer kandidalar içerisinde ağız mukozası ve plastik yüzeylere en iyi tutunan mantardır. Konakta kolonizasyonu başlatıp çoğaltan ve konağa zarar veren; adezinler, proteinazlar, süperoksit dismutaz, fosfolipaz, pigmentler, üreaz, katalaz, toksinler, mannitol, kapsül, hücre duvarı bileşenleri gibi çeşitli virülans faktörlerine ve mekanizmalara sahiptir. Konağa tutunduktan bir süre sonra kandida biyofilm oluştururlar, en alt tabakadaki hücreleri ile konak dokuya sıkıca bağlanır ve konak hücrelerini işgal ederler. Kandida biyofilm formasyonu ile fagositoz ve kompleman gibi konağın doğal savunma sistemlerine karşı direnç sağlarlar. Aynı zamanda, dokuda oluşturdıkları hasara karşı gelişen sitokin üretimi, inflamasyon gibi konak immün yanıtı bağli olarak dokuda yıkıma neden olurlar (Çerikçioğlu, 2012; Huffnagle ve ark., 2000; Karkowska-Kuleta ve ark., 2009). Ağız boşluğundaki mukozal veya yapay yüzeylerde oluşan biyofilm, özellikle antifungal ajanlara karşı, patojenik hücreleri antimikrobiyal ilaçlardan koruyan biyofilm yapısı nedeniyle zor yok edilir ve özgül bağışık yanıttan kaçmayı kolaylaştırır (Gilbert ve ark., 1997).

C. albicans, insanlarda en sık rastlanan mantar patojenidir ve ağız içinde oluşan mantar enfeksiyonlarının başlıca etkeni olduğu tespit edilmiştir (Biswas & Chaffin, 2005; Mısırlıgil ve ark., 1982). *C. albicans*, sağlıklı bireylerin oral kavitesindeki mikroorganizmaların yaklaşık %25'ini oluşturur (Budtz-Jorgensen ve ark., 2000). Lokal veya sistemik immün sisteminin baskılandığı durumlarda, radyoterapi gören hastalarda, beslenme yetersizliklerinde, ağız kuruluğunda, protez kullanımında, diyabet gibi endokrin hastalıklarda, uzun süreli antibiyotik ya da kortikosteroid kullanımında ve HIV pozitif olan bireylerde dokuların *C. albicans* duyarlılığının arttığı görülmüştür (Sherman ve ark., 2002; Zegarelli, 1993). Uzun süreli geniş spektrumlu antibiyotik kullanımı, gastrointestinal sistemin doğal flora dengesini bozarak fırsatçı patojenlerin çoğalmasına ve enfeksiyon riskinin artmasına neden olabilmektedir. Ayrıca, uzun süreli antibiyotik kullanımı, fagositoz ve hücre içi lizis fonksiyonlarına engel olarak immün sistemin zayıflamasına da neden olabilir. İmmünsüpresif ilaçlar ise nötrofil fonksiyonlarını bozarak fırsatçı lezyonların gelişim riskini artırabilir. B₁₂ vitamini ve folik asit eksikliği gibi sistemik durumlarda ve de sigara, alkol gibi lokal olarak mukozayı tahriş edici kimyasallar sebebiyle immün savunmanın etkilendiği durumlarda kandida enfeksiyonu olduğu görülmüştür (Bottero ve ark., 1997; Kennedy & Volz, 1985; Mısırlıgil, 2004). Ağız kandidiyazisi, ağız içi mukozal yüzeylerde görülen, kremi, sarı-beyaz renkte, hafif kazımayla kaldırılabilen, ağırlı psödomembranöz tabakalar halinde gözlenen bir hastalıktır. Özellikle AIDS hastalarının neredeyse tamamında görüldüğü için AIDS için tanı kriterleri arasında yer almaktadır (Lewis & Williams, 2017).

Sistemik olarak sağlıklı kişilerde derin periodontal ceplerde, tedaviye direnç gösteren periodontal lezyonlarda, akut periodontal abselerde ve implant ile kemik bütünleşmesinin başarısız olduğu dental implantlarda subgingival *C. albicans* kolonizasyonu gösterilmiştir (Listgarten ve ark., 1993; MacNeill ve ark., 1997). Kandidalar dental biyofilm içindeki diğer bakterilerle koagrega olabilir ve epitel ve bağ dokusu hücrelerine invazyon gösterebilir, subgingival yerleşimi ile periodontal hastalığın ilerlemesine sebep olabilmektedir (Gonzalez ve ark., 1987; Haynes, 2001). Gonzalez ve ark. (1987), yaptıkları çalışmada kandidaların dokulara invaze olma yetenekleri ile lokalize agresif periodontitisin patogeneğinde önemli rolü olduğunu ileri sürmüşlerdir. Periodontitisli hastalarda, periodontal cep içinde kandidaların, özellikle de *C. albicans*'ın, yüksek miktarlarda bulunduğunu ileri süren çalışmalar ile birlikte (Cuesta ve ark., 2010; Dogan ve ark., 2003), periodontitisli bireylerde supra ve subgingival florada kandida üremesine rastlanılamadığını bildiren çalışmalar da mevcuttur (Daniluk ve ark., 2006).

Kandidal enfeksiyonlar geliştiğinde ilk müdahale, altta yatan immün problemin tespit edilmesi ve ona yönelik tedavi uygulanmasıdır. Altta yatan immün problem bulunamadığında veya

düzeltilemediğinde veya destekleyici tedavi uygulamaya karar verildiğinde; lokal ya da sistemik anti-fungal preparatlar verilebilir. Ağız gargaraları ile topikal olarak antifungal ajan kullanımının oral *C. albicans* sayısını azaltabildiği ve tedaviye destek olarak kullanıldıklarında klinik olarak etkili olduğu bilinmektedir (Arendorf & Walker, 1987; Mısırlıgil, 2004). Ancak son zamanlarda, *C. albicans*’ın, tedavi için kullanılan, flukonazol, nistatin, KH, terbenafin, amfoterisin B, vorikonazol ve ravukonazole karşı direnç gösterdiği rapor edilmiştir (Kaur & Nobile, 2023; Kuhn ve ark., 2002; Lee ve ark., 2021; Pristov & Ghannoum, 2019).

4.5. Periodontal Hastalıkların Tedavisi

Periodontal hastalık teşhis edildikten sonra, hastalık evresine bağlı olarak aşamalı bir yaklaşımla tedavi edilmelidir. Tedavinin temel ön koşulu; teşhis, hastalığın nedenleri, risk faktörleri, tedavi seçenekleri ve tedavinin beklenen risk ve faydaları hakkında hastayı bilgilendirmektir. Tedavi planı hastanın tercihlerine, klinik bulgulara ve genel sağlık durumuna bağlı olarak değişiklik gösterebilir (Sanz ve ark., 2020).

Avrupa Periodontoloji Federasyonu öncülüğünde düzenlenen 2019 Perio Çalıştay’ında (XVI. Avrupa Periodontoloji Çalıştay) periodontal tedavi – klinik uygulama kılavuzu yayınlanmıştır (Sanz ve ark., 2020). Kılavuz, periodontitis tedavisini önceden belirlenmiş basamaklı bir tedavi yaklaşımı kullanarak ele almakta ve hastalık evresine bağlı olarak her biri farklı müdahaleleri içeren dört aşamalı bir tedavi önermektedir:

- I. Tedavinin ilk basamağında, supragingival enstrümantasyon yapılarak MDP ve bu birikintilerin tutulumuna sebep olan faktörler elimine edilerek, temiz ve enfeksiyondan arınmış bir ağız ortamının elde edilmesi amaçlanır (Needleman ve ark., 2015; Trombelli ve ark., 2015). Bu doğrultuda hastaya oral hijyen eğitimi verilerek etkin bir fırçalama alışkanlığı kazandırılmalı ve oral hijyen uygulamalarını bozan olası plak tutucu faktörler profesyonel müdahaleler ile ortadan kaldırılmalıdır (Carra ve ark., 2020; Van der Weijden & Slot, 2015). Sağlıklı yaşam tarzı konusunda bireysel danışmanlık yaparak, sigara bırakma, diyabetin metabolik kontrolünü iyileştirme, fiziksel egzersiz, diyet danışmanlığı ve fazla kilo kaybı gibi risk faktörlerinin kontrol altına alınması, tedavinin ve hastalığın uzun vadeli kontrolünün temelini oluşturur (Ramseier ve ark., 2020).
- II. Tedavinin ikinci basamağında, subgingival enstrümantasyon ile subgingival alandaki MDP ve diş taşının kontrolü amaçlanmaktadır (Suvan ve ark., 2020). Bu amaç doğrultusunda ihtiyaç duyulması halinde tedaviye yardımcı olarak ek tedaviler; lokal veya sistemik olarak, fiziksel ya da kimyasal ajanlar, antimikrobiyal ilaçlar veya konak

yanıtını modüle eden ajanlar kullanılmalıdır. Ancak son çalışmalarda, subgingival enstrümantasyona yardımcı ajan olarak lazerin, antimikrobiyal fotodinamik terapinin, statin jellerin, probiyotiklerin, sistemik sub-antimikrobiyal doz doksisisiklinin, lokal ya da sistemik bisfosfanatların, lokal ya da sistemik non-steroidal antienflamatuar ilaçların, omega-3 yağ asitlerinin ve metformin jellerin kullanımı önerilmemektedir (Donos ve ark., 2020; Salvi ve ark., 2020; Sanz ve ark., 2020). Bununla birlikte, KH ağız gargaralarının, lokal uygulanan yavaş salımlı KH ve antibiyotiklerin ve sistemik antibiyotiklerin (genç erişkinlerde evre III generalize periodontitis varlığı gibi bazı özel durumlarda), periodontitis tedavisinde ihtiyaç duyulduğunda yardımcı ajan olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (da Costa ve ark., 2017; Herrera ve ark., 2020; Teughels ve ark., 2020).

Tedavinin ikinci basamağına verilen bireysel yanıt, periodontal dokular iyileştikten sonra değerlendirilmelidir (periodontal yeniden değerlendirme). Tedavinin sonunda, sondalamada kanama olan >4 mm periodontal cep veya derin periodontal cep (≥ 6 mm) olmaması hedeflenir. Bu hedeflere ulaşılamamışsa tedavinin üçüncü basamağı düşünülmelidir. Periodontal tedavi başarılı olduysa, hastalar destekleyici periodontal bakım programına alınmalıdır.

- III. Tedavinin üçüncü basamağı, ikinci basamak tedaviye yeterince yanıt vermeyen bölgelerin [kanama olan 4 mm'den büyük ceplerin varlığı veya derin periodontal ceplerin (≥ 6 mm) varlığı] tedavi edilmesini amaçlar. Bu amaç doğrultusunda, 4-5 mm rezidüel ceplerin varlığında öncelikle subgingival enstrümantasyon tekrarlanmalıdır (Sanz-Sanchez ve ark., 2020). 6 mm'den derin ceplerde subgingival alanlara daha fazla erişim sağlayabilmek veya kemik içi ve furkasyon lezyonlarının varlığında lezyonların rejenere edilmesi ya da rezeke edilmesini sağlamak amacıyla cerrahi tedaviler (flap operasyonu, rezektif periodontal cerrahi, rejeneratif periodontal cerrahi) uygulanmalıdır (Dommisch ve ark., 2020; Jepsen ve ark., 2020; Nibali ve ark., 2020; Polak ve ark., 2020; Sanz-Sanchez ve ark., 2020).

Cerrahi tedavilerin gerektiği durumlarda, hasta onayı alınmalı ve risk faktörleri veya tıbbi kontrendikasyonlar göz önünde bulundurulmalıdır.

Tedavinin üçüncü basamağına verilen bireysel yanıt değerlendirilmeli ve ideal hedeflere ulaşılan hastalar destekleyici periodontal bakım programına alınmalıdır. Ancak, evre III periodontitis hastalarında bu tedavi sonuçlarının tüm dişlerde elde edilemeyebileceği akılda tutulmalıdır.

Tedavinin herhangi bir adımında, etkilenen dişler ümitsiz bir prognoza sahip olarak değerlendirilirse diş çekimi düşünülmelidir (Sanz ve ark., 2020).

IV. Dördüncü basamak, yapılan müdahaleler ile tedavi edilmiş tüm periodontal hastalıklar sonrasında, periodontal istikrarın korunması amacıyla hastalara destekleyici periodontal bakım uygulanmasıdır. Destekleyici periodontal bakım, hastanın diş eti ve periodontal durumuna bağlı olarak tedavi sürecinin ilk ve ikinci basamaklarında tanımlanan önleyici ve tedavi edici müdahaleleri içerir. Bu adım, hastanın ihtiyacına göre düzenli aralıklarla yapılmalı ve kontrol ziyaretlerinden herhangi birinde tekrarlayan hastalık tespit edilirse, uygun tanı ve tedavi planı yeniden uygulanmalıdır (Polak ve ark., 2020; Ramseier ve ark., 2020; Sanz ve ark., 2015; Trombelli ve ark., 2015).

4.6. Antimikrobiyal Tedavi ve Kimyasal Ajanlar

Antimikrobiyaller, bakteri, virüs, mantar ve protozoal mikroorganizmaların neden olduğu enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ajanlardır. Bu ajanlar mikroorganizmaların büyümesini veya çoğalmasını önlemek ya da ortadan kaldırmak amacıyla kullanılırlar (Khardori, 2006). Çeşitli aktif maddeler içeren antimikrobiyal ajanlar diş hekimliğinde ağız hastalıklarının tedavisinde ve özellikle periodontolojide, supragingival plak ve diş eti iltihabını kontrol etmek amacıyla sıklıkla önerilmektedir (Coelho ve ark., 2020; Muller ve ark., 2017).

Eldeki verilere göre, periodontal hastalık lezyonlarında, patojen mikroorganizmalar genellikle periodontal cep ve kök yüzeylerinde yoğunlaşmaktadır. Dentin tübülleri ve kök yüzeylerine komşu yumuşak dokularda da mikroorganizmalar gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, dil ve tonsiller bölge gibi mukozal yüzeylerin, özellikle *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* gibi periodontopatojenler için depo görevi gördüğü bilinmektedir (Barca ve ark., 2015; Saglie ve ark., 1982). Supra ve subgingival enstrümantasyon ile tüm bakteri kütlesi uzaklaştırılsa da patojenlerin bir kısmı periodontal dokuların içine invaze olma yetenekleri veya periodontal aletlerin ulaşamadığı yerlerde bulunmaları nedeniyle tedaviden etkilenmeyip subgingival bölgede veya mukozada kolonize olabilir ve hastalıkta nüks için risk oluşturabilir (Drisko, 2001; Fives-Taylor ve ark., 1999; Pattison, 1996; Quirynen ve ark., 2002; Rams & Slots, 1996).

Periodontal hastalıkların etkili ve güvenli bir şekilde tedavi edilebilmesi; hastalığın nedeninin tanımlanması, müdahale yöntemlerinin etkinliği ve hastaların ağız bakımlarının dikkatli bir şekilde değerlendirilmesine bağlıdır. Dolayısıyla, supra ve subgingival enstrümantasyon ile istenilen sonuca varılamadığında veya tedaviyi desteklemek için antimikrobiyal ajanlar kullanılabilir. Aynı zamanda, diş çekimi ve implant yerleştirme dahil olmak üzere oral

ve periodontal cerrahilerin öncesi ve sonrasında, protezlere bağlı veya ağız kuruluğu gibi sebepler sonucu gelişen kandida enfeksiyonu varlığında, hiperplazi, mukozit varlığında, bakteriyemi veya oral enfeksiyon riski olan hastalarda koruyucu ve tedavi edici ajan olarak da antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır (Coelho ve ark., 2020; Drisko, 2001; Muller ve ark., 2017; Petersilka ve ark., 2002; Quirynen ve ark., 2002).

Antimikrobiyal periodontal tedavinin amacı hastalıkla ilişkili periodontal patojenlerin baskılanması veya tam olarak ortadan kaldırılmasıdır. Antimikrobiyal tedavi, ihtiyaca yönelik olarak sistemik ya da lokal olarak uygulanabilir.

Sistemik yaklaşımlar, periodontal hastalıkların tedavisinde antibiyotiklerin veya konak yanıtını modüle eden ajanların kullanımını kapsar (Elavarasu ve ark., 2012; Herrera ve ark., 2008; Salvi & Lang, 2005). Sistemik uygulamalar serum yoluyla periodontal dokular ve cep içerisine girerek, el aletlerinin veya topikal ajanların ulaşamadığı organizmaları etkiler. Periodontal hastalıklarda sistemik antibiyotik kullanımını gerektirebilecek durumlar, Amerikan Periodontoloji Akademisi tarafından aşağıdaki şekilde belirtilmiştir (Slots, 2004):

- Başarıyla yapılmış geleneksel periodontal tedaviye rağmen ataşman kaybının devam ettiği, tedaviye cevap vermeyen periodontitis olgularında,
- Agresif periodontitis hastalarında,
- Sistemik bulgularla birlikte izlenen akut periodontal enfeksiyonlarda,
- Profilaksi amacıyla sistemik bazı hastalıklarda.

Sistemik olarak uygulanan antibiyotikler subgingival enstrümantasyonun tamamlayıcısı olarak kullanıldığında olumlu sonuçlar vermektedir. Ancak yakın zamanda yapılan bir çalışmada, sadece metranidazol ve amoksisilin grubu antibiyotiklerin kombine kullanımının etkili olduğu gösterilmiştir (Teughels ve ark., 2020). 6 ve 12 aylık kullanımları sonucunda, periodontal cep derinliği, sondalamada kanama ve KAK seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilmiştir. Farklı sistemik antimikrobiyal tedaviler arasında en belirgin klinik sonuçları metranidazol + amoksisilin kombinasyonu gösterse de, bu rejim aynı zamanda en yüksek yan etki sıklığı ile ilişkilidir. Sistemik antibiyotik uygulamalarının, antimikrobiyal dirençle ilişkili genlerin artışına ve fekal mikrobiyom üzerinde uzun süreli etkilere neden olduğu gösterilmektedir. Genel sağlık üzerine olan etkileri göz önüne alındığında, periodontitisli hastalarda subgingival enstrümantasyonun bir tamamlayıcısı olarak sistemik antibiyotik kullanımının rutin olarak önerilmemesi gerektiği, ancak, genç erişkinlerde evre III generalize periodontitis varlığı gibi bazı özel durumlarda kullanılması gerektiği tavsiye edilmektedir (Sanz ve ark., 2020).

Lokal antimikrobiyal uygulamalar; plak birikimini önlemek, kök yüzeylerini ve komşu periodontal dokuları dezenfekte etmek amacıyla tasarlanmış antiseptik ajanların ya da subgingival irigasyon, toz, jel veya yavaş salım sistemi şeklindeki ilaçların uygulanmasını içeren kemoterapötik yaklaşımlardır (Cummins, 1997; Quirynen ve ark., 2002; Soskolne ve ark., 1997; Walker ve ark., 2004). Antimikrobiyal ajanların lokal uygulaması, enfeksiyonun olduğu bölgeye 10 kata kadar daha fazla yüksek konsantrasyonlarda direkt olarak etki edebildiği ve sistemik uygulamadan doğabilecek yan etkileri ve hastada direnç gelişimi riskini azaltabildiği için daha çok önerilmektedir (Ciancio ve ark., 1989; Slots & Rams, 1990). Lokal antimikrobiyal uygulamalarda, periodontal hastalıkların tedavisinde supra ve subgingival enstrümantasyona ek olarak MDP formasyonunun kontrol altına alınması amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanların uygulanması öne çıkmaktadır (Herrera ve ark., 2008; Slots, 2012). Bu ajanlar, bir tedavi yöntemi olarak hekimler tarafından profesyonel şekilde uygulanabilecekleri gibi, evde oral hijyen uygulamaları ile birlikte ağız gargaraları yoluyla bireysel olarak da uygulanabilirler (Slots, 2012). 2014 yılında gerçekleştirilen XI. Avrupa Periodontoloji Çalıştayı'nda, MDP kontrolü ve gingivitis tedavisinde, ağız gargaralarının kullanılabileceği önerilmiş, ancak bunun iyi bir mekanik oral hijyen uygulamasına ek olarak kullanılması gerektiği belirtilmiştir (Chapple ve ark., 2015).

Lokal olarak uygulanan ağız gargaraları ile antimikrobiyal ajanların supragingival bölgelere dağıldığı ancak subgingival olarak 3 mm'den daha derine ulaşmadığı belirlenmiştir (Pitcher ve ark., 1980). Bunun sebebinin diş eti oluğu sıvısının oluşturduğu ozmotik basınç ile solüsyonların cep içine girmesini engellemesi olduğu düşünülmektedir (Hardy ve ark., 1982). Diş hekimleri tarafından solüsyonların cep içerisine subgingival irigasyon şeklinde uygulanması ile bölgeye özel periodontal tedavi yapılır. Bunun yanı sıra antimikrobiyal ajanların subgingival irigasyonunun, periodontal ceplerin derin bölgeleri ve furkasyon bölgelerine uygulama güçlüğü ve çok sayıda periodontal lezyonu olan bireylerde uzun zaman alması gibi dezavantajları vardır. Aynı zamanda lokal uygulama ile komşu gingival dokular ve cep dışı yüzeylerdeki bakterilerin eliminasyonu sağlanamamakta, bu durum da ileri dönemde hastalık rekürrensine sebep olabilmektedir (Rams & Slots, 1996). Periodontal hastalıkların tedavisinde tüm faktörler göz önüne alınarak durum değerlendirilmeli ve uygun tedavi yöntemine karar verilmelidir.

Antimikrobiyal ağız gargaraları koruyucu, tedavi edici ve bazı profesyonel işlemlerde yardımcı olarak kullanılabilmektedirler. Özellikle diş çürüğü ve gingivitis önlemek ya da tedavi etmek için önerilirler (Fischman, 1994). Kemoterapi ya da immün sistemini baskılayıcı tedavi gören hastalarda, tedavinin yan etkisi olarak mukozit veya kserostomi (ağız kuruluğu) gelişebilir.

Aynı zamanda antihipertansif, antihistamin, antiparkinson, antidepresan gibi ilaçların kullanımı yan etkisi olarak da kserostomi görülebilir. Bu hastaların ağız sağlığını koruyabilmeleri ve normal yeme alışkanlıklarını sürdürebilmeleri için antimikrobiyal ağız gargaraları önerilir (Ciancio, 1994). Kserostomi ile ilişkili olarak oral kandidiyazis de görülür. Antifungal özelliği olan gargaralar diş hekimliğinde çok önemlidir. Özellikle protez kullanan hastalarda, immün sistemi baskılayıcı tedavi gören onkoloji hastalarında tıbbi tedaviye yardımcı olarak ve AIDS hastalarında oral kandidiyazisin bilinen en önemli etkeni olan *C. albicans*'a karşı antifungal gargarlar kullanılmaktadır (Ciancio, 1994; Külekçi ve ark., 1999). Antimikrobiyal ağız gargaraları ve subgingival irrigasyon, bakteriyel endokardit profilaksisi amacıyla da antibiyotik profilaksisine ek olarak önerilmektedir (Baddour ve ark., 2015). Aynı zamanda, tedavi edilmiş periodontitis hastalarında periodontal bakım sürecinde, gingival enflamasyonu kontrol altına almak için, gargara ya da diş macunu formunda antiseptik ve antienflamatuar ajanlar, prebiyotik ve probiyotikler kullanılmaktadır (Figüero ve ark., 2019; Rosling ve ark., 1997). Diş macunu formundaki antiseptik ajanlar olarak KH, triklosan kopolimer ve stannöz florür-sodyum heksametafosfat içerikli ürünler önerilirken, gargara formu için KH, esansiyel yağlar ve setilpiridinyum klorür içeren ürünlerin kullanımı önerilmektedir (Escribano ve ark., 2016; Figüero ve ark., 2019; Figüero ve ark., 2020; Serrano ve ark., 2015). Bahsedilen terapötik hedeflere ulaşmak için plak kontrolünün sağlanması amacıyla çeşitli antimikrobiyal ajanlar tanıtılmış ve değerlendirilmiştir (Rosan & Lamont, 2000; Slots, 2012; Wennström, 1996) (Tablo 1).

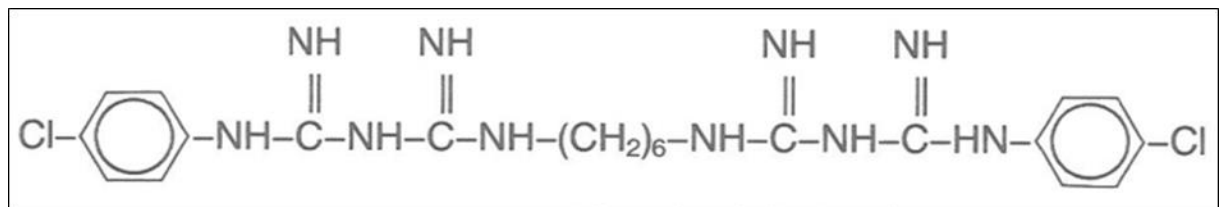
İdeal bir antimikrobiyal kimyasal ajan; istenilen etki bölgesine ulaşmalı, yeterli konsantrasyonda kalmalı, patojen mikroorganizmaların kolonizasyonunu, adezyonunu ve biyofilm formasyonunu hasara uğrattırken, kommensal flora ve mukoza üzerinde minimal etkiye sahip olmalıdır. Konak dokuları üzerinde ya da yanlışlıkla yutulduğunda toksik etki göstermemelidir (Fischman, 1994; Goodson ve ark., 1985; Greenstein & Tonetti, 2000). Lokal antimikrobiyal ajanların etkinliği, ağız içerisinde uygulanma şekline, dayanıklılığına, tedavi süresine ve bireyin tedavi esnasında hekimle işbirliğine bağlı olarak değişkenlik gösterebilmektedir (DeVore, 1994; Petersilka, 2011).

Tablo 1. Plak kontrolünün sağlanması amacıyla kullanılan kemoterapötik ajanlar

a. Bisbiguanid antiseptikler	g. Enzimler
• KH • Aleksidin • Oktenidin / Bispiridinler	• Proteaz • Lipaz • Amilaz • Elastaz • Laktoperoksidaz • Mutanaz
b. Kuarterner amonyum bileşikleri	h. Doğal ürünler (Bitkisel özler)
• Setilpiridinyum klorid • Benzetonyum klorid • Benzalkonyum klorid	• Sanguinarin • Propolis
c. Deterjanlar	i. Oksijenize ajanlar
• Sodyum lauril sülfat	• Hidrojen peroksit (H₂O₂)
d. Fenoller ve esasnsiyel yağlar	j. Halojen içerikli antiseptikler
• Timol • Mentol • Ökaliptol	• İyot • Povidon iyodür • Sodyum hipoklorit
e. Triklosan	
f. Metal tuzları	
• Bakır • Kalay • Çinko	

4.7. Klorheksidin

KH, medikal alanda ve diş hekimliğinde en çok kullanılan antimikrobiyal ajanlardan biridir. Yapısal formülünde, iki adet simetrik 4-klorofenil halkası ve birbirlerine merkezi hekzametilen zinciriyle bağlı iki adet biguanid grubu bulunan sentetik bir katyonik bisbiguaniddir (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀) (Greenstein ve ark., 1986) (Şekil 8).



Şekil 8. Klorheksidin kimyasal yapısı (Greenstein ve ark., 1986)

KH, güçlü bazik karakterlidir ve asitler ile reaksiyona girerek tuz formunu oluşturur. KH tuzlarının suda çözünürlükleri farklılık gösterir (Denton, 2001). Oral preparat olarak en çok

kullanılan klorheksidin glukonat, KH tuzundan ve glukonik asitten oluşur ve suda çözünür. Fizyolojik pH'da hızlıca çözünerek pozitif yüklü KH molekülleri salınmasına neden olur (Greenstein ve ark., 1986). Sulu çözeltiler pH 5-8 aralığında en stabil haldedir; pH 8'in üzerinde baz çökelirken pH 5'ten asidik ortamlarda stabilitesi ve etkinliği bozulmaktadır (Denton, 2001).

KH, 1940'lı yılların sonuna doğru "*Imperial Chemical Industries*" şirketi araştırmacıları tarafından geliştirildi ve ilk kez 1953'te cilt yaralarında antiseptik krem olarak kullanılmaya başlandı (Fardal & Turnbull, 1986). Diş hekimliğinde ilk kullanımı endodontide ve cerrahi işlemler öncesi dezenfeksiyon amaçlı olmuştur. KH'nin plak oluşumunu önleyici etkisi 1962 yılında araştırılmaya başlanmış olup, ilk tanımlayıcı çalışma ise Loe ve Schiott (1970) tarafından yapılmıştır (Loe & Schiott, 1970). Çalışmanın sonucunda, diş temizliği yapılmadan, %0,2 KH içerikli 10 mL solüsyonla günde iki kez gargara yapılması ile plak ve diş eti iltihabı oluşumunun önlendiği gösterilmiştir.

KH'nin yumuşak ve sert dokulara bağlanması ve absorbe edilebilmesi ilk kez 1970'lerde tanımlanmıştır ve KH'nin konsantrasyonu, miktarı, ortamın pH'sı, sıcaklık ve solüsyonun dokulara temas süresi gibi faktörlerden etkilenir. KH molekülü, alkali ortamda asidik pH'ya göre daha etkilidir, oral yüzeyler tarafından absorbe edilir ve uzun süre etkili konsantrasyonda kalabilir. Aktivitesi, ortamda organik madde olduğu zaman azalır (Gjerme ve ark., 1974; Schiott ve ark., 1970).

KH, gram pozitiflerde daha etkili olmak üzere hem gram pozitif hem de gram negatif aerob ve anaerob bakterilere karşı etkili geniş spektrumlu bir antiseptik ajandır. Mantarlar, dermofitler ve bazı lipofilik virüsler üzerinde (HIV, herpes simpleks virüsü, influenza virüsü, sitomegalovirüs ve adenovirüs gibi) de etkili olduğu gösterilmiştir (Hennessey, 1973; Russell, 1990). Ancak bakteri sporlarına, aside dirençli boyanan basillere ve mikobakterilere (*Mycobacterium tuberkulozis*) karşı etkili değildir (Russell, 1990, 1999). Bakterileri öldürmedeki etkisi, hücre duvarına bağlanabilmesine bağlıdır. Katyonik (pozitif yüklü) KH molekülü, anyonik (negatif yüklü) mikrobiyal hücre duvarlarına ve diğer mikrobiyal yapıların yüzeylerine bağlanır ve bakteri hücresinin ozmotik dengesini bozar. Düşük konsantrasyonlarda (%0,02-0,06) hücre membranı enzimlerini inhibe edip hücre zarı geçirgenliğini artırarak bakteristatik etki gösterirken, konsantrasyonun daha yüksek olduğu durumlarda (>%0,12) hücre içi sitoplazmik organeller koagüle olmaya başlar, hücre içeriklerinin sızıntısı yavaşlar ve hücre ölümüne neden olarak bakterisit etkisini gösterir (Greenstein ve ark., 1986; Jenkins ve ark., 1988).

KH'nin, mayalara ve mantarlara, özellikle de *C. albicans*'a karşı etkili olduğu da bilinmektedir. Kandidal mikroorganizmaların oral yüzeylere yapışmasını engelleyerek tedaviye katkı sağlar (Ellepola & Samaranayake, 2001). Barasch ve ark. (2004) yaptıkları çalışma ile, 3 aya kadar (tedavi sırasında aylık aralıklarla) %0,12 KH içeren gargara kullanımının hem ağız mantarı enfeksiyonlarında terapötik etki gösterdiğini hem de HIV ile enfekte çocuklarda *C. albicans*'ın neden olduğu enfeksiyonların gelişimini önlediğini bildirmiştir (Barasch ve ark., 2004). Aynı zamanda KH'nin, muhtemelen bazı enzimleri inhibe ederek filamentasyonu inhibe ettiği ve böylelikle *C. albicans* patojenitesini etkilediği ileri sürülmektedir. Mantarların epitelyal hücrelere yapışmasının KH kullanımı sonrası azaldığı gösterilmiştir (McCourtie ve ark., 1985; Tobgi ve ark., 1987). KH'nin adezyonu engelleme özelliğinin amfoterisin B ve nistatinden daha fazla olduğu bulunmuştur. Nistatin ile beraber kullanımının ayrı ayrı kullanımlara göre daha etkili olduğu saptanmıştır (Ellepola & Samaranayake, 2001).

KH hidroksiapatit, pelikül, tükürük glikoproteinleri, muköz membranlar ve diş yüzeyi gibi anyonik yapılar tarafından absorbe edilebilme yeteneği sayesinde antiplak etki gösterir. Absorbe edilen KH, ilgili dokulardan 8-12 saat boyunca salınmaya ve bakteristatik etki göstermeye devam eder (Bonesvoll ve ark., 1974; Gjermo, 1974). Tükürükteki ve plaktaki bakterilerin dış membranına bağlanarak bunların diş yüzeylerine ve epitel hücrelerine tutunmalarına engel olur, plak ve pelikül oluşumunu inhibe eder (Greenstein ve ark., 1986). Bonesvol (1977) çalışmasında, 10 mL %0,2'lik KH solüsyonunun 60 sn süreyle ağızda çalkalanmasından sonra yaklaşık %30'unun absorbe edildiğini ve ilk 4-8 saat boyunca tükürükteki konsantrasyonu logaritmik bir şekilde azalmaya devam eden KH'nin 24 saat sonunda düşük miktarlarda da olsa tükürükte hala bulunduğunu, böylelikle uzun süreli bakterisit etki gösterdiğini bildirmiştir (Bonesvoll, 1977). KH'nin var olan plak birikimlerini azaltmaktan daha çok, temiz diş yüzeyi üzerinde yeni plak birikimini önlediği görülmüştür (Hull, 1980). Deneysel çalışmalar, yüksek molekül ağırlığı ve yükü nedeniyle, KH'nin mekanik bozulma olmadığında biyofilm tabakalarına nüfuzunun zayıf olduğunu ve yalnızca yüzeydeki bakterileri öldürürken daha derin tabakalardaki bakterileri etkilemediğini göstermiştir (Corbin ve ark., 2011; Rabe ve ark., 2015). %0,2 KH içerikli gargaraların oral hijyen işlemleri bırakıldıktan sonra deneysel gingivitis oluşumunu önlediği bulunmuştur. Günümüzde, yeni bir ürün üzerinde yapılan çalışmalarda KH, pozitif kontrol ve hatta "altın standart" olarak kullanılmaktadır. Diş yüzeyindeki KH konsantrasyonunun zamanla salınımının devam etmesi bakteriyostatik etkisinin zamanla artmasına neden olur. MDP üzerindeki bu önemli etkinliklerinden dolayı diş hekimliğinde altın standart olarak kabul edilmektedir (Neely, 2012).

KH'nin bakteriyel matriks metalloproteinazları üzerindeki inhibitör etkisi, özellikle periodontoloji alanında kullanımını artıran bir başka özelliğidir. Bu sayede, kolajen yıkımına ve dolayısıyla doku kaybına neden olan patojenlerin (örneğin *P. gingivalis* tarafından üretilen *gingipain*) ürettiği proteazları inhibe edebilir (Beighton ve ark., 1991; Cronan ve ark., 2006). Aynı zamanda KH'nin dental implantlar üzerinde de etkinliği gösterilmiştir. İmplant yüzeyindeki oksit tabakası tarafından absorbe edildiği ve 24 saat boyunca salınarak ortamda antimikrobiyal etki gösterdiği bildirilmiştir (Kozlovsky ve ark., 2006; Machtei ve ark., 2012).

KH, subgingival enstrümantasyona yardımcı kimyasal ajan olarak sıklıkla kullanılmaktadır (Sanz ve ark., 2020). 2019 Avrupa Çalıştay'ının güncel sistematik derlemesinde aktif periodontal tedavide antiseptiklerin rolü doğrudan ele alınmamıştır. Ancak, subgingival enstrümantasyondan sonra KH kullanımı üzerine yapılan çalışmalara dayanan son öneriler şu şekildedir (da Costa ve ark., 2017);

- Başlangıç tedavisi için genel bir öneri olup olmadığı belirsizdir.
- Subgingival enstrümantasyona yardımcı olarak kullanımından önce mekanik plak kontrolünün yeterli seviyede olduğundan emin olunmalıdır.
- Karar verirken yan etkiler, ekonomik maliyetler ve hastanın genel sağlığı göz önünde bulundurulmalıdır.

KH, ağız boşluğunda genel olarak MDP oluşumunun engellenmesinde, gingivitis ve periodontitisin iyileştirilmesinde periodontal tedaviye yardımcı olarak, çürüğün önlenmesinde, endodontik uygulamalarda kök-kanal sisteminin dezenfeksiyonunda, cerrahi operasyonlardan önce ve sonra gelişebilecek enfeksiyonların ve diğer oral enfeksiyonların önlenmesinde ve tedavisinde yaygın olarak kullanılır (Fardal & Turnbull, 1986). Ağız hijyenini idame etmede yetersiz olan bireylerde, periodontal sağlığa yardım eder. Kullanım amacına yönelik olarak ağız gargaraları, aerosol, sprey (%0,12, %0,2), jel (%0,12, %1) ve cila (%1, %10, %40) formlarında veya yavaş salınım yapan sistemler (*Periochip*) şeklinde uygulanabilir. Yavaş salınım yapan lokal antiseptik ajanların faydalarına ilişkin yeterli kanıt bulunmasa da kullanımı düşünülebilir (Berchier ve ark., 2010; Sanz ve ark., 2020). Herrera ve ark. (2020), *Periochip* kullanımının 6-9 aylık takipte, cep derinliğinde azalma sağlarken, KAK ve sondalamada kanama değerlerinde anlamlı fark yaratmadığını bildirmiştir (Herrera ve ark., 2020). KH ayrıca diş temizliği için kullanılan diş macunu ve diş ipi gibi ürünlerde de bulunabilir (Puig Silla ve ark., 2008). Bununla birlikte, normal diş macunları içerisindeki sodyum lauril sülfat ya da florür gibi anyonik bileşikler, katyonik KH'yi inaktive eder, biyoyararlanımını azaltır. Diş macunundaki serbest kalsiyum iyonları KH'ye bağlanarak, KH'nin oral dokulara bağlanmasını azaltır. Bu sebeple,

diş fırçalaması ile KH gargara arasındaki zamanın en az 30 dk olmasına dikkat edilmelidir (Mandel, 1994).

KH uygulaması, sıklıkla gargara olarak veya hekim tarafından irrigasyon yapılarak birlikte kullanılır. Bu bileşim aynı zamanda sprey ya da jel olarak da uygulanabilir. %0,12-0,2 konsantrasyonlarında ağız gargarası kullanımı, diş eti iltihabı ve plak indekslerinin önemli ölçüde azalmasına katkı sağlar (Berchier ve ark., 2010). Aynı zamanda, cila formları da diş eti iltihabı, plak birikimi, kanama seviyeleri ve gingival indeksler üzerinde önemli etkilere sahiptir (McCracken, 2008). Solüsyon formundaki KH'nin 30 sn veya daha kısa sürede mikroorganizmaları yok edebildiği, %2'lik jel form için bu sürenin 22 sn ve %0,2'lik jel formu için ise sürenin 2 saate kadar uzayabildiği tespit edilmiştir (Vianna ve ark., 2004). Gargara formlarının ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından önerilen kullanım biçimi, %0,12-0,2'lik KH solüsyonlarının 15-30 güne kadar, günde iki kez, 10-15 ml, 30-45 sn ağzın çalkalanması şeklindedir (da Costa ve ark., 2017). Becerik ve ark. (2011)'ın yaptığı klinik çalışmada, hastaların etkili fırçalama ile birlikte günde iki defa 1 dk boyunca 10 mL %0,2 KH ile ağız çalkalama yapması ile 4 hafta sonunda periodontal ceplerden toplanan plak örneklerindeki toplam bakteri miktarında azalma olduğu gösterilmiştir (Becerik ve ark., 2011).

Tükürük, dil, oral mukoza ve tonsiller, periodontal patojenlerin önemli supragingival rezervuarlarıdır. Bazı patojenlerin, özellikle de *A.actinomycescomitans*'ın, dil dorsumunda ve oral mukozada kolonize olup dokulara invaze olduğu bilinmektedir (Fine ve ark., 2006). Bakterilerin konağa invazyonu tedavi edilen bölgelerin re-infeksiyonu için uygun ortam oluşturur. Tedavide supra ve subgingival enstrümantasyona ek olarak KH gibi antimikrobiyal ajanlarla ağız çalkalama yapılması ile bu mukozal rezervuarların tedavisinin başarılı olabileceği düşünülmektedir (Rams & Slots, 1996).

KH'nin diş eti oluğu sıvısında bulunan serum bileşikleri ile etkisiz hale gelebildiği, bu nedenle subgingival irrigasyon solüsyonu olarak %2 gibi yüksek konsantrasyonların %0,12 ve %0,2'lik konsantrasyonlardan daha iyi antibakteriyel etkinlik gösterdiği bildirilmiştir (Basrani ve ark., 2003; Mariotti & Rumpf, 1999). Southard ve ark. (1989), subgingival enstrümantasyon sonrası %2'lik KH solüsyonu ile 4 hafta boyunca haftada 1 kez subgingival irrigasyon uygulanmasıyla *P. gingivalis* seviyesinin 15 hafta boyunca düşük seviyede kalabildiğini belirtmiştir. Subgingival irrigasyon uygulanmadığı takdirde bu sürenin 7 hafta ile sınırlı kaldığı ifade edilmiştir (Southard ve ark., 1989). Ancak bu konsantrasyondaki KH normal uygulamalardan yaklaşık 10 kat yüksektir ve kullanımı kabul görmemektedir. Düşük konsantrasyonlardaki KH bile, İDF için toksiktir ve kolajen üretimini azaltır, periodontal sağlığı etkiler (Quirynen ve ark., 2002).

Uzun yıllardır bir çok alanda sıklıkla kullanılan KH'nin yan etkileri ile ilgili çeşitli veriler mevcuttur. Diş hekimliğinde en çok kullanılan formu olan solüsyon ile gargara yapılmasının ardından yaklaşık %4'ü yutulmaktadır. Gastrointestinal sistemden emiliminin çok zayıf olması özelliği ile yutulan ve dokular tarafından absorbe edilen KH'nin %90'ı feçes, kalanı ise idrar yoluyla, sistemik toksisite yaratmadan vücuttan atılır (Greenstein ve ark., 1986). Bununla birlikte, KH'nin oral kullanımıyla ilişkili daha ciddi yan etkiler arasında, şiddetli anafilaksi ile birlikte olabilecek olası Tip IV ve Tip I aşırı duyarlılık reaksiyonları bulunmaktadır. KH için, bu reaksiyonlar 0,78/100.000 insidansla bildirilmiştir (Garcez, 2018; Rose ve ark., 2019). Aynı zamanda, kontak dermatit, ürtiker, fotosensitivite ve ilaç döküntüsü de bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Moghadam ve ark., 1991; Wahlberg & Wennersten, 1971).

KH'nin ağız gargarası olarak kullanımına bağlı bazı lokal yan etkileri tanımlanmıştır. En yaygın olanları kserostomi, tat almada bozukluk, özellikle tuzlu ve acı tatların azalması, ve dişlerde, dilde ve ağız içi restorasyonlarda sarı-kahverengi renklenme oluşturmalarıdır. Plak önleyici özelliklere sahip olmasına rağmen, %0,12 KH ağız gargarasıyla diş taşı oluşumunun arttığı bildirilmiştir (Zanatta ve ark., 2010). Diğer daha az yaygın yan etkiler arasında oral mukozada yanma hissi, deskuamasyon, parotis bezinin şişmesi ve ağızda parestezi sayılabilir (Tartaglia ve ark., 2019). Dişlerde ve dilde görülen bu renklenmelerin, uzun süreli kullanımlarda, non-enzimatik kahverengileşme (Maillard reaksiyonu) ve pelikül proteinlerinin denatürasyonu ile pigmente metal sülfid oluşması sonucu görüldüğü ileri sürülmektedir (Nordbo ve ark., 1982).

KH kullanımı; doku nekrozu, enflamatuvar reaksiyonlar ve rejenerasyon inhibisyonu ile ilişkilendirilmiştir (Coelho ve ark., 2020). KH'nin *in vitro* çalışmalarda epitelyal hücreler, fibroblastlar, İDF, periodontal ligament hücreleri, osteoblastlar, makrofajlar ve nötrofiller üzerinde sitotoksik etkiler oluşturduğu bildirilmiştir (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2015). Giannelli ve ark. (2008), KH'nin *in vitro* olarak farklı hücre tiplerinde mitokondriyal membran potansiyelinde değişimlere, hücre içi Ca^{+2} artışına ve reaktif oksijen türleri oluşumuna neden olarak apoptozu ve otofajik/nekrotik hücre ölümünü uyardığını göstermiştir (Giannelli ve ark., 2008). Cline ve Layman (1992), %0.01'lik KH konsantrasyonunun İDF'nin *in vitro* gelişimini %90 oranında azaltırken daha yüksek konsantrasyonlarda bu hücrelerin tutundukları yüzeyden ayrılmasına neden olduğunu bildirmişlerdir (Cline & Layman, 1992). Başka bir çalışmada da KH uygulanan kök yüzeylerine, İDF'nin yapışmadığı ve periodontal rejenerasyonunun meydana gelmediği ileri sürülmüştür (Cline & Layman, 1992). KH'nin bukkal mukoza hücrelerinde DNA hasarını artırdığını ve diğer hücrelerde de genotoksik etki yarattığını gösteren çalışmalar bulunmaktadır (Eren ve ark., 2002; Li ve ark., 2014; Ribeiro ve ark., 2004). Bu bulguların yanı sıra, KH toksisitesi ile ilgili farklı veriler de mevcuttur. Sanchez ve ark.

(1988), köpekler üzerinde yaptıkları çalışmada *in vitro* olarak bildirilen bu sitotoksik etkilere *in vivo* şartlarda rastlanmadığını rapor etmişlerdir (Sanchez ve ark., 1988). Southard ve ark. (1989), %2'lik KH ile subgingival irigasyon yapıldığında diş eti dokularında bir toksisitenin görülmediğini bildirmişlerdir (Southard ve ark., 1989). Ribeiro ve ark. (2005), KH'nin DNA üzerine zararını inceledikleri çalışmalarında genotoksik etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir (Ribeiro ve ark., 2005). Benzer şekilde, KH'nin onkogen bir ajan olmadığını öne süren başka çalışmalar da mevcuttur (Denton, 2001; Hikiba ve ark., 2005).

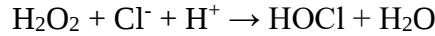
KH ile ilgili ortaya çıkan bir başka önemli sorun, antimikrobiyal dirençtir; KH'nin öldürmeyi amaçladığı mikroorganizmalar adapte olarak dirençli hale gelebilir ve sonuç olarak ağız çalkalama solüsyonunun etkisinin azalmasına neden olabilir (Kampf, 2016). Bu durumda genetik mutasyonlar meydana gelebilir ve hücre zarı yapısında değişikliklere neden olarak, diğer bakterilerin de antibiyotiklere karşı çapraz direnç kazanmasına neden olabilir (Cieplik ve ark., 2019; Zhang ve ark., 2019). Alerjiler ve lekelenme gibi faktörlerin yanı sıra, KH kullanımını önerirken antimikrobiyal direncin de göz önünde bulundurulması gerekmektedir.

4.8. Hipokloröz Asit

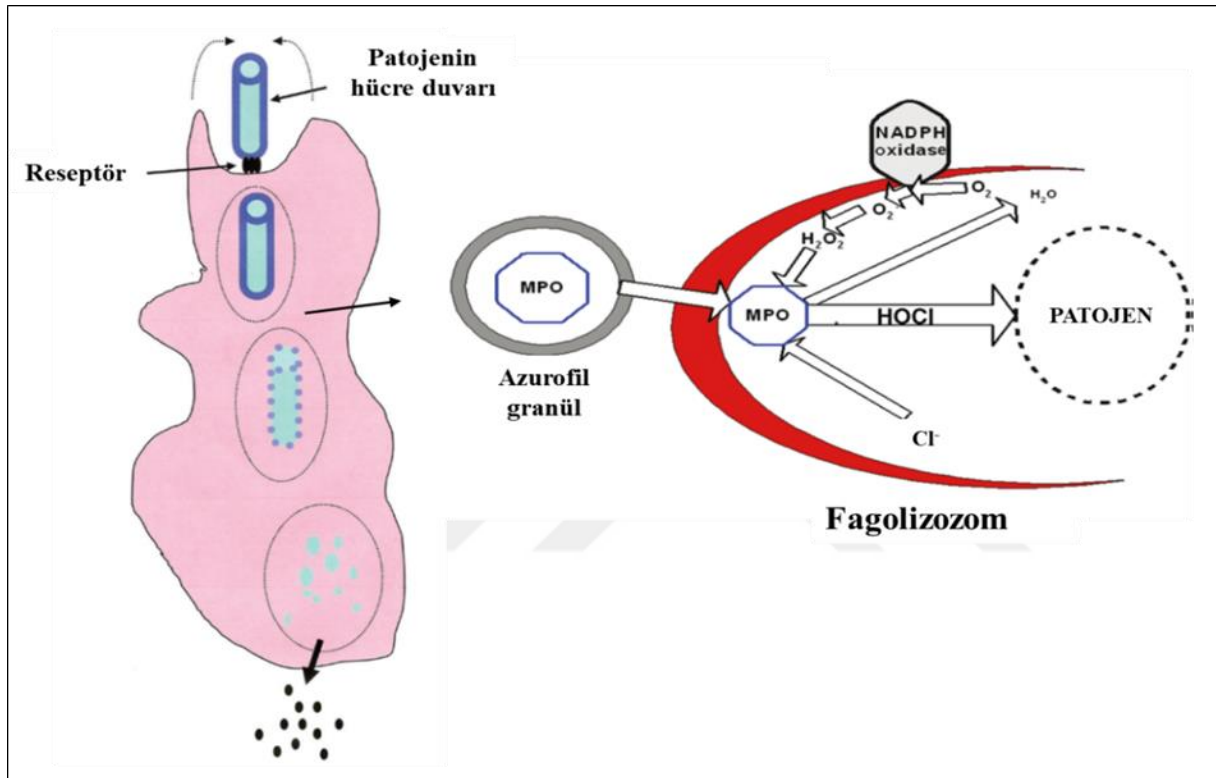
HOCl, fagositoz sırasında nötrofiller, eozinofiller, mononükleer fagositoz yapan hücreler ve B lenfositleri tarafından sentezlenen ve tüm mikroorganizmaların yok edilmesinde aktif rol oynayan fizyolojik bir moleküldür (Pullar ve ark., 2000). İlk kez 1823 yılında Sir Davy tarafından tanımlanmış, 1881'de Faraday tarafından *in vitro* koşullarda üretilmiş ve Birinci Dünya Savaşı sırasında enfekte yaraların tedavisinde antiseptik olarak kullanılmaya başlanmıştır (Dychdala, 2001; Levine, 2013).

HOCl, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından antijenlerin fagositozu sırasında sentezlenen reaktif oksijen türleri olarak bilinen küçük moleküller grubunun bir parçasıdır (Green ve ark., 2014). Akut enflamatuvar yanıt; yaralanma veya patojenlere karşı doğal bağışıklık sistemi tarafından, bağışıklık hücrelerinin akını ile başlatılır ve bu süreçte birçok reaktif kimyasallar kullanılır. Doğuştan gelen bağışıklık hücreleri patojenleri hem kemotaktik olarak hem de doğrudan fiziksel temas yoluyla algılayabilir ve nihayetinde fagositozla sonuçlanan kombinasyonel bir süreç gerçekleşir (Heinrich & Lee, 2011) (Şekil 9). Fagositoz tamamlandığında, mitokondriyal membrana bağlı, reaktif oksijen türlerinin üretiminden sorumlu temel enzim olan nikotinamid adenin dinükleotid fosfat oksidaz (NADPH oksidaz) aktive edilir ve süperoksit (O_2^-) oluşturulur. Süperoksit dismutaz etkisiyle O_2^- , hidrojen peroksit (H_2O_2) dönüştürülür. Ardından, monositler, makrofajlar ve özellikle de nötrofiller tarafından salgılanan bir protein olan miyeloperoksidaz, H_2O_2 ve fizyolojik klorür (Cl^-)

arasındaki reaksiyonu katalizleyerek aşağıda gösterilen reaksiyonla HOCl üretir (oksidatif patlama) (Fu ve ark., 2003; Pullar ve ark., 2000).



Reaksiyonlar sonucu, fagolizozomun lümeni giderek daha asidik hale gelir, HOCl etkisiyle patojen hücre duvarı bütünlüğü bozulur. Proteinlerin yapısal bütünlüğünü bozarak agregasyonuna neden olur. Ekzositoz meydana gelir ve kalıntılar dışarı atılır (Armstrong ve ark., 2015; Wang ve ark., 2007).



Şekil 9. Nötrofil tarafından patojenin fagositozu ve sonrasında oksidatif patlama sürecinde HOCl üretimi ile patojenin sindirimi (Armstrong ve ark., 2015 ve Wang ve ark., 2007’den yararlanılarak hazırlanmıştır)

HOCl'nin antimikrobiyal etkisinin, gram pozitif bakterilere kıyasla gram negatif bakterilerde daha güçlü olduğu görülmektedir. Kükürt içerikli bileşikler HOCl'ye karşı duyarlıdır ve gram negatif bakterilerin zarında kükürt ve demir açısından zengin olan hem grupları bulunur. HOCl ile bu membran proteinleri arasında geri dönüşümsüz bir reaksiyon oluşur ve gram negatif bakterilerde yapısal hasara neden olur, hücre geçirgenliğini değiştirerek bakteriyel yaşamı etkiler (McKenna & Davies, 1988; Rosen & Klebanoff, 1982). HOCl, lipopolisakkarit ve *gingipain* gibi bakteriyel endotoksin ve ekzotoksinlerin etkisini oksidasyon/klorinasyon yoluyla nötralize eder. Böylece periodontal dokulara karşı potansiyel zararlı olan aktivitelerini azaltır. Öte yandan HOCl, bakteri antijenlerinin klorinasyonu ile antijenlerin

immünojenitesini etkiler; gram negatif periodontal patojenlere karşı nonspesifik immün yanıtı teşvik ederken, gram pozitif bakteriler tarafından indüklenen yanıtı azaltır (Kontny ve ark., 2003). Bu durum, makrofajlar aracılığıyla enflamasyonu aktive eden antijen fagositozunu etkiler. Gram pozitif bakteriler tarafından salınan antijenlerin klorinasyonu, nitroz oksit ve tümör nekroz faktörü- α gibi makrofaj sekretuar aktivitelerini önemli ölçüde etkiler; ancak fagositoz ve interlökin-6 üretimi değişmez (Marcinkiewicz ve ark., 1994). Periodontal olarak sağlıklı bireylerde normal subgingival floranın çoğunluğu gram pozitif bakterilerden oluşurken, güçlü periodontal patojenler çoğunlukla gram negatif bakterilerden oluşur. HOCl'nin etkisiyle, gram negatif bakterilere karşı savunma yeteneğinin gram pozitif bakterilerden daha gelişmiş olması, immün sistemin periodontal dokuların normal fizyolojik durumunu korumasına katkı sağlayabilmektedir.

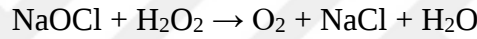
HOCl aynı zamanda güçlü bir oksidan ajan olarak bilinir. Hücrelerde herhangi bir oksidatif stres durumunun oluşumunu önlemede kritik bir role sahip organik bileşikler olan tiyol ve tiyoeter gruplarını oksitleyebilir ve amin gruplarını halojenleyerek monokloraminler ve dikloraminler gibi toksik kloraminler üretir. Bunlar da kendi başlarına oksidan ajanlardır ve fagolizozomların antimikrobiyal aktivitesine katkıda bulunur (Grisham ve ark., 1984). HOCl yüksek redoks potansiyeli ile atomların elektronlarını kopararak; sülfhidril enzimlerinin ve amino asitlerin oksidasyonu, amino asitlerin klorinasyonu, hücreler arası madde kaybı, protein sentezinin inhibisyonu, oksijen ve besinlerin alımının azaltılması, solunum bileşenlerinin oksidasyonu, adenosin trifosfat üretiminin azaltılması, DNA zincir kırıkları ve DNA sentezinin baskılanması gibi yollarla bakterisidal etki gösterir. Tüm bu özelliklerinden dolayı mikroorganizmalar HOCl'ye karşı direnç geliştirememektedir (Barrette ve ark., 1987; Dychdala, 2001; Knox ve ark., 1948; McKenna & Davies, 1988). HOCl bakterilerin olduğu gibi, virüs ve mantarların da hızla ölümüne ve de prionların inaktivasyonuna sebep olur. HOCl'nin COVID-19 dâhil çeşitli virüsleri 1 dakikadan daha kısa bir zamanda etkisiz hale getirdiği gösterilmiştir (Kampf ve ark., 2020).

HOCl konsantrasyona bağlı olarak hem proenflamatuar hem de antienflamatuar özelliklere sahiptir. Bu, periodontal dokularda enflamatuar yanıtı modüle eden çok önemli bir mekanizma olabilir. Düşük konsantrasyonlarda HOCl, periodontal dokuya zarar verebilir. HOCl'nin düşük dozu, matriks metalloproteinazların, kolajenaz-2 ve jelatinaz B'nin proformlarını, tiyol grubu oksidasyonu yoluyla aktive edebilir, ancak daha yüksek konsantrasyonlarda HOCl, katalitik bölgedeki triptofan ve glisin kalıntılarının oksidatif modifikasyonu yoluyla matriks metalloproteinaz-7 aktivasyonunu inhibe eder (Fu ve ark., 2003). Benzer şekilde, HOCl, HOCl/kolajenaz oranı 40'ı aştığında kolajenaz aktivitelerini, HOCl/jelatinaz oranı 30'u

aşığında da jelatinazları inhibe eder (bu yüksek HOCl konsantrasyonunu gösterir); ancak oran düştüğünde bunları inhibe etmediği görülür (Davies ve ark., 1994; Michaelis ve ark., 1992). Sonuç olarak HOCl, periodontitiste çift taraflı bir etkiye sahiptir. Her ne kadar periodontitiste HOCl etkileri iyi belgelenmemiş olsa da, HOCl'nin periodontitisin ilerlemesini modüle etmede çok önemli bir rol oynadığı ve hasarını onarmada yardımcı olabileceği görülmektedir.

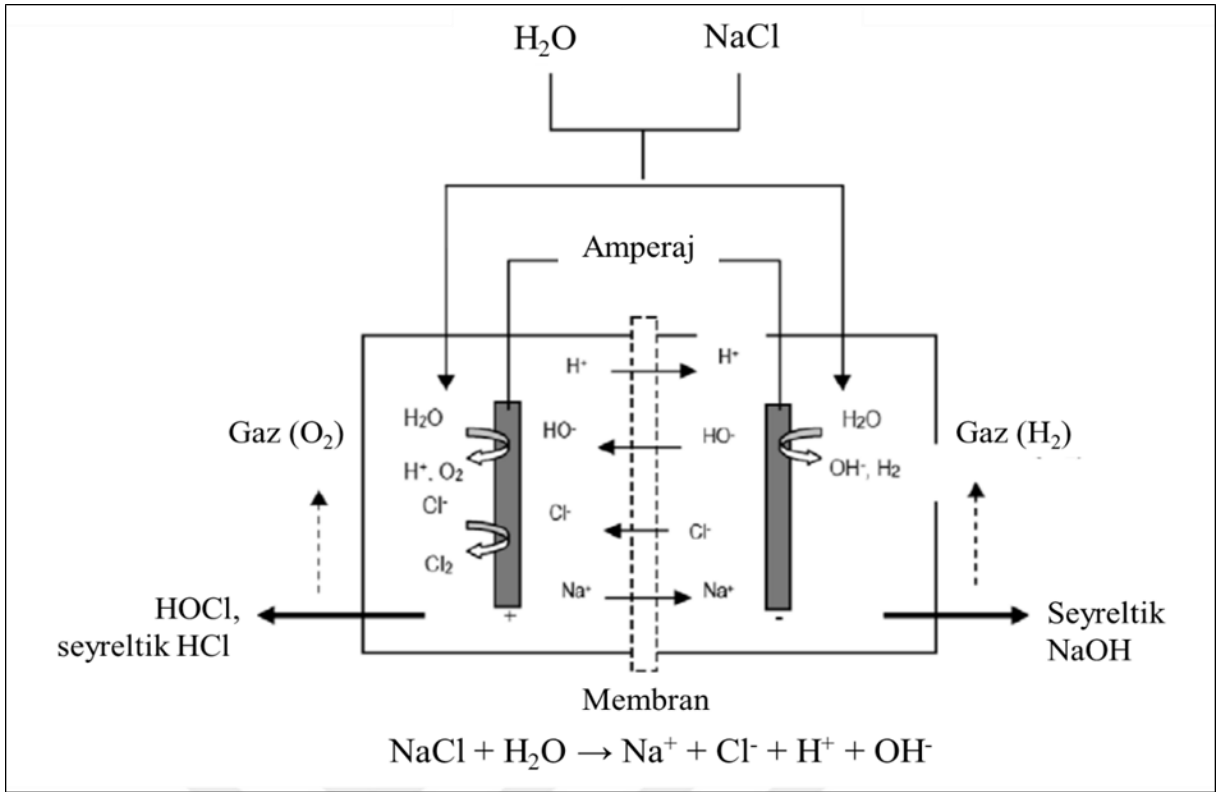
Ayrıca HOCl, taurin amino asidini okside eder ve klor-aurin oluşumunu indükler. Klor-aurin, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye ve enflamatuvar mediatörlerin üretimini inhibe edebilme yeteneğine sahip bir oksidandır. Klor-aurin, HOCl'in aşırı etkilerine karşı dokular üzerinde önemli bir koruyucu etkiye sahiptir, antienflamatuvar olarak etki eder ve iyileşmeyi artırır (Kim & Cha, 2014).

HOCl, *in vitro* şartlarda sodyum hipoklorid (NaOCl) ve H₂O₂'nin tersiner reaksiyonu ile üretilen, klor bazlı ve klorun su içinde çözünmesiyle oluşan zayıf bir asittir (Levine, 2013). Standart reaksiyon denklemi aşağıdaki şekildedir (Khan & Kasha, 1994).



Seyreltilmiş NaCl çözeltisi, belirli iyonların geçmesine izin veren yarı geçirgen bir zar ile ayrılmış, anot ve katot bölmeleri içeren bir elektrokimyasal düzenek kullanılarak çeşitli reaksiyonlar ile elektrolize edilir ve HOCl üretilir (Huang ve ark., 2008) (Şekil 10). HOCl su, organik ve inorganik maddeler ile temas ettiğinde, çözelti içinde hidrojen (H⁺) ve hipoklorit (OCl⁻) iyonlarına ayrışır (Pullar ve ark., 2000). HOCl, nötr pH'da daha stabil olma eğilimindedir, ayrışma reaksiyonu azaldığında ortamdaki HOCl/OCl⁻ oranı artar ve daha fazla bakterisidal etki gösterir (Len ve ark., 2002). HOCl çözeltileri UV ışınlarına, güneş ışığına veya havayla temas ettiğinde veya çözeltinin sıcaklığı 25°C'den yüksek olduğunda daha az stabildir. HOCl çözeltileri serin, karanlık yerlerde saklanmalı ve hava ile teması minimize edilmelidir. Üretim için kullanılan su, mümkün olan en az organik ve inorganik iyon konsantrasyonuna sahip olan su olmalıdır (Ishihara ve ark., 2017; Kampf ve ark., 2020; Park ve ark., 2007; Rutala ve ark., 1998).

HOCl'nin konsantrasyonu ppm (*parts per million*) olarak ifade edilir ve çözeltideki aktif klor miktarını belirtir (Block & Rowan, 2020). HOCl'nin bakteriyel, viral ve fungal patojenlere karşı etkinliği temas süresi ve konsantrasyonu ile ilişkilidir ve az miktarda bile kısa sürede spor oluşturan ve oluşturmayan bakterileri öldürebilir (Sakarya ve ark., 2014). HOCl, gıda sanayisinde, meyve ve sebzelerde görülen patojen mikroorganizmalara karşı dezenfektan



Şekil 10. *In vitro* koşullarda HOCl sentezi (Huang ve ark., 2008'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

amaçlı kullanılmaktadır (Beuchat, Farber, ve ark., 2001). Tıp alanında; açık yaranın temizlenmesi, irrigasyonu, nemlendirilmesi ve debridmanında, mikroorganizmaların uzaklaştırılmasında, kronik yaralarda, diabetik ayak ülserlerinde, cerrahi yaralarda, yanık tedavisinde, ağız, burun, boğaz ve dudak ülserlerinde, nazal ve boğaz enfeksiyonlarında, göz enfeksiyonlarında ve göz kapağı iltihabında antimikrobiyal ve yara bakım solüsyonu olarak kullanılmaktadır (Armstrong ve ark., 2015; Stroman ve ark., 2017). Aynı zamanda, diğer dezenfektan ajanlardan daha etkin ve daha zararsız olması nedeniyle hem el hem de yüzey dezenfektanı olarak kullanımı öne çıkmaktadır (Overholt ve ark., 2018; Wolfe ve ark., 2017).

Wang ve ark. (2007), 28 günlük toksisite çalışmalarından elde ettikleri verilere göre, sıçanlar ve minik domuzlar üzerinde tam kalınlıktaki yaralara, günlük olarak uygulanan 1, 3 ve 10 ppm konsantrasyonlarındaki stabilize HOCl'nin, 24 saat boyunca kapalı bir pansumanla birlikte kullanımının, herhangi bir sistemik toksisite belirtisi göstermediğini, stabilize edilmiş HOCl'nin güvenli olduğunu belirtmişlerdir (Wang ve ark., 2007). Aynı zamanda yaptıkları *in vitro* bir çalışmada, 0,1-2,8 ppm konsantrasyon aralığında HOCl, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktivite göstermiştir; *C. albicans* dahil test edilen organizmaların çoğu (%99,99'dan fazlası) uygulamanın ilk 2 dakikasında öldürülmüştür (Wang ve ark., 2007). Sam ve ark. (2009), HOCl'nin konsantrasyona bağlı bir şekilde enflamatuvar yanıtı modüle

edebildiğini, hem proenflamatuar hem de antienflamatuar özelliklere sahip olduğunu ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulduğunu belirtmiştir (Sam & Lu, 2009). Sakarya ve ark. (2014), stabilize HOCl solüsyonunun antimikrobiyal ve biyofilm eradikasyonu üzerine ve dermal fibroblastlar ile keratinositlerin göçü üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Çok düşük konsantrasyonlarda bile temas ettiği anda (12 sn-0 dk) bakteriler (*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *C. albicans*) için öldürücü olduğu, biyofilmi ortadan kaldırebildiği, biyofilm altındaki inaktif bakteriyi öldürebildiği, fibroblastların ve keratinositlerin hasarlanmış alana göçünü doza bağımlı olarak etkilediği sonucunu ortaya koymuşlardır. Yüksek konsantrasyonlarda (55-109 ppm) hücrelerin göçünün bozulmasına sebep olurken, düşük konsantrasyonlarda (5,5-11 ppm) daha yüksek migrasyona sebep olduğu gözlenmiştir (Sakarya ve ark., 2014). Bu özellikleriyle HOCl'nin ideal bir yara bakım solüsyonu olmaya aday olduğunu ortaya koymuşlardır. Anagnostopoulos ve ark. (2018), *in vitro* olarak %0,01 (100 ppm) HOCl, %5 povidon iyodür, %4 KH ve %70 izopropil alkol solüsyonlarının antimikrobiyal etkilerini karşılaştırmışlardır. HOCl'nin povidon iyodür ve KH'ye kıyasla çok daha hızlı bakterisidal etki gösterirken, izopropil alkol ile benzer etkinliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. 100 ppm HOCl'nin antiseptik ajan olarak eşdeğer hatta daha iyi bir alternatif olabileceğini ancak hücreler üzerindeki güvenirliliğinin kanıtlanmaya ihtiyacı olduğunu vurgulamışlardır (Anagnostopoulos ve ark., 2018). HOCl'nin medikal alanda ideal bir yara bakım solüsyonu olarak kullanılıyor olması, ağız içerisinde biyofilm kaynaklı periodontal enfeksiyonlarda da kullanılabileceği görüşünü doğurmuştur.

2009 yılında yayınladığı bildiride Calderon (2009), periodontal alanda en fazla 500 ppm derişiminde HOCl kullanımını önermiş, daha yoğun derişimlerin ortamdan birkaç dakika içinde uzaklaştırılması gerektiğini öne sürmüştür (Calderon, 2009). HOCl'nin sistemik ve gastrointestinal etkilerini değerlendirmek ve gargara olarak kullanıldığında yutulması durumunda ne olacağını araştırmak için bir hayvan çalışması yapılmıştır (Morita ve ark., 2011). Farelere içme suyu olarak HOCl suyu verilmiş ve ardından ağız boşluğunun görsel muayenelerinde, histopatolojik ve sistemik değerlendirmelerin sonuçlarında anormal bulgular saptanmadığı belirtilmiştir. Castillo ve ark. (2015), 250 ppm ve 500 ppm HOCl ile %0.2'lik KH'nin bakteriyel proteinler üzerindeki etkinliğine bakmış; gram pozitif bakterilerde (*Streptococcus mutans* ve *Actinomyces israelii*) KH, gram negatiflerde (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *C. rectus* ve *Klebsiella oxytoca*) HOCl artan derişime bağılı olarak daha etkin bulunmuştur (Castillo ve ark., 2015). Soo-Byeong Kim (2016), çalışmasında 3-5 ppm HOCl solüsyonunun, 1 dk içerisinde, test edilen tüm anaerobik (*P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *F. nucleatum*) ve fakültatif anaerobik (*S. mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus godonii*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus salivarius*) bakterilere

karşı güçlü bakterisidal aktivite sergilediğini göstermiştir ve HOCl solüsyonunun *in vivo* ve *in vitro* deneyler ile desteklenmesi gereken potansiyel bir ağız gargarası olduğunu öne sürmüştür (Kim, 2016). Kim ve Nam (2018) yaptıkları klinik bir çalışmada, 5'er hastaya 1 dk boyunca ağız gargarası olarak 10-30 ppm HOCl, %0.005'lik KH ve serum kullandırmışlar ve bakılan klinik parametrelerde (halitosis, dental çürük aktivitesi ve bakteri türleri ve hareketliliği) HOCl kullanan grup lehine sonuçlar elde etmişlerdir (Kim & Nam, 2018). Veriler doğrultusunda diş hekimliği pratiğinde yaygın olarak kullanılan ancak yan etkileri olan KH yerine ağız gargarası olarak HOCl'nin kullanılmasının ağız hastalıklarının önlenmesine katkı sağlayabileceğini ve MDP'nin dişlere yapışmasını engelleyebileceğini ileri sürmüşlerdir (Kim & Nam, 2018). Başka bir klinik çalışmada Lafaurie ve ark. (2018), beş ayrı grup olarak hastalara 30 sn boyunca 250 ppm ve 500 ppm HOCl, %0,12'lik ve %0,2'lik KH ve plasebo olarak distile su ile gargara yaptırmışlardır. Tükürükteki bakteri canlılığı üzerine, HOCl grupları sadece hemen çalkalama sonrası plasebo grubuna göre farklılık gösterirken, %0,2 KH grubu hem başlangıçta hem de 7 saat boyunca belirgin etki göstermiştir. Plak tutulumu açısından gruplar arasında fark gözlenmemiştir (Lafaurie ve ark., 2018). Hsieh ve ark.'nın (2020), zebra balıkları üzerinde yaptıkları çalışmada 125 ve 250 ppm HOCl ve NaOCl solüsyonları karşılaştırılmış; değerlendirilen gram pozitif bakteriler (*Enterococcus faecalis* ve *S. mutans*) üzerinde HOCl daha etkin bulunmuştur ve balıklara toksik etki yaratmadığı gözlenmiştir (Hsieh ve ark., 2020).

4.9. Sitotoksosite Testleri

Hücrelerin hayatta kalma ve ölüm gibi yaşamsal faaliyetleri, fizyolojik koşullara verilen hücresel tepkilerle belirlenir ve normal gelişimi ve doku homeostazı katı bir düzen içinde yürütülür. Hücre ortamındaki değişiklikler, hücre büyümesinin durması, apoptoz (programlı hücre ölümü) veya nekroz (hasar yolu ile kontrolsüz hücre ölümü) gibi çeşitli hücre hasarlarının oluşmasına ve hücre sayısının azalmasına sebep olabilir (Han ve ark., 2008; H. Kim ve ark., 2009).

Sitotoksosite, canlı hücreler üzerindeki toksik etki oranını ifade eder. Hücre canlılığı ise, örnek içindeki sağlıklı hücre sayısı olarak tanımlanır. Canlı hücreler üzerinde, ilaç veya kimyasal maddelere bağlı olarak önemli yapı ve fonksiyon değişikliklerinin saptanması ve yorumlanması amacıyla çeşitli toksikolojik analizler yapılır (Saygı, 2003). Sitotoksosite testleri, *in vivo* ya da *in vitro* koşullarda yapılabilmektedir. *In vitro* olarak yapılan testlerde, sitotoksitesi araştırılan madde çeşitli konsantrasyonlarda hücrelerin üzerine uygulanır ve bu maddenin hücre morfolojisi ve hücrelerin yaşama oranları üzerine etkileri araştırılır (Stoddart, 2011).

Günümüzde hücre canlılığının/sitotoksitenin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bunlar enzim aktivitesi, hücre zarı geçirgenliği, hücre adezyonu, adenosin trifosfat üretimi, koenzim üretimi ve nükleotid alım aktivitesi gibi farklı hücre fonksiyonlarına dayanmaktadır (Kamiloglu ve ark., 2020). Bu yöntemler, farklı sınıflandırmalar olsa da Tablo 2’de görüldüğü şekilde kategorize edilebilir (Adan ve ark., 2016; Kamiloglu ve ark., 2020; Stoddart, 2011).

Tablo 2. Hücre canlılığı/sitotoksitenin belirleme yöntemleri

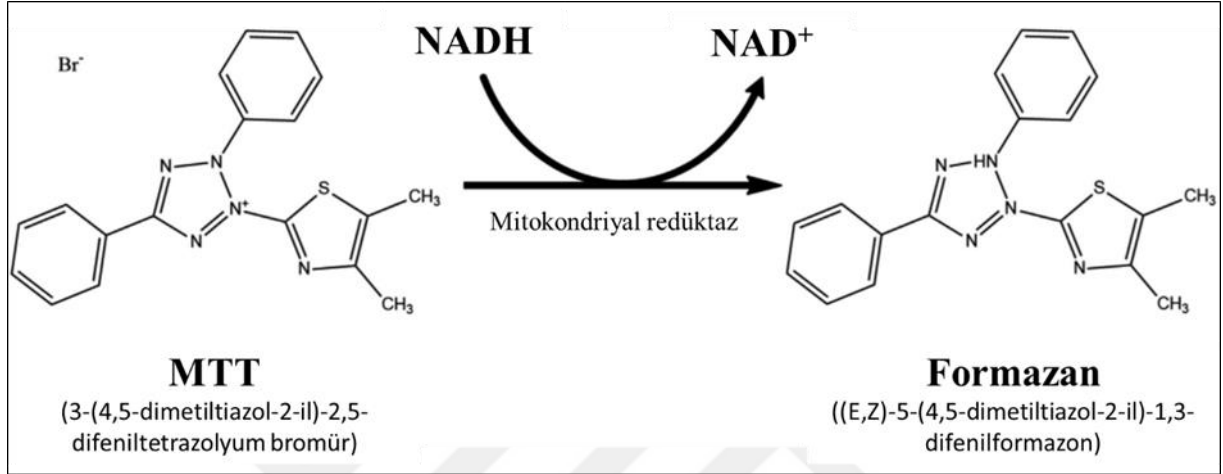
a. Boyama analizleri	• Laktat dehidrogenaz (LDH) testi
• Tripan mavisi testi	• Sulforhodamin B (SRB),
• Eozin, kongo kırmızısı ve eritrosin B boyası yöntemleri	• Nötral kırmızı testi (NRU),
b. Kolorimetrik analizler	c. Kristal viyole yöntemi (CVS) Florometrik analizler
• 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür (MTT) testi	• Alamar mavisi testi
• 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sülfenil)-2H-tetrazolyum (MTS) testi	• 5-karboksifloresein diasetat asetoksimetil ester (5-CFDA-AM) testi
• 2,3-bis-(2-metoksi-4-nitro-5-sülfenil)-2H-tetrazolyum-5-karboksanilid (XTT) testi	d. Luminometrik analizler
• 2-(4-iyodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST-1) testi	• Adenosin trifosfat testi
• 2-(2-metoksi-4-nitrofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disülfenil)-2H-tetrazolyum, monosodyum tuzu (WST-8) testi	• Gerçek zamanlı canlılık belirleme yöntemleri
	e. Akış sitometrisi analizleri
	• Membran asimetri testleri
	• Membran geçirgenlik testleri
	• Mitokondri testleri

İdeal sitotoksitenin/hücre canlılığı ölçüm yöntemi güvenilir, hızlı ve verimli olmalı, süre ve maliyeti uygun olmalı ve test bileşiğiyle etkileşime girmemelidir (Aslantürk, 2018; Shokrzadeh & Modanloo, 2017).

4.9.1. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür hücre canlılık testi

MTT testi, Mosmann tarafından 1983’te geliştirilmiş, hücre canlılığı, proliferasyonu ve sitotoksitenin belirlenmede kullanılan, metabolik aktivitenin ölçülmesine dayalı kolorimetrik bir yöntemdir (Mosmann, 1983). Proliferasyona uğrayan canlı hücrelerdeki mitokondriyal dehidrogenaz enzimlerinin aktivitesi ile sarı renkli MTT tetrazolyum tuzunun suda çözünmeyen mor renkli formazan kristallerine dönüştürülmesi prensibine dayanır (Şekil 11). Oluşan formazan kristalleri dimetil sülfoksit (DMSO) veya izopropil alkolde çözündürülür.

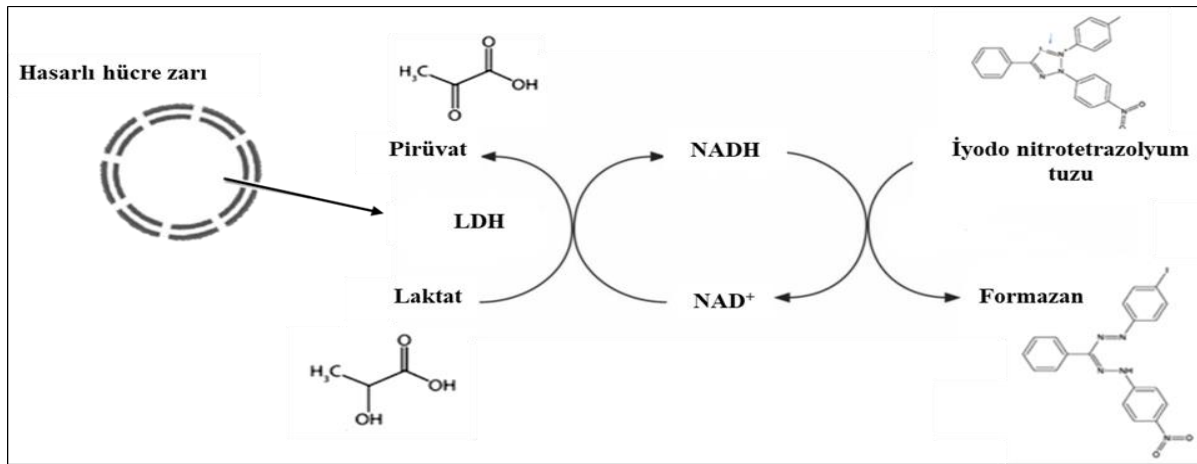
Metabolizması aktif olmayan ölü hücreler tetrazolyum tuzlarını renkli formazan ürünlerine indirgeyemezler. Oluşan renk reaksiyonu yoğunluğu doğrudan hücre sayısı ile ilişkilidir (Kamiloglu ve ark., 2020). En sık kullanım alanları; sitokinlerin, büyüme faktörlerinin medyum komponentlerinin hücreler üzerine etkilerinin araştırılması ve sitotoksik ajanların etkinliğinin test edilmesidir (Kumar ve ark., 2018b; Mosmann, 1983).



Şekil 11. MTT'nin formazan kristallerine indirgenmesi (Kamioğlu ve ark., 2020'den yararlanılarak hazırlanmıştır)

4.9.2. Laktat dehidrogenaz sitotoksisite testi

LDH testi, immün hücrelerinde sitotoksitenin hızlı ve hassas bir şekilde ölçülebilmesi için 1980'lerde geliştirilmiştir (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Çeşitli kimyasal maddelerin ve ilaçların toksisitesini belirlemede kullanılan kolay, hızlı ve güvenilir bir yöntemdir. LDH, stabil bir sitoplazmik enzimdir ve membran bütünlüğü zarar gördüğünde hücre kültürü ortamına salınır (Chan ve ark., 2013). Bu, apoptozis, nekroz veya diğer hücre hasar türlerine maruz kalan hücrelerin tipik bir özelliğidir. Ortamdaki hücre dışı LDH enzimi, ilk olarak laktatı pirüvata çevirir ve bu esnada nikotinamid adenin dinükleotidi (NAD⁺) indirgeyerek nikotinamid adenin dinükleotid hidrid (NADH) oluşturur. Daha sonra NADH, sarı olan iyodo tetrazolyum tuzunu suda çözünebilen kırmızı bir formazan ürününe indirger (Şekil 12). Formazan oluşumunun seviyesi, ortama salınan LDH miktarı ile doğru orantılıdır ve bu nedenle test sırasında oluşan renk yoğunluğu, hasar görmüş hücrelerin sayısı ile orantılı olarak sitotoksitenin göstergesidir (Kumar ve ark., 2018a).



Şekil 12. LDH sitotoksosite testinin mekanizması

4.10. Antimikrobiyal Aktivite Testleri

Bir özüt veya bileşiğin belirli bir mikroorganizma türüne karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak amacıyla çeşitli yöntemler kullanılabilir. Rutin laboratuvarlarda duyarlılığın saptanmasında en sık olarak kullanılan yöntem disk difüzyon testleridir. Ancak bir ajanın antimikrobiyal etkisinin derinlemesine incelenmesi için önerilen yöntemler, zamana bağlı öldürme yöntemi ve akış sitoflorometrik yöntemlerdir. Bu yöntemler, test edilen ajanın bakterisidal veya bakteriyostatik özellikleri ve zaman veya konsantrasyona bağlı inhibe edici etkilerinin doğası hakkında ve test edilen mikroorganizmanın hücre hasarına ilişkin bilgi sağlamaktadır (Balouiri ve ark., 2016). Antimikrobiyal aktivitenin *in vitro* değerlendirilme teknikleri Tablo 3’te verilmiştir (Balouiri ve ark., 2016).

Tablo 3. Antimikrobiyal aktivite değerlendirme yöntemleri

a. Diffüzyon yöntemleri	c. Dilüsyon yöntemleri
- Agar disk-difüzyon yöntemi - Antimikrobiyal gradyan yöntemi - Diğer difüzyon yöntemleri i) Agar well difüzyon yöntemi ii) Agar plug difüzyon yöntemi iii) Çapraz çizgi yöntemi iv) Zehirli gıda yöntemi	- Broth dilüsyon yöntemi - Agar dilüsyon yöntemi
b. İnce tabaka kromatografisi (TLC)-biyootografi	d. Zamana bağlı öldürme yöntemi
- Agar difüzyon - Direk biyootografi - Agar overlay biyotest	e. Adenozin trifosfat biyoluminesans analizi
	f. Akış sitoflorometrik yöntem

4.10.1. Zamana bağı öldürme yöntemi

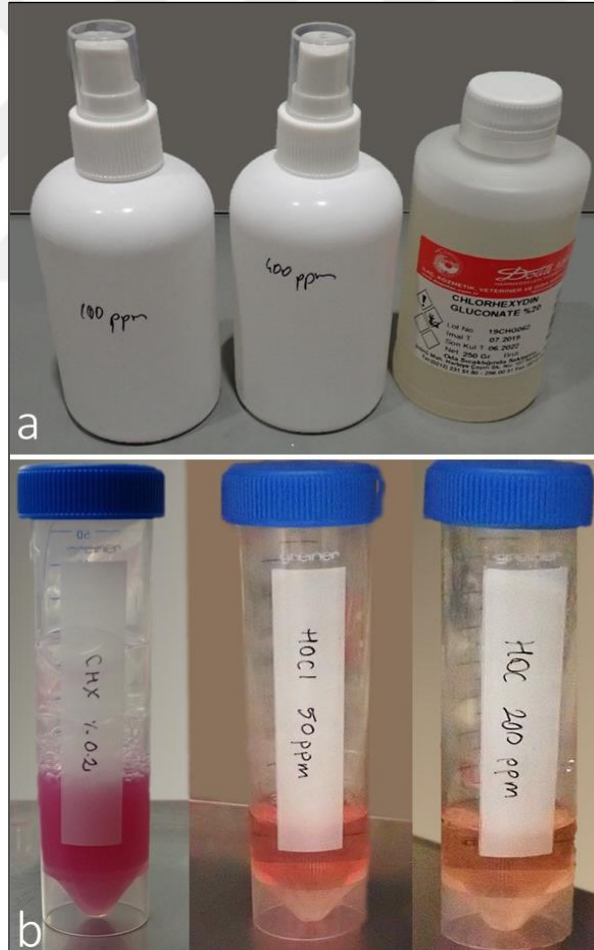
Zamana bağı öldürme (*time-kill*) testi, bakterisidal veya fungisidal etkinin belirlenmesi için en uygun yöntemdir. Zamana bağı veya konsantrasyona bağı olarak antimikrobiyal etkinin incelenmesine olanak sağlar. Test edilen ajan ile mikroorganizma arasındaki dinamik etkileşim hakkında bilgi sunar (Pfaller ve ark., 2004). Bu yöntemde, belirli miktarda mikroorganizmanın belirli yoğunluktaki ajan ile belirli bir süre teması gerekmektedir. Zamana bağı azalmanın tespiti için farklı zamanlarda canlı bakteri sayımı yapılır. Bakterisidal etkiden bahsedebilmek için canlı bakterilerin miktarının %99,9 azalması gerekmektedir (Konate ve ark., 2012).



5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Solüsyonların Hazırlanması

Çalışmamızda 50 ppm HOCl (%0,005), 200 ppm HOCl (%0,02) ve %0,2 KH solüsyonları kullanıldı. Deneylerde kullanılacak olan KH'nin nihai konsantrasyonuna ulaşmak için, %20'lik klorheksidin glukonat (Doğa İlaç, İstanbul, Türkiye) solüsyonu (Şekil 13a) işlemiden hemen önce büyüme ortamında seyreltilerek hazırlandı (Şekil 13b). 100 ppm ve 400 ppm konsantrasyonlarındaki HOCl solüsyonları (Anolit Co., Ankara, Türkiye) da (Şekil 13a) son konsantrasyonların elde edilebilmesi amacıyla, kullanımdan hemen önce büyüme ortamında yarı yarıya seyreltilerek hazır hale getirildi (Şekil 13b).



Şekil 13. a. Test solüsyonları b. Test solüsyonlarının son konsantrasyonları

5.2. Sitotoksik Aktivite Deneyleri

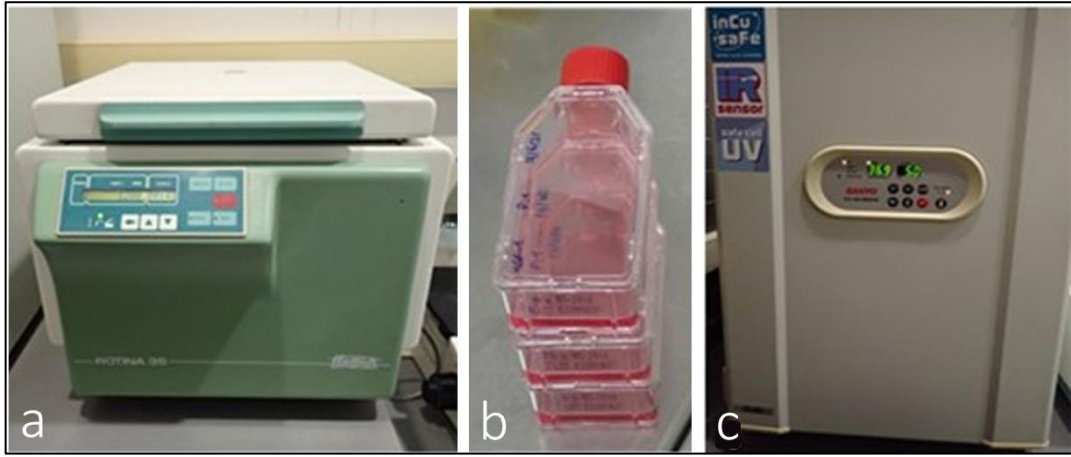
5.2.1. Hücrelerin çözülmesi, pasajlanması, çoğaltılması ve sayılması

Çalışmamızda ATCC firmasından ticari olarak temin edilen İDF (İDF-1, Katalog no: CRL-2014, ATCC, Manassas, VA, ABD) hücreleri (Şekil 14a) kullanıldı. Hücrelerin beslenme şartları; sodyum pirüvat, yüksek D-glukoz ve sodyum bikarbonat içeren *Dulbecco's Modified Eagles Medium* (DMEM) (Katalog no: F 0445, Biochrom AG, Berlin, Almanya) (Şekil 14b) içerisine %10 fetal sığır serumu (Katalog no: 16000-036, Gibco™, Thermo Fisher Scientific, ABD), %1 penisilin/streptomisin, %1 L-glutamin ve %0.1 amfoterisin B bileşenleri ilave edilerek oluşturulan besiyeri (Şekil 14c) kullanılarak sağlandı.

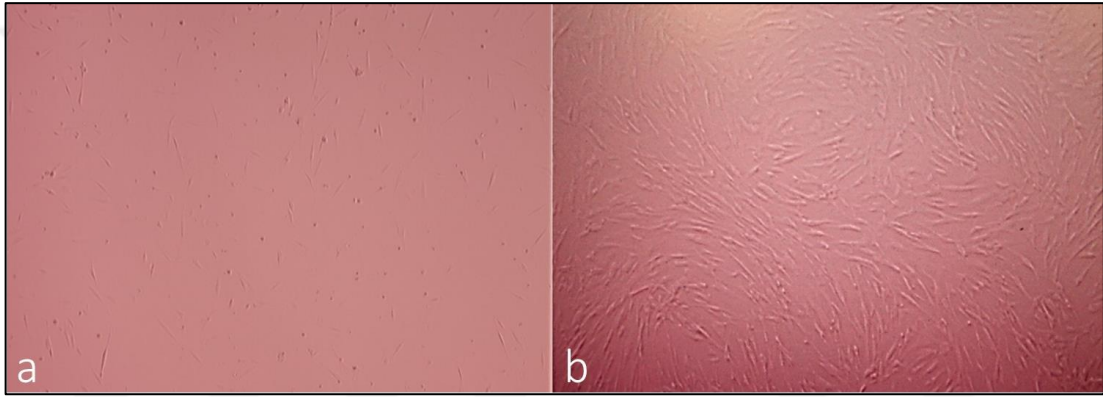


Şekil 14. a. İDF hücre dizini, b. DMEM, c. Besiyeri

Sıvı azot tankında -152°C 'de saklanan hücreler dışarı çıkarıldı ve DMSO ile oda sıcaklığında hızla çözünmesi sağlandı. Çözünen hücreler, içerisinde 10 mL besiyeri bulunan 15 mL'lik tüplere aktararak 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj (Santrifüj cihazı, Biosafe Avanti J-30I, Beckman Coulter, A.B.D) (Şekil 15a) edildi. Daha sonra süpernatant uzaklaştırıldı ve santrifüj sonrası dipte kalan hücreler (pellet) üzerine yeni besiyeri eklenerek resüspanse edildikten sonra 25 cm²'lik flasklara ekildi (Şekil 15b). Hücreler 37 °C'de %5 CO₂ içeren ortamda inkübasyona (CO₂ inkübatör, MCO 18 AIC, Sanyo, ABD) (Şekil 15c) bırakılıp, hücre çoğalması her gün takip edildi. Pasaj yapmak için hücrelerin ekildikleri flaskları %70-80 oranında doldurmaları beklendi (Şekil 16).



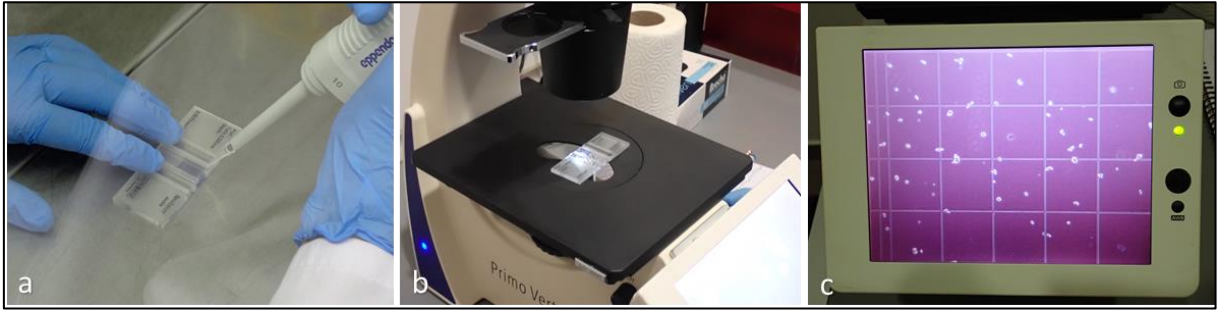
Şekil 15. a. Santrifüj cihazı, b. Hücre ekimi, c. İnkübatör



Şekil 16. İDF hücrelerinin, a. Başlangıç, b. %80 yoğunluğa ulaştıktan sonra ışık mikroskopunda görüntüsü

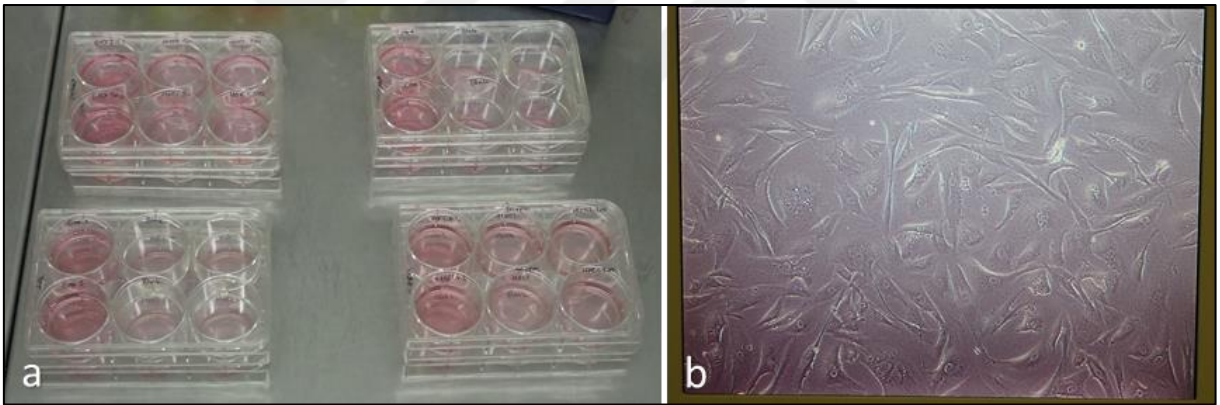
Dolan flasklardaki hücreler fosfat tamponlu salin (FTS) (Katalog no: 311-425-CL, Wisent, Kanada) ile üç kez yıkandı, tripsin-EDTA (Katalog no: P10-0235SP, Pan-Biotech, Almanya) eklenerek 37°C’de 4 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası tripsinin etkisini ortadan kaldırmak amacıyla eklenen besiyeri ile birlikte 15 mL’lik tüplere toplanan hücreler 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Üzerindeki süpernatant uzaklaştırılarak pelletin miktarına göre besiyeri ile resüspanse edildi ve tekrar flasklara ekildi. Hücrelerin sayılması amacıyla, 10 µL hücre süspansiyonu 10 µL tripan mavisini ile karıştırılarak, thoma lamı ve lamel arasına konuldu ve ışık mikroskopunda 10× büyütmede hücreler sayıldı (Şekil 17). Tripan mavisini ile boyanan hücreler ölü, boyanmayan hücreler canlı olarak değerlendirildi ve aşağıdaki formüle göre mL’deki hücre sayısı hesaplandı.

$$\text{Hücre sayısı} = \text{Ortalama sayım değeri} \times \text{Seyreltme faktörü} \times 10^4$$



Şekil 17. a. Thoma lamı üzerinde hücrelerin tripan mavisi ile boyanması, **b.** Işık mikroskobu, **c.** Hücrelerin 10× büyütmede sayılması

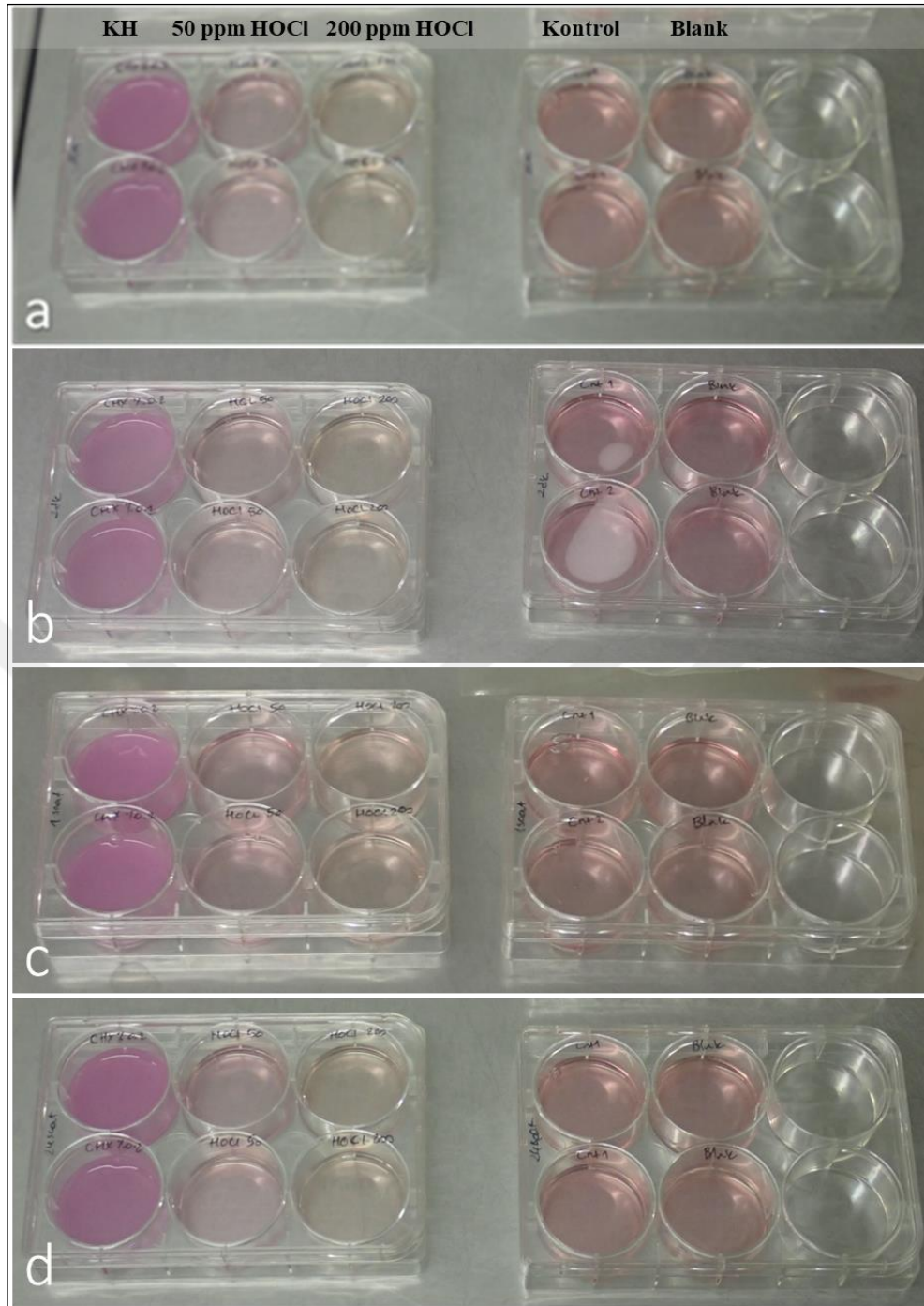
İDF hücre dizileri anlatıldığı gibi çoğaltılıp sayıldıktan sonra $1,5 \times 10^5$ hücre/kuyucuk olacak şekilde, 2 mL besiyeri/kuyucuk içeren, sekiz ayrı 6 kuyucuklu plakalara ekildi ve 24 saat boyunca 37°C 'de %5 CO_2 içeren ortamda hücrelerin kuyucuklara tutunmaları için inkübe edildi (Şekil 18).



Şekil 18. a. Flasklara ekimi yapılan İDF hücreleri, **b.** İnkübasyon sonrası 24. sa mikroskopik görüntüsü

5.2.2. 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolyum bromür testinin uygulanması

İDF hücrelerinde hücre canlılığı MTT testi kullanılarak değerlendirildi. MTT testine hazırlık olarak inkübasyonun ardından plakalardaki mevcut besiyerleri uzaklaştırıldı. İDF hücrelerinin üzerine, çalışmamızda değerlendirilen 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl, %0,2 KH solüsyonları ve kontrol grubu ile hücresiz (blank) gruba sadece besiyeri eklendi. Uygulama sonrası 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa olarak belirlenen sürelerde değerlendirme için beklendi (Şekil 19).



Şekil 19. İDF hücreleri üzerine 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl, %0,2 KH solüsyonları ve kontrol grubu olarak da sadece besiyeri eklenmesi sonrası **a.** 30 sn, **b.** 2 dk, **c.** 1 sa, **d.** 24 sa görüntüsü

İDF hücre dizileri, 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa süresince solüsyonlarda bekletilmesinin ardından solüsyonlar kuyucuklardan uzaklaştırıldı. İDF hücrelerinin canlılığının incelenmesi, hücre canlılığı ve proliferasyonun bir göstergesi olarak hücre metabolik aktiviteyi ölçmek için kullanılan MTT testi ile yapıldı. MTT solüsyonu, ana stok 5 mg/mL olacak şekilde, *thiazolyl blue tetrazolium bromide* tozunun (Katalog no: GC4568, Glentham Life Sciences, İngiltere)

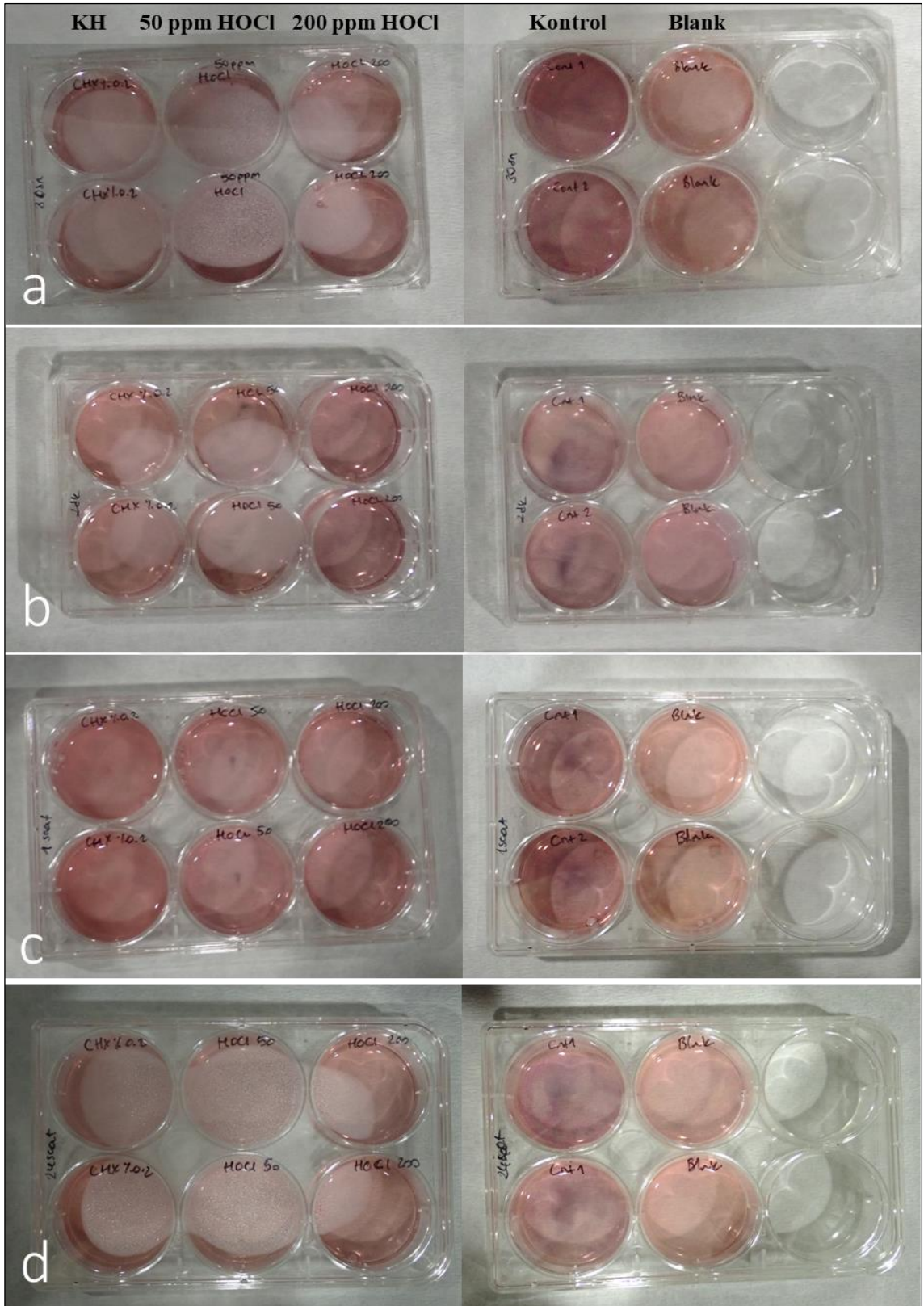
(Şekil 20) FTS içinde çözündürülmesi ile hazırlandı. İyice karıştırılarak homojen hale geldikten sonra filtreden geçirilerek kullanıma hazır hale getirildi. Daha sonrasında her kuyucukta son konsantrasyonu 0.33 mg/mL olacak şekilde kuyucuklara 132 µL MTT solüsyonu 2 mL besiyeri ile birlikte eklendi ve 37°C, %5 CO² ortamda 3 saat inkübasyona bırakıldı (Şekil 21).



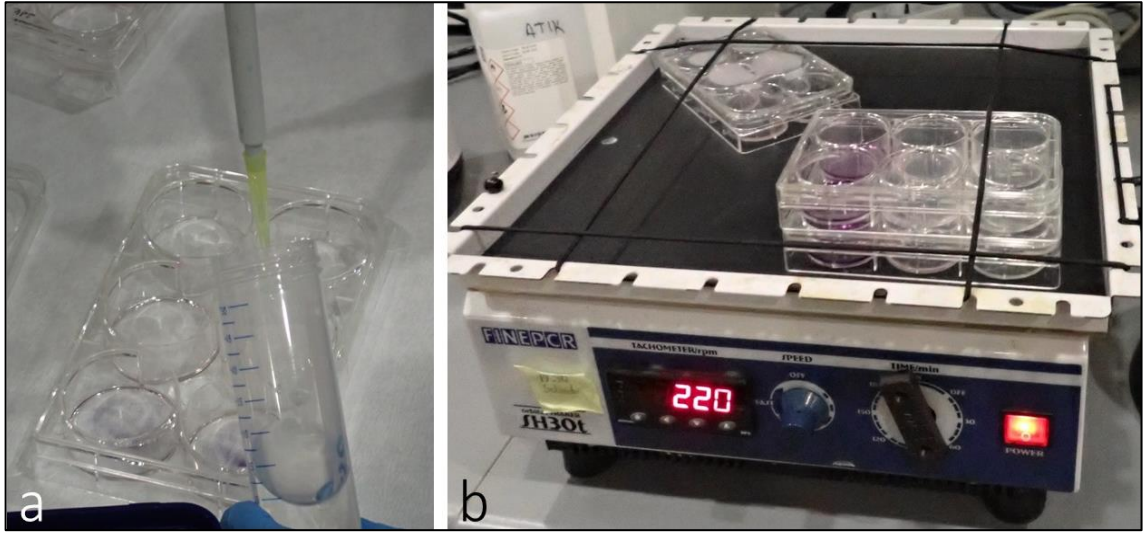
Şekil 20. *Thiazolyl blue tetrazolium bromide*

İnkübasyon periyodu ardından, 6 kuyucuklu plakalarda kalan hücre ortamı boşaltılarak MTT formazan tuzu açığa çıkarmak için 200 µL DMSO kuyucuklara eklendi ve yaklaşık 10 dk çözünmesi beklendi (Şekil 22). Çözücü tampon eklenen kuyucuklardan alınan 2×100 µL örnekler 96 kuyucuklu plakalara konularak (Şekil 23) absorbans değerleri *PerkinElmer Enspire multimode plate reader* (Perkin Elmer, Boston, ABD)'da 570 nm'de okundu (Şekil 24). Kontrol grubunun canlılığı 100 olarak kabul edilerek, elde edilen absorbans değerleri aşağıdaki formül kullanılarak canlılık (%) değerlerine çevrildi.

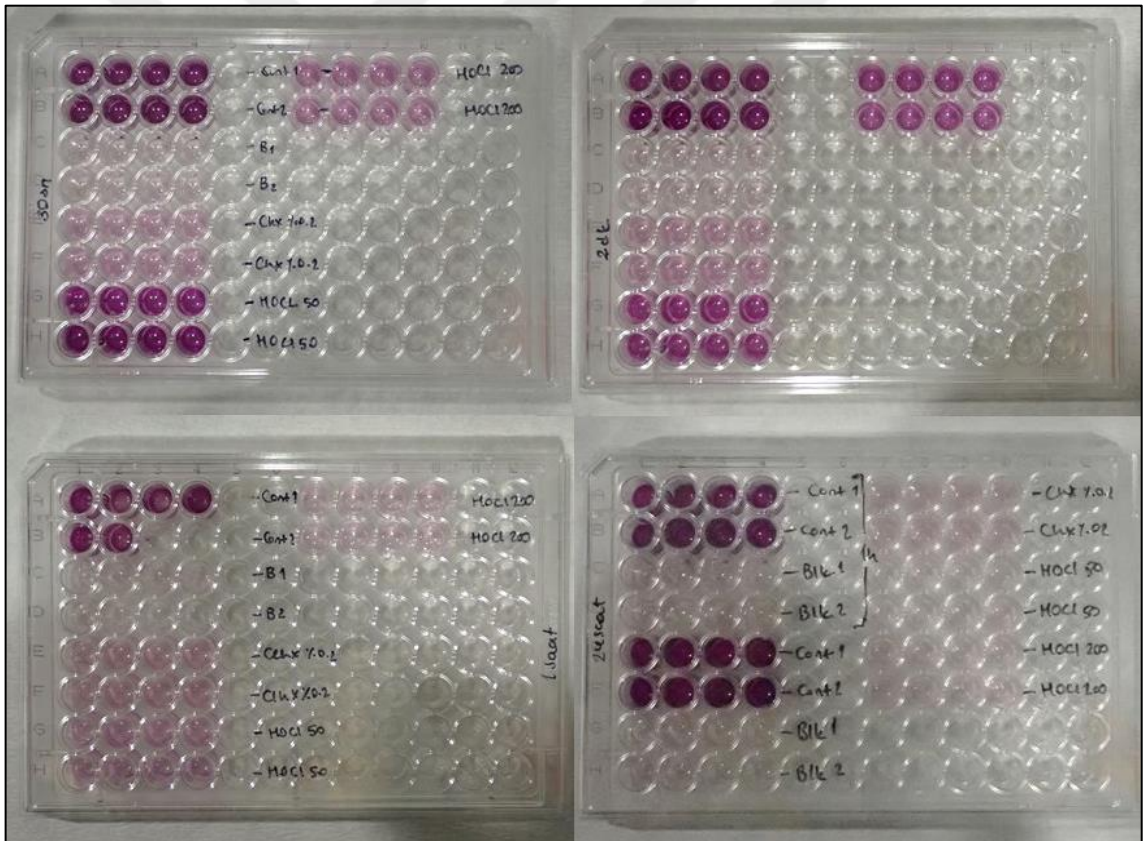
$$[(AD_{\text{örnek}} - AD_{\text{hücresiz}})/(AD_{\text{kontrol}} - AD_{\text{hücresiz}})] \times 100$$



Şekil 21. İDF hücrelerinin bulunduğu 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl, %0,2 KH, kontrol ve hüresiz (blank) kuyucukların üzerine MTT ilavesi sonrası 3 saat inkubasyonun ardından **a.** 30 sn, **b.** 2 dk, **c.** 1 sa, **d.** 24 sa gruplarının görüntüsü



Şekil 22. a. İDF hücrelerin üzerine DMSO ilave edilmesi, **b.** Karıştırıcıda 10 dk beklenmesi.



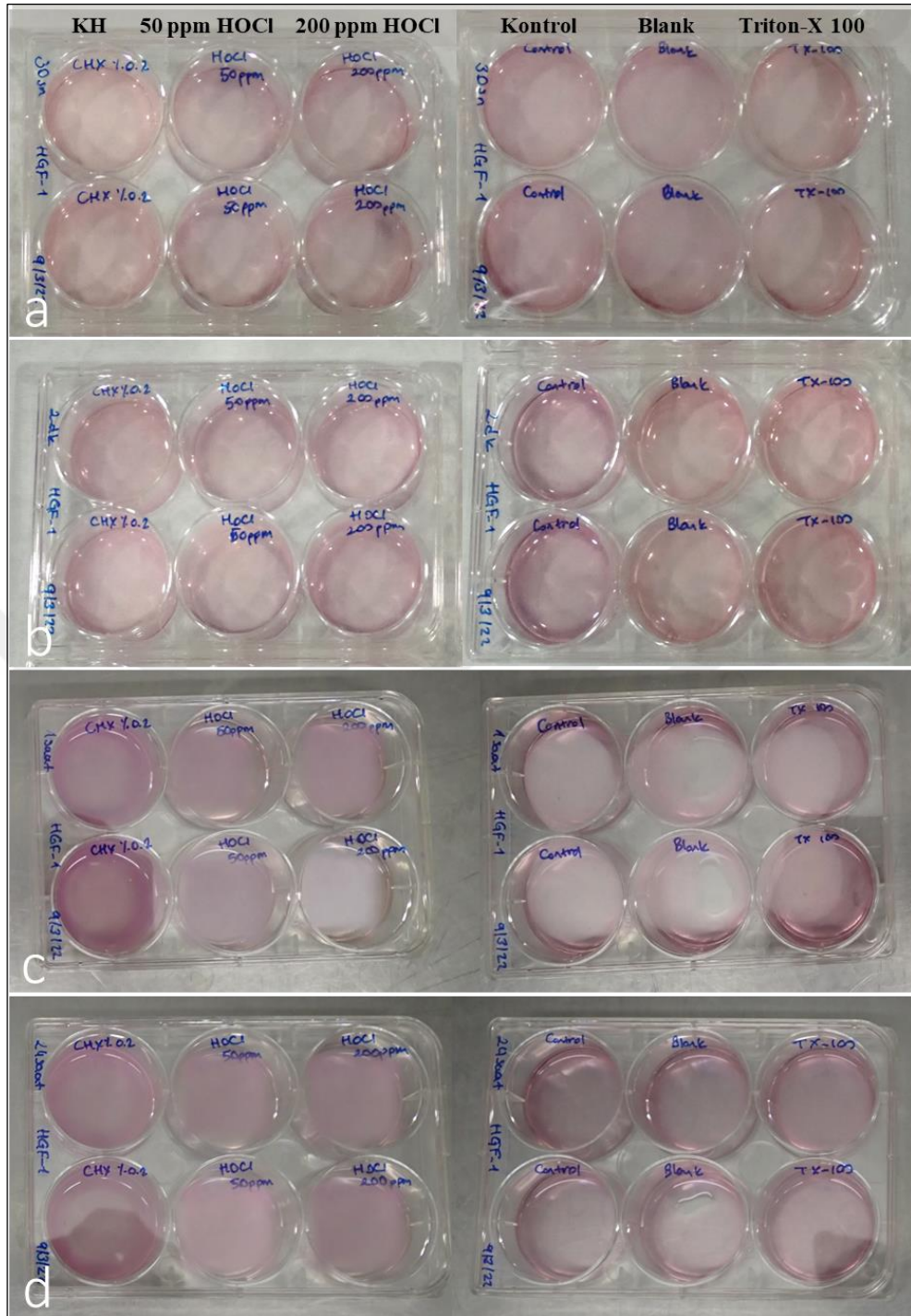
Şekil 23. 96 kuyucuklu plakalara eklenen örnekler



Şekil 24. a. *PerkinElmer Enspire multimode* plaka okuyucu, **b.** Plakaların okutulması sonucu elde edilen absorbans değerleri

5.2.3. Laktat dehidrogenaz testinin uygulanması

İDF hücreleri üzerindeki sitotoksik etkilerin saptanması, nekrozun göstergesi olan hücre dışı LDH enzimi salınımlarının incelendiği LDH testi (CytoScan™, G-Biosciences, MO, ABD) kullanılarak yapıldı. Sitotoksikite testi, kullanılan ticari kitin talimatları doğrultusunda gerçekleştirildi. Daha önce bahsedildiği gibi çoğaltılıp sayılan İDF hücreleri, her birinde $1,5 \times 10^5$ hücre olacak şekilde plakalara ekildi ve 24 saat boyunca %5 CO₂'li ortamda 37°C'de kuyucuklara tutunmaları için inkübasyona bırakıldı (Şekil 25). İnkübasyon süresi sonunda besiyerleri dökülerek 50 ppm HOCl, 200 ppm HOCl ve %0,2 KH solüsyonları eklendi. Maksimum LDH aktivitesi grubu değerleri solüsyon ile muamele edilmemiş kontrol grubu hücreleri üzerine %0,1 Triton X-100 eklenmesiyle elde edilirken, 10 µL steril, ultra-saf su içinde, işlem görmemiş hücreler spontan LDH aktivitesi kontrolü olarak kullanıldı.

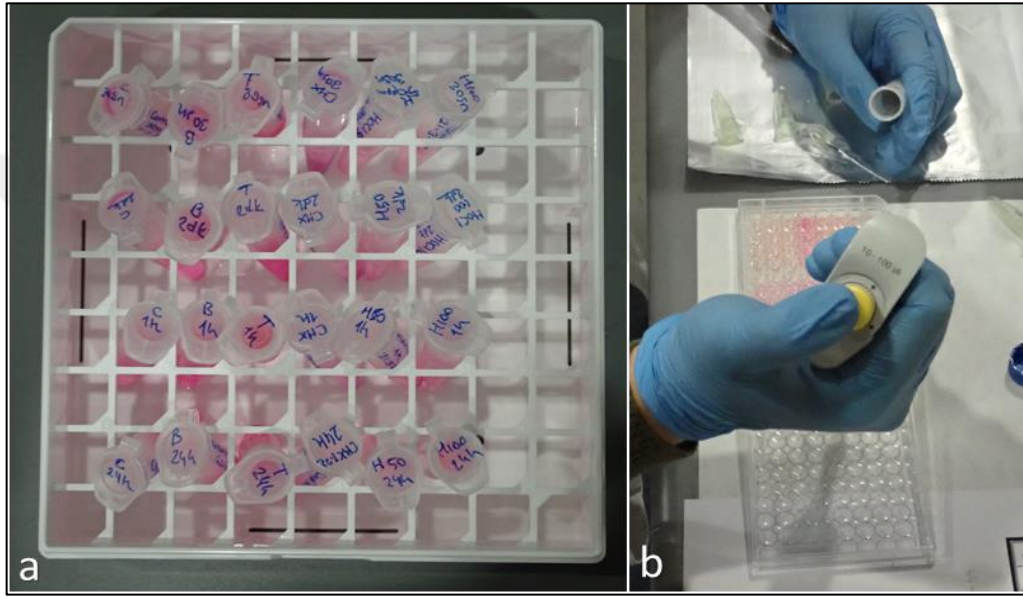


Şekil 25. Flasklara ekimi yapılan İDF hücreleri **a.** 30 sn, **b.** 2 dk, **c.** 1 sa, **d.** 24 sa grupları

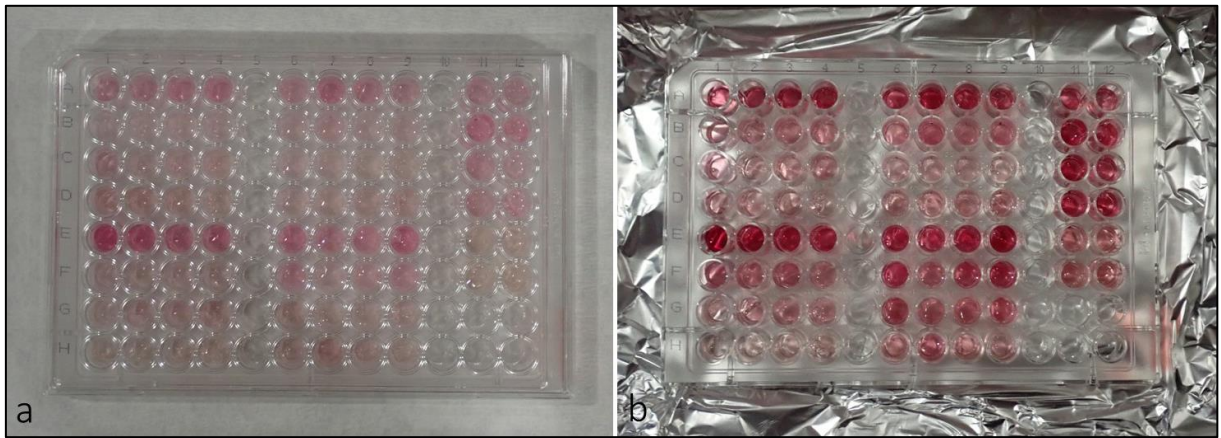
Belirlenen 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerince solüsyonların bekletilmesinin ardından plakalardan besiyerleri toplanarak 1200 rpm’de 5 dakika santrifüj edildi. Hücrelerden ortama salınan LDH’nin bulunduğu süpernatantlardan yeni mikrotüpler içerisine 10 µL aktarıldı ve kit içerisinden çıkan solüsyonlarla hazırlanan “LDH Reaksiyon Karışımı”ndan 100 µL eklenerek 96 kuyucuklu plakalara ekim yapıldı (Şekil 26 ve 27a). Işıktan korunarak 30 dakika boyunca

oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra, kit içerisinde bulunan “Durdurucu Solüsyon” eklenerek reaksiyonlar durduruldu (Şekil 27b). 96 kuyucuklu plaka içerisindeki örnekler absorbands değerleri *PerkinElmer Enspire multimode plate reader* kullanılarak 490 nm’de ölçüldü. Numune ile tedavi edilen hücrelerden LDH’nin yüzde salınımı LDH’nin maksimum salınımı ile karşılaştırılarak değerlendirildi. Sitotoksisite (%) aşağıdaki formül ile hesaplandı.

$$\frac{(\text{LDH Aktivitesi örnek} - \text{LDH Aktivitesi kontrol})}{(\text{LDH Aktivitesi maksimum} - \text{LDH Aktivitesi kontrol})} \times 100$$



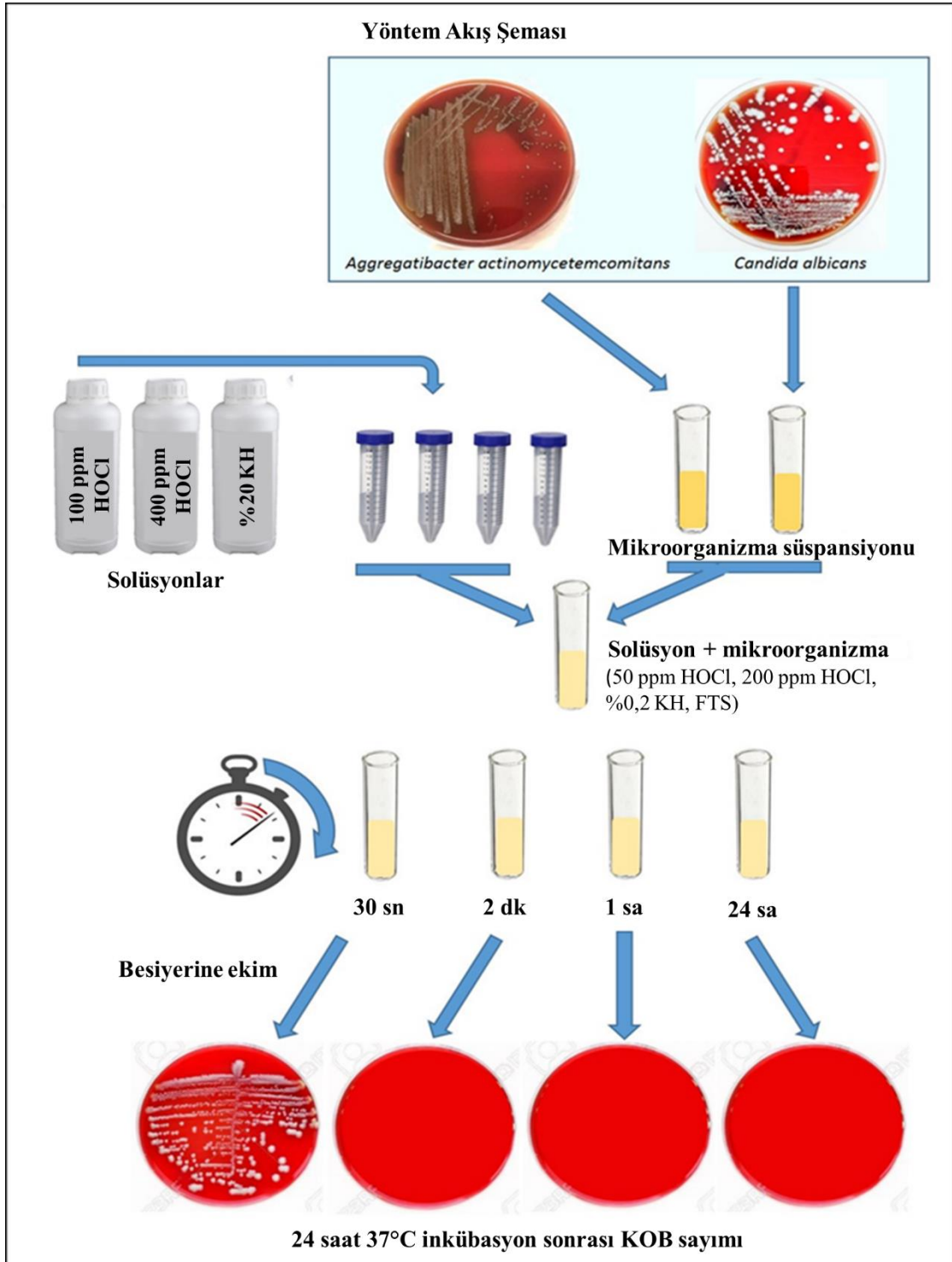
Şekil 26. a. Örneklerden toplanan süpernatantların aktarıldığı mikrotüpler, **b.** LDH Reaksiyon Karışımı eklenerek örneklerin 96 kuyucuklu plakalara aktarılması



Şekil 27. a. 96 kuyucuklu plakalara aktarılan örnekler, **b.** Karanlık ortamda 30 dk inkübasyon sonrası 96 kuyucuklu plakalar içindeki örnekler

5.3. Antimikrobiyal Aktivite Deneyleri

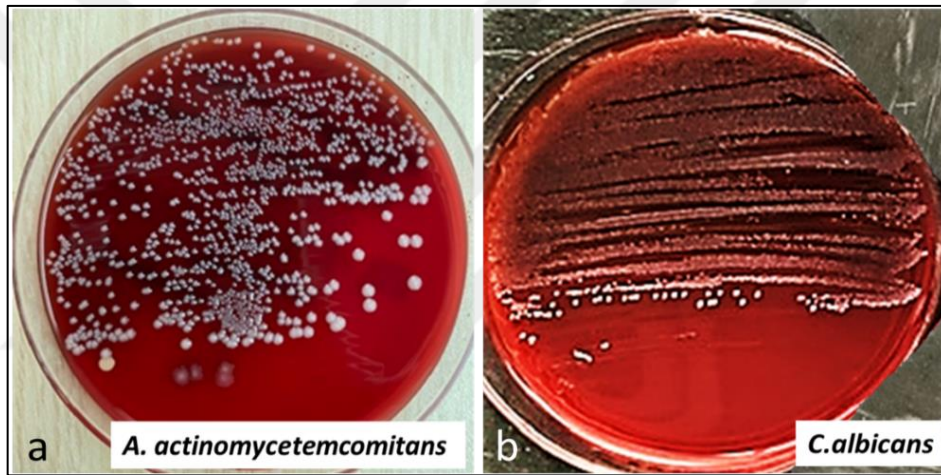
Çalışmada solüsyonların *A. actinomycetemcomitans* (Katalog no: 29522, ATCC, Manassas, VA, ABD) ve *C. albicans* (Katalog no: 10231, ATCC, Manassas, VA, ABD) mikroorganizmalarına karşı antimikrobiyal aktiviteleri değerlendirildi. Kullanılan antiseptik solüsyonların etkinliği zamana bağlı öldürme yöntemiyle test edildi. Uygulanan yöntemin basamakları akış şemasında gösterildi (Şekil 28).



Şekil 28. Yöntem akış şeması

5.3.1 Mikroorganizmaların kültürü

A. actinomycetemcomitans, 10 mL beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerine (Katalog no: TV5090E, Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, ABD) ekilerek, inkübatörde (CB-S 260 Binder GmbH, Tuttlingen, Almanya) 37°C’de %5 CO₂ içeren atmosfer koşullarında 24-36 saat inkübasyon ile üretildi (Şekil 29a). *C. albicans*, 10 mL Sabouraud dekstrozs sıvı besiyerine (Katalog no: CM0041T, Oxoid, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, ABD) ekilerek 35°C inkübatörde (UN110, Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach, Almanya) 24-36 saat boyunca inkübe edilerek üretildi (Şekil 29b). Her iki mikroorganizma 10 mL FTS (pH=7.4) içinde süspansiyon edildi ve konsantrasyon 1×10^8 KOB (koloni oluşturan birim)/mL olacak şekilde ayarlandı. Kontaminasyon kontrolü amacıyla %5 koyun kanlı agar besiyerine ekim yapıldı.



Şekil 29 a. Beyin-kalp infüzyon sıvı besiyerine ekilen *A. actinomycetemcomitans*, b. Sabouraud dekstrozs sıvı besiyerine ekilen *C. albicans* mikroorganizmaları

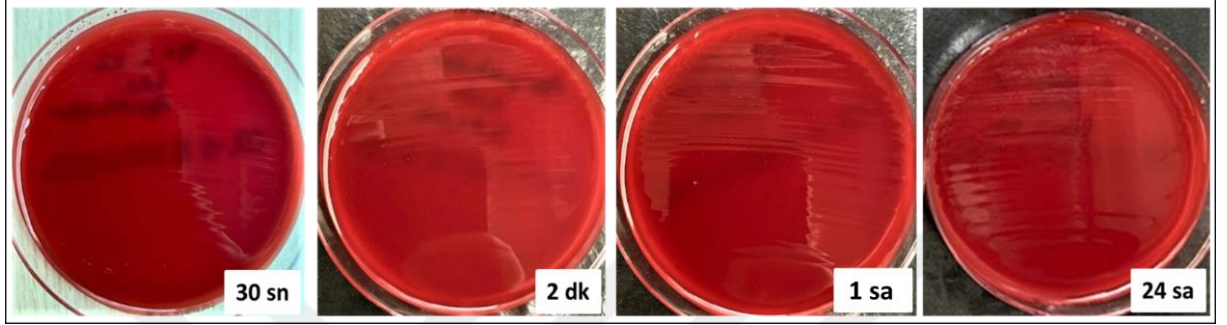
5.3.2. *A. actinomycetemcomitans*'a karşı antimikrobiyal etkinliğin saptanması

Hazırlanan *A. actinomycetemcomitans* süspansiyonu steril FTS ile 1/10 oranında sulandırıldı, böylece son konsantrasyonu 1×10^7 KOB/mL olacak şekilde ayarlandı. Dört steril tüp içerisinde her birinden 500 µL olacak şekilde, iki farklı konsantrasyonda HOCl (50 ppm ve 200 ppm), KH (%0,2) ve steril FTS hazırlandı. Hazırlanan bakteri süspansiyonundan aseptik koşullarda tüplere 500 µL aktarıldı. Kronometre ile zaman tutuldu.

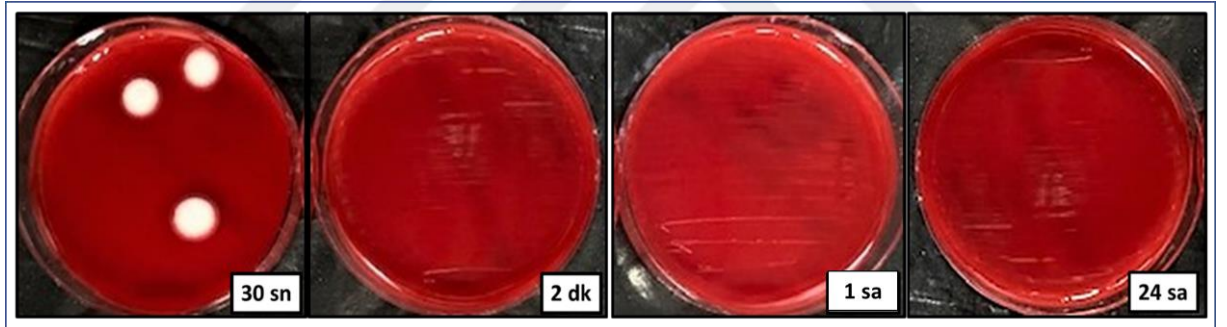
İnkübasyon boyunca 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24. saatte her bir tüpten 50 µL örnek alındı ve 450 µL steril FTS içine aktarıldı, tüp vorteks karıştırıcı ile çalkalandı. Tüp içerisinden steril pipet ile 100 µL alındı; %5 koyun kanlı agar besiyerine koloni sayım metodu kullanılarak ekim yapıldı.

Ekim yapılan besiyerleri 37°C inkübatörde %5 CO₂ içeren atmosfer koşullarında 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

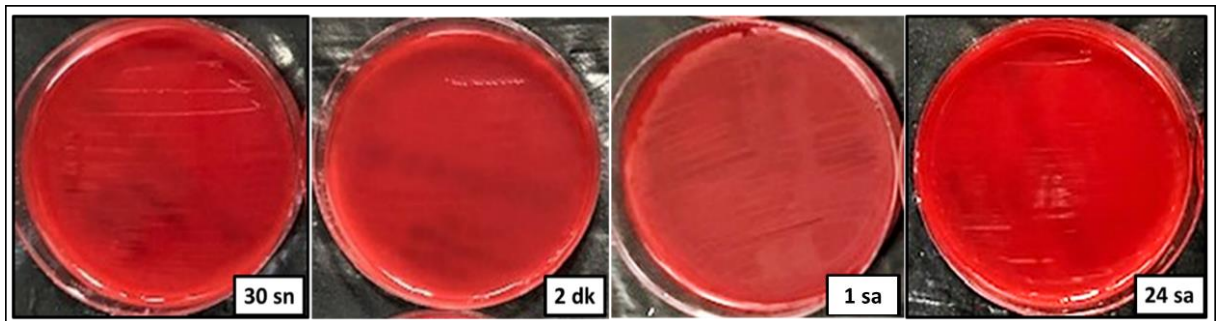
İnkübasyon sonrası besiyerlerinde üreyen *A. actinomycetemcomitans* kolonileri sayılarak (KOB/mL), her bir zaman noktası için koloni sayısındaki azalma ve antimikrobiyal etkinlik oranı (% etkinlik) hesaplandı (Şekil 30, 31 ve 32).



Şekil 30. *A.actinomycetemcomitans* için %0,2 KH antimikrobiyal aktivite testi



Şekil 31. *A.actinomycetemcomitans* için 50 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi



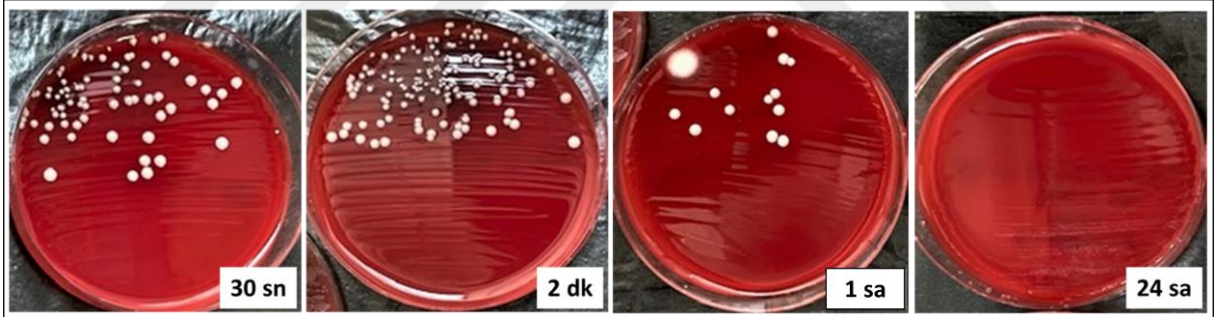
Şekil 32. *A.actinomycetemcomitans* için 200 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi

5.3.3. *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinliğin saptanması

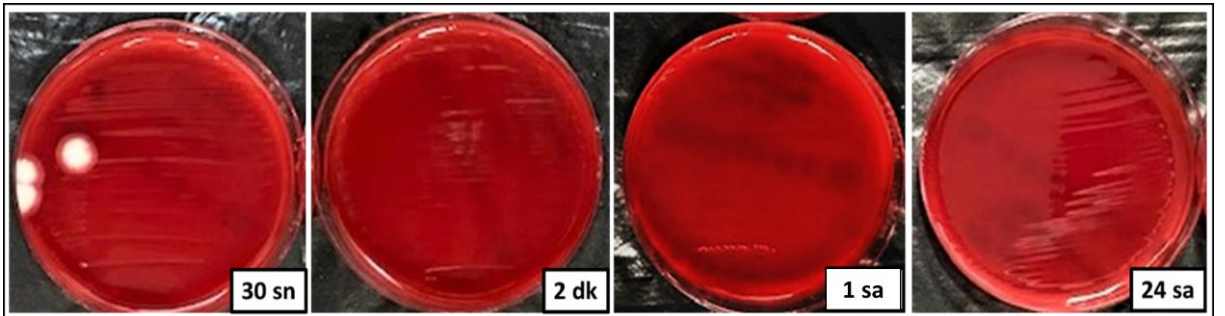
Hazırlanan *C. albicans* süspansiyonu steril FTS (pH=7.4) ile 1/10 oranında sulandırılarak, son konsantrasyonu 1×10^7 KOB/mL olacak şekilde ayarlandı. Dört steril tüp içerisinde her birinden 500 µL olacak şekilde, iki farklı konsantrasyonda HOCl (50 ppm ve 200 ppm), KH (%0,2) ve steril FTS hazırlandı. Hazırlanan maya süspansiyonundan aseptik koşullarda tüplere 500 µL aktarıldı. Kronometre ile zaman tutuldu.

İnkübasyon boyunca 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24. saatte her bir tüpten 50 µL örnek alındı ve 450 µL steril FTS içine aktarıldı, tüp vorteks karıştırıcı ile çalkalandı. Tüp içerisinde steril pipet ile 100 µL alındı; %5 koyun kanlı agar besiyerine koloni sayım metoduna uygun şekilde ekim yapıldı. Besiyerleri 35°C inkübatörde normal atmosfer koşullarında 24 saat boyunca inkübasyona bırakıldı.

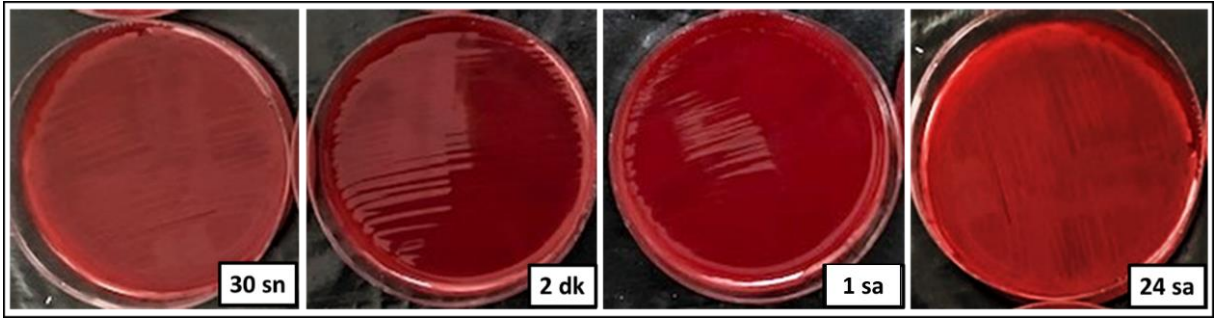
İnkübasyon sonrası besiyerlerinde üreyen *C. albicans* kolonileri sayılarak (KOB/mL), her bir zaman noktası için koloni sayısındaki azalma ve antimikrobiyal etkinlik oranı (% etkinlik) hesaplandı (Şekil 33, 34 ve 35).



Şekil 33. *C. albicans* için %0,2 KH antimikrobiyal aktivite testi



Şekil 34. *C. albicans* için 50 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi



Şekil 35. *C. albicans* için 200 ppm HOCl antimikrobiyal aktivite testi

5.4. Verilerin Değerlendirilmesi ve İstatiksel Analiz

Veriler GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, ABD) programı kullanılarak analiz edildi. Sonuçlar, ortalama $\pm$ standart sapma, minimum ve maksimum değerler olarak ifade edildi. Grup içi karşılaştırmalar *two-way ANOVA*, ikili karşılaştırmaları (*post-hoc*) ise *Tukey* testi ile, gruplar arası karşılaştırmalar *one-way ANOVA* ve *post-hoc Tukey* testi ile değerlendirildi. $p < 0,05$ seviyesindeki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

6. BULGULAR

6.1. Sitotoksik Aktivitenin Değerlendirilmesi

6.1.1. Solüsyonların insan diş eti fibroblast hücrelerinin canlılığı üzerine etkileri

MTT testi sonuçlarına göre tespit edilen yüzde canlılık değerleri Tablo 4’de gösterildi.

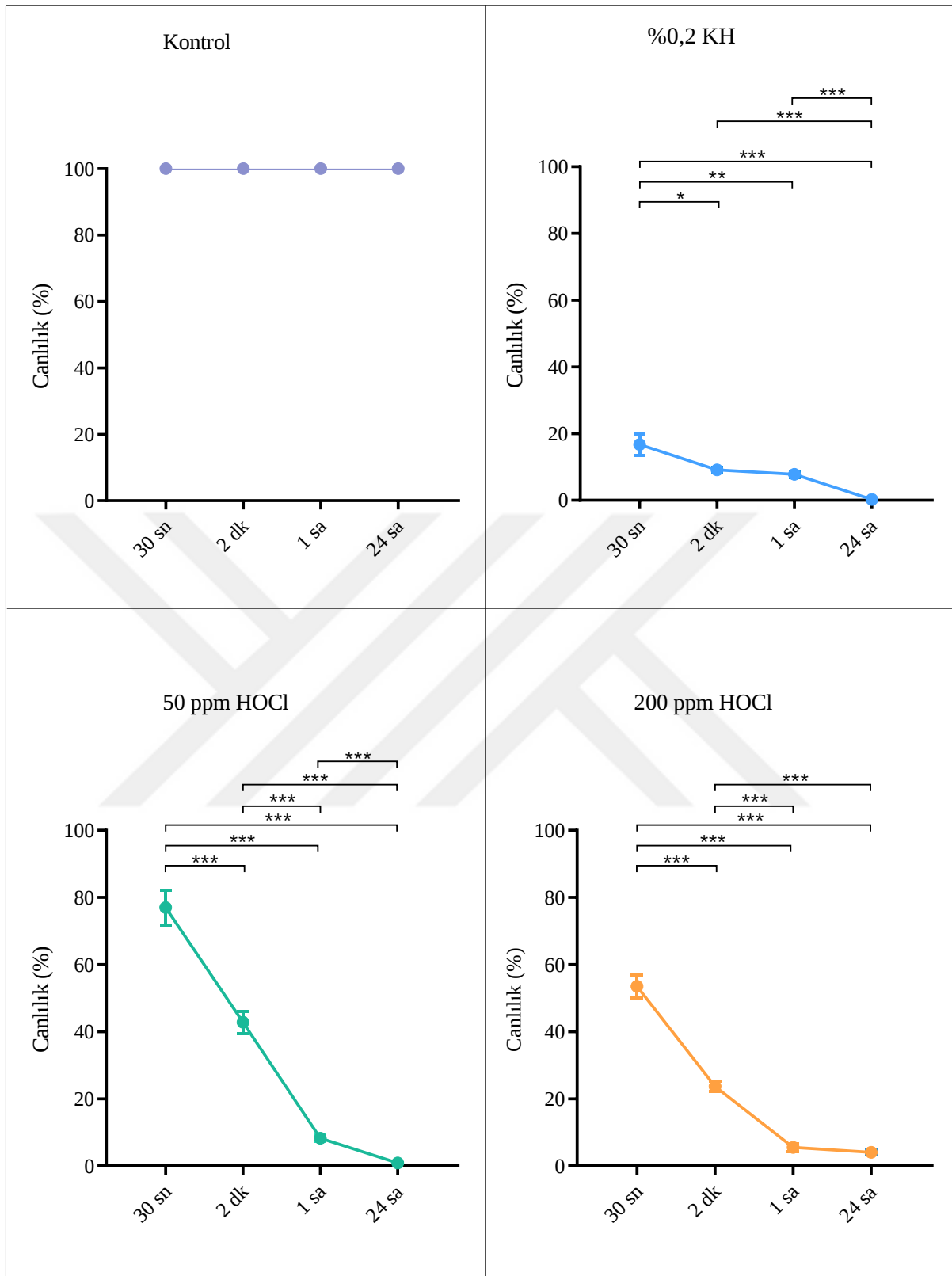
Grup içi karşılaştırmalarda %0,2 KH uygulanan hücrelerin canlılığının zamanla azaldığı ($p<0,01$), ancak 2 dk ve 1 saatte benzer olduğu görüldü ($p>0,05$) (Şekil 36). 50 ppm HOCl uygulanan hücrelerin yüzde canlılık değerleri zamanla istatistiksel olarak azalma gösterdi ($p<0,0001$) (Şekil 36). 200 ppm HOCl uygulanan hücrelerdeki canlılık değerlerinin de zaman içinde azaldığı ($p<0,0001$), ancak 1sa ile 24 sa arasında anlamlı fark göstermediği görüldü ($p>0,05$) (Şekil 36).

Gruplar arası karşılaştırmalarda yüzde canlılık değerlerinde tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 4). Tüm test solüsyonlarının, kontrol grubuna kıyasla tüm zaman noktalarında hücre canlılığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edildi ($p<0,0001$) (Tablo 4). İDF hücrelerinin yüzde canlılık değerleri 30 sn, 2 dk ve 24 saatlik uygulama sonrasında KH grubunda 50 ppm ve 200 ppm HOCl gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük gözlenirken ($p<0,01$), 1. saatte en düşük hücre canlılığı 200 ppm HOCl uygulanan grupta görüldü ($p<0,001$) (Tablo 4, Şekil 37). 30 sn, 2 dk ve 1 sa süresince 50 ppm HOCl uygulanan İDF hücrelerinde canlılık değerlerinin 200 ppm HOCl grubundaki hücrelere kıyasla anlamlı derecede yüksek olduğu tespit edilirken ($p<0,0001$), 24. saatte 200 ppm HOCl hücre canlılığının 50 ppm HOCl grubundan istatistiksel olarak daha yüksek olduğu kaydedildi ($p<0,0001$) (Tablo 4, Şekil 37).

Tablo 4. Solüsyon gruplarının İDF hücreleri üzerine MTT testi ile ölçülen canlılık değerlerinin (%) çoklu ve ikili karşılaştırmaları

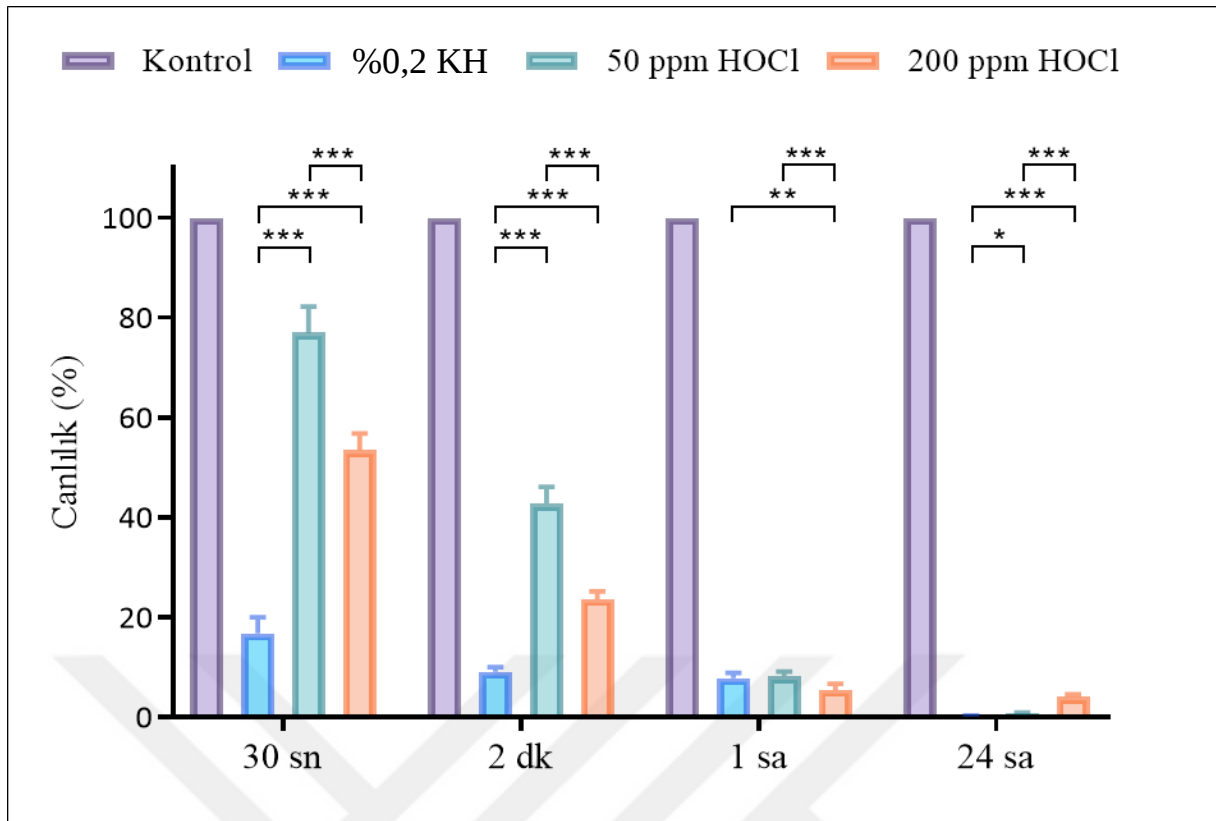
Zaman	<u>Gruplar</u>										
	Kontrol ^a Ort ± SS (Min – Max)	%0,2 KH ^b Ort ± SS (Min – Max)	50 ppm HOCl ^c Ort ± SS (Min – Max)	200 ppm HOCl ^d Ort ± SS (Min – Max)	<i>p</i>	<i>p</i> ^(a-b)	<i>p</i> ^(a-c)	<i>p</i> ^(a-d)	<i>p</i> ^(b-c)	<i>p</i> ^(b-d)	<i>p</i> ^(c-d)
30 sn	100 ± 0,00 (100 – 100)	16,72 ± 3,26 (13,10 – 21,09)	77,02 ± 5,24 (68,91 – 84,06)	53,47 ± 3,35 (48,12 – 57,51)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
2 dk	100 ± 0,00 (100 – 100)	9,14 ± 0,85 (8,17 – 10,85)	42,82 ± 3,30 (36,89 – 47,11)	23,66 ± 1,56 (21,67 – 26,39)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
1 sa	100 ± 0,00 (100 – 100)	7,80 ± 1,06 (6,29 – 9,17)	8,25 ± 0,90 (6,75 – 9,39)	5,50 ± 1,20 (4,02 – 7,47)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,7598	0,0002	<0,0001
24 sa	100 ± 0,00 (100 – 100)	0,25 ± 0,15 (0,11 – 0,56)	0,82 ± 0,10 (0,63 – 0,92)	4,06 ± 0,55 (3,26 – 4,56)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0028	<0,0001	<0,0001

One-way ANOVA ve *post-hoc* Tukey testi, $p < 0,05$, KH: Klorheksidin, HOCl: Hipokloröz asit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma



Şekil 36. Kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen canlılık değerlerinin zaman içindeki değişimi.

Two-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$



Şekil 37. Kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerindeki canlılık değerlerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması. One-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,01$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$

6.1.2. Solüsyonların insan diş eti fibroblast hücreleri üzerine sitotoksik etkileri

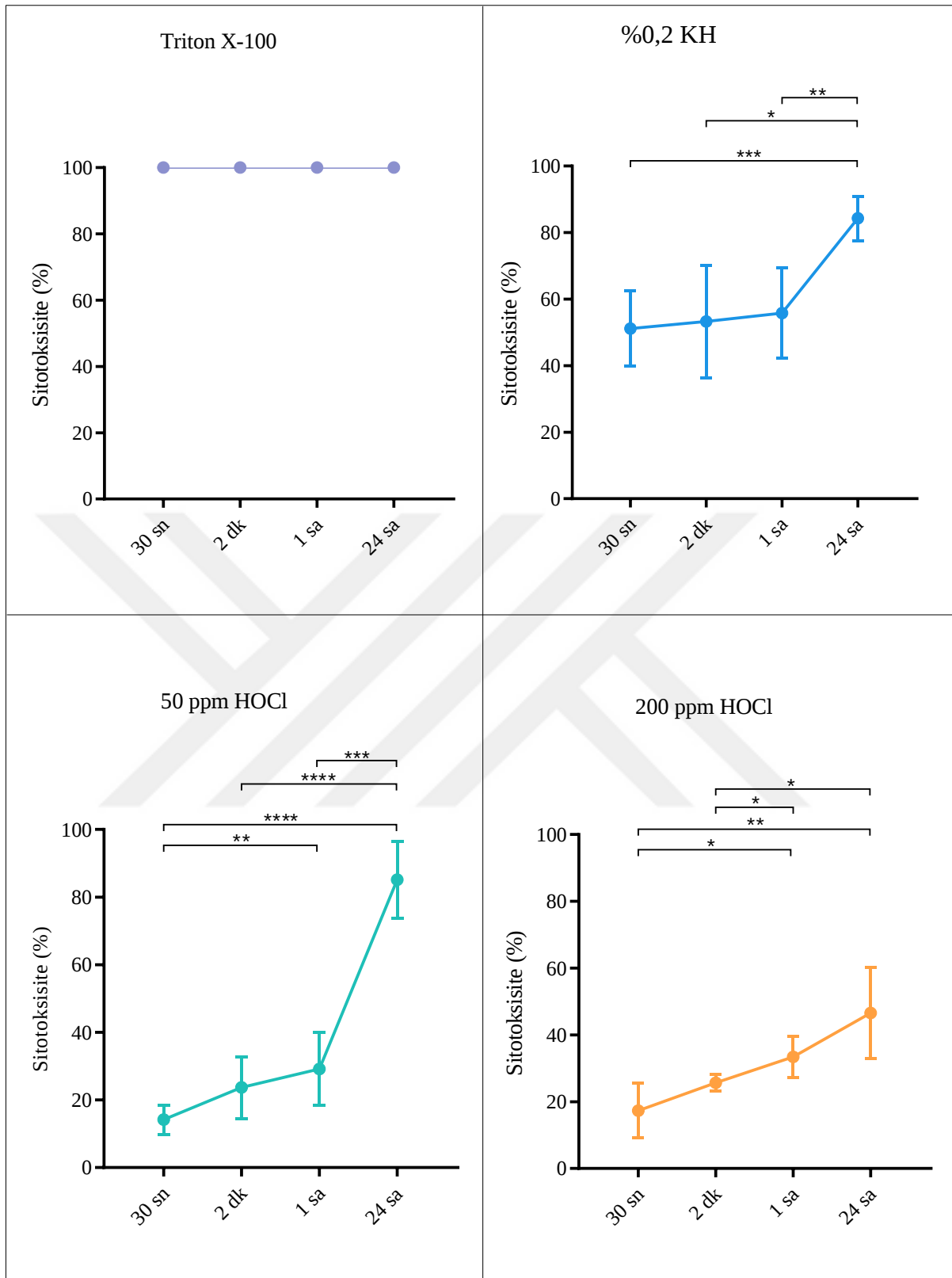
LDH testi sonuçlarına göre tespit edilen yüzde sitotoksosite değerleri Tablo 5’de gösterildi.

Grup içi değerlendirmelerde %0,2 KH uygulanan hücrelerin yüzde sitotoksosite değerlerinde 30 sn, 2 dk ve 1 sa süresince anlamlı bir fark gözlenmezken ($p > 0,05$) 24 sa sonunda istatistiksel olarak artış görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 38). 50 ppm HOCl uygulanan hücrelerin yüzde sitotoksosite değerlerinin 30 sn, 2 dk ve 1 sa uygulama süresince artma eğiliminde olduğu ($p > 0,05$) ancak 1 sa ($p < 0,01$) ve 24 sa ($p < 0,001$) sonunda istatistiksel olarak anlamlı derecede arttığı gözlemlendi (Şekil 38). 200 ppm HOCl uygulanan hücrelerdeki sitotoksosite değerlerinin 30 sn ve 2 dk sürelerinde benzerlik gösterdiği ($p > 0,05$), 1 sa sonunda anlamlı derecede arttığı saptandı. 24 sa uygulama süresinde artan yüzde sitotoksosite değerlerinin ($p < 0,05$) 1 sa ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bir fark göstermediği görüldü ($p > 0,05$) (Şekil 38).

Tablo 5. Solüsyon gruplarının İDF hücreleri üzerindeki LDH testi ile ölçülen sitotoksisite değerlerinin (%) çoklu ve ikili karşılaştırmaları

Zaman	<u>Gruplar</u>										
	Triton X-100 ^a Ort ± SS (Min – Max)	%0,2 KH ^b Ort ± SS (Min – Max)	50 ppm HOCl ^c Ort ± SS (Min – Max)	200 ppm HOCl ^d Ort ± SS (Min – Max)	<i>p</i>	<i>p</i> ^(a-b)	<i>p</i> ^(a-c)	<i>p</i> ^(a-d)	<i>p</i> ^(b-c)	<i>p</i> ^(b-d)	<i>p</i> ^(c-d)
30 sn	100 ± 0,00 (100 – 100)	51,17 ± 11,3 (37,03 – 67,38)	14,16 ± 4,39 (10,92 – 24,04)	17,35 ± 8,18 (7,38 – 32,13)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8187
2 dk	100 ± 0,00 (100 – 100)	53,30 ± 16,9 (29,38 – 81,85)	23,69 ± 9,12 (10,47 – 38,66)	25,69 ± 2,51 (22,87 – 28,99)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,9759
1 sa	100 ± 0,00 (100 – 100)	55,77 ± 13,6 (38,40 – 72,70)	29,19 ± 10,9 (16,93 – 48,75)	33,42 ± 6,12 (24,57 – 42,58)	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,0002	0,7955
24 sa	100 ± 0,00 (100 – 100)	84,30 ± 6,69 (74,51 – 92,70)	85,14 ± 11,4 (67,97 – 96,32)	46,55 ± 13,6 (28,83 – 64,94)	<0,0001	0,0129	0,0198	<0,0001	0,9979	<0,0001	<0,0001

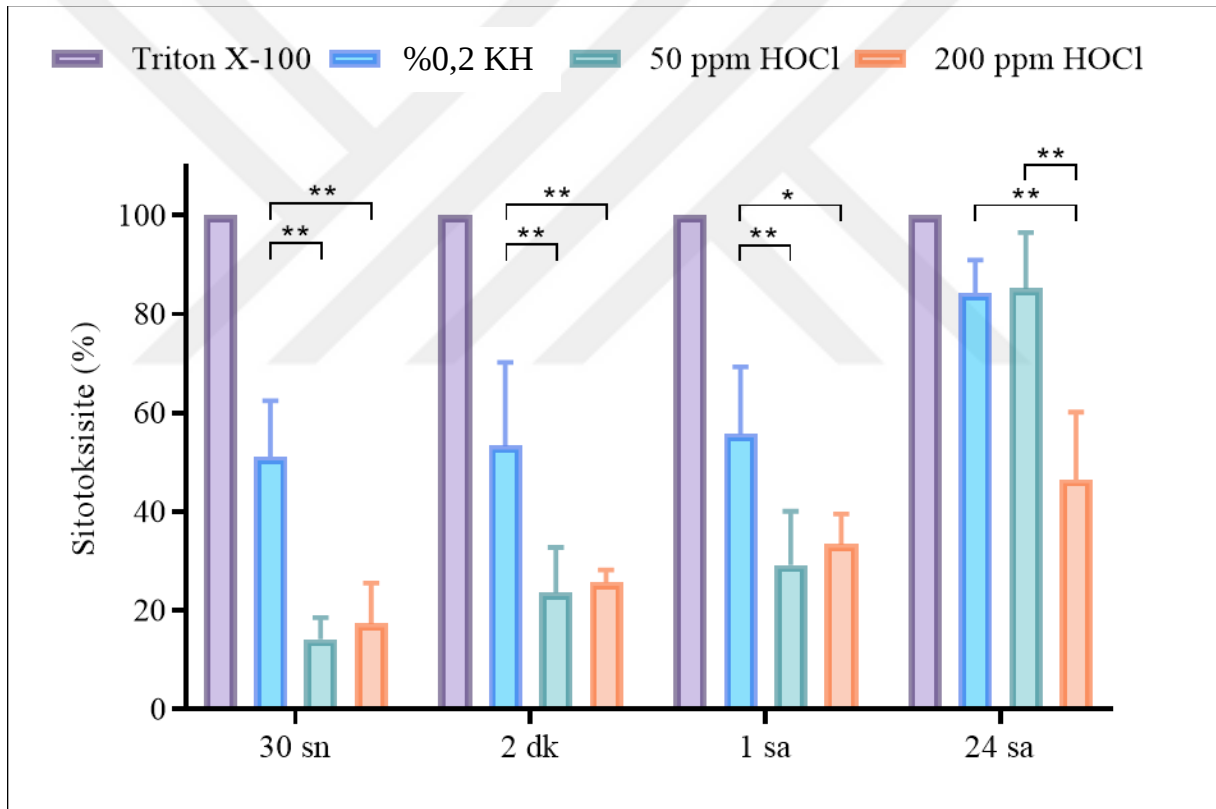
One-way ANOVA ve *post-hoc* Tukey testi, $p < 0,05$, KH: Klorheksidin, HOCl: Hipokloröz asit, Ort: Aritmetik ortalama, SS: Standart sapma



Şekil 38. Triton X-100 (Kontrol), %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen sitotoksosite değerlerinin zaman içindeki değişimi.

Two-way ANOVA ve *post-hoc* Tukey testi, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Gruplar arası karşılaştırmalarda yüzde sitotoksosite değerlerinde tüm zaman dilimlerinde istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0,0001$) (Tablo 5). Tüm solüsyonların, Triton X-100 (Kontrol) grubuna kıyasla tüm zaman noktalarında sitotoksosite değerleri anlamlı derecede daha düşük bulundu ($p<0,05$) (Tablo 5). İDF hücrelerinin yüzde sitotoksosite değerleri 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonu uygulanan gruplarda KH grubuna kıyasla anlamlı derecede daha az görüldü ($p<0,001$), sadece 24 sa uygulama süresinde 50 ppm HOCl grubu ile KH grubu arasında anlamlı bir fark kaydedilmedi ($p>0,05$) (Tablo 5, Şekil 39). 50 ppm HOCl uygulanan İDF hücrelerindeki yüzde sitotoksosite değerlerinin 24. saatte daha yüksek ($p<0,0001$) bulunması dışında HOCl grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Tablo 5, Şekil 39).



Şekil 39. Triton X-100 (Kontrol), %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının İDF hücreleri üzerindeki sitotoksosite değerlerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması.

One-way ANOVA ve *post-hoc* Tukey testi, * $p<0,001$, ** $p<0,0001$

6.2. Antimikrobiyal Aktivitenin Değerlendirilmesi

6.2.1. *A. actinomycetemcomitans*'a karşı antimikrobiyal etkinlik

Zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçlarına göre tespit edilen *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı Tablo 6'da gösterildi.

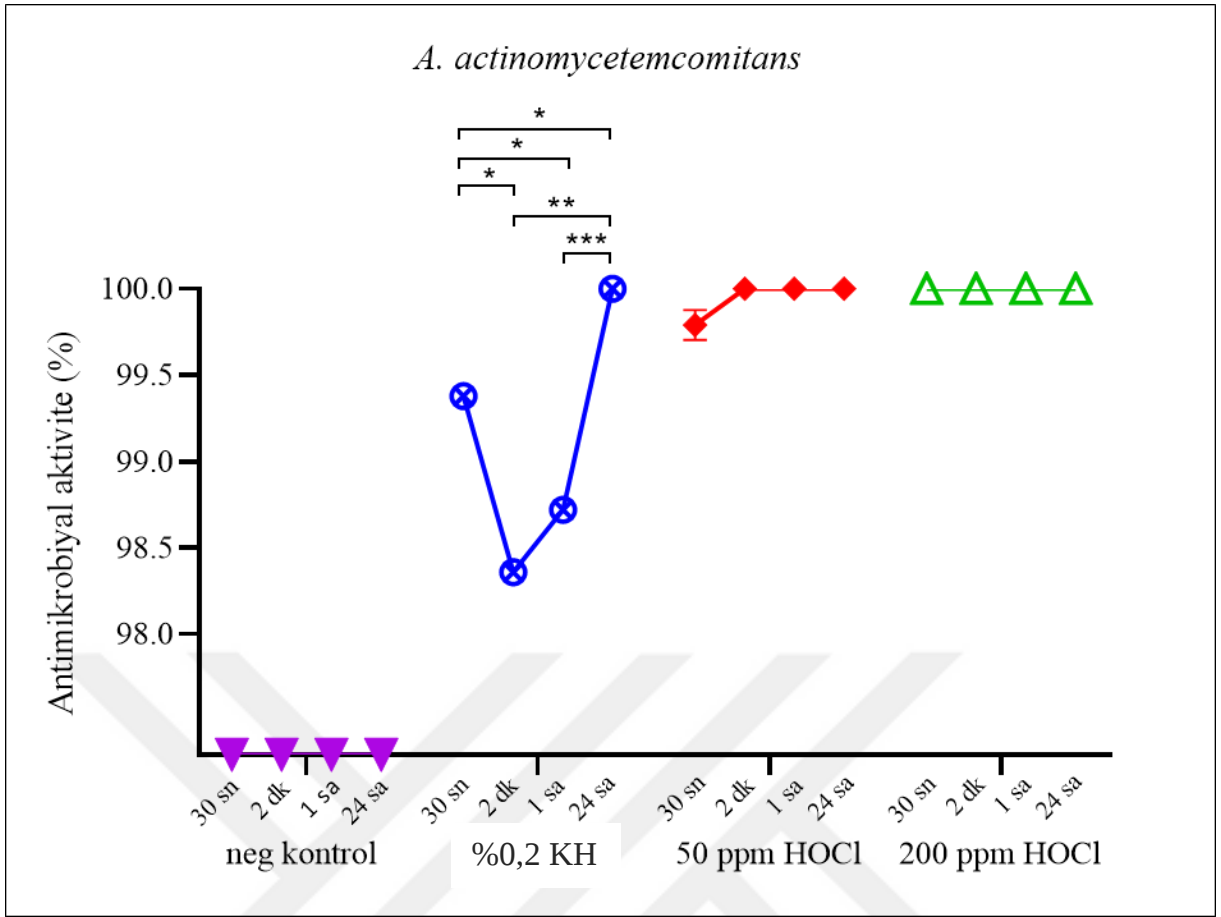
Tablo 6. Solüsyonların uygulanması sonrası, gruplardaki *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı

Mikroorganizma	Zaman	Hayatta kalan bakteri sayısı (KOB/mL)		
		%0,2 KH	50 ppm HOCl	200 ppm HOCl
<i>A. actinomycetemcomitans</i>	Başlangıç	10^7	10^7	10^7
	30 sn	$620 \pm 140,0$	$210 \pm 87,2$	-
	2 dk	$1640 \pm 101,5$	-	-
	1 sa	$1280 \pm 62,4$	-	-
	24 sa	-	-	-

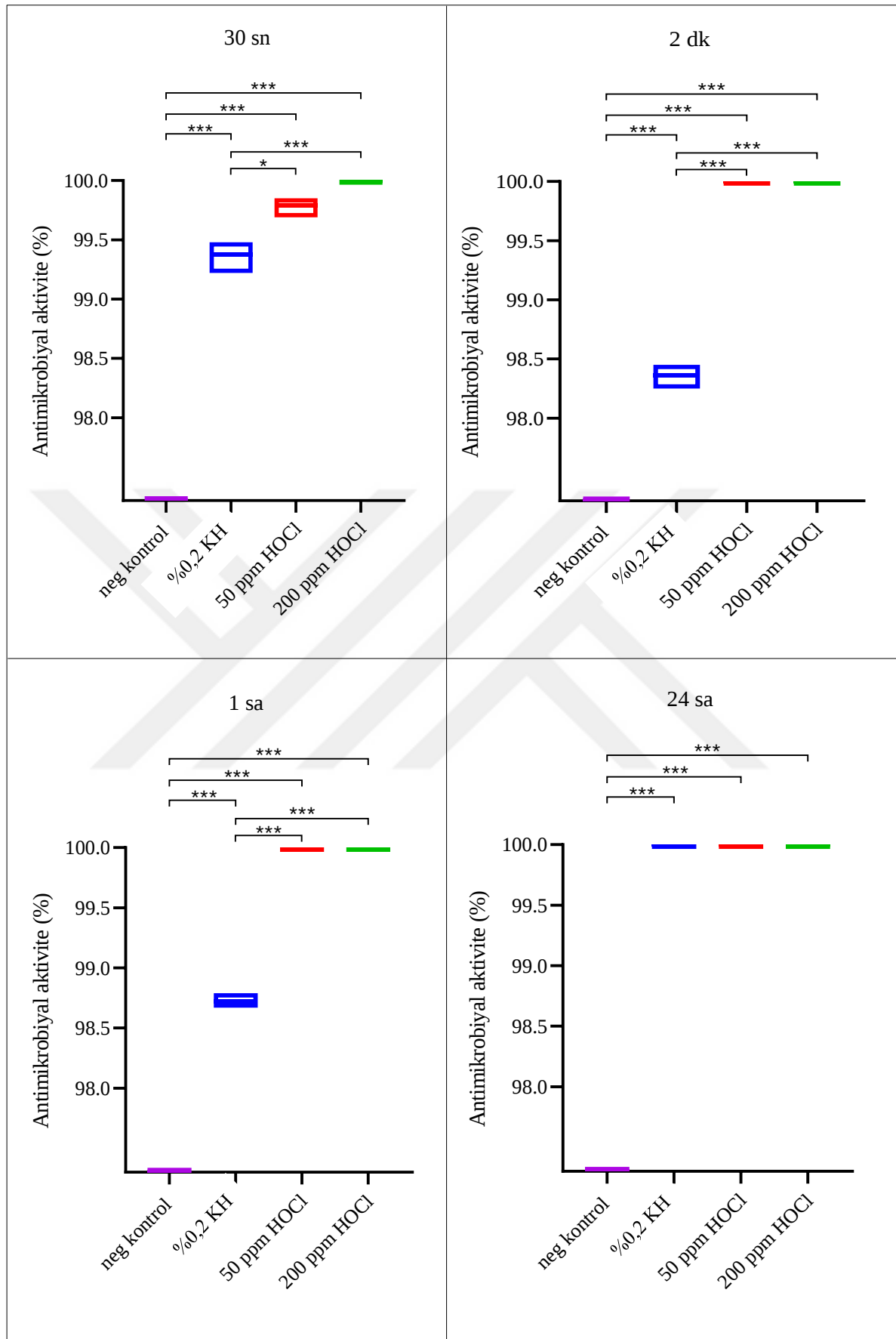
KH: Klorheksidin, HOCl: Hipokloröz asit, KOB: Koloni oluşturan birim

Grup içi değerlendirmelere bakıldığında, %0,2 KH uygulanan *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmaları için antimikrobiyal aktivite yüzdelерinin 30 sn ve 2 dk sonrası %99,38±0,1'den %98,36±0,1'e düştüğü görüldü ($p<0,05$) (Şekil 40). Daha sonra antimikrobiyal aktivite değerlerinin 1 sa sonunda %98,72±0,1'e ($p<0,05$) ve 24 sa sonunda %100'e yükseldiği ($p<0,05$) ancak 2 dk ve 1 sa süreleri sonunda saptanan değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmediği tespit edildi ($p>0,05$) (Şekil 40). 50 ppm HOCl uygulanan mikroorganizmalar için antimikrobiyal aktivite yüzdeleri 30 sn sonrası %99,79±0,09 ve 2 dk, 1 sa ve 24 sa sonrası %100 olarak kaydedildi, değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmediği tespit edildi ($p>0,05$) (Şekil 40). 200 ppm HOCl grubunda saptanan antimikrobiyal aktivite yüzdeleri tüm zaman noktalarında %100 olarak kaydedildi ($p>0,05$) (Şekil 40).

Gruplar arası ikili karşılaştırmalarda tüm solüsyonların, negatif kontrol (steril FTS) grubuna kıyasla tüm zaman noktalarında, mikrobiyal canlılığı azalttığı (Tablo 6) ve tespit edilen antimikrobiyal aktivite değerlerinin negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak yüksek olduğu görüldü ($p<0,0001$) (Şekil 41). 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarında, *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmalarına karşı 30 sn, 2 dk ve 1 sa uygulama sürelerinde KH grubundan daha yüksek antimikrobiyal aktivite değerleri tespit edildi ($p<0,01$) (Şekil 41). HOCl grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p>0,05$) (Şekil 41).



Şekil 40. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmaları üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin zaman içindeki değişimi. Two-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$



Şekil 41. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının *A. actinomycetemcomitans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite yüzdelерinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması. One-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$

6.2.2. *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinlik

Zamana bağlı öldürme yöntemi sonuçlarına göre tespit edilen *C. albicans* mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı Tablo 7'de gösterildi.

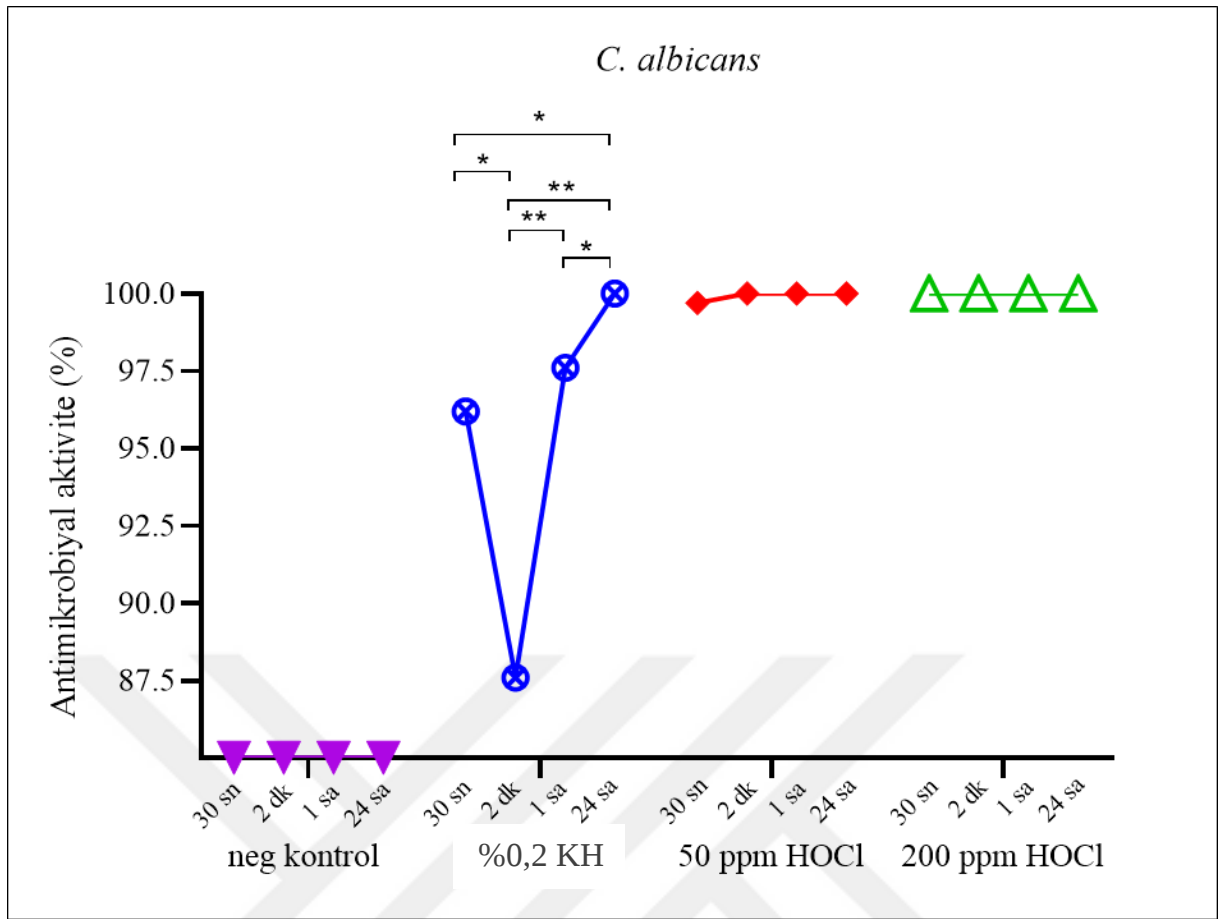
Tablo 7. Solüsyonların uygulanması sonrası, gruplardaki *C. albicans* mikroorganizmalarının her bir zaman noktası için koloni sayısı

Mikroorganizma	Zaman	Hayatta kalan bakteri sayısı (KOB/mL)		
		%0,2 KH	50 ppm HOCl	200 ppm HOCl
<i>C. albicans</i>	Başlangıç	10^7	10^7	10^7
	30 sn	$3800 \pm 916,5$	$300 \pm 45,8$	-
	2 dk	$12400 \pm 655,7$	-	-
	1 sa	$2400 \pm 360,6$	-	-
	24 sa	-	-	-

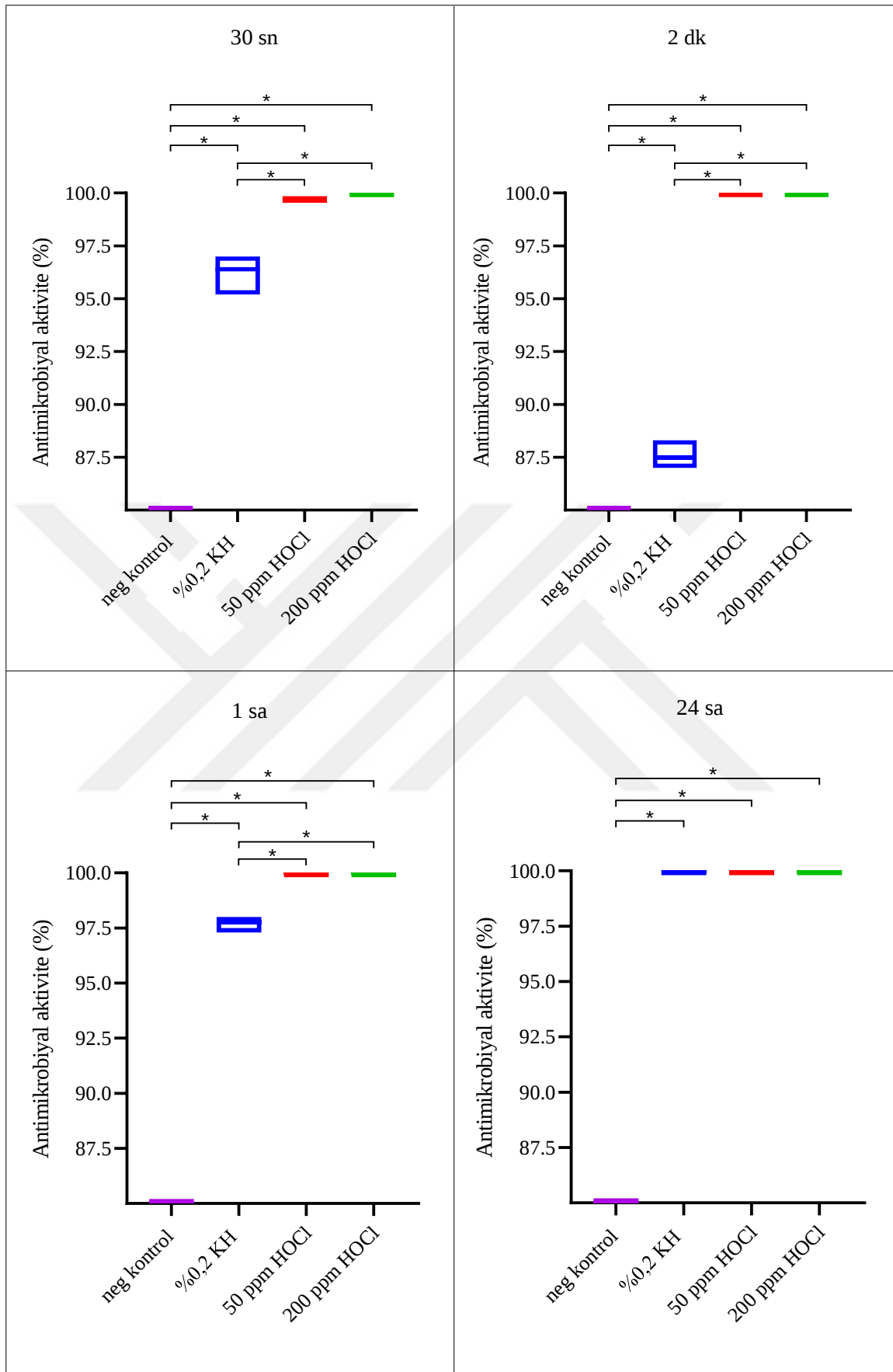
KH: Klorheksidin, HOCl: Hipokloröz asit, KOB: Koloni oluşturan birim

Grup içi değerlendirmelere bakıldığında, %0,2 KH uygulanan *C. albicans* mikroorganizmaları için antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin 30 sn ve 2 dk sonrası $\%96,20 \pm 0,9$ 'dan $\%87,60 \pm 0,7$ 'ye düştüğü görüldü ($p < 0,05$) (Şekil 42). Daha sonra antimikrobiyal aktivite değerlerinin 1 sa sonunda $\%97,60 \pm 0,4$ 'e ($p < 0,01$) ve 24 sa sonunda $\%100$ 'e ($p < 0,05$) yükseldiği tespit edildi (Şekil 42). 50 ppm HOCl uygulanan mikroorganizmalar için antimikrobiyal aktivite yüzdeleri 30 sn sonrası $\%99,70 \pm 0,05$ ve 2 dk, 1 sa ve 24 sa sonrası $\%100$ olarak kaydedildi, değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmedi ($p > 0,05$) (Şekil 42). 200 ppm HOCl grubunda saptanan antimikrobiyal aktivite yüzdeleri tüm zaman noktalarında $\%100$ olarak kaydedildi ($p > 0,05$) (Şekil 42).

Yapılan gruplar arası ikili karşılaştırmalarda tüm solüsyonların, negatif kontrol (steril FTS) grubuna kıyasla mikrobiyal canlılığı, tüm zaman noktalarında, önemli ölçüde azalttığı (Tablo 7) ve kaydedilen antimikrobiyal aktivite değerlerinin negatif kontrol grubu ile kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı seviyede yüksek olduğu tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 43). 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarında, *C. albicans* mikroorganizmalarına karşı 30 sn, 2 dk ve 1 sa uygulama sürelerinde KH grubundan daha yüksek antimikrobiyal aktivite değerleri tespit edildi ($p < 0,0001$) (Şekil 43). HOCl grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark gözlenmedi ($p > 0,05$) (Şekil 43).



Şekil 42. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının *C. albicans* mikroorganizmaları üzerine 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa uygulanması sonucu tespit edilen antimikrobiyal aktivite yüzdelerinin zaman içindeki değişimi
Two-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$



Şekil 43. Negatif kontrol, %0,2 KH, 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl gruplarının *C. albicans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal aktivite yüzdelерinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde karşılaştırılması.
One-way ANOVA ve post-hoc Tukey testi, * $p < 0,0001$

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Periodontal hastalıklar; dental biyofilm, konak immün yanıtı ve çeşitli risk faktörleri ile ilişkili, periodonsiyumun enfeksiyonu ile karakterize, ataşman kaybına yol açan, çok faktörlü kronik enflamatuvar hastalıklardır (Albandar, 2011; Armitage, 1999; Ship & Beck, 1996). Periodontal hastalıkların etiyolojisi her ne kadar karmaşık olsa da MDP ve ağız boşluğundaki patojen mikroorganizmalar temel faktörler olarak kabul edilir (Sanz ve ark., 2020; Socransky & Haffajee, 1992).

Periodontal hastalıkların tedavisinin ana amacı MDP'yi ve içerisinde bulunan patojen mikroorganizmaları ortadan kaldırmaktır. Tedavinin ilk basamağı olarak, tüm yumuşak ve sert birikintiler, bu birikintilerin tutunmasına sebep olan faktörler elimine edilerek temiz ve enfeksiyondan arınmış bir ağız ortamının elde edilmesi amaçlanır. Bu doğrultuda öncelikle hastaya oral hijyen eğitimi verilerek etkin bir fırçalama alışkanlığı kazandırılır, supra ve subgingival enstrümantasyon ile MDP ve diş taşı uzaklaştırılır ve subgingival biyofilm bozularak bakteriyel yük azaltılır (Needleman ve ark., 2015; Suvan ve ark., 2020; Trombelli ve ark., 2015). Ancak, mekanik tedavi ile kök yüzeyine sınırlı olarak erişilebilmesi nedeniyle ve *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans* gibi konağa invaze olabilmeye yetenekleri olan bazı periodontopatojenlerin baskın olduğu durumlarda, mekanik tedavi periodontal patojenleri ortadan kaldırmada yetersiz olabilir. Bu doğrultuda ilave olarak, tedaviye yardımcı ek tedavi alternatiflerinden biri olan antimikrobiyal ajanların kullanımı öne çıkmaktadır (Sanz ve ark., 2020).

A. actinomycetemcomitans, 1999 sınıflamasında agresif periodontitis olarak tanımlanan periodontal hastalık formunun primer etiyolojik ajanı olarak ilişkilendirilen gram negatif, fakültatif anaerobik bir periodontopatojendir (Fine ve ark., 2007). Aynı zamanda şiddetli periodontitis, geleneksel periodontal tedaviye dirençli erişkin periodontitis ve erken başlangıçlı periodontitis vakalarının patogenezinde de rol oynamaktadır (Rodenburg ve ark., 1990; Slots ve ark., 1990; Zambon ve ark., 1996). *A. actinomycetemcomitans*'ın hastalıklı bölgelerden uzaklaştırılması, genellikle hastalığın klinik semptomlarının iyileşmesi ile ilişkili bulunmuştur (Fives-Taylor ve ark., 1999). *C. albicans*, insan ağızında karşılaşılan en yaygın ve en fazla hastalık yapan mantar türüdür. Oral kandidiyazis ve *Candida* ilişkili protez stomatiti gibi çeşitli oral mantar enfeksiyonlarına neden olan önemli bir patojendir ve temel olarak zayıflamış bağışıklık sistemine sahip insanları etkiler (Sherman ve ark., 2002; Zegarelli, 1993). Ayrıca, *C. albicans*, derin periodontal ceplerde, tedaviye direnç gösteren periodontal lezyonlarda, akut

periodontal abselerde ve peri-implant lezyonlarında da (fırsatçı patojen olarak) tespit edilmiştir (Listgarten ve ark., 1993; MacNeill ve ark., 1997). *A. actinomycetemcomitans*'ın ve *C. albicans*'ın dokuya invaze olma yeteneği, periodontal tedavide supra ve subgingival enstrümantasyonun tek başına yeterli olmasına engel olabilmekte ve re-infeksiyona neden olabilmektedir. Her iki mikroorganizma da diş biyofilmindeki bakterilere tutunabilir, epitel hücrelerine ve bağ dokusuna invaze olarak ağız hastalıklarının ilerlemesine neden olabilir (Rams & Slots, 1996). Tüm bu veriler ışığında, çalışmamızda KH'nin ve HOCl'nin oral antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesinde, periodontal tedaviye yardımcı olarak antimikrobiyal ajan kullanımı ihtiyacı yüksek olan *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans* patojenleri tercih edildi.

Antimikrobiyal ajanlar, diş hekimliğinde enfeksiyonların önlenmesi veya tedavisi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Özellikle periodontolojide, diş eti hastalıklarının tedavisinde dental plak kontrolüne ve patojenlerin büyüme ve üremesini durdurarak ya da patojenleri ortadan kaldırarak diş eti iltihabının giderilmesine yardımcı olurlar (Khardori, 2006). Ayrıca, implant ya da diş çekimi gibi oral ve periodontal cerrahi işlemler öncesi ve sonrasında enfeksiyon riskini azaltmak ve iyileşme sürecini hızlandırmak için ve de kandidiyazis, hiperplazi, mukozit, kserostomi gibi ağız hastalıklarının tedavisinde antimikrobiyal ajanlar kullanılmaktadır (Coelho ve ark., 2020; Muller ve ark., 2017; Petersilka ve ark., 2002; Quirynen ve ark., 2002).

KH, ağız boşluğunda en sık kullanılan kemoterapötik antimikrobiyal ajandır (Dadpe ve ark., 2018). Güçlü antimikrobiyal etkinliğine rağmen, doza ve zamana bağlı olarak görülen yan etkileri nedeniyle daha iyi bir alternatif ajana ihtiyaç duyulmaktadır (Batra ve ark., 2022; Coelho ve ark., 2020; Thomas ve ark., 2015). Literatüre bakıldığında, nötrofiller tarafından periodontal ceplerde salınan reaktif oksijen türlerinden biri olan HOCl'nin, periodontal dokulardaki enflamasyonu ve iyileşmeyi düzenlemede rol oynadığı görülmektedir (Mainnemare ve ark., 2004). HOCl'nin düşük toksisitesi, yüksek antimikrobiyal etkinliği, biyofilmi yok etme yeteneği, anti-enflamatuar etkisi ve tıbbi olarak yara, ülser ve yanık tedavisinde topikal solüsyon olarak kullanılıyor olması nedeniyle ağız sağlığında yeni bir ajan olarak kullanımı önerilmektedir (Armstrong ve ark., 2015; Selkon ve ark., 2006). Bununla birlikte, HOCl'nin ağız boşluğu ve periodontal alandaki etkinliğini değerlendiren sınırlı sayıda çalışma mevcutken, bilğimiz dahilinde literatürde İDF üzerine toksisitesini değerlendiren in vitro araştırmaya rastlanılamamıştır. HOCl'nin plak kontrolü ve ağız sağlığının idamesinde antimikrobiyal ve sağlığı koruyucu bir ajan olarak kullanılması ile ilgili yapılacak ileri araştırmalar periodontitis tedavisinde daha iyi bir prognoza katkıda bulunabilir. Çalışmamızda,

%0,2 KH ile 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının, İDF üzerindeki hücre canlılığı ve sitotoksik etkileri ve ağız içi hastalıklarında aktif rol oynayan *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırılarak incelendi.

Diş hekimliğinde kullanılan KH formları, farklı şekillerde ve farklı konsantrasyonlarda mevcuttur. KH'nin ağız gargaraları, spreyleyler, aerosoller, çipler veya jeller gibi formlarının bulunması klinik uygulamalarda kullanımının çok yönlülüğünü artırmaktadır. Ağız çalkalama suları, aerosol ve spreyley formlarının konsantrasyonları genellikle %0,12-0,2 arasında değişirken; jeller için %0,12-1 ve cila formları için %1, %10 ve %40 olarak mevcuttur (Berchier ve ark., 2010). %0,02 ile %0,06 konsantrasyon aralığında KH bakteriyostatik bir ajan olarak rol oynarken; %0,12 ile %0,2 konsantrasyon aralığında ise bakterisit etkilidir (Jones, 1997; Varoni ve ark., 2012). Günlük doz kullanımı net olmamakla birlikte, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından, ağız gargaralarının %0,12-0,2'lik konsantrasyonlarda kullanılması ve 10-15 mL gargara ile günde iki kez, 30 saniye boyunca gargara yapılması önerilmektedir (da Costa ve ark., 2017). Avrupada ise %0,2'lik konsantrasyonların günde iki kez, 10 mL olarak kullanımı öne çıkmaktadır. %0,2 KH konsantrasyonlarının ağız gargarası olarak kullanımı, gingival enflamasyon, kandidiyazis ve diş plağına karşı oldukça etkilidir (Sogut, 2013). Greenstein ve ark. (1986) 10 mL %0,2'lik KH solüsyonu ile 1 dakika süreyle ağız çalkalanmasından sonra KH'nin yaklaşık %30'unun ağız boşluğunda tutunduğunu ve tutunan KH'nin 8-12 saat süreyle düşük konsantrasyonlarda salınmaya devam ederek uzun süreli bakterisit etki gösterdiğini bildirmiştir (Greenstein ve ark., 1986). Bu veriler göz önünde bulundurularak çalışmamızda %0,2'lik KH konsantrasyonunun kullanılması tercih edildi.

HOCl solüsyonu, klor bazlı bir antiseptik ajandır. Etkisini esas olarak proteinleri denatüre ederek gösterir ve sulu çözelti içinde ortamın pH'ına bağlı olarak H^+ ve OCl^- iyonlarına ayrışır (Pullar ve ark., 2000). HOCl solüsyonları, pH 5,5'in altında çözünmezken bu değerin üzerinde çözünmeye başlar, OCl^- oluşur. pH değeri 3 ile 6 aralığında olduğunda baskın tür HOCl'dir ve maksimum antimikrobiyal özelliklere sahiptir. pH 9,5'in üzerine yükseldikçe ortamda OCl^- iyonu üstün duruma geçer ve solüsyonun dezenfekte etkisi azalır, çünkü HOCl, OCl^- iyonundan çok daha fazla bakterisidal etki gücüne sahiptir. pH değerinin 3'ün altına düşmesi durumunda tüm aktif klorun hızlı kaybına neden olabilecek önemli miktarda, sağlık riski oluşturan, klor gazı (Cl_2) açığa çıkar (Wang ve ark., 2007). HOCl solüsyonları pH 7,6'nın altında stabil olma eğilimindedir ve yaklaşık pH 7,5'te çözeltideki klorin türleri karışımı ($HOCl/OCl^-$) oranı %50/50 şeklindedir. Çözeltinin stabil kalması ve istenen yüksek aktivitesinin korunması için, HOCl'nin nötr pH'da kullanılması önerilmektedir (Migliarina & Ferro, 2014; Yamaner, 2022). HOCl gibi klor bazlı solüsyonlarda çözeltideki aktif klor miktarı,

ppm olarak adlandırılarak solüsyonun konsantrasyonunu belirtir. Yapılan bir *in vitro* çalışmada HOCl solüsyonu konsantrasyonunun steril su içerisinde zamanla çözünerek seyreltiği, takip edilen 40 dk'lık süre sonunda konsantrasyonun 3,5 ppm'den pH 7'de 1,63 ppm'e, pH 8,4'te ise 1,13 ppm'e düştüğü gözlenmiştir (Kim ve ark., 2008). HOCl'nin patojenlere karşı etkinliği temas süresi ve konsantrasyonu ile ilişkilidir ve az miktarda bile kısa sürede spor oluşturan ve oluşturmeyan bakterileri öldürebilir (Sakarya ve ark., 2014). Klor bazlı solüsyonlarda ve HOCl solüsyonlarında, ABD Gıda ve İlaç Dairesi tarafından antiseptik ve dezenfektan olarak önerilen konsantrasyon, pH 8'in altında olacak şekilde ve 1-2 dakikalık temas süresi içinde 50-200 ppm olarak belirtilmiştir (Beuchat, Busta, ve ark., 2001; Code of Federal Regulations, 2023). Çalışmamızda, nötr pH'da 50 ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının etkinlikleri değerlendirildi.

Antimikrobiyal ajanların uygulama süreleri ile ilgili çalışmalara bakıldığında, KH ile yapılan *in vitro* çalışmalarda değerlendirme sürelerinin 15 sn ile 48 sa aralığında (Castillo ve ark., 2015; Decker ve ark., 2017; Etemadi ve ark., 2020; Mima ve ark., 2011; Tirali ve ark., 2013; Vahabi ve ark., 2019; Von Maltzahn ve ark., 2020; Voos ve ark., 2014) ve hatta 72 sa (Koychev ve ark., 2017) ve 96 sa (Bidar ve ark., 2012) sürelerinde olduğu, klinik çalışmalarda ise uygulama sürelerinin 1 dk ağız çalkalama (Becerik ve ark., 2011; Sritrairat ve ark., 2011) veya 5-10 dk subgingival irrigasyon (Jalaluddin ve ark., 2019; Kshitish & Laxman, 2010; Vitt ve ark., 2020) şeklinde olduğu rapor edilmiştir. Diş hekimliğinde ağız gargarası olarak kullanıldığında KH ile, günde iki kez 30 sn boyunca gargara yapılması önerilmektedir (da Costa ve ark., 2017). Aynı zamanda, %0,2 KH'nin lokal kullanımı amacıyla üretilen ağız gargaraları üreticilerinin kullanım talimatları da KH'nin ağız içerisinde yaklaşık 1 dk süresince çalkalanması doğrultusundadır. HOCl ile yapılan *in vitro* çalışmalarda ise değerlendirme sürelerinin 30 sn ile 30 dk (Anagnostopoulos ve ark., 2018; Castillo ve ark., 2015; Kim ve ark., 2008; Odorcic ve ark., 2015) ve 1 sa ile 24 sa (Harriott ve ark., 2019; Ortega-Pena ve ark., 2017; Stoffel ve ark., 2020) aralığında olduğu, klinik olarak değerlendiren mevcut iki çalışmada ise hastalara 30 sn (Lafaurie ve ark., 2018) veya 1 dk (Kim & Nam, 2018) süreleri boyunca gargara yaptırılarak çalışıldığı görülmüştür. Klinik uygulamalar esnasında, ağız boşluğundaki dokularla ve mevcut mikrobiyal patojenlerle temas süresi genellikle kısadır ve hastalar günlük rutinlerinde gargaralarını 30 sn ile 1 dk arası süresince ağızlarını çalkalayarak kullanırlar. Tüm bu bilgiler ışığında çalışmamızda, hem klinik kullanımı yeterince taklit edebilmek hem de daha uzun maruz kalma sürelerinin etkilerini değerlendirebilmek için 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde çalışıldı.

Bilgimiz dahilinde HOCl'nin İDF üzerine sitotoksik etkilerinin araştırıldığı ve aynı zamanda ağız içi hastalıklarında aktif rol oynayan *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans*'a karşı

antimikrobiyal etkinliklerinin incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada nötr pH değerlerine sahip %0,2 KH'nin ve KH'ye alternatif bir oral antimikrobiyal ajan olarak 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl'nin, İDF hücre canlılığı ve sitotoksitesi üzerine etkileri ile *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans*'a karşı antimikrobiyal etkinliklerinin 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa temas sürelerinde karşılaştırılarak değerlendirilmesi hedeflendi.

Günümüzde hücre canlılığının/sitotoksitenin belirlenmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. MTT testi, hücre canlılığını veya sitotoksitesini değerlendirmek için en sık kullanılan kolorimetrik yöntemlerden biridir. Bu yöntem, temel olarak mitokondriyal enzimlerin aktivitesini ölçer. Aynı zamanda hücrelerin mitokondriyal fonksiyonunun belirlenmesi yoluyla hücre canlılığını belirler (Mosmann, 1983). LDH testi, kültürde hücre ölümünü doğrudan ölçmek için kullanılan hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntemdir (Decker & Lohmann-Matthes, 1988). Test, hücre zarının bütünlüğü kaybolduğunda büyüme ortamına salınan LDH enziminin ölçümüne dayanır. Kimyasal maddelerin ve ilaçların sitotoksitesini belirlemede sıklıkla kullanılmaktadır (Chan ve ark., 2013). Bu çalışmada KH ve HOCl solüsyonlarının İDF hücreleri üzerindeki hücre canlılığı etkileri MTT testi ile, sitotoksik etkileri ise LDH testi ile belirlendi.

Kimyasal bir bileşiğin belirli bir mikroorganizma türüne karşı *in vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak amacıyla kullanılan metotlardan zamana bağlı öldürme yöntemi, bir ajanın bakterisidal veya fungisidal etkisinin değerlendirilmesinde en uygun yöntemlerdendir (Pfaller ve ark., 2004). Zamana veya konsantrasyona bağlı olarak antimikrobiyal etkinliğe ve test edilen mikroorganizmanın hücre hasarına ilişkin bilgi sağlar (Balouiri ve ark., 2016). Çalışmada KH ve HOCl solüsyonlarının *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans* mikroorganizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri zamana bağlı öldürme yöntemi kullanılarak değerlendirildi.

KH'nin, antimikrobiyal özellikleri iyi tanımlanmış ve ağız hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılıyor olmasına rağmen, İDF ve diğer hücreler üzerinde güçlü bir sitotoksik etkiye sahip olduğu, düşük KH konsantrasyonlarının bile İDF'lerde ve epitel hücrelerinde protein ve DNA sentezini inhibe ettiği belirtilmiştir (Karpinski & Szkaradkiewicz, 2015). Tüter ve ark. (1998) yaptıkları çalışmada %0,2 KH ile farklı gargaraların İDF üzerine etkilerini incelemişler ve 10 sn, 30 sn, 1 dk ve 2 dk'lık zaman dilimlerinde gruplar arası ve grup içi karşılaştırma yapmışlardır. Sonuçlara göre KH grubu kontrol grubuna (sadece besiyeri) kıyasla hücre canlılığını anlamlı derecede azaltmıştır. Ancak grup içi kıyaslamada 10 sn ile 2 dk arasında anlamlı fark tespit edilirken, diğer süreler arasında fark saptanmamıştır (Tüter ve ark., 1998). Schmidt ve ark. (2016) %0,2'lik KH solüsyonunu İDF hücreleri üzerine 1 dk, 5 dk ve 15 dk

boyunca maruz bıraktıkları *in vitro* çalışmalarında, hücre canlılığının zamanla yaklaşık olarak %76'dan %73'e ve %63'e düştüğünü belirtmişlerdir. En yüksek toksik etki, en uzun uygulama süresinde tespit edilmiştir (Schmidt ve ark., 2016). Sukumaran ve ark. (2020) farklı KH konsantrasyonlarının (%0,03, %0,06, %0,1, %0,12 ve %0,2) 1, 2, 4, 6, 8 ve 10 dk sürelerindeki İDF hücre canlılığı ve yara iyileşmesine etkilerini incelemişlerdir. %0,2 KH de dahil olmak üzere, konsantrasyona ve zamana bağlı olarak hücre canlılığında önemli ölçüde azalma gözlenmiştir (Sukumaran ve ark., 2020). Hadzik ve ark. (2021) %0,2'lik KH içerikli ticari bir ağız gargarasının %1,56'dan %50'ye değişen altı farklı konsantrasyonunun İDF üzerine etkisini değerlendirmişlerdir. 5 dk, 6 sa ve 24 sa boyunca *in vitro* olarak yapılan çalışmada, tüm solüsyonların kontrole (DMSO) göre anlamlı derecede hücre canlılığını azalttığını ancak, %0,2'lik KH gargaranın sadece en düşük ve en yüksek konsantrasyonları arasında anlamlı fark gözlenirken, diğerleri arasında benzer sonuçlar tespit edildiği, zamanla bir fark gözlenmediği belirtilmiştir (Nawrot-Hadzik ve ark., 2021). Çekilmiş dişler üzerinde yapılan bir çalışmada, Babgi ve ark. (2021), kök yüzeyine ekilen İDF hücrelerinin % 0,2 KH jel ile 2 dk maruz bırakıldıktan sonra canlılığında güçlü bir inhibisyon tespit etmiştir (Babgi ve ark., 2021). Utami ve ark. (2022) tarafından yapılan bir başka *in vitro* çalışmada da 24 saat sonunda İDF hücre canlılığı yüksek oranda azalmıştır (Utami ve ark., 2022). Çalışmamızın bulgularına bakıldığında, literatürle uyumlu olarak, 30 sn, 2 dk, 1 sa ve 24 sa sürelerinde, % 0,2 KH uygulanan İDF hücrelerinde canlılığın zamanla azaldığı ve hücre canlılığı değerlerinin kontrol grubuna (besiyeri) kıyasla tüm zaman noktalarında anlamlı seviyede daha düşük olduğu tespit edildi.

KH'nin toksisitesini değerlendirebilmek için aynı zamanda, İDF hücrelerinde nekroz indüksiyonu (LDH salınımı) incelendi, ancak literatürde KH uygulanması sonrası hücre ölümünü araştıran az sayıda çalışmaya rastlanmıştır (Faria ve ark., 2009; Giannelli ve ark., 2008; Schmidt ve ark., 2018). Gianelli ve ark. (2008) yaptıkları çalışmada, KH'nin % 0,12'lik konsantrasyonunun, 1 dk tedaviden sonra fibroblastların nekrozunu % 50'den daha yüksek oranlarda etkilediğini (Giannelli ve ark., 2008), aynı şekilde Faria ve ark. (2009), daha düşük konsantrasyonlarda bile KH'nin 24 sa uygulama sonrası İDF üzerinde %80 nekroz gösterdiğini belirtmişlerdir (Faria ve ark., 2009). Schmidt ve ark. (2018) %0,2'lik KH solüsyonu ile farklı ağız gargaralarının, 1 dk, 5 dk ve 15 dk süresince İDF ve insan nazal epitel hücreleri üzerine apoptotik ve nekrotik etkilerini incelemişlerdir. KH solüsyonunun kontrol grubuna (FTS) göre yüksek sitotoksik etki gösterdiği ancak kendi içinde zamanlar arasında anlamlı bir fark görülmediği belirtilmiştir (Schmidt ve ark., 2018). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, %0,2 KH ile tedavi sonrası İDF üzerindeki toksisite değerlerinin 30 sn, 2 dk ve 1 sa uygulama sürelerinde %51,17-55,75 arasında olduğu ve istatistiksel bir fark olmadığı ancak 24 sa'lik

uygulama süresinde toksisitenin %84,30 olduğu ve tüm değerlendirme zamanlarına göre anlamlı yüksek bulunduğu kaydedildi.

Bununla birlikte, literatürde *in vivo* çalışmalarda KH'nin İDF hücreleri üzerinde toksik etki yaratmadığını öne süren çalışmalar da mevcuttur (Sanchez ve ark., 1988; Southard ve ark., 1989). KH'nin toksisite bulgularının *in vitro* ve *in vivo* koşullarda farklılık göstermesinin sebebi olarak, ağız ortamında epitelyal bariyerin alt tabakadaki hücreleri koruması ve KH'nin konak hücreleri yerine daha çok oral floradaki bakterilere bağlanması ihtimalleri düşünülmektedir (Lindhe ve ark., 1970; Pucher & Daniel, 1992). KH'nin %0,2'lik konsantrasyonlarının ağız içi çalkalama amacıyla kullanılmakla birlikte, KH'nin penetrasyonunu önlemek için oral kaviteyi kaplayan epitel hücrelerin devamlılığını koruyor olması ve bariyer oluşturması gerekliliği bildirilmiştir (Ramberg ve ark., 1996).

Literatürde, HOCl'nin dermal fibroblastlar ve keratinositler üzerine sitotoksitesinin önemli ölçüde az olduğu ve ideal bir yara bakım solüsyonu olmaya aday olduğu ortaya koyulmuştur (Armstrong ve ark., 2015; Day ve ark., 2017; Gonzalez-Espinosa ve ark., 2007; Kramer ve ark., 2018; Rani ve ark., 2014). Sakarya ve ark. (2014) çeşitli HOCl konsantrasyonlarının dermal fibroblast ve keratinositlere etkisini incelemek için 10 dk, 4 sa, 8 sa ve 24 sa sürelerinde *in vitro* olarak çalışmışlardır. HOCl solüsyonunun, 10 dk'lık uygulama sonundaki sonuçları ile uzun dönem sonuçlarının benzerlik gösterdiğini, dermal fibroblastların ve keratinositlerin hasarlanmış alana göçünü doza bağımlı olarak etkilediğini, yüksek konsantrasyonlarda (55-109 ppm) hücrelerin göçünün bozulmasına sebep olurken, düşük konsantrasyonlarda (5,5-11 ppm) daha yüksek migrasyona sebep olduğunu bildirmişlerdir (Sakarya ve ark., 2014). Rani ve ark. (2014) ticari olarak temin edilebilen cilt/yara temizleme ajanlarının toksik olmayan dozlarını tespit edebilmek için fare dermal fibroblastlarında çalışma yapmışlar ve 100 ppm HOCl içerikli bir ajanın (*NeutroPhase*) non-toksik olduğunu göstermişlerdir (Rani ve ark., 2014). Yakın zamanda yine topikal antiseptikler ile yapılan başka bir *in vitro* çalışmada Ortega-Pena ve ark. (2017) 6, 12, 24 ve 48 saatlik zaman dilimlerinde, ticari olarak temin edilen bir HOCl solüsyonunun (*Vashe*) farklı konsantrasyonlarının (3,3 ppm, 16,5 ppm ve 33 ppm) fibroblastlar üzerinde fazla sitotoksik etkiye neden olmadan kısa sürede biyofilm oluşumunu inhibe ettiğini göstermişlerdir. Araştırmanın sonuçlarına göre, tüm zaman boyunca HOCl solüsyonlarında, birbirleri ile benzer şekilde, fibroblast hücre canlılığının %50'nin üzerinde seyrettiği görülmüştür, ancak fibroblast popülasyonları zamandan bağımsız şekilde artma-azalma eğilimi göstermiştir (Ortega-Pena ve ark., 2017). Tüm bu bilgilere ek olarak, yüksek konsantrasyonlarda HOCl'nin (500 ppm) dokuda nekroza ve/veya apoptoza neden olabileceği de gösterilmiştir (Vile ve ark., 2000; Zhang ve ark., 2001). Bilgimiz dahilinde, literatürde

HOCI'nin İDF üzerine etkilerini değerlendiren bir araştırmaya rastlanmadığından çalışmamız HOCl solüsyonlarının İDF üzerindeki hücre canlılığı ve sitotoksik etkilerini değerlendiren ilk çalışmadır. Sonuçlarımızı bire bir karşılaştırmak mümkün olmamıştır. Dermal fibroblastlar üzerinde yapılan çalışmaların sonuçlarına benzer olarak çalışmamızda kullanılan 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının İDF hücre canlılığını doza ve zamana bağlı olarak azalttığı tespit edildi. 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl sitotoksitesite değerlerinin zamanla artış eğilimi göstererek 24. sa'ya kadar birbirleri ile benzer iken 24. sa'da 50 ppm HOCl'nin sitotoksitesitesi anlamlı daha yüksek olarak kaydedildi. Çalışmamızda 24. sa'da yüksek konsantrasyon HOCl'de (200 ppm) düşük konsantrasyon HOCl'ye (50 ppm) göre sitotoksitesininin az olması HOCl solüsyonu konsantrasyonunun arttıkça ortamdaki patojen veya organik maddeler ile daha fazla reaksiyona girerek hemen ayrışmaya başlaması, daha hızlı deaktive olması ve etkinliğinin azalmasıyla ilgili olduğu düşünülmektedir.

Literatürde KH ile HOCl'nin dermal fibroblastlar üzerine toksisitesinin kıyaslandığı tek *in vitro* çalışmada, 330 ppm HOCl solüsyonu ile %0,05 KH solüsyonları karşılaştırılmış; 3 dk'lık maruziyet sonucu, verilerimize benzer şekilde, HOCl'nin daha az sitotoksitesiteye neden olduğu bildirilmiştir (Day ve ark., 2017). Çalışmamızın sonuçlarına göre, 50 ppm ve 200 ppm HOCl'nin hem kısa dönemde hem de uzun dönemde genel olarak %0,2'lik KH'ye kıyasla daha yüksek canlılık değerleri gösterdiği görüldü. Sitotoksitesite verileri ise dozlar arasında fark olmaksızın KH'ye kıyasla daha düşük olarak kaydedildi. Literatürde HOCl konsantrasyonlarının İDF üzerine etkileri ile ilgili bir çalışma görülememekle birlikte, dermal fibroblastlar üzerindeki toksik dozu ile ilgili de ortak bir karara rastlanılamamıştır. Ancak farklı konsantrasyonlara ve zaman dilimlerine rağmen, genel olarak toksitesite ile ilgili bulgular çalışmamız ile uyumludur. HOCl'nin İDF üzerine sitoksitesitesinin net olarak anlaşılabilmesi için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır. Böylece, güvenli dozlar belirlenebilir ve antiseptik olarak insanlarda kullanımıyla ilgili öneriler geliştirilebilir.

%0,2 KH'nin oral mikrobiyom üzerindeki etkilerinin değerlendirildiği çalışmalara bakıldığında, *A. actinomycetemcomitans* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğu görülmüştür. Voos ve ark. (2014) *A. actinomycetemcomitans*'nın planktonik kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada, *A. actinomycetemcomitans* bakterilerinde 1 dk sonunda %0,2 KH'nin %100 etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir (Voos ve ark., 2014). Decker ve ark. (2017) *in vitro* şartlarda %0,2 KH ve çeşitli ağız gargaralarını karşılaştırdıkları çalışmada 30 sn sonunda KH'nin *A. actinomycetemcomitans* koloni büyümesini tamamen engelleyerek bakterisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Decker ve ark., 2017). Benzer şekilde, başka *in vitro* çalışmalarda da %0,2 KH solüsyonunun 5 dk ve 24 sa sürelerinde, *A. actinomycetemcomitans* üzerinde

yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir (Etemadi ve ark., 2020; Vahabi ve ark., 2019). Çalışmamızda literatürle uyumlu olarak, %0,2'lik KH'nin *A. actinomycetemcomitans* üzerine antimikrobiyal etkinlik değerleri kontrol grubuna kıyasla tüm zaman noktalarında anlamlı yüksek olarak tespit edildi. 30 sn'de %99 görülen antimikrobiyal aktivite yüzdesi 2 dk değerlendirme süresinde %98'e düşüş gösterip, sonrasında tekrar artarak 1 saat sonunda %98,72 ve 24 sa sonunda %100 olarak kaydedildi. Huth ve ark. (2011) ise, *A. actinomycetemcomitans*'nın *in vitro* planktonik ve biyofilm kültürleri üzerinde yaptıkları çalışmada %0,2 KH'nin 60 sn sonunda, nitroselüloz membran filtrele emdirilmiş her iki *A. actinomycetemcomitans* kültürü üzerinde yaklaşık %35 antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini tespit etmişlerdir (Huth ve ark., 2011). Elde edilen sonuçlara göre antimikrobiyal etkinliğin literatürün geneline kıyasla daha düşük görülmesi, test edilen diğer solüsyonların da etkinliğinin düşük çıkmasıyla yorumlanmıştır. Başka bir *in vitro* çalışma da, %0,2 KH uygulamasının 24 sa'lık değerlendirmede, *A. actinomycetemcomitans* üzerinde çok az veya sıfır antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur (Von Maltzahn ve ark., 2020). Ancak, bu araştırma da tamamen farklı bir teknik olan titanyum örneklerde, olgunlaşmış bir biyofilm formunda *A. actinomycetemcomitans* kullanılarak yapılmıştır. Araştırma sonuçlarındaki bu farklılıkların uygulama tekniklerinden kaynaklandığı düşünülmektedir.

HOCl'nin patojenler üzerindeki etkinliğini inceleyen araştırmalar, pek çok bakteri, virüs ve mantarlar karşısında geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğunu ortaya koymuştur (Armstrong ve ark., 2015). HOCl'nin *A. actinomycetemcomitans* üzerindeki etkinliğini değerlendiren bilginiz dahilinde tek bir *in vitro* araştırmaya rastlanmıştır (Castillo ve ark., 2015). Castillo ve ark. (2015), 250 ppm ve 500 ppm HOCl ile %0,2'lik KH'nin 30 sn uygulama süresinde bakteriyel canlılığa etkilerini incelemişler ve değerlendirilen gram pozitif bakterilerde KH'nin etkinliği daha yüksek bulunurken, *A. actinomycetemcomitans* ve diğer gram negatif bakteriler üzerinde HOCl antimikrobiyal aktivitesi, artan derişime bağlı olarak, daha etkin bulunmuştur (Castillo ve ark., 2015). Çalışmamızda 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonları literatürle benzer şekilde, erken dönemde 0,2% KH solüsyonundan daha fazla antimikrobiyal etkinlik gösterdi, 24. saatte ise etkinlikleri benzerdi. Ancak çalışmamızda her iki HOCl solüsyonunun *A. actinomycetemcomitans* üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri uygulama sonrası kısa sürede %100'e yükselerek hem birbirlerine kıyasla hem de tüm zaman noktaları arasında anlamlı bir fark göstermezken, Castillo ve ark. (2015) 500 ppm HOCl'nin 250 ppm'den daha yüksek etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bulgular arasındaki bu farklılığın, çalışmada farklı ve/veya daha yüksek konsantrasyonların kullanımından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Lafaurie ve ark. (2018) yaptıkları bir klinik çalışmada, periodontal sağlıklı beş ayrı gruba hastaya 30 sn boyunca 250 ppm ve 500 ppm HOCl, %0,12'lik ve %0,2'lik KH ve plasebo olarak distile su ile diş fırçalama sonrası gargara yaptırarak gargaraların tükürükteki bakteri canlılığı üzerine etkilerini incelemişlerdir. HOCl gruplarında total bakteri canlılığı, sadece çalkalama sonrası 30. sn'de plasebo grubuna göre daha düşük gözlenirken, devamında anlamlı fark görülmemiştir. %0,2 KH grubunda hem başlangıçta hem de 7 saat boyunca bakteri canlılığında önemli ölçüde azalma gözlenmiştir (Lafaurie ve ark., 2018). Gram pozitif bakteriler sağlıklı florada diş yüzeyine ilk kolonize olan türdür ve daha yüksek oranda bulunur. HOCl'nin tükürükteki bakteriler üzerinde daha düşük antimikrobiyal etki göstermesinin sebebi olarak, KH'nin tükürükte bulunan gram pozitif bakteriler üzerinde daha fazla etkili olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. HOCl'nin periodontal hastalıklarla ilişkili *P. gingivalis* ve *A. actinomycetemcomitans* gibi gram negatif bakteriler üzerinde daha yüksek etki gösterip sağlıklı floradaki tükürük üzerinde etkisinin daha düşük olması, normal floranın korunmasında KH'ye kıyasla daha güvenilir olduğunu düşündürmektedir.

KH'nin *C. albicans*'ı etkisiz hale getirmede yüksek etkili olduğu birçok araştırma tarafından desteklenmektedir, ancak antifungal etkinlik için gerekli KH konsantrasyonu ve temas süresi çalışmalarda farklılık göstermektedir. Vianna ve ark. (2004), farklı KH konsantrasyonlarının (%0,2, %1, %2) *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini inceledikleri çalışmalarında, %0,2'lik KH jelin 10 dk uygulama süresinde, %0,2'lik KH likit formunun ise 15 sn'de kültürdeki tüm mantarları inhibe ettiğini ortaya koymuşlardır (Vianna ve ark., 2004). Bùrgers ve ark. (2012), %0,2'lik KH'nin *C. albicans* üzerine 1 dk uygulama süresinde yaklaşık %99 oranında antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir (Burgers ve ark., 2012). Oliveira ve ark. (2014) %0,2'lik KH solüsyonunun 5 dk uygulama süresinde test edilen hiçbir mikroorganizmayı tamamen inhibe edemediğini ve *C. albicans* üzerinde %68,8 gibi düşük bir oranda antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini belirtmişlerdir (Oliveira ve ark., 2014). Mohammadi ve Asgary (2015), 5 dk'lık uygulama süresinde, Abbaszadegan ve ark. (2015) ise 24 sa'lık uygulama süresinde %0,2'lik KH'nin *C. albicans* üzerine kontrol gruplarına (sırasıyla steril salin ve DMSO) kıyasla anlamlı yüksek ancak diğer test solüsyonlarından daha düşük antimikrobiyal aktivite gösterdiğini bildirmişlerdir (Abbaszadegan ve ark., 2015; Mohammadi & Asgary, 2015). %0,2 KH solüsyonunun 2 dk (Medvedec Mikic ve ark., 2018) ve 1 sa (Aghili ve ark., 2015) uygulama sonrası *C. albicans* üzerinde %100 antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini bildiren çalışmalar da mevcuttur. Bunlara ek olarak, başka bir *in vitro* çalışmada, %0,2'lik KH'nin 24 sa uygulama süresince *C. albicans* üzerinde hiç antimikrobiyal etkinlik göstermediği belirtilmiştir (Tirali ve ark., 2013). Çalışmada test edilen solüsyonların antimikrobiyal aktivitesini belirlemek için agar difüzyon yöntemi kullanılmış ve bu farklı sonucun nedeninin

çalışmanın tasarımına atfedilebileceği düşünülmüştür. Agar plakası üzerinde yapılan antibakteriyel çalışmalar çok yaygın testlerdir, ancak mikrobiyal inhibisyon bölgesi test maddesinin çözünürlüğüne ve agar üzerinde yayılma yeteneğine bağlı olduğundan, tam etkin potansiyelini ifade etmeyebilir (Mayrhofer ve ark., 2008). Çalışmamızda literatürün geneli ile uyumlu olarak, %0,2'lik KH'nin *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivite yüzdeleri kontrol grubuna kıyasla tüm zaman noktalarında anlamlı yüksek olarak kaydedildi. 30. sn'de %96,2 olarak kaydedilen antimikrobiyal aktivite değeri, 2. dk'da %87'6'ya gerileyip daha sonra artış göstererek 1. saatte %97,6 ve 24. saatte %100'e yükseldi.

Yüksek antimikrobiyal özelliğe sahip olan HOCl'nin, *C. albicans* üzerinde de oldukça etkili olduğu öne sürülmektedir (Armstrong ve ark., 2015). Landa-Solis ve ark. (2005), nötr pH'da 20 ppm HOCl içerikli çözeltinin *C. albicans* üzerinde 30 saniye temas sonrası %99,99'dan fazla bakterisidal ve fungisidal etkinliğinin olduğunu göstermişlerdir (Landa-Solis ve ark., 2005). Wang ve ark. (2007) 0,1-2,8 ppm konsantrasyon aralığında HOCl'nin, *C. albicans* üzerine uygulama sonrası 1 dk'den kısa sürede %100 antimikrobiyal aktivite gösterdiğini belirtmişlerdir (Wang ve ark., 2007). Kim ve ark. (2008) 3,5 ppm HOCl solüsyonunun pH 7,0 iken 30 sn uygulama sonrası *C. albicans* üzerinde %96,88 ve pH 8,4 iken ise % 95,06 fungisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Kim ve ark., 2008). Sakarya ve ark. (2014), HOCl solüsyonunun 3 ppm ve 192 ppm arası konsantrasyonlarının antimikrobiyal ve olgun biyofilm eradikasyonu üzerine etkinliğini araştırmışlardır. Çok düşük konsantrasyonlarda (3 ppm) bile 0 dk içerisinde HOCl'nin *C. albicans* ve test edilen diğer bakteriler için öldürücü olduğunu ve artan konsantrasyona bağlı olarak etkinliğinin artarak 24 sa'lik uygulama sonrası 192 ppm HOCl'nin *C. albicans* biyofilmini tamamen erdike edebildiğini ortaya koymuşlardır (Sakarya ve ark., 2014). Odorcic ve ark. (2015), 100 ppm HOCl'nin 60 sn içinde *C. albicans* sayısını en az %99,99 azaltarak hızlı bir şekilde fungisidal etki gösterdiğini bildirmişlerdir (Odocic ve ark., 2015). Ortega-Pena ve ark. (2017), ticari olarak temin edilen farklı antiseptiklerin ve bir HOCl solüsyonunun (Vashe) farklı konsantrasyonlarının (3,3 ppm, 16,5 ppm ve 33 ppm) etkinliğini klinik olarak izole edilmiş mikroorganizmalar üzerinde incelemişlerdir. HOCl solüsyonlarının 2 sa uygulama sonrası *C. albicans* biyofilmini büyük oranda inhibe ettiğini, 6 sa uygulama sonrası yüksek antimikrobiyal etkinlik gösterirken, 12 sa sonrası etkinliğinin azalmaya başladığını belirtmişlerdir. HOCl solüsyonlarının etkinliğinin, konsantrasyonu ile doğru orantılı olmadığı, sebebi olarak ise mikroorganizmaların çevresel faktörlere karşı duyarlılığına bağlı olarak etkinliğin değişebileceği öne sürülmüştür (Ortega-Pena ve ark., 2017). Harriot ve ark. (2019), içerikleri aynı olan ticari olarak temin edilen iki ayrı, 330 ppm HOCl (Vashe) ve 250 ppm HOCl (PhaseOne) yara bakım solüsyonlarının seyreltilmiş konsantrasyonlarının (%100, %50, %25) *C. albicans*'ın üzerindeki etkinliğini araştırmışlardır

ve solüsyonların birbirlerinden farklı fungisidal etkinlik gösterdiklerini bildirmişlerdir. *Vashe* için %100 fungisidal etki normal konsantrasyonunda 1 sa uygulama sonrası gözlenirken, *PhaseOne* için %100 fungisidal etki normal ve %50'lik konsantrasyonlarında 1 sa uygulama sonrası, %25'lik konsantrasyonunda ise 24 sa uygulama sonrası gözlenmiştir. Genel olarak bakıldığında, HOCl'nin konsantrasyonlardan bağımsız olarak değişken ancak yüksek fungisidal etkinlik gösterdiğini bildirmişlerdir (Harriott ve ark., 2019). Bilgimiz dahilinde, 50 ppm veya 200 ppm HOCl ile *C. albicans*'ın ilişkisini inceleyen bir çalışmaya rastlanmamıştır. Çalışmamızda 50 ppm HOCl ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının her ikisinin de *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal aktivitelerinin 30 sn uygulama sonrası %100'e yükseldiği ve incelenen konsantrasyonların farklı olmasına rağmen bulguların literatür ile benzerlik gösterdiği tespit edildi.

KH ile HOCl'nin *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin birlikte değerlendirildiği bilimiz dahilindeki tek *in vitro* çalışmada, %4 KH ile 100 ppm HOCl karşılaştırılmış ve HOCl'nin *C. albicans* üzerinde uygulama sonrası hemen fungisidal etki gösterirken, KH için tam fungisidal etkinin 1 dakikada gözlemlendiği rapor edilmiştir (Anagnostopoulos ve ark., 2018). Çalışmamızda da uyumlu olarak, HOCl'nin KH'ye kıyasla daha kısa sürede daha yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu kaydedildi.

Çalışmamızın en büyük limitasyonu, hücre canlılığı ve sitotoksitesinin incelenmesi için kullanılan MTT ve LDH testlerinin sonuçlarının doğruluğunun bir taramalı elektron mikroskobu tarafından desteklenmemesidir. Ayrıca, bu çalışma sadece *in vitro* koşullarda yapıldığından, klinik ortamdaki pek çok değişken faktörün etkisi değerlendirilemediği için sonuçlar sınırlı bir anlam taşıyabilmektedir. Çalışmanın başka bir kısıtlaması da, temel araştırma hedefi olarak belirli patojenler ile çalışılmış olması olabilir. Ancak, antiseptiklerin antimikrobiyal etkinliğini az sayıda mikroorganizmaya güvenerek test etmek mümkündür ve sıkça uygulanmaktadır.

Sonuç olarak;

- % 0,2 KH solüsyonunun, zamana bağlı olarak, İDF hücre canlılığını yüksek oranda azalttığı ve yüksek sitotoksik etki gösterdiği tespit edildi.
- 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının uygulama sonrası erken dönemde İDF hücre canlılığını %0,2 KH'den çok daha düşük oranda azaltması ve KH'ye kıyasla daha düşük sitotoksik etki göstermesi, uzun dönemde ise etkinliklerinin benzer ve/veya daha yakın oranda HOCl lehinde görülmesi sebebiyle diş hekimliği uygulamalarında ağız içinde HOCl solüsyonlarının kullanımının %0,2 KH'ye kıyasla daha güvenilir olabileceği düşünüldü.
- 50 ppm ve 200 ppm HOCl solüsyonlarının *A. actinomycetemcomitans* ve *C. albicans* üzerinde %0,2 KH'ye kıyasla daha yüksek bakterisidal ve fungisidal etki göstermesi nedeniyle ağız içi uygulamalarda KH'ye alternatif antimikrobiyal ajan olarak kullanılabileceği ortaya koyuldu.
- HOCl solüsyonlarının İDF üzerindeki canlılık etkileri ve sitotoksite değerleri ile mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri karşılaştırıldığında 50 ppm ve 200 ppm konsantrasyonlarının risk/fayda durumlarının birbirlerine üstünlük göstermediği tespit edildi.
- HOCl'nin daha düşük sitotoksitesi ve daha yüksek antimikrobiyal aktivitesi göz önüne alındığında ağız içi uygulamalarda KH'ye alternatif antiseptik ajan olarak kullanılabileceği ancak İDF üzerine etkilerinin net olarak anlaşılabilmesi ve ideal konsantrasyonun belirlenebilmesi için daha fazla araştırmaya ihtiyaç olduğu sonucuna varıldı.

8. KAYNAKLAR

- Abbaszadegan, A., Gholami, A., Mirhadi, H., Saliminasab, M., Kazemi, A., & Moein, M. R. (2015). Antimicrobial and cytotoxic activity of ferula gummosa plant essential oil compared to NaOCl and CHX: A preliminary in vitro study. *Restorative Dentistry and Endodontics*, 40(1), 50-57. <https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.1.50>
- Adan, A., Kiraz, Y., & Baran, Y. (2016). Cell proliferation and cytotoxicity assays. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 17(14), 1213-1221. <https://doi.org/10.2174/1389201017666160808160513>
- Aghili, H., Jafari Nadoushan, A. A., & Herandi, V. (2015). Antimicrobial effect of zataria multiflora extract in comparison with chlorhexidine mouthwash on experimentally contaminated orthodontic elastomeric ligatures. *Journal of Dentistry*, 12(1), 1-10.
- Ainamo, J., & Talari, A. (1976). The increase with age of the width of attached gingiva. *Journal of Periodontal Research*, 11(4), 182-188. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1976.tb00069.x>
- Albandar, J. M. (2011). Underestimation of periodontitis in NHANES surveys. *Journal of Periodontology*, 82(3), 337-341. <https://doi.org/10.1902/jop.2011.100638>
- Albandar, J. M. (2014). Aggressive periodontitis: Case definition and diagnostic criteria. *Periodontology 2000*, 65(1), 13-26. <https://doi.org/10.1111/prd.12014>
- Albandar, J. M., Brown, L. J., & Loe, H. (1997). Putative periodontal pathogens in subgingival plaque of young adults with and without early-onset periodontitis. *Journal of Periodontology*, 68(10), 973-981. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.10.973>
- Almeida, O. P. d., & Scully, C. (2002). Fungal infections of the mouth. *Brazilian Journal of Oral Sciences*, 1(1), 19-26. <https://doi.org/10.20396/bjos.v1i1.8640965>
- Anagnostopoulos, A. G., Rong, A., Miller, D., Tran, A. Q., Head, T., Lee, M. C., & Lee, W. W. (2018). 0.01% Hypochlorous acid as an alternative skin antiseptic: An in vitro comparison. *Dermatologic Surgery*, 44(12), 1489-1493. <https://doi.org/10.1097/DSS.0000000000001594>
- Anderegg, C. R., Metzler, D. G., & Nicoll, B. K. (1995). Gingiva thickness in guided tissue regeneration and associated recession at facial furcation defects. *Journal of Periodontology*, 66(5), 397-402. <https://doi.org/10.1902/jop.1995.66.5.397>
- American Academy of Periodontology. (2015). *American academy of periodontology task force report on the update to the 1999 classification of periodontal diseases and conditions*. *Journal of Periodontology*, 86(7), 835-838. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.157001>
- Arakawa, S., Nakajima, T., Ishikura, H., Ichinose, S., Ishikawa, I., & Tsuchida, N. (2000). Novel apoptosis-inducing activity in *Bacteroides forsythus*: A comparative study with three serotypes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and Immunity*, 68(8), 4611-4615. <https://doi.org/10.1128/IAI.68.8.4611-4615.2000>

- Arendorf, T. M., & Walker, D. M. (1987). Denture stomatitis: A review. *Journal of Oral Rehabilitation*, 14(3), 217-227. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2842.1987.tb00713.x>
- Armitage, G. C. (1999). Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Annals of Periodontology*, 4(1), 1-6. <https://doi.org/10.1902/annals.1999.4.1.1>
- Armstrong, D. G., Bohn, G., Glat, P., Kavros, S. J., Kirsner, R., Snyder, R., & Tettelbach, W. (2015). Expert recommendations for the use of hypochlorous solution: Science and clinical application. *Ostomy/Wound Management*, 61(5), 2-19.
- Asikainen, S., Alaluusua, S., & Saxen, L. (1991). Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. *Journal of Periodontology*, 62(3), 203-206. <https://doi.org/10.1902/jop.1991.62.3.203>
- Asikainen, S., Chen, C., & Slots, J. (1996). Likelihood of transmitting *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in families with periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 11(6), 387-394. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1996.tb00200.x>
- Asikainen, S., Lai, C. H., Alaluusua, S., & Slots, J. (1991). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes in periodontal health and disease. *Oral Microbiology and Immunology*, 6(2), 115-118. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1991.tb00462.x>
- Aslantürk, Ö. S. (2018). In vitro cytotoxicity and cell viability assays: Principles, advantages, and disadvantages. In M. L. Larramendy & S. Soloneski (Eds.), *Genotoxicity - A predictable risk to our actual world* (pp. 1-17). IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71923>
- Babgi, W., Alhajaji, M., Al-Mehmadi, L., Elbaqli, R., Khayat, N., Aldahlawi, S., & Youssef, A. R. (2021). Effect of root conditioning agents hyaluronic acid, EDTA and chlorhexidine on the attachment of human gingival fibroblasts to healthy root surface. *Saudi Dental Journal*, 33(6), 342-347. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2020.03.009>
- Baddour, L. M., Wilson, W. R., Bayer, A. S., Fowler, V. G., Jr., Tleyjeh, I. M., Rybak, M. J., Barsic, B., Lockhart, P. B., Gewitz, M. H., Levison, M. E., Bolger, A. F., Steckelberg, J. M., Baltimore, R. S., Fink, A. M., O'Gara, P., & Taubert, K. A. (2015). Infective endocarditis in adults: Diagnosis, antimicrobial therapy, and management of complications: A scientific statement for healthcare professionals from the american heart association. *Circulation*, 132(15), 1435-1486. <https://doi.org/10.1161/CIR.0000000000000296>
- Baehni, P., Tsai, C. C., McArthur, W. P., Hammond, B. F., & Taichman, N. S. (1979). Interaction of inflammatory cells and oral microorganisms. VIII. Detection of leukotoxic activity of a plaque-derived gram-negative microorganism. *Infection and Immunity*, 24(1), 233-243. <https://doi.org/10.1128/iai.24.1.233-243.1979>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71-79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Barasch, A., Safford, M. M., Dapkute-Marcus, I., & Fine, D. H. (2004). Efficacy of chlorhexidine gluconate rinse for treatment and prevention of oral candidiasis in HIV-infected children: a pilot study. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral*

- Barca, E., Cifcibasi, E., & Cintan, S. (2015). Adjunctive use of antibiotics in periodontal therapy. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, 49(3), 55-62. <https://doi.org/10.17096/jiufd.90144>
- Barrette, W. C., Jr., Albrich, J. M., & Hurst, J. K. (1987). Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 55(10), 2518-2525. <https://doi.org/10.1128/iai.55.10.2518-2525.1987>
- Bartold, P. M., Walsh, L. J., & Narayanan, A. S. (2000). Molecular and cell biology of the gingiva. *Periodontology 2000*, 24(1), 28-55. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240103.x>
- Basrani, B., Tjaderhane, L., Santos, J. M., Pascon, E., Grad, H., Lawrence, H. P., & Friedman, S. (2003). Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 96(5), 618-624. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(03\)00166-5](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(03)00166-5)
- Batra, C., Alalshaikh, M., Gregory, R. L., Windsor, L. J., Blanchard, S. B., & Hamada, Y. (2022). An in vitro comparison of four antibacterial agents with and without nicotine and their effects on human gingival fibroblasts. *Journal of Periodontology*, 93(2), 24-33. <https://doi.org/10.1002/JPER.21-0262>
- Becerik, S., Turkoglu, O., Emingil, G., Vural, C., Ozdemir, G., & Atilla, G. (2011). Antimicrobial effect of adjunctive use of chlorhexidine mouthrinse in untreated gingivitis: a randomized, placebo-controlled study. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology*, 119(6), 364-372. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2011.02741.x>
- Beighton, D., Decker, J., & Homer, K. A. (1991). Effects of chlorhexidine on proteolytic and glycosidic enzyme activities of dental plaque bacteria. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(2), 85-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1991.tb01693.x>
- Benatti, B. B., Silverio, K. G., Casati, M. Z., Sallum, E. A., & Nociti, F. H., Jr. (2007). Physiological features of periodontal regeneration and approaches for periodontal tissue engineering utilizing periodontal ligament cells. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103(1), 1-6. <https://doi.org/10.1263/jbb.103.1>
- Berchier, C. E., Slot, D. E., & Van der Weijden, G. A. (2010). The efficacy of 0.12% chlorhexidine mouthrinse compared with 0.2% on plaque accumulation and periodontal parameters: A systematic review. *J Clin Periodontol*, 37(9), 829-839. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2010.01575.x>
- Berkovitz, B. K., & Shore, R. C. (1982). Cells of the periodontal ligament. In B. K. Berkovitz, B. J. Moxham, & H. E. Newman (Eds.), *The Periodontal ligament in health and disease* (pp. 25-45). Elsevier Science & Technology.
- Beuchat, L. R., Busta, F. F., Farber, J. N., Garrett, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., & Suslow, T. V. (2001). Analysis and evaluation of preventive control measures for the control and reduction/elimination of microbial hazards on fresh and fresh-cut produce. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2(1), 1-200.

- Beuchat, L. R., Farber, J. M., Garrett, E. H., Harris, L. J., Parish, M. E., Suslow, T. V., & Busta, F. F. (2001). Standardization of a method to determine the efficacy of sanitizers in inactivating human pathogenic microorganisms on raw fruits and vegetables. *Journal of Food Protection*, 64(7), 1079-1084. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-64.7.1079>
- Bidar, M., Naderinasab, M., Talati, A., Ghazvini, K., Asgari, S., Hadizadeh, B., Gharechahi, M., & Mashadi, N. A. (2012). The effects of different concentrations of chlorhexidine gluconate on the antimicrobial properties of mineral trioxide aggregate and calcium enrich mixture. *Dental Research Journal*, 9(4), 466-471.
- Billings, M., Holtfreter, B., Papapanou, P. N., Mitnik, G. L., Kocher, T., & Dye, B. A. (2018). Age-dependent distribution of periodontitis in two countries: Findings from NHANES 2009 to 2014 and SHIP-TREND 2008 to 2012. *Journal of Clinical Periodontology*, 45 (Suppl 20), 130-148. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12944>
- Birkedal-Hansen, H. (1993a). Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of Periodontal Research*, 28(6), 500-510. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1993.tb02113.x>
- Birkedal-Hansen, H. (1993b). Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *Journal of Periodontology*, 64(5), 474-484. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.5s.474>
- Biswas, S. K., & Chaffin, W. L. (2005). Anaerobic growth of *Candida albicans* does not support biofilm formation under similar conditions used for aerobic biofilm. *Current Microbiology*, 51(2), 100-104. <https://doi.org/10.1007/s00284-005-4552-3>
- Block, M. S., & Rowan, B. G. (2020). Hypochlorous acid: A review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 78(9), 1461-1466. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2020.06.029>
- Bonesvoll, P. (1977). Oral pharmacology of chlorhexidine. *Journal of Clinical Periodontology*, 4(5), 49-65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1977.tb00051.x>
- Bonesvoll, P., Lokken, P., & Rolla, G. (1974). Influence of concentration, time, temperature and pH on the retention of chlorhexidine in the human oral cavity after mouth rinses. *Archives of Oral Biology*, 19(11), 1025-1029. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90089-2](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90089-2)
- Bottero, A., Lauritano, D., Spadari, F., Zambellini Artini, M., & Salvato, A. (1997). Atrophy of the oro-pharyngeal mucosa caused by vitamin B12 and folic acid deficiency. Etiopathologic aspects and clinico-therapeutic problems. *Minerva Stomatologica*, 46(7-8), 359-374.
- Budtz-Jorgensen, E., Mojon, P., Rentsch, A., & Deslauriers, N. (2000). Effects of an oral health program on the occurrence of oral candidosis in a long-term care facility. *Community Dentistry and Oral Epidemiology*, 28(2), 141-149. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0528.2000.028002141.x>
- Burgers, R., Witecy, C., Hahnel, S., & Gosau, M. (2012). The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans*, and *Streptococcus sanguinis*. *Archives of Oral Biology*, 57(7), 940-947. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.01.015>
- Calderon, J. L. (2009). *Method of producing and applications of composition of hypochlorous acid* (Publication No. US 2009/0258083 A1). United States Patent Application

Publication.

<https://patentimages.storage.googleapis.com/b0/ef/aa/16f998ab0066bf/US20090258083A1.pdf>

- Calderone, R. (2004). The 7th conference on *Candida* and candidiasis. *FEMS Yeast Research*, 4(8), 885-886. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2004.06.009>
- Carra, M. C., Detzen, L., Kitzmann, J., Woelber, J. P., Ramseier, C. A., & Bouchard, P. (2020). Promoting behavioural changes to improve oral hygiene in patients with periodontal diseases: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 72-89. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13234>
- Castillo, D. M., Castillo, Y., Delgadillo, N. A., Neuta, Y., Jola, J., Calderon, J. L., & Lafaurie, G. I. (2015). Viability and effects on bacterial proteins by oral rinses with hypochlorous acid as active ingredient. *Brazilian Dental Journal*, 26(5), 519-524. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201300388>
- Caton, J. G., Armitage, G., Berglundh, T., Chapple, I. L. C., Jepsen, S., Kornman, K. S., Mealey, B. L., Papapanou, P. N., Sanz, M., & Tonetti, M. S. (2018). A new classification scheme for periodontal and peri-implant diseases and conditions - Introduction and key changes from the 1999 classification. *Journal of Periodontology*, 89(1), 1-8. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0157>
- Chan, F. K., Moriwaki, K., & De Rosa, M. J. (2013). Detection of necrosis by release of lactate dehydrogenase activity. In Snow, A., Lenardo, M. (Eds) *Immune homeostasis. Methods in molecular biology* (pp. 65-70). Humana Press, Totowa, NJ. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-290-2_7
- Chapple, I. L., Van der Weijden, F., Doerfer, C., Herrera, D., Shapira, L., Polak, D., Madianos, P., Louropoulou, A., Machtei, E., Donos, N., Greenwell, H., Van Winkelhoff, A. J., Eren Kuru, B., Arweiler, N., Teughels, W., Aimetti, M., Molina, A., Montero, E., & Graziani, F. (2015). Primary prevention of periodontitis: Managing gingivitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 71-76. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12366>
- Chapple, I. L. C., Mealey, B. L., Van Dyke, T. E., Bartold, P. M., Dommisch, H., Eickholz, P., Geisinger, M. L., Genco, R. J., Glogauer, M., Goldstein, M., Griffin, T. J., Holmstrup, P., Johnson, G. K., Kapila, Y., Lang, N. P., Meyle, J., Murakami, S., Plemons, J., Romito, G. A., Shapira, L., Tatakis, D. N., Teughels, W., Trombelli, L., Walter, C., Wimmer, G., Xenoudi, P., & Yoshie, H. (2018). Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Journal of Periodontology*, 89(1), 74-84. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719>
- Chung, H. J., Chung, C. P., Son, S. H., & Nisengard, R. J. (1989). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and leukotoxicity in Korean localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 60(9), 506-511. <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.9.506>
- Ciancio, S. (1994). Expanded and future uses of mouthrinses. *Journal of the American Dental Association*, 125(2), 29-32. [https://doi.org/10.1016/s0002-8177\(94\)14005-7](https://doi.org/10.1016/s0002-8177(94)14005-7)
- Ciancio, S. G., Mather, M. L., Zambon, J. J., & Reynolds, H. S. (1989). Effect of a chemotherapeutic agent delivered by an oral irrigation device on plaque, gingivitis, and

- subgingival microflora. *Journal of Periodontology*, 60(6), 310-315. <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.6.310>
- Cieplik, F., Jakubovics, N. S., Buchalla, W., Maisch, T., Hellwig, E., & Al-Ahmad, A. (2019). Resistance toward chlorhexidine in oral bacteria - Is there cause for concern? *Frontiers in Microbiology*, 10(587), 1-11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00587>
- Cline, N. V., & Layman, D. L. (1992). The effects of chlorhexidine on the attachment and growth of cultured human periodontal cells. *Journal of Periodontology*, 63(7), 598-602. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.7.598>
- Code of Federal Regulations. (2023). *Tolerance exemptions for active and inert ingredients for use in antimicrobial formulations*. Office of the Federal Register. <https://www.ecfr.gov/current/title-40/chapter-I/subchapter-E/part-180/subpart-D/section-180.940>
- Coelho, A. S., Laranjo, M., Goncalves, A. C., Paula, A., Paulo, S., Abrantes, A. M., Caramelo, F., Ferreira, M. M., Silva, M. J., Carrilho, E., & Botelho, M. F. (2020). Cytotoxic effects of a chlorhexidine mouthwash and of an enzymatic mouthwash on human gingival fibroblasts. *Odontology*, 108(2), 260-270. <https://doi.org/10.1007/s10266-019-00465-z>
- Colard, T., Falgayrac, G., Bertrand, B., Naji, S., Devos, O., Balsack, C., Delannoy, Y., & Penel, G. (2016). New insights on the composition and the structure of the acellular extrinsic fiber cementum by raman analysis. *PloS One*, 11(12), 7016-7316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167316>
- Contreras, A., & Slots, J. (2000). *Herpesviruses* in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 35(1), 3-16. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0765.2000.035001003.x>
- Corbin, A., Pitts, B., Parker, A., & Stewart, P. S. (2011). Antimicrobial penetration and efficacy in an in vitro oral biofilm model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55(7), 3338-3344. <https://doi.org/10.1128/AAC.00206-11>
- Cortelli, J. R., Aquino, D. R., Cortelli, S. C., Roman-Torres, C. V., Franco, G. C., Gomez, R. S., Batista, L. H., & Costa, F. O. (2012). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* serotypes infections and periodontal conditions: A two-way assessment. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 31(7), 1311-1318. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1444-2>
- Cortelli, J. R., Cortelli, S. C., Jordan, S., Haraszthy, V. I., & Zambon, J. J. (2005). Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(8), 860-866. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00777.x>
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 711-745. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>
- Cronan, C. A., Potempa, J., Travis, J., & Mayo, J. A. (2006). Inhibition of *Porphyromonas gingivalis* proteinases (gingipains) by chlorhexidine: Synergistic effect of Zn(II). *Oral Microbiology and Immunology*, 21(4), 212-217. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2006.00277.x>

- Cuesta, A. I., Jewtuchowicz, V., Brusca, M. I., Nastri, M. L., & Rosa, A. C. (2010). Prevalence of *Staphylococcus* spp and *Candida* spp in the oral cavity and periodontal pockets of periodontal disease patients. *Acta Odontologica Latinoamericana*, 23(1), 20-26.
- Cummins, D. (1997). Vehicles: How to deliver the goods. *Periodontology 2000*, 15(1), 84-99. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00108.x>
- Çerikçioğlu, N. (2012). Mantarlarda virülans faktörleri. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 26(2), 261-269.
- da Costa, L., Amaral, C., Barbirato, D. D. S., Leao, A. T. T., & Fogacci, M. F. (2017). Chlorhexidine mouthwash as an adjunct to mechanical therapy in chronic periodontitis: A meta-analysis. *Journal of the American Dental Association*, 148(5), 308-318. <https://doi.org/10.1016/j.adaj.2017.01.021>
- Dadpe, M. V., Dhore, S. V., Dahake, P. T., Kale, Y. J., Kendre, S. B., & Siddiqui, A. G. (2018). Evaluation of antimicrobial efficacy of *Trachyspermum ammi* (Ajwain) oil and chlorhexidine against oral bacteria: An in vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*, 36(4), 357-363. https://doi.org/10.4103/JISPPD.JISPPD_65_18
- Daniluk, T., Tokajuk, G., Cylwik-Rokicka, D., Rozkiewicz, D., Zaremba, M. L., & Stokowska, W. (2006). Aerobic and anaerobic bacteria in subgingival and supragingival plaques of adult patients with periodontal disease. *Advances in Medical Sciences*, 51(1), 81-85.
- Davies, J. M., Horwitz, D. A., & Davies, K. J. (1994). Inhibition of collagenase activity by N-chlorotaurine, a product of activated neutrophils. *Arthritis and Rheumatism*, 37(3), 424-427. <https://doi.org/10.1002/art.1780370317>
- Day, A., Alkhalil, A., Carney, B. C., Hoffman, H. N., Moffatt, L. T., & Shupp, J. W. (2017). Disruption of biofilms and neutralization of bacteria using hypochlorous acid solution: An in vivo and in vitro evaluation. *Advances in Skin & Wound Care*, 30(12), 543-551. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000526607.80113.66>
- Decker, E. M., Barth, V., Kopunic, A., & von Ohle, C. (2017). Antimicrobial efficiency of mouthrinses versus and in combination with different photodynamic therapies on periodontal pathogens in an experimental study. *Journal of Periodontal Research*, 52(2), 162-175. <https://doi.org/10.1111/jre.12379>
- Decker, T., & Lohmann-Matthes, M. L. (1988). A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *Journal of Immunological Methods*, 115(1), 61-69. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(88\)90310-9](https://doi.org/10.1016/0022-1759(88)90310-9)
- Denton, G. W. (2001). Chlorhexidine. In S. S. Block (Ed.), *Disinfection, sterilization and preservation* (pp. 321-337). Lippincott Williams&Wilkins.
- DeVore, L. R. (1994). Antimicrobial mouthrinses: Impact on dental hygiene. *Journal of the American Dental Association*, 125(2), 23-28. [https://doi.org/10.1016/s0002-8177\(94\)14004-5](https://doi.org/10.1016/s0002-8177(94)14004-5)
- Dogan, B., Antinheimo, J., Cetiner, D., Bodur, A., Emingil, G., Buduneli, E., Uygur, C., Firatli, E., Lakio, L., & Asikainen, S. (2003). Subgingival microflora in Turkish patients with

- periodontitis. *Journal of Periodontology*, 74(6), 803-814. <https://doi.org/10.1902/jop.2003.74.6.803>
- Dogan, B., Kipalev, A. S., Okte, E., Sultan, N., & Asikainen, S. E. (2008). Consistent intrafamilial transmission of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* despite clonal diversity. *Journal of Periodontology*, 79(2), 307-315. <https://doi.org/10.1902/jop.2008.070270>
- Dogan, B., Saarela, M. H., Jousimies-Somer, H., Alaluusua, S., & Asikainen, S. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype e-biotypes, genetic diversity and distribution in relation to periodontal status. *Oral Microbiology and Immunology*, 14(2), 98-103. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.1999.140204.x>
- Domisch, H., Walter, C., Dannewitz, B., & Eickholz, P. (2020). Resective surgery for the treatment of furcation involvement: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 375-391. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13241>
- Donos, N., Calciolari, E., Brusselaers, N., Goldoni, M., Bostanci, N., & Belibasakis, G. N. (2020). The adjunctive use of host modulators in non-surgical periodontal therapy. A systematic review of randomized, placebo-controlled clinical studies. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 199-238. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13232>
- Drisko, C. H. (2001). Nonsurgical periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 25(1), 77-88. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2001.22250106.x>
- Dychdala, G. R. (2001). Chlorine and chlorine compounds. In S. S. Block (Ed.), *Disinfection, sterilization and preservation* (pp. 167-195). Lippincott Williams & Wilkins.
- Ebersole, J. L., Dawson, D. R., 3rd, Morford, L. A., Peyyala, R., Miller, C. S., & Gonzalez, O. A. (2013). Periodontal disease immunology: 'Double indemnity' in protecting the host. *Periodontology 2000*, 62(1), 163-202. <https://doi.org/10.1111/prd.12005>
- Elavarasu, S., Sekar, S., & Murugan, T. (2012). Host modulation by therapeutic agents. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 4(2), 256-259. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100244>
- Ellepola, A. N., & Samaranayake, L. P. (2001). Adjunctive use of chlorhexidine in oral candidoses: A review. *Oral Diseases*, 7(1), 11-17.
- Ennibi, O. K., Benrachadi, L., Bouziane, A., Haubek, D., & Poulsen, K. (2012). The highly leukotoxic JP2 clone of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in localized and generalized forms of aggressive periodontitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70(4), 318-322. <https://doi.org/10.3109/00016357.2011.642002>
- Eren, K., Ozmeric, N., & Sardas, S. (2002). Monitoring of buccal epithelial cells by alkaline comet assay (single cell gel electrophoresis technique) in cytogenetic evaluation of chlorhexidine. *Clinical Oral Investigations*, 6(3), 150-154. <https://doi.org/10.1007/s00784-002-0168-1>
- Escribano, M., Figuero, E., Martin, C., Tobias, A., Serrano, J., Roldan, S., & Herrera, D. (2016). Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents: A systematic review and network meta-analyses of the Turesky modification of the Quigley and Hein plaque index. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(12), 1059-1073. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12616>

- Etemadi, A., Eftekhari Bayati, S., Pourhajibagher, M., & Chiniforush, N. (2020). In vitro effect of antimicrobial photodynamic therapy with phycocyanin on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm on SLA titanium discs. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32(1), 20-62. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102062>
- Fardal, O., & Turnbull, R. S. (1986). A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *Journal of the American Dental Association*, 112(6), 863-869. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1986.0118>
- Faria, G., Cardoso, C. R., Larson, R. E., Silva, J. S., & Rossi, M. A. (2009). Chlorhexidine-induced apoptosis or necrosis in L929 fibroblasts: A role for endoplasmic reticulum stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 234(2), 256-265. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2008.10.012>
- Faveri, M., Mayer, M. P., Feres, M., de Figueiredo, L. C., Dewhirst, F. E., & Paster, B. J. (2008). Microbiological diversity of generalized aggressive periodontitis by 16S rRNA clonal analysis. *Oral Microbiology and Immunology*, 23(2), 112-118. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00397.x>
- Figuro, E., Herrera, D., Tobias, A., Serrano, J., Roldan, S., Escribano, M., & Martin, C. (2019). Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: A systematic review and network meta-analyses. *Journal of Clinical Periodontology*, 46(7), 723-739. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13127>
- Figuro, E., Roldan, S., Serrano, J., Escribano, M., Martin, C., & Preshaw, P. M. (2020). Efficacy of adjunctive therapies in patients with gingival inflammation: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 125-143. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13244>
- Fine, D. H., Kaplan, J. B., Kachlany, S. C., & Schreiner, H. C. (2006). How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: A model for infectious diseases. *Periodontology 2000*, 42(1), 114-157. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00189.x>
- Fine, D. H., Markowitz, K., Furgang, D., Fairlie, K., Ferrandiz, J., Nasri, C., McKiernan, M., & Gunsolley, J. (2007). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: Longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *Journal of Clinical Microbiology*, 45(12), 3859-3869. <https://doi.org/10.1128/JCM.00653-07>
- Fine, D. H., Patil, A. G., & Loos, B. G. (2018). Classification and diagnosis of aggressive periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 95-111. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12942>
- Fiorellini, J. P., & Stathopoulou, G. (2015). Anatomy of the Periodontium. In F. A. Carranza, J. L. Forrest, S. Jepsen, P. R. Klokkevold, M. G. Newman, P. Preshaw, H. H. Takei, W. Teughels (Eds.), *Carranza's Clinical Periodontology* (pp. 9-39). Saunders Elsevier.
- Fischman, S. L. (1994). A clinician's perspective on antimicrobial mouthrinses. *Journal of the American Dental Association*, 125(2), 20-22. [https://doi.org/10.1016/s0002-8177\(94\)14003-3](https://doi.org/10.1016/s0002-8177(94)14003-3)

- Fives-Taylor, P. M., Meyer, D. H., Mintz, K. P., & Brissette, C. (1999). Virulence factors of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Periodontology* 2000, 20(1), 136-167. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00161.x>
- Fu, X., Kassim, S. Y., Parks, W. C., & Heinecke, J. W. (2003). Hypochlorous acid generated by myeloperoxidase modifies adjacent tryptophan and glycine residues in the catalytic domain of matrix metalloproteinase-7 (matrilysin): An oxidative mechanism for restraining proteolytic activity during inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28403-28409. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304739200>
- Garcez, T. (2018). *Chlorhexidine*. Report and findings of the royal college of anaesthetists' 6th national audit project: Perioperative anaphylaxis. <https://www.rcoa.ac.uk/sites/default/files/documents/2019-09/NAP6-REPORT-2018-STD.pdf>
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2001). Connective tissue. In D. Thorp (Ed.), *Color atlas and text of histology* (pp. 109-128). WB Saunders Company.
- Giannelli, M., Chellini, F., Margheri, M., Tonelli, P., & Tani, A. (2008). Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: A molecular and ultrastructural investigation. *Toxicology in Vitro*, 22(2), 308-317. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2007.09.012>
- Gilbert, P., Das, J., & Foley, I. (1997). Biofilm susceptibility to antimicrobials. *Advances in Dental Research*, 11(1), 160-167. <https://doi.org/10.1177/08959374970110010701>
- Gjerme, P. (1974). Chlorhexidine in dental practice. *Journal of Clinical Periodontology*, 1(3), 143-152. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1974.tb01250.x>
- Gjerme, P., Bonesvoll, P., & Rolla, G. (1974). Relationship between plaque-inhibiting effect and retention of chlorhexidine in the human oral cavity. *Archives of Oral Biology*, 19(11), 1031-1034. [https://doi.org/10.1016/0003-9969\(74\)90090-9](https://doi.org/10.1016/0003-9969(74)90090-9)
- Gleiznys, A., Zdanaviciene, E., & Zilinskas, J. (2015). *Candida albicans* importance to denture wearers. A literature review. *Stomatologija*, 17(2), 54-66.
- Glimcher, M. J. (1987). The nature of the mineral component of bone and the mechanism of calcification. *Instructional Course Lectures*, 36(1), 49-69.
- Gonzalez-Espinosa, D., Perez-Romano, L., Guzman-Soriano, B., Arias, E., Bongiovanni, C. M., & Gutierrez, A. A. (2007). Effects of pH-neutral, super-oxidised solution on human dermal fibroblasts in vitro. *International Wound Journal*, 4(3), 241-250. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2007.00331.x>
- Gonzalez, S., Lobos, I., Guajardo, A., Celis, A., Zemelman, R., Smith, C. T., & Saglie, F. R. (1987). Yeasts in juvenile periodontitis. Preliminary observations by scanning electron microscopy. *Journal of Periodontology*, 58(2), 119-124. <https://doi.org/10.1902/jop.1987.58.2.119>
- Goodson, J. M., Offenbacher, S., Farr, D. H., & Hogan, P. E. (1985). Periodontal disease treatment by local drug delivery. *Journal of Periodontology*, 56(5), 265-272. <https://doi.org/10.1902/jop.1985.56.5.265>

- Green, J. N., Kettle, A. J., & Winterbourn, C. C. (2014). Protein chlorination in neutrophil phagosomes and correlation with bacterial killing. *Free Radical Biology and Medicine*, 77(1), 49-56. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.08.013>
- Greenstein, G., Berman, C., & Jaffin, R. (1986). Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *Journal of Periodontology*, 57(6), 370-377. <https://doi.org/10.1902/jop.1986.57.6.370>
- Greenstein, G., & Tonetti, M. (2000). The role of controlled drug delivery for periodontitis. The research, science and therapy committee of the American Academy of Periodontology. *Journal of Periodontology*, 71(1), 125-140. <https://doi.org/10.1902/jop.2000.71.1.125>
- Grisham, M. B., Jefferson, M. M., Melton, D. F., & Thomas, E. L. (1984). Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. *Journal of Biological Chemistry*, 259(16), 10404-10413.
- Haffajee, A. D., & Socransky, S. S. (1994). Microbial etiological agents of destructive periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 5(1), 78-111. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1994.tb00020.x>
- Han, S. I., Kim, Y. S., & Kim, T. H. (2008). Role of apoptotic and necrotic cell death under physiologic conditions. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 41(1), 1-10. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2008.41.1.001>
- Han, X., Kawai, T., & Taubman, M. A. (2007). Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontology* 2000, 45(1), 76-94. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2007.00215.x>
- Hardy, J. H., Newman, H. N., & Strahan, J. D. (1982). Direct irrigation and subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 9(1), 57-65. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1982.tb01222.x>
- Harriott, M. M., Bhindi, N., Kassis, S., Summitt, B., Perdakis, G., Wormer, B. A., Rankin, T. M., Kaoutzanis, C., Samaha, M., Stratton, C., & Schmitz, J. E. (2019). Comparative antimicrobial activity of commercial wound care solutions on bacterial and fungal biofilms. *Annals of Plastic Surgery*, 83(4), 404-410. <https://doi.org/10.1097/SAP.0000000000001996>
- Haubek, D., Poulsen, K., Westergaard, J., Dahlen, G., & Kilian, M. (1996). Highly toxic clone of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in geographically widespread cases of juvenile periodontitis in adolescents of African origin. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(6), 1576-1578. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.6.1576-1578.1996>
- Haynes, K. (2001). Virulence in *Candida* species. *Trends in Microbiology*, 9(12), 591-596. [https://doi.org/10.1016/s0966-842x\(01\)02237-5](https://doi.org/10.1016/s0966-842x(01)02237-5)
- Hazen, K. C., & Howell, S. A. (2007). *Candida*, *Cryptococcus*, and other yeasts of medical importance. In P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. L. Landry, & M. A. Pfaller (Eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (pp. 1762-1788). ASM Pres.
- Heinrich, V., & Lee, C. Y. (2011). Blurred line between chemotactic chase and phagocytic consumption: An immunophysical single-cell perspective. *Journal of Cell Science*, 124(18), 3041-3051. <https://doi.org/10.1242/jcs.086413>

- Henderson, B., Nair, S. P., Ward, J. M., & Wilson, M. (2003). Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Annual Review of Microbiology*, 57(1), 29-55. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090908>
- Henderson, B., Ward, J. M., & Ready, D. (2010). *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*: A triple A* periodontopathogen? *Periodontology 2000*, 54(1), 78-105. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00331.x>
- Hennessey, T. S. (1973). Some antibacterial properties of chlorhexidine. *Journal of Periodontal Research Supplement*, 8(12), 61-67. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1973.tb02166.x>
- Herrera, D., Alonso, B., Leon, R., Roldan, S., & Sanz, M. (2008). Antimicrobial therapy in periodontitis: The use of systemic antimicrobials against the subgingival biofilm. *Journal of Clinical Periodontology*, 35(8), 45-66. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2008.01260.x>
- Herrera, D., Matesanz, P., Martin, C., Oud, V., Feres, M., & Teughels, W. (2020). Adjunctive effect of locally delivered antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 239-256. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13230>
- Hikiba, H., Watanabe, E., Barrett, J. C., & Tsutsui, T. (2005). Ability of fourteen chemical agents used in dental practice to induce chromosome aberrations in Syrian hamster embryo cells. *Journal of Pharmacological Sciences*, 97(1), 146-152. <https://doi.org/10.1254/jphs.fpj04044x>
- Holmstrup, P., Plemons, J., & Meyle, J. (2018). Non-plaque-induced gingival diseases. *Journal of Periodontology*, 89(1), 28-45. <https://doi.org/10.1002/JPER.17-0163>
- Holtfreter, B., Albandar, J. M., Dietrich, T., Dye, B. A., Eaton, K. A., Eke, P. I., Papapanou, P. N., Kocher, T., & Joint, E. U. U. S. A. P. E. W. G. (2015). Standards for reporting chronic periodontitis prevalence and severity in epidemiologic studies: Proposed standards from the Joint EU/USA Periodontal Epidemiology Working Group. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(5), 407-412. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12392>
- Hsieh, S. C., Teng, N. C., Chu, C. C., Chu, Y. T., Chen, C. H., Chang, L. Y., Hsu, C. Y., Huang, C. S., Hsiao, G. Y., & Yang, J. C. (2020). The antibacterial efficacy and in vivo toxicity of sodium hypochlorite and electrolyzed oxidizing (EO) water-based endodontic irrigating solutions. *Materials (Basel)*, 13(2), 260. <https://doi.org/10.3390/ma13020260>
- Huang, Y. R., Hung, Y. C., Hsu, S. Y., Huang, Y. W., & Hwang, D. F. (2008). Application of electrolyzed water in the food industry. *Food Control*, 19(4), 329-345. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2007.08.012>
- Huffnagle, G., Herring, A. C., & Traynor, T. R. (2000). Role of fungal virulence factors in evasion of host defences. *Annual Review of Biomedical Sciences*, 2(1), 77-90. <https://doi.org/10.5016/1806-8774.2000v2p77>
- Hull, P. S. (1980). Chemical inhibition of plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 7(6), 431-442. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1980.tb02150.x>
- Huth, K. C., Quirling, M., Lenzke, S., Paschos, E., Kamereck, K., Brand, K., Hickel, R., & Ilie, N. (2011). Effectiveness of ozone against periodontal pathogenic microorganisms.

European Journal of Oral Sciences, 119(3), 204-210. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00825.x>

- Ishihara, M., Murakami, K., Fukuda, K., Nakamura, S., Kuwabara, M., Hattori, H., Fujita, M., Kiyosawa, T., & Yokoe, H. (2017). Stability of weakly acidic hypochlorous acid solution with microbicidal activity. *Biocontrol Science*, 22(4), 223-227. <https://doi.org/10.4265/bio.22.223>
- Jalaluddin, M., Jayanti, I., Gowdar, I. M., Roshan, R., Varkey, R. R., & Thirutheri, A. (2019). Antimicrobial activity of curcuma longa extract on periodontal pathogens. *Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences*, 11(2), 203-207. <https://doi.org/10.4103/JPBS.JPBS 295 18>
- Jenkins, S., Addy, M., & Wade, W. (1988). The mechanism of action of chlorhexidine. A study of plaque growth on enamel inserts in vivo. *Journal of Clinical Periodontology*, 15(7), 415-424. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1988.tb01595.x>
- Jepsen, S., Gennai, S., Hirschfeld, J., Kalemaj, Z., Buti, J., & Graziani, F. (2020). Regenerative surgical treatment of furcation defects: A systematic review and Bayesian network meta-analysis of randomized clinical trials. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 352-374. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13238>
- Johansson, A., Claesson, R., Hanstrom, L., & Kalfas, S. (2003). Serum-mediated release of leukotoxin from the cell surface of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *European Journal of Oral Sciences*, 111(3), 209-215. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0722.2003.00030.x>
- Jones, C. G. (1997). Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontology 2000*, 15(1), 55-62. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00105.x>
- Kachlany, S. C. (2010). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin: From threat to therapy. *Journal of Dental Research*, 89(6), 561-570. <https://doi.org/10.1177/0022034510363682>
- Kamiloglu, S., Sari, G., Ozdal, T., & Capanoglu, E. (2020). Guidelines for cell viability assays. *Food Frontiers*, 1(3), 332-349. <https://doi.org/10.1002/fft2.44>
- Kampf, G. (2016). Acquired resistance to chlorhexidine - is it time to establish an 'antiseptic stewardship' initiative? *Journal of Hospital Infection*, 94(3), 213-227. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2016.08.018>
- Kampf, G., Todt, D., Pfaender, S., & Steinmann, E. (2020). Persistence of coronaviruses on inanimate surfaces and their inactivation with biocidal agents. *Journal of Hospital Infection*, 104(3), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2020.01.022>
- Kaplan, J. B., Perry, M. B., MacLean, L. L., Furgang, D., Wilson, M. E., & Fine, D. H. (2001). Structural and genetic analyses of O polysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype f. *Infection and Immunity*, 69(9), 5375-5384. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.9.5375-5384.2001>
- Karkowska-Kuleta, J., Rapala-Kozik, M., & Kozik, A. (2009). Fungi pathogenic to humans: Molecular bases of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. *Acta Biochimica Polonica*, 56(2), 211-224.

- Karpinski, T. M., & Szkaradkiewicz, A. K. (2015). Chlorhexidine-pharmaco-biological activity and application. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 19(7), 1321-1326.
- Kassebaum, N. J., Bernabe, E., Dahiya, M., Bhandari, B., Murray, C. J., & Marcenes, W. (2014). Global burden of severe periodontitis in 1990-2010: A systematic review and meta-regression. *Journal of Dental Research*, 93(11), 1045-1053. <https://doi.org/10.1177/0022034514552491>
- Kassebaum, N. J., Smith, A. G. C., Bernabe, E., Fleming, T. D., Reynolds, A. E., Vos, T., Murray, C. J. L., Marcenes, W., & Collaborators, G. B. D. O. H. (2017). Global, regional, and national prevalence, incidence, and disability-adjusted life years for oral conditions for 195 countries, 1990-2015: A systematic analysis for the global burden of diseases, injuries, and risk factors. *Journal of Dental Research*, 96(4), 380-387. <https://doi.org/10.1177/0022034517693566>
- Kato, S., Nakashima, K., Inoue, M., Tomioka, J., Nonaka, K., Nishihara, T., & Kowashi, Y. (2000). Human epithelial cell death caused by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* infection. *Journal of Medical Microbiology*, 49(8), 739-745. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-8-739>
- Kaur, J., & Nobile, C. J. (2023). Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Current Opinion in Microbiology*, 71(1), 102-237. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2022.102237>
- Kennedy, M. J., & Volz, P. A. (1985). Effect of various antibiotics on gastrointestinal colonization and dissemination by *Candida albicans*. *Sabouraudia*, 23(4), 265-273. <https://doi.org/10.1080/00362178585380391>
- Khan, A. U., & Kasha, M. (1994). Singlet molecular oxygen evolution upon simple acidification of aqueous hypochlorite: Application to studies on the deleterious health effects of chlorinated drinking water. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(26), 12362-12364. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.26.12362>
- Khadori, N. (2006). Antibiotics-past, present, and future. *Medical Clinics of North America*, 90(6), 1049-1076. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2006.06.007>
- Kilian, M., Frandsen, E. V., Haubek, D., & Poulsen, K. (2006). The etiology of periodontal disease revisited by population genetic analysis. *Periodontology 2000*, 42(1), 158-179. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2006.00159.x>
- Kim, C., & Cha, Y. N. (2014). Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects. *Amino Acids*, 46(1), 89-100. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1545-6>
- Kim, H., Yoon, S. C., Lee, T. Y., & Jeong, D. (2009). Discriminative cytotoxicity assessment based on various cellular damages. *Toxicology Letters*, 184(1), 13-17. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2008.10.006>
- Kim, H. J., Lee, J. G., Kang, J. W., Cho, H. J., Kim, H. S., Byeon, H. K., & Yoon, J. H. (2008). Effects of a low concentration hypochlorous acid nasal irrigation solution on bacteria, fungi, and virus. *Laryngoscope*, 118(10), 1862-1867. <https://doi.org/10.1097/MLG.0b013e31817f4d34>

- Kim, S.-B. (2016). Development of a mouthwash alternative using a low-level hypochlorous acid solution with macroporous platinum electrodes and its application to oral health. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 9(11), 21304-21311.
- Kim, T. S., Frank, P., Eickholz, P., Eick, S., & Kim, C. K. (2009). Serotypes of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in patients with different ethnic backgrounds. *Journal of Periodontology*, 80(12), 2020-2027. <https://doi.org/10.1902/jop.2009.090241>
- Kim, Y.-r., & Nam, S.-H. (2018). Comparison of the preventive effects of slightly acidic HOCl mouthwash and CHX mouthwash for oral diseases. *Biomedical Research*, 29(8), 1718-1723. <https://doi.org/10.4066/biomedicalresearch.29-18-477>
- Kirby, A. C., Meghji, S., Nair, S. P., White, P., Reddi, K., Nishihara, T., Nakashima, K., Willis, A. C., Sim, R., Wilson, M., & et al. (1995). The potent bone-resorbing mediator of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is homologous to the molecular chaperone GroEL. *Journal of Clinical Investigation*, 96(3), 1185-1194. <https://doi.org/10.1172/JCI118150>
- Knox, W. E., Stumpf, P. K., Green, D. E., & Auerbach, V. H. (1948). The inhibition of sulfhydryl enzymes as the basis of the bactericidal action of chlorine. *Journal of Bacteriology*, 55(4), 451-458.
- Konate, K., Mavoungou, J. F., Lepengue, A. N., Aworet-Samseny, R. R., Hilou, A., Souza, A., Dicko, M. H., & M'Batchi, B. (2012). Antibacterial activity against beta- lactamase producing Methicillin and Ampicillin-resistants *Staphylococcus aureus*: Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) determination. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 11(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1476-0711-11-18>
- Kontny, E., Maslinski, W., & Marcinkiewicz, J. (2003). Anti-inflammatory activities of taurine chloramine: Implication for immunoregulation and pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 526(1), 329-340.
- Koychev, S., Dommisch, H., Chen, H., & Pischon, N. (2017). Antimicrobial effects of mastic extract against oral and periodontal pathogens. *Journal of Periodontology*, 88(5), 511-517. <https://doi.org/10.1902/jop.2017.150691>
- Kozarov, E. V., Dorn, B. R., Shelburne, C. E., Dunn, W. A., Jr., & Progulske-Fox, A. (2005). Human atherosclerotic plaque contains viable invasive *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(3), 17-18. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000155018.67835.1a>
- Kozlovsky, A., Artzi, Z., Moses, O., Kamin-Belsky, N., & Greenstein, R. B. (2006). Interaction of chlorhexidine with smooth and rough types of titanium surfaces. *Journal of Periodontology*, 77(7), 1194-1200. <https://doi.org/10.1902/jop.2006.050401>
- Kramer, A., Dissemond, J., Kim, S., Willy, C., Mayer, D., Papke, R., Tuchmann, F., & Assadian, O. (2018). Consensus on wound antisepsis: Update 2018. *Skin Pharmacology and Physiology*, 31(1), 28-58. <https://doi.org/10.1159/000481545>
- Kshitish, D., & Laxman, V. K. (2010). The use of ozonated water and 0.2% chlorhexidine in the treatment of periodontitis patients: A clinical and microbiologic study. *Indian Journal of Dental Research*, 21(3), 341-348. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.70796>

- Kuhn, D. M., George, T., Chandra, J., Mukherjee, P. K., & Ghannoum, M. A. (2002). Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: Unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(6), 1773-1780. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.6.1773-1780.2002>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018a). Analysis of cell viability by the lactate dehydrogenase assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 465-468. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095497>
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018b). Analysis of cell viability by the MTT assay. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018(6), 469-471. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095505>
- Külekcı, G., Çintan, S., & Dülger, O. (1999). Diş hekimliğinde antimikrobiyal ağız gargaralarının kullanılması. *Antibiyotik ve Kemoterapi Dergisi*, 13(3), 208-213.
- Lafaurie, G. I., Zaror, C., Diaz-Baez, D., Castillo, D. M., De Avila, J., Trujillo, T. G., & Calderon-Mendoza, J. (2018). Evaluation of substantivity of hypochlorous acid as an antiplaque agent: A randomized controlled trial. *International Journal of Dental Hygiene*, 16(4), 527-534. <https://doi.org/10.1111/idh.12342>
- Landa-Solis, C., Gonzalez-Espinosa, D., Guzman-Soriano, B., Snyder, M., Reyes-Teran, G., Torres, K., & Gutierrez, A. A. (2005). Microcyn: A novel super-oxidized water with neutral pH and disinfectant activity. *Journal of Hospital Infection*, 61(4), 291-299. <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2005.04.021>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical Reviews*, 121(6), 3390-3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- Len, S. V., Hung, Y. C., Chung, D., Anderson, J. L., Erickson, M. C., & Morita, K. (2002). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 209-212. <https://doi.org/10.1021/jf010822v>
- Levine, J. M. (2013). Dakin's solution: past, present, and future. *Advances in Skin & Wound Care*, 26(9), 410-414. <https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000432051.59348.cd>
- Lewis, M. A. O., & Williams, D. W. (2017). Diagnosis and management of oral candidosis. *British Dental Journal*, 223(9), 675-681. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2017.886>
- Li, Y. C., Kuan, Y. H., Lee, S. S., Huang, F. M., & Chang, Y. C. (2014). Cytotoxicity and genotoxicity of chlorhexidine on macrophages in vitro. *Environmental Toxicology*, 29(4), 452-458. <https://doi.org/10.1002/tox.21771>
- Lindhe, J., Heyden, G., Svanberg, G., Loe, H., & Schiott, C. R. (1970). Effect of local applications of chlorhexidine on the oral mucosa of the hamster. *Journal of Periodontal Research*, 5(3), 177-182. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00713.x>
- Lindhe, J., Karring, T., & Araujo, M. (2015). Anatomy of the periodontal tissues. In N. P. Lang & J. Lindhe (Eds.), *Clinical Periodontology and Implant Dentistry* (pp. 3-47). John Wiley&Sons.

- Lindhe, J., Koch, G., & Mansson, U. (1966). The effect of supervised oral hygiene on the gingiva of children. Effect of mouth rinsings. *Journal of Periodontal Research*, 1(4), 268-275. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01871.x>
- Listgarten, M. A., Lai, C. H., & Young, V. (1993). Microbial composition and pattern of antibiotic resistance in subgingival microbial samples from patients with refractory periodontitis. *Journal of Periodontology*, 64(3), 155-161. <https://doi.org/10.1902/jop.1993.64.3.155>
- Loe, H., Anerud, A., Boysen, H., & Smith, M. (1978). The natural history of periodontal disease in man. The rate of periodontal destruction before 40 years of age. *Journal of Periodontology*, 49(12), 607-620. <https://doi.org/10.1902/jop.1978.49.12.607>
- Loe, H., & Schiott, C. R. (1970). The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *Journal of Periodontal Research*, 5(2), 79-83. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00696.x>
- Lopez, R., Dahlen, G., Retamales, C., & Baelum, V. (2011). Clustering of subgingival microbial species in adolescents with periodontitis. *European Journal of Oral Sciences*, 119(2), 141-150. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2011.00808.x>
- Machtei, E. E., Frankenthal, S., Levi, G., Elimelech, R., Shoshani, E., Rosenfeld, O., Tagger-Green, N., & Shlomi, B. (2012). Treatment of peri-implantitis using multiple applications of chlorhexidine chips: A double-blind, randomized multi-centre clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(12), 1198-1205. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12006>
- MacNeill, S., Rindler, E., Walker, A., Brown, A. R., & Cobb, C. M. (1997). Effects of tetracycline hydrochloride and chlorhexidine gluconate on *Candida albicans*. An in vitro study. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(10), 753-760. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb00193.x>
- Mainnemare, A., Megarbane, B., Soueidan, A., Daniel, A., & Chapple, I. L. (2004). Hypochlorous acid and taurine-N-monochloramine in periodontal diseases. *Journal of Dental Research*, 83(11), 823-831. <https://doi.org/10.1177/154405910408301101>
- Mandel, I. D. (1994). Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *Journal of the American Dental Association*, 125(2), 2-10. [https://doi.org/10.1016/s0002-8177\(94\)14001-x](https://doi.org/10.1016/s0002-8177(94)14001-x)
- Mangan, D. F., Taichman, N. S., Lally, E. T., & Wahl, S. M. (1991). Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes. *Infection and Immunity*, 59(9), 3267-3272. <https://doi.org/10.1128/iai.59.9.3267-3272.1991>
- Marcinkiewicz, J., Czajkowska, B., Grabowska, A., Kasproicz, A., & Kociszewska, B. (1994). Differential effects of chlorination of bacteria on their capacity to generate NO, TNF-alpha and IL-6 in macrophages. *Immunology*, 83(4), 611-616.
- Mariotti, A. (1993). The extracellular matrix of the periodontium: Dynamic and interactive tissues. *Periodontology 2000*, 3(1), 39-63. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1993.tb00231.x>

- Mariotti, A. J., & Rumpf, D. A. (1999). Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *Journal of Periodontology*, 70(12), 1443-1448. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.12.1443>
- Marques da Silva, R., Caugant, D. A., Lingaas, P. S., Geiran, O., Tronstad, L., & Olsen, I. (2005). Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* but not bacteria of the red complex in aortic aneurysms by multiplex polymerase chain reaction. *Journal of Periodontology*, 76(4), 590-594. <https://doi.org/10.1902/jop.2005.76.4.590>
- Mayrhofer, S., Domig, K. J., Mair, C., Zitz, U., Huys, G., & Kneifel, W. (2008). Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(12), 3745-3748. <https://doi.org/10.1128/AEM.02849-07>
- McCourtie, J., MacFarlane, T. W., & Samaranayake, L. P. (1985). Effect of chlorhexidine gluconate on the adherence of *Candida* species to denture acrylic. *Journal of Medical Microbiology*, 20(1), 97-104. <https://doi.org/10.1099/00222615-20-1-97>
- McCracken, G. (2008). Chlorhexidine varnish may be useful adjunct to routine periodontal therapy? *Evidence-Based Dentistry*, 9(3), 76. <https://doi.org/10.1038/sj.ebd.6400595>
- McCulloch, C. A., & Melcher, A. H. (1983). Cell density and cell generation in the periodontal ligament of mice. *American Journal of Anatomy*, 167(1), 43-58. <https://doi.org/10.1002/aja.1001670105>
- McKee, M. D., Zalzal, S., & Nanci, A. (1996). Extracellular matrix in tooth cementum and mantle dentin: Localization of osteopontin and other noncollagenous proteins, plasma proteins, and glycoconjugates by electron microscopy. *Anatomical Record*, 245(2), 293-312. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199606\)245:2<293::AID-AR13>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199606)245:2<293::AID-AR13>3.0.CO;2-K)
- McKenna, S. M., & Davies, K. J. (1988). The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochemical Journal*, 254(3), 685-692. <https://doi.org/10.1042/bj2540685>
- Medvedec Mikic, I., Cigic, L., Kero, D., Kalibovic Govorko, D., Prpic Mehicic, G., Tambic Andrasevic, A., & Simeon, P. (2018). Antimicrobial effectiveness of polyhexamethylene biguanide on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *Medicinski Glasnik*, 15(2), 132-138. <https://doi.org/10.17392/959-18>
- Mekalanos, J. J. (1992). Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *Journal of Bacteriology*, 174(1), 1-7. <https://doi.org/10.1128/jb.174.1.1-7.1992>
- Michaelis, J., Vissers, M. C., & Winterbourn, C. C. (1992). Different effects of hypochlorous acid on human neutrophil metalloproteinases: Activation of collagenase and inactivation of collagenase and gelatinase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 292(2), 555-562. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(92\)90030-z](https://doi.org/10.1016/0003-9861(92)90030-z)
- Migliarina, F., & Ferro, S. (2014). A modern approach to disinfection, as old as the evolution of vertebrates. *Healthcare (Basel)*, 2(4), 516-526. <https://doi.org/10.3390/healthcare2040516>

- Miller, A. (1984). Collagen: the organic matrix of bone. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences*, 304(1121), 455-477. <https://doi.org/10.1098/rstb.1984.0040>
- Mima, E. G., Pavarina, A. C., Vargas Fda, S., Giampaolo, E. T., Machado, A. L., & Vergani, C. E. (2011). Effectiveness of chlorhexidine on the disinfection of complete dentures colonised with fluconazole-resistant *Candida albicans*: In vitro study. *Mycoses*, 54(5), 506-512. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2010.01968.x>
- Mısırlıgil, A. (2004). Kandida cinsi mantarlar. In T. Cengiz, A. Mısırlıgil, & M. Aydın (Eds.), *Tıp ve diş hekimliğinde genel ve özel mikrobiyoloji* (pp. 1109-1118). Güneş yayınevi.
- Mısırlıgil, A., Ayhan, N., Yumul, Ç., & Hakküdenler, Y. (1982). Protez stomatitli bireylerin lezyonlarından izole edilen *Candida* türleri. *Mikrobiyoloji Bulteni*, 3(1), 165-168.
- Moghadam, B. K., Drisko, C. L., & Gier, R. E. (1991). Chlorhexidine mouthwash-induced fixed drug eruption. Case report and review of the literature. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, 71(4), 431-434. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90424-b](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90424-b)
- Mohammadi, Z., & Asgary, S. (2015). A comparative study of antifungal activity of endodontic irrigants. *Iranian Endodontic Journal*, 10(2), 144-147.
- Mombelli, A., Gmur, R., Lang, N. P., Corbert, E., & Frey, J. (1999). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in Chinese adults. Serotype distribution and analysis of the leukotoxin gene promoter locus. *Journal of Clinical Periodontology*, 26(8), 505-510. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.1999.260803.x>
- Morita, C., Nishida, T., & Ito, K. (2011). Biological toxicity of acid electrolyzed functional water: Effect of oral administration on mouse digestive tract and changes in body weight. *Archives of Oral Biology*, 56(4), 359-366. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.016>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55-63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Muller, H. D., Eick, S., Moritz, A., Lussi, A., & Gruber, R. (2017). Cytotoxicity and antimicrobial activity of oral rinses in vitro. *Biomed Research International*, 2017(1), 401-723. <https://doi.org/10.1155/2017/4019723>
- Naruishi, K., Takashiba, S., Chou, H. H., Arai, H., Nishimura, F., & Murayama, Y. (1999). Role of soluble interleukin-6 receptor in inflamed gingiva for binding of interleukin-6 to gingival fibroblasts. *Journal of Periodontal Research*, 34(6), 296-300. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1999.tb02257.x>
- Nawrot-Hadzik, I., Matkowski, A., Pitulaj, A., Sterczala, B., Olchow, C., Szewczyk, A., & Choromanska, A. (2021). In vitro gingival wound healing activity of extracts from reynoutria japonica houtt rhizomes. *Pharmaceutics*, 13(11), 1764. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111764>
- Needleman, I., Garcia, R., Gkraniyas, N., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Iorio, A. D., Moreno, F., & Petrie, A. (2018). Mean annual attachment, bone level, and tooth loss: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 112-129. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12943>

- Needleman, I., Nibali, L., & Di Iorio, A. (2015). Professional mechanical plaque removal for prevention of periodontal diseases in adults-systematic review update. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 12-35. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12341>
- Neely, A. L. (2012). Essential oil mouthwash (EOMW) may be equivalent to chlorhexidine (CHX) for long-term control of gingival inflammation but CHX appears to perform better than EOMW in plaque control. *Journal of Evidence-Based Dental Practice*, 12(3), 69-72. [https://doi.org/10.1016/S1532-3382\(12\)70017-9](https://doi.org/10.1016/S1532-3382(12)70017-9)
- Nibali, L., Koidou, V. P., Nieri, M., Barbato, L., Pagliaro, U., & Cairo, F. (2020). Regenerative surgery versus access flap for the treatment of intra-bony periodontal defects: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 320-351. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13237>
- Nordbo, H., Eriksen, H. M., Rolla, G., Attramadal, A., & Solheim, H. (1982). Iron staining of the acquired enamel pellicle after exposure to tannic acid or chlorhexidine: Preliminary report. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 90(2), 117-123. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1982.tb01533.x>
- Norskov-Lauritsen, N., & Kilian, M. (2006). Reclassification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus paraphrophilus* and *Haemophilus segnis* as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* gen. nov., comb. nov., *Aggregatibacter aphrophilus* comb. nov. and *Aggregatibacter segnis* comb. nov., and emended description of *Aggregatibacter aphrophilus* to include V factor-dependent and V factor-independent isolates. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(9), 2135-2146. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.64207-0>
- Odorcic, S., Haas, W., Gilmore, M. S., & Dohlman, C. H. (2015). Fungal infections after boston type 1 keratoprosthesis implantation: Literature review and in vitro antifungal activity of hypochlorous acid. *Cornea*, 34(12), 1599-1605. <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000000639>
- Oliveira, S. A., Zambrana, J. R., Iorio, F. B., Pereira, C. A., & Jorge, A. O. (2014). The antimicrobial effects of Citrus limonum and Citrus aurantium essential oils on multi-species biofilms. *Brazilian Oral Research*, 28(1), 22-27. <https://doi.org/10.1590/s1806-83242013005000024>
- Ortega-Pena, S., Hidalgo-Gonzalez, C., Robson, M. C., & Krotzsch, E. (2017). In vitro microbicidal, anti-biofilm and cytotoxic effects of different commercial antiseptics. *International Wound Journal*, 14(3), 470-479. <https://doi.org/10.1111/iwj.12625>
- Overholt, B., Reynolds, K., & Wheeler, D. (2018). 1151. A safer, more effective method for cleaning and disinfecting GI endoscopic procedure rooms. *Open Forum Infectious Diseases*, 5(1), 346-346. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofy210.984>
- Page, R. C., & Kornman, K. S. (1997). The pathogenesis of human periodontitis: An introduction. *Periodontology 2000*, 14(1), 9-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1997.tb00189.x>
- Page, R. C., Sims, T. J., Engel, L. D., Moncla, B. J., Bainbridge, B., Stray, J., & Darveau, R. P. (1991). The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype-specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infection and Immunity*, 59(10), 3451-3462. <https://doi.org/10.1128/iai.59.10.3451-3462.1991>

- Papapanou, P. N., Sanz, M., Buduneli, N., Dietrich, T., Feres, M., Fine, D. H., Flemmig, T. F., Garcia, R., Giannobile, W. V., Graziani, F., Greenwell, H., Herrera, D., Kao, R. T., Kebschull, M., Kinane, D. F., Kirkwood, K. L., Kocher, T., Kornman, K. S., Kumar, P. S., Loos, B. G., Machtei, E., Meng, H., Mombelli, A., Needleman, I., Offenbacher, S., Seymour, G. J., Teles, R., & Tonetti, M. S. (2018). Periodontitis: Consensus report of workgroup 2 of the 2017 world workshop on the classification of periodontal and peri-implant diseases and conditions. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(20), 162-170. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12946>
- Park, G. W., Boston, D. M., Kase, J. A., Sampson, M. N., & Sobsey, M. D. (2007). Evaluation of liquid- and fog-based application of Sterilox hypochlorous acid solution for surface inactivation of human norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(14), 4463-4468. <https://doi.org/10.1128/AEM.02839-06>
- Pattison, A. M. (1996). The use of hand instruments in supportive periodontal treatment. *Periodontology* 2000, 12(1), 71-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00084.x>
- Paturel, L., Casalta, J. P., Habib, G., Nezri, M., & Raoult, D. (2004). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis. *Clinical Microbiology and Infection*, 10(2), 98-118. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2004.00794.x>
- Pavicic, M. J., van Winkelhoff, A. J., Douque, N. H., Steures, R. W., & de Graaff, J. (1994). Microbiological and clinical effects of metronidazole and amoxicillin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. A 2-year evaluation. *Journal of Clinical Periodontology*, 21(2), 107-112. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1994.tb00287.x>
- Periasamy, S., & Kolenbrander, P. E. (2009). *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* builds mutualistic biofilm communities with *Fusobacterium nucleatum* and *Veillonella* species in saliva. *Infection and Immunity*, 77(9), 3542-3551. <https://doi.org/10.1128/IAI.00345-09>
- Petersilka, G. J. (2011). Subgingival air-polishing in the treatment of periodontal biofilm infections. *Periodontology* 2000, 55(1), 124-142. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00342.x>
- Petersilka, G. J., Ehmke, B., & Flemmig, T. F. (2002). Antimicrobial effects of mechanical debridement. *Periodontology* 2000, 28(1), 56-71. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280103.x>
- Pfaller, M. A., Sheehan, D. J., & Rex, J. H. (2004). Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: Lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(2), 268-280. <https://doi.org/10.1128/CMR.17.2.268-280.2004>
- Pinto da Silva, P., & Gilula, N. B. (1972). Gap junctions in normal and transformed fibroblasts in culture. *Experimental Cell Research*, 71(2), 393-401. [https://doi.org/10.1016/0014-4827\(72\)90309-6](https://doi.org/10.1016/0014-4827(72)90309-6)
- Pitcher, G. R., Newman, H. N., & Strahan, J. D. (1980). Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. *Journal of Clinical Periodontology*, 7(4), 300-308. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1980.tb01972.x>

- Polak, D., Wilensky, A., Antonoglou, G. N., Shapira, L., Goldstein, M., & Martin, C. (2020). The efficacy of pocket elimination/reduction compared to access flap surgery: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 303-319. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13246>
- Poulain, D. (2015). *Candida albicans*, plasticity and pathogenesis. *Critical Reviews in Microbiology*, 41(2), 208-217. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.813904>
- Pristov, K. E., & Ghannoum, M. A. (2019). Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, 25(7), 792-798. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2019.03.028>
- Pucher, J. J., & Daniel, J. C. (1992). The effects of chlorhexidine digluconate on human fibroblasts in vitro. *Journal of Periodontology*, 63(6), 526-532. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.6.526>
- Puig Silla, M., Montiel Company, J. M., & Almerich Silla, J. M. (2008). Use of chlorhexidine varnishes in preventing and treating periodontal disease. A review of the literature. *Medicina Oral, Patologia Oral, Cirugia Bucal*, 13(4), 257-260.
- Pullar, J. M., Vissers, M. C., & Winterbourn, C. C. (2000). Living with a killer: The effects of hypochlorous acid on mammalian cells. *IUBMB Life*, 50(4-5), 259-266. <https://doi.org/10.1080/713803731>
- Quirynen, M., Teughels, W., De Soete, M., & van Steenberghe, D. (2002). Topical antiseptics and antibiotics in the initial therapy of chronic adult periodontitis: microbiological aspects. *Periodontology 2000*, 28(1), 72-90. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2002.280104.x>
- Rabe, P., Twetman, S., Kinnby, B., Svensater, G., & Davies, J. R. (2015). Effect of fluoride and chlorhexidine digluconate mouthrinses on plaque biofilms. *Open Dentistry Journal*, 9(1), 106-111. <https://doi.org/10.2174/1874210601509010106>
- Rabie, G., Lally, E. T., & Shenker, B. J. (1988). Immunosuppressive properties of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin. *Infection and Immunity*, 56(1), 122-127. <https://doi.org/10.1128/iai.56.1.122-127.1988>
- Ramberg, P., Furuichi, Y., Volpe, A. R., Gaffar, A., & Lindhe, J. (1996). The effects of antimicrobial mouthrinses on de novo plaque formation at sites with healthy and inflamed gingivae. *Journal of Clinical Periodontology*, 23(1), 7-11. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1996.tb00497.x>
- Rams, T. E., & Slots, J. (1996). Local delivery of antimicrobial agents in the periodontal pocket. *Periodontology 2000*, 10(1), 139-159. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.1996.tb00072.x>
- Ramseier, C. A., Woelber, J. P., Kitzmann, J., Detzen, L., Carra, M. C., & Bouchard, P. (2020). Impact of risk factor control interventions for smoking cessation and promotion of healthy lifestyles in patients with periodontitis: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 90-106. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13240>
- Rani, S. A., Hoon, R., Najafi, R. R., Khosrovi, B., Wang, L., & Debarov, D. (2014). The in vitro antimicrobial activity of wound and skin cleansers at nontoxic concentrations.

- Ribeiro, D. A., Bazo, A. P., da Silva Franchi, C. A., Marques, M. E., & Salvadori, D. M. (2004). Chlorhexidine induces DNA damage in rat peripheral leukocytes and oral mucosal cells. *Journal of Periodontal Research*, 39(5), 358-361. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2004.00759.x>
- Ribeiro, D. A., Scolastici, C., De Lima, P. L., Marques, M. E., & Salvadori, D. M. (2005). Genotoxicity of antimicrobial endodontic compounds by single cell gel (comet) assay in Chinese hamster ovary (CHO) cells. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 99(5), 637-640. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.07.010>
- Rincon, J. C., Young, W. G., & Bartold, P. M. (2006). The epithelial cell rests of Malassez-a role in periodontal regeneration? *Journal of Periodontal Research*, 41(4), 245-252. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2006.00880.x>
- Rodenburg, J. P., van Winkelhoff, A. J., Winkel, E. G., Goene, R. J., Abbas, F., & de Graff, J. (1990). Occurrence of *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in severe periodontitis in relation to age and treatment history. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(6), 392-399. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1990.tb00036.x>
- Romanos, G. E., & Bernimoulin, J. P. (1990). Collagen as a basic element of the periodontium: Immunohistochemical aspects in the human and animal. 1. Gingiva and alveolar bone. *Parodontologie*, 1(4), 363-375.
- Rosan, B., & Lamont, R. J. (2000). Dental plaque formation. *Microbes and Infection*, 2(13), 1599-1607. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)01316-2](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)01316-2)
- Rose, M. A., Garcez, T., Savic, S., & Garvey, L. H. (2019). Chlorhexidine allergy in the perioperative setting: A narrative review. *British Journal of Anaesthesia*, 123(1), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2019.01.033>
- Rosen, H., & Klebanoff, S. J. (1982). Oxidation of *Escherichia coli* iron centers by the myeloperoxidase-mediated microbicidal system. *Journal of Biological Chemistry*, 257(22), 13731-13735.
- Rosling, B., Wannfors, B., Volpe, A. R., Furuichi, Y., Ramberg, P., & Lindhe, J. (1997). The use of a triclosan/copolymer dentifrice may retard the progression of periodontitis. *Journal of Clinical Periodontology*, 24(12), 873-880. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1997.tb01205.x>
- Russell, A. D. (1990). Bacterial spores and chemical sporicidal agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(2), 99-119. <https://doi.org/10.1128/CMR.3.2.99>
- Russell, A. D. (1999). Bacterial resistance to disinfectants: Present knowledge and future problems. *Journal of Hospital Infection*, 43(1), 57-68. [https://doi.org/10.1016/s0195-6701\(99\)90066-x](https://doi.org/10.1016/s0195-6701(99)90066-x)
- Rutala, W. A., Cole, E. C., Thomann, C. A., & Weber, D. J. (1998). Stability and bactericidal activity of chlorine solutions. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 19(5), 323-327. <https://doi.org/10.1086/647822>

- Saarela, M. H., Dogan, B., Alaluusua, S., & Asikainen, S. (1999). Persistence of oral colonization by the same *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strain(s). *Journal of Periodontology*, 70(5), 504-509. <https://doi.org/10.1902/jop.1999.70.5.504>
- Saglie, F. R., Carranza, F. A., Jr., Newman, M. G., Cheng, L., & Lewin, K. J. (1982). Identification of tissue-invading bacteria in human periodontal disease. *Journal of Periodontal Research*, 17(5), 452-455. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1982.tb02024.x>
- Saglie, F. R., Marfany, A., & Camargo, P. (1988). Intragingival occurrence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides gingivalis* in active destructive periodontal lesions. *Journal of Periodontology*, 59(4), 259-265. <https://doi.org/10.1902/jop.1988.59.4.259>
- Saiki, K., Konishi, K., Gomi, T., Nishihara, T., & Yoshikawa, M. (2001). Reconstitution and purification of cytolethal distending toxin of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Microbiology and Immunology*, 45(6), 497-506. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2001.tb02650.x>
- Saito, A., Hosaka, Y., Nakagawa, T., Seida, K., Yamada, S., Takazoe, I., & Okuda, K. (1993). Significance of serum antibody against surface antigens of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in patients with adult periodontitis. *Oral Microbiology and Immunology*, 8(3), 146-153. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302x.1993.tb00657.x>
- Sakarya, S., Gunay, N., Karakulak, M., Ozturk, B., & Ertugrul, B. (2014). Hypochlorous acid: An ideal wound care agent with powerful microbicidal, antibiofilm, and wound healing potency. *Wounds*, 26(12), 342-350.
- Salvi, G. E., & Lang, N. P. (2005). Host response modulation in the management of periodontal diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(6), 108-129. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2005.00785.x>
- Salvi, G. E., Stahli, A., Schmidt, J. C., Ramseier, C. A., Sculean, A., & Walter, C. (2020). Adjunctive laser or antimicrobial photodynamic therapy to non-surgical mechanical instrumentation in patients with untreated periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 176-198. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13236>
- Sam, C. H., & Lu, H. K. (2009). The role of hypochlorous acid as one of the reactive oxygen species in periodontal disease. *Journal of Dental Sciences*, 4(2), 45-54. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1991-7902\(09\)60008-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1991-7902(09)60008-8)
- Sanchez, I. R., Nusbaum, K. E., Swaim, S. F., Hale, A. S., Henderson, R. A., & McGuire, J. A. (1988). Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and *Staphylococcus aureus*. *Veterinary Surgery*, 17(4), 182-185. <https://doi.org/10.1111/j.1532-950x.1988.tb00995.x>
- Sanz-Sanchez, I., Montero, E., Citterio, F., Romano, F., Molina, A., & Aimetti, M. (2020). Efficacy of access flap procedures compared to subgingival debridement in the treatment of periodontitis. A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 282-302. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13259>
- Sanz, M., Baumer, A., Buduneli, N., Dommisch, H., Farina, R., Kononen, E., Linden, G., Meyle, J., Preshaw, P. M., Quirynen, M., Roldan, S., Sanchez, N., Sculean, A., Slot, D.

- E., Trombelli, L., West, N., & Winkel, E. (2015). Effect of professional mechanical plaque removal on secondary prevention of periodontitis and the complications of gingival and periodontal preventive measures: Consensus report of group 4 of the 11th European Workshop on Periodontology on effective prevention of periodontal and peri-implant diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 214-220. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12367>
- Sanz, M., Ceriello, A., Buysschaert, M., Chapple, I., Demmer, R. T., Graziani, F., Herrera, D., Jepsen, S., Lione, L., Madianos, P., Mathur, M., Montanya, E., Shapira, L., Tonetti, M., & Vegh, D. (2018). Scientific evidence on the links between periodontal diseases and diabetes: Consensus report and guidelines of the joint workshop on periodontal diseases and diabetes by the international diabetes federation and the european federation of periodontology. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(2), 138-149. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12808>
- Sanz, M., Herrera, D., Kebschull, M., Chapple, I., Jepsen, S., Beglundh, T., Sculean, A., Tonetti, M. S., Participants, E. F. P. W., & Methodological, C. (2020). Treatment of stage I-III periodontitis-The EFP S3 level clinical practice guideline. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 4-60. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13290>
- Sanz, M., Kornman, K., & Working group 3 of joint, E. F. P. A. A. P. w. (2013). Periodontitis and adverse pregnancy outcomes: Consensus report of the joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(14), 164-169. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12083>
- Saygı, Ş. (2003). Deneysel toksikolojide toksisite testleri ve test sonuçlarının önemi. *Gülhane Tıp Dergisi*, 45(3), 291-298.
- Saygin, N. E., Giannobile, W. V., & Somerman, M. J. (2000). Molecular and cell biology of cementum. *Periodontology 2000*, 24(1), 73-98. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240105.x>
- Schiott, C. R., Loe, H., Jensen, S. B., Kilian, M., Davies, R. M., & Glavind, K. (1970). The effect of chlorhexidine mouthrinses on the human oral flora. *Journal of Periodontal Research*, 5(2), 84-89. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1970.tb00697.x>
- Schmidt, J., Zyba, V., Jung, K., Rinke, S., Haak, R., Mausberg, R. F., & Ziebolz, D. (2016). Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells - an in vitro study. *Drug and Chemical Toxicology*, 39(3), 322-330. <https://doi.org/10.3109/01480545.2015.1121274>
- Schmidt, J., Zyba, V., Jung, K., Rinke, S., Haak, R., Mausberg, R. F., & Ziebolz, D. (2018). Effects of octenidine mouth rinse on apoptosis and necrosis of human fibroblasts and epithelial cells - an in vitro study. *Drug and Chemical Toxicology*, 41(2), 182-187. <https://doi.org/10.1080/01480545.2017.1337124>
- Schroeder, H. E. (1986). Development, structure, and function of periodontal tissues. In *The Periodontium* (pp. 23-323). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-71261-6-4>
- Schroeder, H. E., & Theilade, J. (1966). Electron microscopy of normal human gingival epithelium. *Journal of Periodontal Research*, 1(2), 95-119. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.1966.tb01850.x>

- Selkon, J. B., Cherry, G. W., Wilson, J. M., & Hughes, M. A. (2006). Evaluation of hypochlorous acid washes in the treatment of chronic venous leg ulcers. *Journal of Wound Care*, 15(1), 33-37. <https://doi.org/10.12968/jowc.2006.15.1.26861>
- Selvig, K. A. (1965). The fine structure of human cementum. *Acta Odontologica Scandinavica*, 23(4), 423-441. <https://doi.org/10.3109/00016356509007523>
- Seneviratne, C. J., Jin, L., & Samaranayake, L. P. (2008). Biofilm lifestyle of *Candida*: A mini review. *Oral Diseases*, 14(7), 582-590. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x>
- Serrano, J., Escribano, M., Roldan, S., Martin, C., & Herrera, D. (2015). Efficacy of adjunctive anti-plaque chemical agents in managing gingivitis: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 106-138. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12331>
- Shenker, B. J., Hoffmaster, R. H., Zekavat, A., Yamaguchi, N., Lally, E. T., & Demuth, D. R. (2001). Induction of apoptosis in human T cells by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* cytolethal distending toxin is a consequence of G2 arrest of the cell cycle. *Journal of Immunology*, 167(1), 435-441. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.435>
- Sherman, R. G., Prusinski, L., Ravenel, M. C., & Joralmon, R. A. (2002). Oral candidosis. *Quintessence International*, 33(7), 521-532.
- Ship, J. A., & Beck, J. D. (1996). Ten-year longitudinal study of periodontal attachment loss in healthy adults. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 81(3), 281-290. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(96\)80327-1](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(96)80327-1)
- Shokrzadeh, M., & Modanloo, M. (2017). An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Research in Medical and Dental Science*, 5(2), 33-41. <https://doi.org/10.5455/jrmds.2017526>
- Simpson, H. E. (1965). The degeneration of the rests of malassez with age as observed by the apoxestic technique. *Journal of Periodontology*, 36(1), 288-291. <https://doi.org/10.1902/jop.1965.36.4.288>
- Slots, J. (2004). Systemic antibiotics in periodontics. *Journal of Periodontology*, 75(1), 1553-1565. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.11.1553>
- Slots, J. (2012). Low-cost periodontal therapy. *Periodontology 2000*, 60(1), 110-137. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2011.00429.x>
- Slots, J., Feik, D., & Rams, T. E. (1990). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Bacteroides intermedius* in human periodontitis: Age relationship and mutual association. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(9), 659-662.
- Slots, J., & Rams, T. E. (1990). Antibiotics in periodontal therapy: Advantages and disadvantages. *Journal of Clinical Periodontology*, 17(7), 479-493. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2710.1992.tb01220.x>
- Slots, J., & Rams, T. E. (1991). New views on periodontal microbiota in special patient categories. *Journal of Clinical Periodontology*, 18(6), 411-420. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1991.tb02309.x>

- Socransky, S. S., & Haffajee, A. D. (1992). The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. *Journal of Periodontology*, 63(4), 322-331. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.4s.322>
- Socransky, S. S., Haffajee, A. D., Cugini, M. A., Smith, C., & Kent, R. L., Jr. (1998). Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(2), 134-144. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1998.tb02419.x>
- Socransky, S. S., Smith, C., & Haffajee, A. D. (2002). Subgingival microbial profiles in refractory periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 29(3), 260-268. <https://doi.org/10.1034/j.1600-051x.2002.290313.x>
- Sodek, J., & McKee, M. D. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology* 2000, 24(1), 99-126. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0757.2000.2240106.x>
- Sogut, M. U. (2013). Jermisid ajanlardan katyonik deterjanlar. *Journal of Experimental and Clinical Medicine*, 30(1), 75-79.
- Soskolne, W. A., Heasman, P. A., Stabholz, A., Smart, G. J., Palmer, M., Flashner, M., & Newman, H. N. (1997). Sustained local delivery of chlorhexidine in the treatment of periodontitis: A multi-center study. *Journal of Periodontology*, 68(1), 32-38. <https://doi.org/10.1902/jop.1997.68.1.32>
- Southard, S. R., Drisko, C. L., Killoy, W. J., Cobb, C. M., & Tira, D. E. (1989). The effect of 2% chlorhexidine digluconate irrigation on clinical parameters and the level of *Bacteroides gingivalis* in periodontal pockets. *Journal of Periodontology*, 60(6), 302-309. <https://doi.org/10.1902/jop.1989.60.6.302>
- Sritairat, N., Nukul, N., Inthasame, P., Sansuk, A., Prasirt, J., Leewatthanakorn, T., Piamsawad, U., Dejrudee, A., Panichayupakaranant, P., Pangsomboon, K., Chanowanna, N., Hintao, J., Teanpaisan, R., Chaethong, W., Yongstar, P., Pruphetkaew, N., Chongsuvivatwong, V., & Nittayananta, W. (2011). Antifungal activity of lawsone methyl ether in comparison with chlorhexidine. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, 40(1), 90-96. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2010.00921.x>
- Stoddart, M. J. (2011). Cell viability assays: Introduction. *Methods in Molecular Biology*, 740(1), 1-6. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-108-6_1
- Stoffel, J. J., Kohler Riedi, P. L., & Hadj Romdhane, B. (2020). A multimodel regime for evaluating effectiveness of antimicrobial wound care products in microbial biofilms. *Wound Repair and Regeneration*, 28(4), 438-447. <https://doi.org/10.1111/wrr.12806>
- Stone, S. J., Heasman, P. A., Staines, K. S., & McCracken, G. I. (2015). The impact of structured plaque control for patients with gingival manifestations of oral lichen planus: A randomized controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4), 356-362. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12385>
- Stroman, D. W., Mintun, K., Epstein, A. B., Brimer, C. M., Patel, C. R., Branch, J. D., & Najafi-Tagol, K. (2017). Reduction in bacterial load using hypochlorous acid hygiene solution on ocular skin. *Clinical Ophthalmology (Auckland, NZ)*, 11(1), 707-714. <https://doi.org/10.2147/OPTH.S132851>

- Sukumaran, S. K., Vadakkekuttikal, R. J., & Kanakath, H. (2020). Comparative evaluation of the effect of curcumin and chlorhexidine on human fibroblast viability and migration: An in vitro study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 24(2), 109-116. https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_173_19
- Suvan, J., Leira, Y., Moreno Sancho, F. M., Graziani, F., Derks, J., & Tomasi, C. (2020). Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 155-175. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13245>
- Taichman, N. S., Iwase, M., Lally, E. T., Shattil, S. J., Cunningham, M. E., & Korchak, H. M. (1991). Early changes in cytosolic calcium and membrane potential induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin in susceptible and resistant target cells. *Journal of Immunology*, 147(10), 3587-3594.
- Takada, K., Saito, M., Tsuzukibashi, O., Kawashima, Y., Ishida, S., & Hirasawa, M. (2010). Characterization of a new serotype g isolate of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Molecular Oral Microbiology*, 25(3), 200-206. <https://doi.org/10.1111/j.2041-1014.2010.00572.x>
- Tartaglia, G. M., Tadakamadla, S. K., Connelly, S. T., Sforza, C., & Martin, C. (2019). Adverse events associated with home use of mouthrinses: A systematic review. *Therapeutic Advances in Drug Safety*, 10(1), 1-16. <https://doi.org/10.1177/2042098619854881>
- Teixeira, R. E., Mendes, E. N., Roque de Carvalho, M. A., Nicoli, J. R., Farias Lde, M., & Magalhaes, P. P. (2006). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype-specific genotypes and periodontal status in Brazilian subjects. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(3), 182-188. <https://doi.org/10.1139/w05-121>
- Temiz, H., Temiz, S., & Kaya, Ş. (2015). Çeşitli klinik örneklerden izole edilen *Kandida* türlerinin dağılımı ve antifungal duyarlılıkları. *Okmeydanı Tıp Dergisi* 31(1), 13-17. <https://doi.org/10.5222/otd.2015.013>
- Teughels, W., Feres, M., Oud, V., Martin, C., Matesanz, P., & Herrera, D. (2020). Adjunctive effect of systemic antimicrobials in periodontitis therapy: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Clinical Periodontology*, 47(22), 257-281. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13264>
- Thomas, A., Thakur, S., & Mhambrey, S. (2015). Comparison of the antimicrobial efficacy of chlorhexidine, sodium fluoride, fluoride with essential oils, alum, green tea, and garlic with lime mouth rinses on cariogenic microbes. *Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry*, 5(4), 302-308. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.161759>
- Tintelnot, K., Haase, G., Seibold, M., Bergmann, F., Staemmler, M., Franz, T., & Naumann, D. (2000). Evaluation of phenotypic markers for selection and identification of *Candida dubliniensis*. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1599-1608. <https://doi.org/10.1128/JCM.38.4.1599-1608.2000>
- Tirali, R. E., Bodur, H., Sipahi, B., & Sungurtekin, E. (2013). Evaluation of the antimicrobial activities of chlorhexidine gluconate, sodium hypochlorite and octenidine hydrochloride in vitro. *Australian Endodontic Journal*, 39(1), 15-18. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2010.00266.x>

- Tobgi, R. S., Samaranayake, L. P., & Macfarlane, T. W. (1987). Adhesion of *Candida albicans* to buccal epithelial cells exposed to chlorhexidine gluconate. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*, 25(5), 335-338. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3323451>
- Tonetti, M. S., Greenwell, H., & Kornman, K. S. (2018). Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *Journal of Periodontology*, 89(1), 159-172. <https://doi.org/10.1002/JPER.18-0006>
- Tonetti, M. S., Jepsen, S., Jin, L., & Otomo-Corgel, J. (2017). Impact of the global burden of periodontal diseases on health, nutrition and wellbeing of mankind: A call for global action. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(5), 456-462. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12732>
- Tonetti, M. S., Van Dyke, T. E., & Working group 1 of the joint, E. F. P. A. A. P. w. (2013). Periodontitis and atherosclerotic cardiovascular disease: Consensus report of the Joint EFP/AAP workshop on periodontitis and systemic diseases. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(14), 24-29. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12089>
- Trombelli, L., Franceschetti, G., & Farina, R. (2015). Effect of professional mechanical plaque removal performed on a long-term, routine basis in the secondary prevention of periodontitis: A systematic review. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 221-236. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12339>
- Tüter, G., Çetiner, D., Yalım, M., & Gürhan, İ. (1998). Farklı kimyasal yapılarıdaki ağız gargaralarının insan dişeti fibroblastları üzerine etkilerinin karşılaştırılması. *Gazi Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Dergisi*, 15(1-2-3), 107-114.
- Utami, W. S., Anggani, H. S., & Purbiati, M. (2022). Cytotoxicity effect of orthodontic miniscrew-implant in different types of mouthwash: An in-vitro study. *Journal of Orthodontic Science*, 11(1), 5. https://doi.org/10.4103/jos.jos_158_21
- Vahabi, S., Hakemi-Vala, M., & Gholami, S. (2019). In vitro antibacterial effect of hydroalcoholic extract of *Lawsonia inermis*, *Malva sylvestris*, and *Boswellia serrata* on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Advanced Biomedical Research*, 8(1), 22. https://doi.org/10.4103/abr.abr_205_18
- Van der Weijden, F. A., & Slot, D. E. (2015). Efficacy of homecare regimens for mechanical plaque removal in managing gingivitis a meta review. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(16), 77-91. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12359>
- van Winkelhoff, A. J., Tjihof, C. J., & de Graaff, J. (1992). Microbiological and clinical results of metronidazole plus amoxicillin therapy in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-associated periodontitis. *Journal of Periodontology*, 63(1), 52-57. <https://doi.org/10.1902/jop.1992.63.1.52>
- Varoni, E., Tarce, M., Lodi, G., & Carrassi, A. (2012). Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatologica*, 61(9), 399-419.
- Venketaraman, V., Lin, A. K., Le, A., Kachlany, S. C., Connell, N. D., & Kaplan, J. B. (2008). Both leukotoxin and poly-N-acetylglucosamine surface polysaccharide protect *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* cells from macrophage killing. *Microbial Pathogenesis*, 45(3), 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2008.05.007>

- Vianna, M. E., Gomes, B. P., Berber, V. B., Zaia, A. A., Ferraz, C. C., & de Souza-Filho, F. J. (2004). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, 97(1), 79-84. [https://doi.org/10.1016/s1079-2104\(03\)00360-3](https://doi.org/10.1016/s1079-2104(03)00360-3)
- Vile, G. F., Rothwell, L. A., & Kettle, A. J. (2000). Initiation of rapid, P53-dependent growth arrest in cultured human skin fibroblasts by reactive chlorine species. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 377(1), 122-128. <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.1706>
- Vitt, A., Babenka, A., Bostrom, E. A., Gustafsson, A., Lira Junior, R., Slizen, V., Sorsa, T., Tervahartiala, T., & Buhlin, K. (2020). Adjunctive antiseptic irrigation of periodontal pockets: Effects on microbial and cytokine profiles. *Dentistry Journal (Basel)*, 8(4), 124. <https://doi.org/10.3390/dj8040124>
- Von Maltzahn, N. F., Stumpp, N. S., & Stiesch, M. (2020). Antibacterial effect of cupral((R)) on oral biofilms - An in-vitro study. *European Endodontic Journal*, 5(1), 40-45. <https://doi.org/10.14744/eej.2019.83997>
- Voos, A. C., Kranz, S., Tonndorf-Martini, S., Voelpel, A., Sigusch, H., Staudte, H., Albrecht, V., & Sigusch, B. W. (2014). Photodynamic antimicrobial effect of safranin O on an ex vivo periodontal biofilm. *Lasers in Surgery and Medicine*, 46(3), 235-243. <https://doi.org/10.1002/lsm.22217>
- Wahlberg, J. E., & Wennersten, G. (1971). Hypersensitivity and photosensitivity to chlorhexidine. *Dermatologica*, 143(6), 376-379. <https://doi.org/10.1159/000252245>
- Walker, C. B., Karpinia, K., & Baehni, P. (2004). Chemotherapeutics: Antibiotics and other antimicrobials. *Periodontology 2000*, 36(1), 146-165. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2004.03677.x>
- Wang, L., Bassiri, M., Najafi, R., Najafi, K., Yang, J., Khosrovi, B., Hwong, W., Barati, E., Belisle, B., Celeri, C., & Robson, M. C. (2007). Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *Journal of Burns and Wounds*, 6(5), 65-79.
- Wennström, J. L. (1996). Rinsing, irrigation and sustain local delivery. In: Lang N. P., Karring T., Lindhe J. (Eds), *Proceedings of the second European workshop on periodontology* (pp. 131-151). Quintessence Books.
- Wiesmann, H. P., Meyer, U., Plate, U., & Hohling, H. J. (2005). Aspects of collagen mineralization in hard tissue formation. *International Review of Cytology*, 242(1), 121-156. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(04\)42003-8](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(04)42003-8)
- Williams, D. W., & Lewis, M. A. (2000). Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *Oral Diseases*, 6(1), 3-11. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2000.tb00314.x>
- Wolfe, M. K., Gallandat, K., Daniels, K., Desmarais, A. M., Scheinman, P., & Lantagne, D. (2017). Handwashing and Ebola virus disease outbreaks: A randomized comparison of soap, hand sanitizer, and 0.05% chlorine solutions on the inactivation and removal of model organisms Phi6 and *E. coli* from hands and persistence in rinse water. *PloS One*, 12(2), 172-734. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172734>
- Wolff, L., Dahlen, G., & Aepli, D. (1994). Bacteria as risk markers for periodontitis. *Journal of Periodontology*, 65(5), 498-510. <https://doi.org/10.1902/jop.1994.65.5s.498>

- Yamaner, Ç. (2022). The effect of neutral electrolyzed water on the microbial population and quality of dried Figs (*Ficus carica* L.) during storage. *Journal of Agricultural Sciences*, 28(2), 232-238. <https://doi.org/10.15832/ankutbd.818884>
- Yang, H. W., Asikainen, S., Dogan, B., Suda, R., & Lai, C. H. (2004). Relationship of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b to aggressive periodontitis: frequency in pure cultured isolates. *Journal of Periodontology*, 75(4), 592-599. <https://doi.org/10.1902/jop.2004.75.4.592>
- Yoshida, Y., Suzuki, N., Nakano, Y., Shibuya, K., Ogawa, Y., & Koga, T. (2003). Distribution of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotypes and *Porphyromonas gingivalis* in Japanese adults. *Oral Microbiology and Immunology*, 18(3), 135-139. <https://doi.org/10.1034/j.1399-302x.2003.00034.x>
- Yücel, A., & Kantarcioglu, A. S. (1999). *Candida albicans*'ın taksonomisindeki önemli bazı değişiklikler. *Cerrahpaşa Tıp Dergisi*, 30(3), 236-246.
- Zambon, J. J. (1985). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *Journal of Clinical Periodontology*, 12(1), 1-20. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051x.1985.tb01348.x>
- Zambon, J. J., Christersson, L. A., & Slots, J. (1983). *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. Prevalence in patient groups and distribution of biotypes and serotypes within families. *Journal of Periodontology*, 54(12), 707-711. <https://doi.org/10.1902/jop.1983.54.12.707>
- Zambon, J. J., Haraszthy, V. I., Hariharan, G., Lally, E. T., & Demuth, D. R. (1996). The microbiology of early-onset periodontitis: Association of highly toxic *Actinobacillus actinomycetemcomitans* strains with localized juvenile periodontitis. *Journal of Periodontology*, 67(3), 282-290. <https://doi.org/10.1902/jop.1996.67.3s.282>
- Zambon, J. J., Slots, J., & Genco, R. J. (1983). Serology of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and serotype distribution in human periodontal disease. *Infection and Immunity*, 41(1), 19-27. <https://doi.org/10.1128/iai.41.1.19-27.1983>
- Zanatta, F. B., Antoniazzi, R. P., & Rosing, C. K. (2010). Staining and calculus formation after 0.12% chlorhexidine rinses in plaque-free and plaque covered surfaces: A randomized trial. *Journal of Applied Oral Science*, 18(5), 515-521. <https://doi.org/10.1590/s1678-77572010000500015>
- Zegarelli, D. J. (1993). Fungal infections of the oral cavity. *Otolaryngologic Clinics of North America*, 26(6), 1069-1089.
- Zhang, C., Patel, R., Eiserich, J. P., Zhou, F., Kelpke, S., Ma, W., Parks, D. A., Darley-Usmar, V., & White, C. R. (2001). Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *American Journal of Physiology: Heart and Circulatory Physiology*, 281(4), 1469-1475. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.2001.281.4.H1469>
- Zhang, Y., Zhao, Y., Xu, C., Zhang, X., Li, J., Dong, G., Cao, J., & Zhou, T. (2019). Chlorhexidine exposure of clinical *Klebsiella pneumoniae* strains leads to acquired resistance to this disinfectant and to colistin. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 53(6), 864-867. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.02.012>

10. BİLİMSEL FAALİYETLER

- Bayraktar, G. & Doğan, B. Akut Nekrotizan Ulseratif Gingivitis: Olgu Sunumu. Türk Periodontoloji Derneği 49. Uluslararası Bilimsel Kongresi, 27-29 Ekim 2019, Antalya, Türkiye. (Poster)
- Bayraktar, G., Yılmaz Göler, A. M., Aksu, M. B., & Öztürk Özener, H. Hipokloröz asit ve klorheksidinin *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ve insan diş eti fibroblastları üzerine etkilerinin in vitro olarak incelenmesi. Türk Dişhekimleri Birliği 26. Uluslararası Dişhekimliği Kongresi, 08-11 Eylül 2022, İstanbul, Türkiye. (Sözel Sunum)
- Bayraktar, G., Yılmaz Göler, A. M., & Öztürk Özener, H. (2023). Klorheksidinin İnsan Diş eti Fibroblastları Üzerindeki Hücre Canlılığı ve Sitotoksitesite Etkinliğinin *In vitro* Koşullarda Değerlendirilmesi. European Journal of Research in Dentistry, 7(1): 27-32. <https://dx.doi.org/10.29228/erd.40>
- Öztürk Özener, H. & Bayraktar, G. Hipokloröz Asidin Sitotoksitesinin ve Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi: *In Vitro* Çalışma. Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi (TDK-2021-10281) 2021-2023.