



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**FARKLI KÖK KANAL MEDİKAMENTLERİNİN
ENTEROCOCCUS FAECALIS VE *CANDIDA ALBICANS*
ÜZERİNE ANTIMİKROBİYAL ETKİLERİNİN İN VİTRO
OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI**

BURÇİN ARICAN ÖZTÜRK

DOKTORA TEZİ

ENDODONTİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu

2015-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum : Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi : Doktora
Anabilim Dalı : Endodonti
Tez Sahibi : Burçin ARICAN ÖZTÜRK
Tez Başlığı : Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin *Enterococcus Faecalis* Ve *Candida Albicans* Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması
Sınav Yeri : Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Erdal İnönü Toplantı Salonu
Sınav Tarihi : 20.02.2015

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)

Hesna Sazak Öveçoğlu

Kurumu

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD

İmza

Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)

Mahir Günay

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD

Yıldız Garip Berker

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD


Faruk Haznedaroğlu

İstanbul Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD

Tanju Kadir

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Temel Tıp Bilimleri

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 25/02/2015 tarih ve 22 sayılı kararı ile onaylanmıştır.


Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

- Sınav evrakları 3 iş günü içinde ıslak imzalı tek kopya halinde Enstitüye teslim edilmelidir.
- Bu form bilgisayar ortamında doldurulacaktır.

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışımın olmadığını, tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları kaynaklar listesine aldığımı, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Burçin ARICAN ÖZTÜRK



TEŞEKKÜR

Doktora tezimin hazırlanması esnasında her zaman bana yol gösteren bilgi birikimi, deneyim ve desteği ile bana yardımcı olan tez danışmanım ve değerli hocam Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu'na,

Çalışmalarım sırasında mikrobiyolojik değerlendirilmenin yapılmasına yardımcı olan sayın hocam Prof. Dr. Tanju Kadir'e ve Uzm. Dr. Banu Can'a

Bu çalışmanın ilham kaynağı olan ve her zaman yanımda olan çok sevdiğim Yrd. Doç. Dr. Bilge Tarçın ve Yrd. Doç. Dr. Birsay Gümrü Tarçın'a,

Çalışmamın her aşamasında benimle birlikte kafa yoran Uzm. Farmakolog Salih Gümrü'ye,

Abim kadar sevdiğim, her tökezlediğimde beni tutan Dr. Emre İriboz'a

Endodonti Anabilim Dalı Öğretim üyeleri Prof. Dr. Mahir Günday, Prof. Dr. Yıldız Garip Berker, Yrd. Doç. Dr. Diler Erbay Türkaydın, Yrd. Doç. Dr. Fatıma Betül Baştürk ve üç silahşörler Dt. Sema Sönmez, Dt. Koral Bayraktar ve Dt. Tuna Kaplan'a

Benimle aynı zorlukları yaşayan ve bana bilgisiyle çok destek olan Dr. Parla Meva Gerni'ye

Tez çalışmam boyunca yakın ilgi, yardım ve desteklerini gördüğüm tüm Endodonti Anabilim Dalı ve Temel Bilimler asistanlarına ve personeline,

Sonsuz sevgi ve sabrıyla beni sarmalayan, desteğini her saniye hissettiğim sevgilim, eşim, hayat arkadaşım Umut Yılmaz Öztürk'e

Ve beni bugünlere getiren, hayatımın her saniyesini borçlu olduğum, her daim sığındığım liman olan çok sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim. İyi ki varsınız.

Burçin ARICAN ÖZTÜRK

Bu alışma, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından SAG-C-DRP 150513-0154 proje numarası ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN.....	i
TEŞEKKÜR.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
KISALTMA VE SİMGELER.....	viii
ŞEKİL, RESİM VE TABLOLAR.....	x
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1 Kök Kanallarının Dezenfeksiyonunun Önemi.....	5
2.2. Kök Kanal Mikroflorası.....	9
2.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i>	13
2.2.2. <i>Candida albicans</i>	16
2.3.Kök Kanal Medikamentleri.....	18
2.3.1.Kalsiyum hidroksit.....	18
2.3.2. Antibiyotikler.....	20
2.3.2.1. Ledermix.....	23
2.3.2.2. Klindamisin.....	24
2.3.2.3. Üçlü antibiyotik patı.....	25
2.3.2.4. Ampisilin.....	28
2.3.2.5. Aminoglikozitler.....	29
2.3.3. Laktoferrin.....	31
2.3.3.1. Laktoferrinin antibakteriyel etkisi.....	31
2.3.3.1.A. Bakteriostatik etki.....	31

2.3.3.1.B. Bakterisidal etki.....	32
2.3.3.2. Laktoferrinin antifungal etkisi.....	32
2.3.3.3. Laktoferrinin antiviral etkisi.....	033
2.4. Mikroorganizma İzolasyon Yöntemleri.....	0033
2.4.1. Mikrobiyolojik kültür yöntemi	34
2.4.2. Moleküler yöntemler.....	34
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	0...39
3.1.Ön Çalışmalar.....	39
3.2. Çalışmada Kullanılan Deney Örneklerinin Hazırlanması.....	43
3.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması.....	45
3.4. Kök Kanallarının Enfekte Edilmesi.....	47
3.4.1. Kök kanallarının <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilmesi.....	000.....47
3.4.2. Kök kanallarının <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilmesi.....	000.....49
3.5. Kök Kanal Medikamentlerinin Uygulanması.....	0...50
3.5.1. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen kök kanallarına medikamentlerin uygulanması.....	50
3.5.2. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen kök kanallarına medikamentlerin uygulanması.....	54
3.6. Deney ve Kontrol Gruplarından Örnek Alınması.....	00.56
3.6.1. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen dişlerden örnek alınması.....	56
3.6.1.1. Üçüncü günde (birinci alt grup) örnek alınan dişler	56
3.6.1.2. Yedinci günde (ikinci alt grup) örnek alınan dişler.....	57
3.6.2. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen dişlerden örnek alınması.....	00058
3.6.2.1. Üçüncü günde (birinci alt grup) örnek alınan dişler.....	58
3.6.2.2. Yedinci günde (ikinci alt grup) örnek alınan dişler.....	59
3.7. DNA İzolasyonu.....	59

3.7.1 Gerçek Zamanlı PZR (Q-PCR) metodu	61
3.8. İstatistiksel Analiz.....	65
4. BULGULAR.....	66
4.1. <i>Candida albicans</i> ile Enfekte Edilen Örneklerden Elde Edilen Bulgular.....	66
4.1.1. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen örneklerden 0. günde elde edilen bulgular.....	067
4.1.2. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen örneklerden 3. günde elde edilen bulgular.....	068
4.1.3. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen örneklerden 7. günde elde edilen bulgular.....	0..77
4.1.4. <i>Candida albicans</i> ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalma oranları arasındaki farkın kıyaslanması.....	85
4.2. <i>Enterococcus faecalis</i> ile Enfekte Edilen Örneklerden Elde Edilen Bulgular....	86
4.2.1. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen örneklerden 0. günde elde edilen bulgular.....	0..87
4.2.2. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen örneklerden 3. günde elde edilen bulgular.....	0..88
4.2.3. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen örneklerden 7. günde elde edilen bulgular.....	0..97
4.2.4. <i>Enterococcus faecalis</i> ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalma oranları arasındaki farkın kıyaslanması.....	00105
4.3. Kök kanal medikamentlerinin 3. günde <i>Candida albicans</i> ve <i>Enterococcus faecalis</i> üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması	00.....106
4.4. Kök Kanal Medikamentlerinin 7. günde <i>Candida albicans</i> ve <i>Enterococcus faecalis</i> Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması	0..107
5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR.....	109
5.1. Sonuçlar.....	0127

6. KAYNAKLAR.....	128
7. EKLER.....	159
8. ÖZGEÇMİŞ.....	163

KISALTMA ve SİMGELER

µm: Mikrometre

2P: ikili antibiyotik patı (Ampisilin, Gentamisin Birlikteliği)

BHI: Brain Heart Infusion Broth

BHIA: Brain Heart Infusion Agar

C. albicans: *Candida albicans*

Ca(OH)₂: Kalsiyum Hidroksit

CFU: colony forming unit

CHG: Kalsiyum hidroksit+gliserin

CHX: Klorheksidin

CMCP: Camphorated paramonochlorophenol

DNA: Deoksiribonükleik asit

dNTP: Oligonükleotit

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

EDTA: Etilen diamin tetra asetik asit

GG: Gates Glidden

LF: Laktoferrin

LPO: Laktoperoksidaz

LPS: Lipopolisakkarit

M3P: Modifiye üçlü antibiyotik patı (Ampisilin, Gentamisin, Laktoferrin)

mm: milimetre

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

nm: nanometre

PCR / PZR: Polimeraz Zincir Reaksiyonu

PUI: Pasif ultrasonik irigasyon

Q-PCR: Real Time PCR / Gerçek zamanlı PZR

SCAP: Apikal papilla kök hücresi

SDA: Sabouraud Dextrose Agarda

SDB: Sabouraud Dextrose Broth

SEM: Scanning electron microscope

TAP: Üçlü antibiyotik patı (Metronidazol, Minosiklin, Siprofloksasin)

Tm: Erime ısısı

WMTA: Beyaz mineral trioksit agregat

ŞEKİL, RESİM ve TABLOLAR

i. Şekillerin Listesi

Şekil 1: Endodontik enfeksiyonlarda gözlemlenen filalar

Şekil 2: Kalsiyum ve hidroksil iyonları

Şekil 3: Kalsiyum karbonat oluşumu

Şekil 4: Klindamisin yapısı

Şekil 5: Metronidazolün yapısı

Şekil 6: Minosiklinin yapısı

Şekil 7: Siprofloksasinin yapısı

Şekil 8: Ampisilin yapısı

Şekil 9: Polimeraz zincir reaksiyonu basamaklarını gösteren diyagram

Şekil 10: *C. albicans* 0. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Şekil 11: *C. albicans* 0. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 12: *C. albicans* 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri

Şekil 13: *C. albicans* 3. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 14: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 15: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 16: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 17: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 18: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 19: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 20: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 21: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 22: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 23: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 24: *C. albicans* 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Şekil 25: *C. albicans* 7. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 26: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 27: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 28: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 29: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 30: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 31: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 32: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 33: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 34: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 35: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 36: Deney gruplarının 3 ve 7. günde *Candida albicans*' ı eredike etme oranları

Şekil 37: *E. faecalis* 0. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Şekil 38: *E. faecalis* 0. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 39: *E. faecalis* 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Şekil 40: *E. faecalis* 3. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 41: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 42: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 43: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 44: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 45: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 46: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 47: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 48: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 49: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 50: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 51: *E. faecalis* 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Şekil 52: *E. faecalis* 7. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Şekil 53: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 54: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 55: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 56: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 57: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 58: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 59: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 60: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 61: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 62: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Şekil 63: Deney gruplarının 3 ve 7. günde *E. faecalis*' i yok etme oranları.

Şekil 64: Deney gruplarının 3. günde *C. albicans* ve *E. faecalis*' i yok etme oranları

Şekil 65: Deney gruplarının 7. günde *C.albicans* ve *E.faecalis* ' i yok etme oranları

ii. Resimlerin Listesi

- Resim 1: 48 saatin sonunda Agar difüzyon testi ile elde edilen inhibisyon zonları
- Resim 2: Kök kanalından alınan örneklerin petri kabına ekilmesi
- Resim 3: Aynı dişten alınan iki farklı örneğin kültür yöntemi ile ekilmesi sonucu elde edilen mikroorganizma kolonizasyonu
- Resim 4: *Candida albicans* ile enfekte edilen numuneden alınan örnekte meydana gelen kontaminasyon
- Resim 5: Kanal medikamentinin besiyerine taşınması sonucu meydana gelen üreme
- Resim 6: RT-PCR sonucu elde edilen DNA
- Resim 7: Hazırlanan akrilik blok
- Resim 8: Protaper Universal Sistem
- Resim 9: Otoklavlanan malzemeler
- Resim 10: Cam kaplara yerleştirilen numuneler
- Resim 11: BHI agar ve sıvı besiyeri
- Resim 12: Spektrofotometrede hazırlanan süspansiyon
- Resim 13: Bakteri süspansiyonunun kök kanalına mikropipet ile inokülasyonu
- Resim 14: SD agar ve sıvı besiyeri
- Resim 15: Cam havanda ezilen medikament
- Resim 16: Hassas terazi
- Resim 17: Kalsiyum hidroksit ve serum fizyolojik
- Resim 18: Hazırlanan üçlü antibiyotik patı
- Resim 19: Üçlü patta kullanılan antibiyotikler
- Resim 20: Hazırlanan ikili pat
- Resim 21: İkili ve modifiye ikili patta kullanılan antibiyotikler
- Resim 22: Laktoferrin
- Resim 23: PUI ile kök kanalından antibiyotik patının uzaklaştırılması

Resim 24: Kök kanalından paper point ile alınan rnekler

Resim 25: İnkübatör

Resim 26: Vortex

Resim 27: rnelere çözelti eklenmesi ve n iŖlemler

Resim 28: Silika kolona yüklenen numune

Resim 29: Santrifüje yerleŖtirilen numuneler

Resim 30: Biorad CFX Connect Real Time PCR cihazı

Resim 31: Cihazdan elde edilen bilgilerin bilgisayar ekranındaki görüntüsü

iii. Tabloların Listesi

Tablo 1: Destekleyici antibiyotiklerin endikasyonları

Tablo 2: *E. faecalis* ile enfekte edilen gruplardaki numune sayıları

Tablo 3: *C. albicans* ile enfekte edilen gruplardaki numune sayıları

Tablo 4: Q-PCR Isı Döngüsü Programı

Tablo 5: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapmaları

Tablo 6: *C. albicans* ile enfekte edilen dişlerde 3. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

Tablo 7: *C. albicans* ile enfekte edilen gruplarda 3. gündeki relatif hücre miktarları

Tablo 8: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerde 3. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları (%) arasındaki kıyaslama

Tablo 9: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

Tablo 10: *C. albicans* ile enfekte edilen dişlerde 7. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

Tablo 11: *C. albicans* ile enfekte edilen gruplarda 7. gündeki relatif hücre miktarları

Tablo 12: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerde 7. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları arasındaki kıyaslama

Tablo 13: *C. albicans* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi ($t= 2,101$, $df= 18$, $p<0,05$)

Tablo 14: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

Tablo 15: *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerde 3. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

Tablo 16: *E. faecalis* ile enfekte edilen gruplarda 3. gündeki relatif hücre miktarları

Tablo 17: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerde 3. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları (%) arasındaki kıyaslama

Tablo 18: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

Tablo 19: *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerde 7. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

Tablo 20: *E. faecalis* ile enfekte edilen gruplarda 7. gündeki relatif hücre miktarları

Tablo 21: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları arasındaki kıyaslama

Tablo 22: *E. faecalis* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi ($t= 2,101$, $df= 18$, $p<0,05$)

Tablo 23: Kanal medikamentlerinin 3. günde mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerinin 1-kuyruklu-t-testi ile karşılaştırılması ($t= 1,7341$, $df= 18$, $p<0,05$)

Tablo 24: Kanal medikamentlerinin 7. günde mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerinin 1-kuyruklu-t-testi ile karşılaştırılması ($t= 1;7341$, $df= 18$, $p<0,05$)

ÖZET

Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin in Vitro Olarak Karşılaştırılması

Arş. Gör. Dt. Burçin Arıcan Öztürk **Danışman:** Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu
Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Endodonti Anabilim Dalı

Amaç: Bu çalışmanın amacı çeşitli kök kanal medikamentlerinin 3 ve 7 günlük sürelerde *Candida albicans* ve *Enterococcus faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkisini araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda 240 adet tek kök tek kanallı insan dişi kullanılmıştır. Kök kanalları şekillendirildikten ve akrilik bloklara gömüldükten sonra otoklavda steril edilmiştir. Örnekler iki gruba ayrılarak birinci grubun kök kanallarına *E. faecalis* diğereine ise *C. albicans* süspansiyonu inoküle edilmiş ve 37° C’ de 48 saat etüvde bekletilmiştir. Enfekte edilen dişler her grupta on diş olacak şekilde alt gruplara ayrılmıştır. Kanal içi medikamenti olarak kalsiyum hidroksit (Grup 1), üçlü antibiyotik patı (Grup 2), ikili antibiyotik patı (Grup 3), modifiye üçlü pat (Grup 4) ve laktoferrin (Grup 5) kullanılmıştır. Üçüncü ve yedinci gün sonunda kök kanallarından paper point ile alınan örnekler boş eppendorf tüplere alınıp bir seri işlemden geçirildikten sonra DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra da Gerçek Zamanlı PZR işlemi uygulanmıştır. Veriler istatistiksel olarak analiz edilmiştir.

Bulgular: Kullanılan tüm kanal içi medikamentleri *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerine hem 3. günde hem de 7. günde oldukça etkili olmuştur. Uygulanan tüm medikamentlerin üç gün içerisinde *C. albicans* hücrelerinin en az % 99,8’ ini, *E. faecalis* hücrelerinin en az % 89’ unu öldürdüğü görülmüştür. Kanal içi medikamentlerinin hepsinin *C. albicans*’ a etkisi *E. faecalis*’ e kıyasla, istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı bulunmuştur.

Anahtar kelimeler: Kök kanal medikamenti, *E. faecalis*, *C. albicans*, laktoferrin, üçlü antibiyotik patı

ABSTRACT

In Vitro Comparison of Antimicrobial Effects of Different Root Canal Medicaments on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*

Res. Asst. Dt. Burçin Arıcan Öztürk **Supervisor:** Prof. Dr. Hesna Sazak Öveçoğlu

Marmara University, Institute of Health Science, Department of Endodontics

Aim: Aim of this study is the investigation of antimicrobial effects of different root canal medicaments on *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* on 3 and 7 days periods.

Materyal and Methods: 240 single rooted human teeth with single canals were used in this study. First of all, root canals were shaped mechanically and embedded in acrylic blocks, then sterilized in autoclave. The samples were divided into two groups; the root canals of first group was inoculated with *E. faecalis* and the other with *C. albicans* suspension and incubated at 37°C for 48 hours. The infected teeth were divided into subgroups each containing 10 teeth and calcium hydroxide (Group 1), triple paste (Group 2), double paste (Group 3), modified triple paste (Group 4) and lactoferrin (Group 5) were administered as root canal medicaments. At the end of 3 and 7 day, paper points containing root canal samples were placed into empty eppendorf tubes and after a serial procedure DNA was isolated. Then, Real-Time PCR (QPCR) was applied. The data were analyzed statistically.

Results: All medicaments used in this study were determined effective against *E. faecalis* and *C. albicans* on both day 3 and 7. All medicaments could eliminate more than % 99,8 *C. albicans* and more than % 89 *E. faecalis* at the end of the day 3. Beside this, all of them were statistically much more effective against *C. albicans* in comparison with *E. faecalis*.

Key words: Root canal medicaments, *E. faecalis*, *C. albicans*, lactoferrin, triple antibiotic paste.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kök kanal enfeksiyonları anaerop ve fakültatif anaerop bakterilerden oluşan polimikrobiyal enfeksiyonlardır (Lana ve ark., 2001; Dumani, 2008; Mittal ve Jain, 2012; Delgado ve ark., 2013). Periradiküler doku ve enfekte kök kanalındaki bakteriler, periapiks çevresinde sement ve dentin tübüllerini işgal ederek periapikal ve pulpal hastalıkların etiyojisini oluşturmaktadır (Vijayaraghavan ve ark., 2012). Başarılı bir endodontik tedavi yapabilmek için bu mikroorganizmaların kök kanal boşluğundan uzaklaştırılması zorunludur.

Enfekte kök kanalındaki mikroorganizmaların sayısı yapılan mekanik preparasyon, irigasyon ve kanal içi medikamentlerin kombine uygulanımı ile büyük ölçüde azaltılabilir. Yapılan in vitro çalışmalarda mekanik preparasyonun kök kanallarının anatomisi nedeniyle bakterilerin eliminasyonunda tek başına yeterli olmadığı görülmüştür (Matsuo ve ark, 2003; Orstavik 2003). Bu nedenle rezidüel doku ve mikroorganizmaların yok edilmesinde irigasyon ve kanal içi medikament kullanımına ihtiyaç vardır.

Birçok araştırmada *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans* 'ın inatçı apikal periodontitis ve kök kanal dolgu tekrarı olgularında en sık izole edilen mikroorganizma olduğu gösterilmiştir (Waltimo ve ark, 1997; Baumgartner ve ark, 2000; Egan ve ark, 2002). Bakterilerin dentin tübüllerine 1000 µm derinliğine kadar kolonize olabildiği, yıkama solüsyonlarının ise ancak 100 µm kadar penetre olabildiği göz önüne alındığında yıkama solüsyonlarıyla tek başına kök kanal dezenfeksiyonu sağlanması imkansızdır (Beer ve ark., 2012). Bilhassa enfekte dişlerde dentin tübüllerini işgal eden bu inatçı mikroorganizmaları tamamen uzaklaştırabilecek bir ajan henüz bulunmamıştır.

Grossmann'ın kök kanallarında antibiyotik kullanımının önünü açtığı günden bugüne birçok çalışmada antibiyotik kombinasyonlarının antimikrobiyal etkinliği incelenmiştir (Takushige ve ark., 2004; Trope, 2008; Mozayeni ve ark., 2014). Günümüzde en sık kullanılan üçlü antibiyotik patı; dirençli bakteri türlerinin

oluşmasını engellemek amacıyla Sato ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir (Sato ve ark. 1996). Rejenerasyon, periradiküler lezyonlu inatçı vakalar, kök kırıkları, revaskularizasyon gibi tedavilerde sıklıkla kullanılan bu patın apikal papilla hücreleri üzerindeki inhibisyon etkisi, dişin kuronunda yarattığı renklenme ve kök kanalında tamamen uzaklaştırılmasının mümkün olmayışı gibi dezavantajları vardır (Takushige ve ark., 2004; Özkan ve Er, 2005; Yassen ve ark., 2013). Bu nedenle halen yeni antibiyotik kombinasyonları geliştirilmektedir. Enterokok enfeksiyonlarının tedavisinde, hücre duvarı aktif ajanların (aminoglikozitle birlikte kullanılan penisilin ya da glikopeptit gibi) bakterisidal kombinasyonlarının sinerjik kullanımının gerekliliğini savunan birçok araştırma mevcuttur (Sande ve İrwin, 1974; Aydın, 2000; Aslangül ve ark., 2005). Bu durumu göz önüne alarak çalışmamızda kullanımı kolay, antimikrobiyal etkinliğe sahip yeni bir kanal medikamenti kullanılmıştır. Doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynayan, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümöral, parasitidal ve antienflamatuvar etki gösteren, insan gözyaşı ve sütünde en sık bulunan laktoferrin diş hekimliğinde birçok araştırmaya konu olmuş ancak bugüne kadar kök kanalında kullanımına rastlanmamıştır (Orla, 2001; Orsi, 2004; Ammons ve ark., 2009; Ammons ve ark., 2011; Alves ve ark., 2012). Bu amaçla çalışmamızda üçlü pata alternatif olarak kök kanallarında ilk defa uygulanan ampisilin, gentamisin ve laktoferrin kombinasyonlarının etkinliği incelenmiştir.

Bu çalışmada, *E. faecalis* ve *C. albicans* ile enfekte edilen insan dişlerinde yeni geliştirilen antibiyotik kombinasyonlarının (metronidazol + minosiklin + siprofloksasin (Grup 2), ampisilin+ gentamisin (Grup 3), ampisilin + gentamisin + laktoferrin (Grup 4), laktoferrin (Grup 5)), ve geleneksel kanal içi medikamenti kalsiyum hidroksit (Grup 1) antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi ve birbirleriyle kıyaslanması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Kanallarının Dezenfeksiyonunun Önemi:

Kök kanal tedavisinde başarı sağlamak için birincil amaç, kök kanal sisteminin mikroorganizmalardan arındırılmasını sağlamak olmalıdır (Gomes ve ark., 2003). Bu amacı gerçekleştirebilmek için etkili bir mekanik şekillendirme, irigasyon ve seanslar arası kök kanal medikamenti uygulaması yapılmalıdır.

Endodontik tedavinin önceliği kanalların tam olarak boşaltılması ve şekillendirilmesidir. Nekrotik dokular, pulpa artıkları ve mikroorganizmaların kaldırılması bu işlemin bir parçasıdır. Şekillendirme ise, hekimin kanal dolgusunu kolaylıkla yerleştirebileceği yeterli bir kavitenin oluşturulmasıdır. Tüm bunlar göz önüne alındığında kök kanal preparasyonu Grossman' ın tanımıyla biyomekanik preparasyon olarak tarif edilmektedir (Alaçam ve ark., 2012).

Kök kanallarının şekillendirilmesi esnasında dikkat edilmesi gereken hususlar da çok önemlidir. Mekanik preparasyon sonrası elde edilen kök kanalı orjinal kök kanalının hatlarına benzerlik göstermelidir. Mekanik temizlemenin ardından herhangi bir artık doku bırakılmamalı, kök kanal duvarlarının tümü mekanik olarak prepare edilmelidir. Apikal daralım bölgesine doğru gittikçe daralan, düzgün tersine konik bir şekil sağlanmalı ve kök kanalı, kanal dolgu maddelerinin kolayca yerleştirilebileceği bir şekil göstermelidir. Preparasyona bağlı zip, perforasyon gibi komplikasyonlar bulunmamalıdır. Kanal preparasyonu tamamlandığında olabildiğince fazla radiküler dentin dokusu korunmalıdır. Kök kanal preparasyonu bittiğinde apikalde bir daralım (rezistans formu) ve apikal üçlüde de bir retansiyon formu sağlanmış olmalıdır (Sjögren ve ark., 1990; Taylor ve ark., 1997; Hargreaves ve Cohen, 2011; Alaçam ve ark. 2012).

Kök kanallarının temizlenmesi için birçok preparasyon yöntemi mevcut olmakla birlikte bu yöntemler esas olarak iki alt başlıkta toplanabilir;

1. Apikal genişletmenin önce yapıldığı yöntemler; standart genişletme yöntemi, Step back yöntemi, balanslı kuvvet uygulama, ilerleyen şekilde genişletme yöntemi olarak sınıflandırılabilir (Alaçam ve ark., 2012).

Apikal genişletmenin önce yapıldığı tekniklerde; periapikal bölgede travmaya sebep olma olasılığı azalır, taşkın dolumu önleyen apikal matriks başarılı bir şekilde elde edilir, lateral kanalları doldurmak için fazla kondensasyon basıncı uygulanabilir, basamak oluşturma ve perforasyon olasılığı azalır (Gang ve Gang, 2008).

2. Koronal genişletmenin önce yapıldığı yöntemler; Step-down yöntemi, Double-Flared yöntem, Crown-down basınçsız preparasyon yöntemi, Canal master yöntemi, antikurvatür eğeleme yöntemi olarak sınıflandırılabilir (Alaçam ve ark., 2012).

Koronal genişletmenin önce yapıldığı tekniklerde ise; kök kanalının orta ve koronal 1/3' lük kısmındaki enfekte dokuların apikal bölgeye taşınması engellenir, koronal kısmın önce genişletilmesi ile bir rezervuar alan elde edilir ve yıkamanın daha etkin olması sağlanır, eğri kök kanallarında önce koronal bölgenin genişletilmesi ile kanal aletlerinin apikale ulaşması kolaylaşır ve istenen kök kanal formu elde edilebilir (Gang ve Gang, 2008; Çalışkan 2006).

Enfekte bir kök kanalında mikroorganizma sayısı 10^2 den 10^8 e kadar değişkenlik gösterebilmektedir (Sjögren ve ark., 1991). Mekanik şekillendirme ile kök kanalından % 50 oranında mikroorganizmaların uzaklaştırılabildiği tespit edilse de, bakteri endotoksinlerinin kök kanalından uzaklaştırılmasının mümkün olmadığı görülmüştür. Bu nedenle kanal aletlerinin ulaşamadığı yerlerdeki mikrobiyal topluluğun uzaklaştırılması için çeşitli ajanların kullanılması gereklidir (Lee ve ark., 1990; Horiba ve ark., 1990). İrigasyon solüsyonlarının, kemomekanik şekillendirme sırasında kök kanallarının temizlenmesi ve dezenfeksiyonu için kullanılması oldukça önemlidir (Akçay ve ark., 2010). Kök kanal sisteminin kompleks anatomisi ve ulaşılabilirliğinin sınırlı olması nedeniyle dentin tübüllerinde kalan mikroorganizmalar kök kanal enfeksiyonlarının tekrarlamasına neden olabilmektedir (Nair ve ark., 1990). İrigasyon solüsyonları ise nekrotik doku çözücü özelliği

sayesinde irregüler dentin duvarlarındaki ve ulaşılmayan lateral ve aksesuar kanallardaki debris, pulpa dokusu ve mikroorganizmaların uzaklaştırılmasını sağlar.

Yıkama solüsyonları genel olarak germisidal etkiye sahip olmakla birlikte birçoğu antibakteriyel etki de gösterir. Kök kanal irigasyon ajanları kimyasal olarak aktif ve aktif olmayan olmak üzere iki gruba ayrılır. Su, salin ve lokal anestezi kimyasal olarak aktif olmayan solüsyonlardır. Alkalen solüsyonlar (Sodyum hipoklorit), şelasyon ajanları (EDTA), oksitleyici solüsyonlar (oksijenli su, hidrojen peroksit, karbamid peroksit), antibakteriyel ajanlar (klorheksidin, MTAD), asitler (hidroklorik asit, tannik asit, poliakrilik asit, laktik asit), enzimler (tripsin, papain) ve deterjanlar (sodyum lauril sülfat) kimyasal olarak aktif materyallerdir (Gang ve Gang, 2007; Alaçam ve ark., 2012). Bu aktif materyaller içerisinde en sık kullanılan irigasyon ajanları sodyum hipoklorit, EDTA ve klorheksidindir.

Sodyum hipoklorit geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır. Endodontide ilk kullanımı 1936 yılında Walker tarafından önerilmiştir. Genel olarak % 0,5 ile % 5,25 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Organik artıklara karşı iyi bir çözücü etkisinin olması, antiseptik olması, düşük yüzey gerilimi nedeniyle dentin duvarlarına kolayca difüze olabilmesi, kolay bulunması ve ucuz olması başlıca tercih nedenleridir (Alaçam ve ark., 2012). Bunun yanı sıra sodyum hipoklorit kullanılan konsantrasyon ve doz miktarına bağlı olarak toksik etki gösterebilir, endotel hücrelerinde hasar yaratabilir ve nötrofil migrasyonuna neden olabilir (Gerek, 2008).

Sodyum hipoklorit güçlü bir doku eritici özelliğine sahip olmasına rağmen inorganik doku içeriği de olan smear dokusunu çözemez. Bu nedenle şelasyon ajanları ile birlikte kullanımı gerekmektedir (Ashraf ve ark., 2014; Ahmetoğlu ve ark., 2014). EDTA, endodontide sıklıkla kullanılan bir şelasyon maddesidir. Kimyasal olarak kök kanal dentinini yumuşatır, smear tabakasını çözer ve dentin geçirgenliğini artırır. EDTA' ya dentine olan penetrasyonunu ve temizleme etkinliğini arttırmak için surfaktanlar eklenir. Setrimit ve sodyum lauril eter bu surfaktanlardandır (Guerisoli ve ark., 2002). EDTA' nın sınırlı antibakteriyel etkisi vardır ve bu etki pH ve yoğunluğuna bağlıdır. Endodontide sıklıkla % 17 oranında kullanılan bu ajan yalnızca smear tabakasını kaldırmakla kalmayıp smear dokusu altındaki dentinde de demineralizasyona neden olabilmektedir. Bu istenmeyen

miktardaki demineralizasyonu engellemek için EDTA' nın yoğunluğu arttırılmakta ancak bu durumda da smear tabakasının uzaklaştırılması güçleşmektedir (Alaçam ve ark., 2012). Çalt ve Serper yaptıkları çalışmada, 10 ml EDTA' nın 1 dakika süreyle kök kanalına uygulanmasının smear tabakasının uzaklaştırılması için yeterli olduğunu bildirmişlerdir (Çalt ve Serper, 2002).

Geniş etki spektrumu, düşük yoğunlukta bakteriyostatik yüksek yoğunlukta ise bakterisit etki göstermesi, iritasyon özelliğinin çok az olması gibi etkilere sahip olması nedeniyle klorheksidin solüsyonları da günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır. Klorheksidin; 5,5-7 arası pH değerlerinde antimikrobiyal etki gösteren bir katyonik bisguanindir. Gram-pozitif, Gram-negatif bakterilere, bakteriyel sporlara, lipofilik virüslere, maya ve dermatofitlere etkilidir. Bakterilerin stoplazmik membran yapılarına bozarak etki eder. Ancak organik artıkların bulunduğu ortamlarda etkinliğini azalması, nekrotik dokuları çözememesi ve etkisinin pH' a bağlı olması gibi olumsuz etkileri de mevcuttur (Alaçam ve ark., 2012). Dumani, yaptığı çalışmasında *E. faecalis*' in üremesini en iyi engelleyen solüsyonun klorheksidin olduğunu ancak inhibisyon zonu oluşturmada % 5' lik NaOCl' nin en etkili olduğunu bildirmiştir (Dumani, 2008).

Yapılan çalışmalarda mekanik şekillendirme ve bunu takiben yapılan irigasyon işlemlerinin kök kanallarındaki bakterileri tamamen elimine edemediği ve bazı inatçı patojenlerin varlıklarını sürdürdükleri görülmüştür (Waltimo ve ark., 1997; Portenier ve ark., 2001; Peters ve ark., 2002; Haapasalo ve ark., 2005). Mikroorganizmalar anastamozlar da dahil kök kanalının her yerinde bulunabilirler. Bu penetrasyon 300 µm' ye varan çeşitli derinliklerde olabilir (Horiba ve ark., 1990; Berutti ve ark., 1997; de Lucena ve ark., 2013). Weiger ve arkadaşları yaptıkları in vitro çalışmada 4 haftalık bir enfeksiyon sürecinin sonunda bakterilerin en az 150 µm' ye kadar penetre olabildiklerini göstermişlerdir (Weiger ve ark., 2002). Yapılan bir çalışmada Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında bulunan endotoksinlerin kök dentininde 800 µm derinliğe nüfuz edebildikleri tespit edilmiştir (Horiba ve ark., 1990). Bu nedenle enfekte kök kanallarının temizlenmesi için kemomekanik preparasyonu takiben çeşitli kök kanal medikamentleri kullanılmaktadır.

Kanal içi medikamentler rezidüel mikroorganizmaların eliminasyonunu ve enfeksiyonun ortadan kaldırılmasını sağlarlar. Enfekte kök kanalında kullanılan kanal medikamentlerinden beklenen, kanalın mekanik şekillendirilmesinden sonra kalan artık bakterileri elimine etmesi, periapikal doku enflamasyonunu azaltması, kanal içeriğini inert hale getirmesi, doku debrislerini nötralize etmesidir. Ayrıca geçici dolgudan kaynaklanabilecek sızıntıya karşı bariyer oluşturması ve nemli kök kanalının kurumasına yardımcı olması istenilen özelliklerdir (Chong ve Ford, 2007). Günümüzde bu amaçla sıklıkla kullanılan medikament kalsiyum hidroksittir.

Kalsiyum hidroksit yüksek pH' sı sayesinde Gram-negatif türlerin hücre duvarındaki lipopolisakkarit yapısının biyolojik özelliklerini bozarak membran transportasyon mekanizmasını inaktif hale getirir ve böylece bakteri hücrelerinin ölümünü sağlar (Siqueira ve Lopes, 1999). Bununla birlikte dentinin tamponlanma etkisi nedeniyle medikamentin yaratacağı yüksek pH nötralize olabilir (Haapasalo ve ark., 2000). Bu nedenle günümüzde inatçı mikroorganizmalara uzun süreli etki gösterebilecek yeni ara seans medikamenti arayışları devam etmektedir.

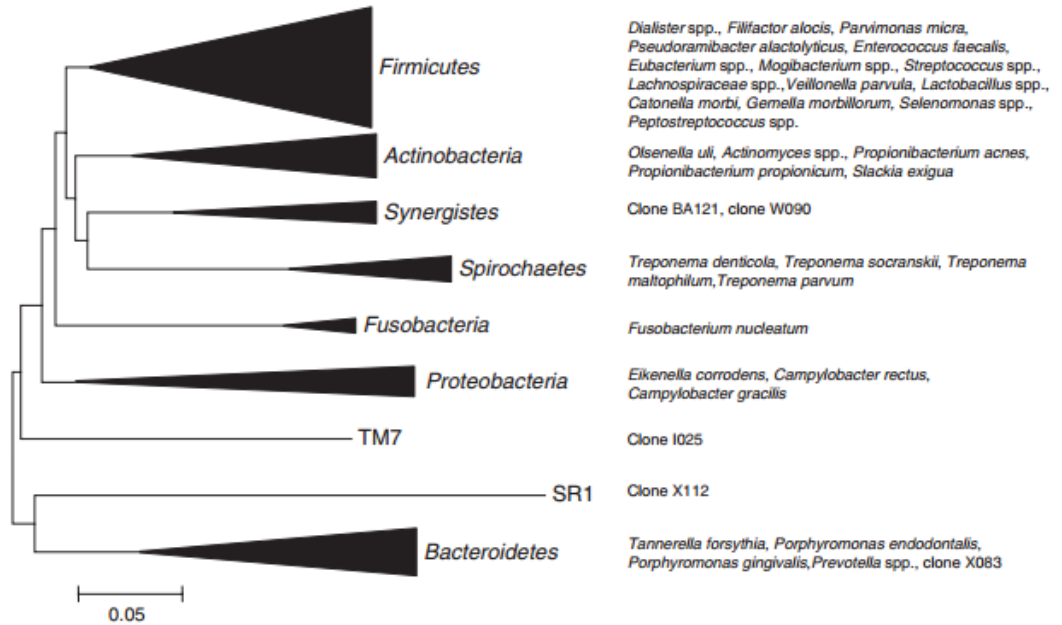
Lana ve arkadaşları, pulpa nekrozu bulunan 31 kök kanalını tedavi öncesi ve sonrasında mikrobiyolojik olarak incelemişlerdir. Kemomekanik preparasyon ve kalsiyum hidroksit uygulamasını takiben 2 kök kanalında fakültatif anaeroblara, 3 kök kanalında ise mayalara rastlanmıştır. Endodontik tedavinin tamamlanmasının ardından ise 7 kök kanalında mikroorganizmaya rastlanmıştır. Bunların 5'i anaerob iken biri mayadır. Bu çalışmanın sonuçlarına göre endodontik tedavinin tamamlanmasına rağmen kök kanallarında zorunlu anaeroplara hala yaşamlarını sürdürebilmektedir (Lana ve ark., 2001).

2.2. Kök Kanal Mikroflorası

Kök kanal enfeksiyonları polimikrobiyal enfeksiyonlardır (Lana ve ark., 2001; Dumani, 2008; Mittal ve Jain, 2012; Delgado ve ark., 2013). Kök kanalında, pulpal patolojinin evresine bağlı olmakla birlikte baskın olarak Gram-negatif anaerob bakteriler bulunur (Fabricius ve ark., 1982). Ayrıca fakültatif anaerob bakteriler, mikroaerofilik bakteriler, aerob bakteriler ve mantarların da kök kanalı mikroflorasında bulunduğu bildirilmiştir (Lana ve ark., 2001). Bakterilerin kök kanallarına birçok giriş yolu olmasına rağmen esas olarak giriş kavitesinden, dentinal

tübülden, çürük lezyonlarından, periodontal ligament veya gingival sulkustan, daha az sıklıkla da mine ve dentin çatlaklarından, başarısız restorasyonlardan ve anakorezis yoluyla pulpaya ulaşabilirler (Torabinejad ve ark., 1990; Garg N ve Garg A, 2008).

Endodontik enfeksiyonlarda moleküler ve kültür yöntemleri ile toplamda 468 özel bakteriyel tür tespit edilmiştir. Bununla birlikte kök kanal florasında arkea, ökarya, 6 *Candida*, 1 *Geotrichum*, 1 *Rhodotorula* ve 1 *Saccharomyces* türüne de rastlanılmıştır (Siqueira ve Roças, 2009). Endodontik enfeksiyonlarda en sık gözlemlenen filalar Şekil 1’ de gösterilmektedir.



Şekil 1: Endodontik enfeksiyonlarda gözlemlenen filalar (Siqueira ve Roças, 2009)

Primer intraradiküler enfeksiyonlarda endodontik mikrobiyota kişiden kişiye değişmekle birlikte anaerob bakteri türleri baskın durumdadır. Bugüne kadar primer intraradiküler enfeksiyonlarda kültür ve moleküler yöntemlerle toplamda 391 bakteri, 4 mantar ve 1 arkeal takım tespit edilmiştir. Gram-pozitif, Gram-negatif bakteriler, çomaklar ve koklar bir arada bulunmaktadır. Bunlar içinde kanlı ağarda siyah-kahverengi koloniler oluşturan siyah pigmentli Gram-negatif anaerob çomaklar (*Prevotella* ve *Porphyromonas*) ön plana çıkmaktadır. *Fusobacterium nucleatum*,

Pseudoramibacter alactolyticus, *Filifactor alocis*, *Propionibacterium propionicum*, *Peptostreptococcus micra*, *Veillonella parvula*, *Eikenella corrodens*, *Neisseria mucosa*, *Centipeda periodontii*, *Granulicatella adiacens*, *Gemella morbillorum*, *Treponema* cinsleri, *Capnocytophaga* türleri ve anaerop laktobasillere de rastlanılmıştır (Siqueira ve Roças, 2009).

Sekonder enfeksiyonlar, primer enfeksiyon sırasında kök kanalında bulunmayan ancak ara seansta kök kanalına taşınan mikroorganizmalar vasıtasıyla oluşmaktadır. İnatçı enfeksiyonlar ise primer ve sekonder enfeksiyonlarda kök kanalında bulunan mikroorganizmaların; ortam şartlarına, besin yokluğuna ve antimikrobiyal kanal medikamentlerine rağmen gösterdiği direnç sonucu oluşmaktadır (Siqueira, 2002). *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Prevotella intermedia*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *E. faecalis*, *Gemella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *F. nucleatum*, ve *C. albicans* sekonder ve intaçı enfeksiyonlarda sıklıkla gözlemlenen bakterilerdir. (Siqueira ve Roças, 2009)

Gomes ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları çalışmada 41' i primer, 19' u sekonder enfeksiyonlu 60 kök kanalından izole edilen bakterilerin % 70' inin anaerop ve mikrofilik olduğunu gözlemlemişlerdir. Aynı çalışmada başarısız endodontik tedavili dişlerde fakültatif anaerobik ve gram pozitif bakterilerin baskın olduğu saptanmıştır. Perküsyon hassasiyeti, şişlik ve ağrı varlığının özellikle Gram-negatif anaeroplara ilişkisi olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca başarısız endodontik tedavi ile *E. faecalis*, *Streptococcus* türleri, *Peptostreptococcus micros* ve *Fusobacterium necrophorum* varlığı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (Gomes ve ark., 2004).

Kemomekanik şekillendirme ve ara seans kanal medikamenti uygulamasını takiben kök kanalından alınan örneklerde de mikroorganizmalar izole edilebilmektedir. *Streptokoklar* (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *S. Oralis*), *P.micra*, actinomycesler (*A. İsrailii*, *A. Odontolyticus*), *Propionibacterium*'lar (*P. acnes*, *P. propionicum*), *Pseudoramibacter alactolyticus*,

laktobasiller (*L. paracasei*, *L. acidophilus*), *E. faecalis* en sık izole edilen bakterilerdir (Siqueira ve Roças, 2009).

Gerek kültür gerekse moleküler yöntemlerle kök kanal tedavisi tekrarlarında en sık izole edilen mikroorganizma türü *E. faecalis*' tir (Pinheiro ve ark., 2003b; Roças ve ark., 2004b; Zoletti ve ark., 2006) Bu dişlerde *E. faecalis*' e rastlanma oranı ise primer enfeksiyonlardakine kıyasla 9 kat daha fazladır (Roças ve ark., 2004b). *P. alactolyticus*, *P. propionicum*, *Filifactor alocis*, *Dialister pneumosintes*, ve *Dialister Invisus* kök kanal tedavisi tekrarlarında sıklıkla rastalanan diğer bakterilerdir (Siqueira ve Roças, 2009). *C. albicans*, kanal tedavisi tekrarlarında en sık rastlanan mantar cinsidir (Peciuliene ve ark., 2001; Egan ve ark., 2002).

Apikal periodontitisli kök kanal tedavili dişlerin mikrobiyotasında yaygın olarak Enterokok türleriyle birlikte Streptokoklar, Laktobasiller, fakültatif anaeroplara, anaerop bakteriler, Gram-negatif enterik çomaklar ve mayalar bulunmaktadır (Sundqvist ve ark., 1998; Roças ve ark., 2004b).

Kronik perapikal lezyonlu dişlerde ise baskın olarak bulunan Gram-negatif bakteriler kök kanal sistemine ve apikal biofilm tabakasına yerleşirler (Leonardo ve ark., 1993; Trope ve ark. 1999; Nelson- Filho ve ark., 2002). Gram-negatif bakterilerin hücre duvarında lipid, protein ve polisakkaritten oluşan endotoksinler mevcuttur ve kimyasal yapılarından dolayı lipopolisakkarit (LPS) olarak adlandırılırlar (Rietschel ve Brade, 1992). Endotoksinin toksik etkisinden sorumlu olan Lipid A kısmı hücre ölümü sırasında salınır (Barthel ve ark., 1997). Ölü ya da canlı bakterilerden salınan endotoksinler, makrofaj, nötrofil ve fibroblastlar üzerinden etki ederek yüksek oranda kimyasal enflamatuvar mediyatörlerinin salınmasını sağlarlar. Enflamatuvar cevap ile birlikte periapikal kemik kaybına neden olurlar (Yamasaki ve ark., 1992; Rietschel ve Brade, 1992; Leonardo ve ark., 2004; Mohammadi ve Dummer, 2011).

E. faecalis gibi Gram-pozitif bakterilerde ise immünolojik ve yapısal olarak LPS' ye çok benzeyen ampifilik yapıda lipoteikoik asit (LTA) mevcuttur. Bir endotoksin olarak değerlendirilmeyen LTA, konak hücrede enflamatuvar cevabı indükleyen bir virulans faktörüdür (Baik ve ark., 2008). Proenflamatuvar sitokinleri ve nitrik oksidi indüklemektedir (Baik ve ark., 2008). Bakterinin, konak

antimikrobiyal moleküllerine, antibiyotiklere ve dezenfektanlara karşı gösterdiği direnç adezyon yeteneği sayesinde oluşturduğu biofilm ile sağlanmaktadır (Fabretti ve ark, 2006). *E. faecalis*' e karşı oluşan opsonik antikorlar, genellikle LTA yüzeyindeki epitoplara karşı oluşmaktadır (Theilacker ve ark, 2006). Baik ve arkadaşları yaptıkları çalışmalarda LTA' nın makrofajları uyararak TNF- α salınmasını uyardığını ancak kullanılan kalsiyum hidroksitin, LTA' yı deaksile ederek *E. faecalis*' in enflamatuvar aktivitesini zayıflattığını ileri sürmüşlerdir (Baik ve ark., 2008; Baik ve ark., 2011).

Ortamdaki besin kıtlığı bazı bakteri hücrelerinin olumsuz yönde etkilenmesini sağlarken, bu her mikroorganizma için geçerli değildir (de Lucena ve ark., 2013). Ortamdaki besin eksikliğine rağmen canlılığını koruyabilen en önemli bakterilerden biri de *E. faecalis*' tir. Love ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, *E. faecalis*' in dentin matriksindeki kollajen fibrillere adezyonu sayesinde dentinin derin tabakalarına ulaşarak üreme kapasitesini sürdürdüğü ve böylece kök kanal medikamentlerinden, irigasyon solüsyonlarından ve ortamın yüksek alkalinitesinden korunabildikleri bildirilmiştir (Love ve ark., 2001).

2.2.1. *Enterococcus faecalis*

Enterokoklar, Thiercelin tarafından 1899 yılında Fransa'da tanımlanmış ve 1930 yılında Lancefield tarafından serolojik olarak grup D streptokok olarak sınıflandırılmıştır (Murray, 1990). Bugüne kadar 12 enterokok türü izole edilmiştir ve bunların yaklaşık % 90' ını *E. faecalis* oluşturmaktadır (Gordon ve ark., 1992).

Enterokoklar oral kavitede, gastro-intestinal boşlukta, hayvanlarda, suda ve yiyeceklerde bulunurlar (Portenier ve ark., 2003). Enterokoklar bakteriyemiye, endokardite, neonatal enfeksiyonlara, idrar yolları enfeksiyonlarına, merkezi sinir sistemi enfeksiyonlarına, nasokomial enfeksiyonlara, süper enfeksiyonlara, intraabdominal ve pelvik enfeksiyonlarına neden olabilmektedirler (Murray, 1990).

Enterokoklar tekli, ikili, ya da kısa zincirler halinde görülebilen Gram-pozitif koklardır (Murray, 1990). Yüksek alkalın ve tuz konsantrasyonları dahil olmak üzere zorlu çevre şartlarında yaşayabilmektedirler (Dumani, 2008). Genellikle antiseptiklere ve dezenfektanlara karşı oldukça dirençli olmalarının sebebi proton pompasını kullanmaları sayesinde yüksek alkalın ortamda bile yaşamlarını

sürdürebilmeleridir (Evans ve ark., 2002). Ortamın pH' ı arttığında, *E. faecalis* hücre içi pH 'ını korumak için stoplazmik membrandan proton pompalayarak sitoplazmik pH' ını sürdürebilir (Booth, 1985). Evans ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, *E. faecalis*' i pH 11,1' deki kalsiyum hidroksitle 30 dakika boyunca temas ettirip daha sonra ortama proton pompa inhibitörü eklediklerinde hücrelerin yaşamlarını sürdürebilme oranlarında 20 kat azalma olduğunu bildirmişlerdir (Evans ve ark., 2002).

E. faecalis, sporsuz, Gram-pozitif grup D fakültatif anaerob bir bakteridir. Çapı 0,5-2 µm arasındadır. Küre veya ovoid şekilde olabilir. *E. faecalis* beyazımsı koloniler oluşturarak 10° C ile 45 °C arasında yaşayabilmekte, 60° C sıcaklığa ve 9,6 pH değerine ise 30 dakika direnç gösterebilmektedir (Tannock ve ark., 2002). Kök kanalından dentin kanalcıklarının içine 800 µm derinliğe kadar ulaşabilmektedir (Haapasalo ve ark., 1987).

E. faecalis invazyonunu kolaylaştıran, immünmodülasyona etki eden ve toksin kaynaklı zararlar meydana getirebilen değişken virulans faktörlerine sahiptir (Dumani, 2008). Agregasyon maddesi, jelatinaz, sitolizin, yüzey proteini, kapsüller polisakkarit, ekstraselüler süperoksit üretimi, litik enzimler, feromonlar ve lipoteikoik asit (LTA) bunların arasındadır (Roças ve ark., 2004a). Aynı zamanda virulans özelliklerini türler arasında paylaşma yeteneğine de sahiptir (Dumani, 2008). Sahip olduğu jelatinaz, serine proteaz ve kollajene tutunma proteini sayesinde dentin tübüllerine rahatlıkla girebilmektedir (Hubble ve ark., 2003). Ayrıca ölmüş hücrelerin serumunu besin kaynağı olarak kullanabilmekte ve yenilenebilmektedir (Figdor ve ark, 2003). Yüksek tuz konsantrasyonunun olduğu ortamda da gelişimini sürdürebilmekte, yüksek ısı değişimlerine ve yüksek pH' a tolerans gösterebilmekte ve bu özellikleri sayesinde diğer mikroorganizmaların canlı kalamadığı ortamlarda bile canlılığını sürdürebilmektedir (Peciuliene ve ark., 2008).

E. faecalis kök kanal dolgusu tamamlanmış dişlerde bile kök kanalının ekolojik şartlarına en iyi uyum sağlayan mikroorganizmadır (Portenier ve ark., 2003). Başarısız kök kanal tedavilerinde yoğun olarak gözlemlenmiştir (Gomes ve ark., 2004; Zoletti ve ark., 2006). Bunun nedeni yaşamsal ve virulans faktörlerinin fazla oluşu ve diğer mikroorganizmaların yaşamlarına olanak bırakmayacak şekilde

ortamdaki besinleri tüketmeleri ile açıklanabilmektedir (Gerek, 2008). *E. faecalis* besinden kıt olan ortamlarda da yaşayabilmektedir. Apikal bölgeden kendisine besin sağlayabildiği ve apikal bölgedeki serum kaynaklı sıvı ile mikrofloranın varlığını sürdürebildiği gösterilmiştir (Figdor ve ark., 2003). Ayrıca ortamda bulunan serum, dentin ve kollajen gibi faktörler de bakterinin hayatta kalmasına yardımcı olmaktadır (Kayaoğlu ve ark., 2009).

E. faecalis retreatment gereken başarısız kök kanal tedavilerinde de en sık rastlanan mikroorganizmadır (Gomes ve ark., 2006). Pinheiro ve arkadaşları periapikal lezyonlu 60 dişin kök kanal tedavilerini tekrarladıkları çalışmalarında, *E. faecalis*' i % 53 oranında izole etmişlerdir (Pinheiro ve ark., 2003a). Sundqvist ve arkadaşları, apikal lezyonlu başarısız kök kanal tedavilerinde *E. faecalis*' i % 38 oranında tespit etmişlerdir (Sundqvist ve ark., 1998). Siqueira ve Roças, inatçı periradiküler lezyona sahip 22 başarısız kök kanal tedavili dişte yaptıkları çalışmada PCR yöntemini kullanmış ve kök kanal dolununun 0-2 mm geride olduğu grupta *E. faecalis*' in izole edilme oranını % 58, 2-5 mm geride olduğu grupta ise % 100 oranında olduğunu bildirmişlerdir. Toplamda tüm başarısız kök kanal tedavili dişlerden alınan örneklerde ise *E. faecalis*' in izole edilme oranı % 77 olarak bildirilmiştir (Siqueira ve Roças, 2004). Fouad ve arkadaşları, periapikal lezyona sahip olan başarısız kök kanal tedavili 37 diş üzerinde yaptıkları çalışmada 14 *Enterococcus* türünü PCR amplifikasyon ve moleküler dizileme yöntemi ile incelemişlerdir. Bu çalışmada % 22 oranında tek tespit edilebilen enterokokkal türün *E. faecalis* olduğu bildirilmiştir (Fouad ve ark., 2005).

Siren ve arkadaşları, pratisyen hekimlerle yürüttükleri çalışmalarında kök kanal ağzının seans aralarında açık bırakılması durumunda enterik ve non-enterik bakterilerin kök kanalında görülme oranlarını incelemişlerdir. Kök kanal ağzı açık bırakıldığı durumlarda enterik bakterilere rastlanma oranı % 55, non-enterik bakterilere rastlanma oranını ise % 30 olduğunu bildirmişlerdir. Enterik bakterilere rastlanan örneklerin % 30' unun ise çok seanslı kanal tedavilerinden elde edildiği bildirilmiştir (Siren ve ark., 1997).

2.2.2. *Candida albicans*

Kandidalar, sağlıklı bireylerin gastrointestinal, vajinal ve orofarınjiyal mikroflorasında kolonize olurlar (Baumgartner ve ark., 2000). Morfolojik olarak tek hücreli, küre, oval veya silindirik, 2-8 x 3-15 µm boyutlarında mikroorganizmalar olup tomurcuklarla çoğalırlar. Kandidalar farklı pH derecelerine adapte olabilirler, çeşitli yüzeylere yapışırlar, enzimler üretirler ve immün sistemden etkilenmemek için morfolojik şekillerini değiştirebilirler (Ruff ve ark., 2006).

Mantarlar temel olarak 2 ana formda bulunurlar: maya veya küf. Küfler çok hücreli filamentöz mantarlardır. Bir filamentte 'hifa' denir. Mayalar sferik veya oval şekilli tek hücreli mantarlardır. Mayalar 1-6 µm çapında, hifalar ise 1,9-2,6 µm çapında olup dentin tübüllerine daha çok penetre olabilmektedir (Siqueira ve Şen, 2004).

Mantarların oral mikrofloradaki büyük bir bölümünü *Candida* türleri oluşturur. *Candida* türleri sağlıklı bireylerin ağız mikroflorasında % 25, hasta bireylerinkinde ise % 50 oranında bulunan mikroorganizmalardır (Şen ve ark., 1999). *Candida* cinsine ait 200 tür olmasına karşın candida enfeksiyonlarının % 75' inin sorumlusu *C. albicans* 'dır (Slots ve ark., 1988).

C. albicans esas olarak oral mikroflorada bulunan bir mikroorganizmadır fakat nekrotik pulpal dişlerin kök kanallarında da gözlemlenmiştir (Şen ve ark.,1995; Waltimo ve ark., 1997). Primer kök kanal enfeksiyonlarının yanı sıra (Baumgartner ve ark., 2000; Lana ve ark.,2001) kanal tedavisi tekrarlarında ve iyileşmeyen inatçı olgularda da tespit edilmişlerdir (Siqueira ve Şen, 2004). Enfekte kök kanalında mantarların bulunma oranının % 1 - % 17 arasında olduğunu bildirilmiştir. Bununla birlikte kök kanallarındaki mantar sayısı genel olarak bakteri sayısından azdır (Waltimo ve ark., 2004; Ruff ve ark., 2006).

C. albicans, genetik çeşitlilik yaratmak için kromozom uzunluk polimorfizmleri, karşılıklı translokasyonlar, kromozomal delesyonlar ve belli kromozomlarda trizomiler gibi yapısal değişiklikler göstermektedir. Bu karyotipik değişiklikler, fenotip değişmelerine yol açmakta ve böylece organizmaya bir adaptasyon stratejisi sağlamaktadır. Çevresel şartlara bağlı olarak mantarların tek hücreli yapıdan ipliksi

yapıya geçebilmelerine çiftyapılılık (dimorfizm) denir. *C. albicans* fenotip sıçraması yoluyla farklı hücre şekillerine geçebilmektedir (Gerek, 2008).

C. albicans aynı zamanda çevresel değişikliklere kolaylıkla adapte olabilen fırsatçı bir patojendir. Normal insan mikrobiyotasında bulunduğu fakat patolojilerin hızlıca gelişmesini sağlayan mekanizmalara ve virülans determinantlarına da sahip olduğu tespit edilmiştir (Pfaller ve Diekema, 2007). Kollagenaz, aminopeptidaz, alkalinfosfataz, kondroitin sülfataz, hiyaluronidaz gibi virülans determinantları ekstraselüler matriks protein degradasyonu yoluyla etki etmektedir (Haynes, 2001).

Nair ve arkadaşları, asemptomatik, kök kanal tedavili ve inatçı periapikal lezyonlu dişlerin kök kanallarını elektron ve ışık mikroskobu ile inceledikleri çalışmalarında 9 olgunun 6' sında apikal bölgede mikroorganizma varlığını tespit etmişlerdir. Kanalların 4' ünde bir veya birden fazla bakteri tespit edilirken, 2' sinde mantarlara rastlanmıştır (Nair ve ark., 1990).

Birincil endodontik enfeksiyonlarda mantar bulunma sıklığının çeşitli yöntemlerle araştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (Şen ve ark., 1995; Egan ve ark, 2002; Dumani, 2008). Nekrotik pulpalı on adet dişin kök kanal florasının ve dentin yapısının SEM ile incelendiği bir çalışmada on dişin 4' ünde maya gözlemlenmiştir (Şen ve ark., 1995). Baumgartner ve arkadaşları, PZR yöntemi kullandıkları çalışmalarında apikal periodontitisli dişlerde % 21 oranında *C. albicans* bulunduğunu tespit etmişlerdir (Baumgartner ve ark., 2000).

Apikal periodontitisli dişlerin kök kanallarında ve tükrükte mayaların varlığının araştırıldığı bir çalışmada, *C. albicans*' in hem tükrükte hem de kök kanalında en sık izole edilen mantar türü olduğu bildirilmiştir. Mayalar kök kanallarında yaklaşık % 10 oranında tespit edilmiştir. Bu türlerin de tükrükte olan türlerle ilişkili olduğu bildirilmiştir (Egan ve ark, 2002).

Egan ve ark. 2002, besiyeri olarak Sabouraud Dextrose Agar'ı (SDA) seçtikleri bir çalışmada birincil enfeksiyonlarda mantar bulunma oranını % 5,7 iken ikincil enfeksiyonlu dişlerde % 16 olarak tespit etmişlerdir. Dumani (2008), birincil ve ikincil enfeksiyonlarda *C. albicans* bulunma oranını kültür ve PZR yöntemi ile incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda hem birincil hem de ikincil enfeksiyonlu

dişlerde *C. albicans* bulunma oranlarının tespitinde kullanılan iki farklı yöntem arasında bir fark görülmediği bildirilmiştir.

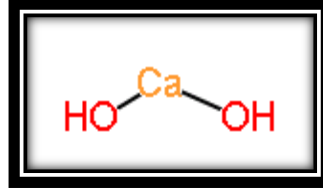
2.3. Kök Kanal Medikamentleri

Kök kanallarının mekanik şekillendirilmesi ve irigasyonunun ardından kök kanalında kalan mikroorganizmaların eliminasyonu için seanslar arasında kök kanal medikamentleri kullanılmaktadır. Kök kanal medikamentleri; mikroorganizmaları öldürür, enflamasyonu ve ağrıyı azaltır, seans aralarında kök kanalının yeniden enfekte olmasını engeller, enflamatuvar kök rezorpsiyonun kontrol altına alır ve apikal eksüdanın kesilmesine yardım eder (Farhad ve Mohammadi 2005; Chong ve Ford, 2007). Bu amaçla günümüzde aldehitler (formokresol), fenolik birleşikler (ojenol, kamforlu monoklorofenol), kalsiyum hidroksit ve antibiyotik kombinasyonları olmak üzere çeşitli medikamentler kullanılmaktadır.

2.3.1. Kalsiyum hidroksit

Kalsiyum hidroksit ilk olarak 1920 yılında Hermann tarafından pulpa kuafajı tedavisinde kullanılmıştır (Mohammadi ve Dummer, 2011). Pulpa kuafaj materyali olmasının yanı sıra ara seans kök kanal medikamenti, daimi kök kanal dolum materyali ve irigasyon ajanı olarak da kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra perforasyon tedavilerinde, apeksifikasyon, kök kırıkları, rezorpsiyonlar ve avülsiyon gibi dental travma olgularında da kullanılmaktadır. Beyaz kokusuz bir toz olup formülü $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ' dir. Moleküler ağırlığı 74.08' dir. Suda çözünürlüğü azdır (yaklaşık 25°C 'de 1.2 gL^{-1}) Biyolojik ve antimikrobiyal aktivitesi, organik doku çözebilme özelliği, periapikal dokuda sitotoksik etki yaratmaması, rezorptif süreci durdurması ve bakteriyel endotoksinleri etkisiz hale getirebilmesi nedeniyle endodontide sıklıkla kullanılmaktadır (Hasselgren ve ark., 1988; Rehman ve ark.,1996; Tanomaru, 2003; AAE, 2004; Mohammadi ve Dummer, 2011; Mohammadi ve ark., 2012).

Kalsiyum hidroksit, aköz ortamda kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrılır (Rehman ve ark.,1996). Hidroksil iyonları oldukça oksidan serbest radikaller olup birçok molekül ile etkileşime girebilir (Şekil 2).



Şekil 2: Kalsiyum ve hidroksil iyonları

Hidroksil iyonları bakterinin sitoplazmik membranının pH' ını değiştirerek membran proteinlerinin denatüre olmasını sağlar (Siqueira ve Lopes, 1999). Yüksek pH, stoplazmik membrandaki doymamış yağ asitlerinin ve fosfolipidlerin yıkımı, besin transportasyonu ve organik bileşenlerde meydana gelen hasar vasıtasıyla stoplazmik membranın bütünlüğünü bozarak bakteri hücresi üzerinde toksik etki yaratır (Estrela ve ark., 1999). Hidroksil iyonları stoplazma membranı ve protein denatürasyonunun yanı sıra bakteri DNA' sına da zarar verir (Siqueira ve Lopes, 1999).

Kalsiyum iyonları karbon dioksit veya karbonat iyonu ile karşılaştığında kalsiyum karbonat oluşur. Kalsiyum karbonatın biyolojik ve antibakteriyel etkinliği yoktur (Şekil 3) (Farhad ve Mohammadi, 2005).



Şekil 3: Kalsiyum karbonat oluşumu

Sjögren ve arkadaşları, kemomekanik preparasyonu takiben canlılığını sürdüren mikroorganizmaların eliminasyonu için Ca(OH)_2 ' nin en az 7 gün uygulanması gerektiğini savunmaktadır (Sjögren ve ark. 1991). Bununla birlikte kronik periapikal periodontitisli dişlerde kalsiyum hidroksitin 14 günden az uygulanmaması gerektiğini savunan çalışmalar da mevcuttur (Nerwich ve ark, 1993; Leonardo ve ark, 2002).

Roças ve Siqueira, apikal periodontitisli 24 nekrotik kök kanalı üzerinde CHG (Kalsiyum hidroksit + gliserin) ve CHPG (Kamforluparamonoklorofenol + gliserin) kanal medikamentlerinin tedavi öncesi ve sonrası etkinliklerini Broad-range PCR yöntemini kullanarak incelemişlerdir. Kanal içi medikament uygulamasını takiben daha fazla bakteri eliminasyonunun sağlandığı ancak iki kanal içi medikamenti arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir (Roças ve Siqueira, 2011).

Lima ve arkadaşları, *E. faecalis* ATCC 29212 suşu ile enfekte ettikleri 106 adet çekilmiş tek kök tek kanallı insan dışında yaptıkları çalışmada, çeşitli kalsiyum hidroksitli patların (Calen, Calen/CMCP, Calen/CHX) 7 ve 14. günlerdeki antimikrobiyal etkinliklerini mikrobiyolojik kültür yöntemi ile incelemişlerdir. Kalsiyum hidroksitli tüm kanal içi medikamentlerinin *E. faecalis*' in uzaklaştırılmasında anlamlı derecede etkili olduğu görülmüştür (Lima ve ark., 2012).

*Calen: Ca(OH)₂, çinko oksit, polietilen glikol(PEG 400), colophony(çam ağacı esaslı rezin) karışımından oluşan hazır bir pat.

Ara seans medikamentlerinin kök kanalından tamamen uzaklaştırılmaması daimi kök kanal dolum materyalinin dentin penetrasyonunu ve kanal duvarına olan adaptasyonun olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle medikamentlerin kök kanalından uzaklaştırılması endodontik tedavide başarı elde edebilmek için önemlidir. Victorino ve arkadaşları, seans arasında uygulanan intrakanal medikamentlerinin kök kanal duvarından uzaklaştırılmasında kullanılan irigasyon ajanlarının etkinliklerini inceledikleri çalışmada, kök kanal medikamenti olarak kalsiyum hidroksit ve propolis patını kullanmışlar ve son irigasyonu % 1 NaOCl, % 17 EDTA, salin ile yapmışlardır. Kök kanal patının kanaldan uzaklaştırılmasında bu irigantların etkinlikleri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Victorino ve ark., 2010). Bununla birlikte ara seans medikamenti olarak kullanılan kalsiyum hidroksitin, sodyum hipokloritin doku çözme etkinliğini arttırdığı bildirilmiştir (Hasselgren ve ark., 1988).

2.3.2. Antibiyotikler

Mikroorganizmaların üremesini engelleyen veya öldüren, biyolojik veya sentetik kaynaklı, düşük molekül ağırlıklı kimyasal maddelere antibiyotik adı verilir. Antibiyotikler hedef hücreye etkilerine göre, etki mekanizmalarına göre, etki gösterdiği mikroorganizma grubuna göre, etki spektrumuna göre, immunmodülatör etkilerine göre sınıflandırılırlar.

Antibiyotikler hedef hücreye etkilerine göre bakterisitler ve bakteriyostatikler olarak ikiye ayrılır (Akkan, 1997):

-Bakterisidler: Bakteri hücrelerini direk yok ederler. Bakterisit etki gücünün göstergesi '*Minimum Bakterisit Konsantrasyonu*' dur. Penisilin, sefalosporin,

aminoglikozitler, vankomisin, rifampisin, florokinonlar, polimiksinler, teikoplanin bu grup antibiyotiklerdir.

-Bakteriyostatikler: Bakteri hücrelerinin gelişmesini ve üremesini engellerler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi '*Minimum İnhibitör Konsantrasyonu*' dur. Tetrasiklinler, makrolitler, sülfonamidler, amfenikoller, linkozamidler, metronidazol, mikonazol bu grup antibiyotiklerdir.

Bakterisit etkiye sahip antibiyotiklerin kombine kullanımı çoğunlukla sinerjistik etki gösterirken bakterisit ve bakteriyostatik etkili iki ilacın bir arada kullanılması antagonist etki ile sonuçlanır (Newman ve van Winkelhoff, 2006).

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre beş gruba ayrılırlar (Akkan, 1997).

1. Bakteri hücre duvarı sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler: penisilin, sefalosporin, monobaktamlar, karbapenemler, sikloserin, ristosetin, basitrasin, teikoplanin, vankomisin bu gruba girmektedir.

2. Stoplazma membran geçirgenliğini engelleyenler: Polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, kandisein, ketokonazol, flukonazol, heksaklorofen, katyonik deterjanlar bu gruba girmektedir.

3. Protein sentezini engelleyenler: tetrasiklinler, aminoglikozitler, makrolitler, amfenikoller, linkozamidler, füsodik asit bu gruba girmektedir.

4. Bakterinin genetik materyali üzerine etki yapanlar: florokinonlar, rifampisinler, nalidiksik asit, metronidazol, aktinomisinler, mitomisinler, bleomisin bu gruba girmektedir.

5. Bakteriyel antimetabolitler: sülfonamidler, trimetoprim, izoniazid bu gruba girmektedir.

Endodontik enfeksiyonda sistemik tutulum ya da progresif bir enfeksiyon söz konusu olduğunda destekleyici antibiyotiklerin sistemik kullanım endikasyonları Tablo 1' de gösterilmektedir. Endodontik enfeksiyonların tedavisinde akla ilk gelecek antibiyotik Penisilin VK' dır. Bunun dışında amoksisilin, metronidazol, klindamisin, klaritromisin, eritromisin ve kloramfenikol türevleri de sıklıkla destekleyici tedavide kullanılmaktadır (Newman ve van Winkelhoff, 2006; Alaçam ve ark.,2012).

Tablo 1: Destekleyici antibiyotiklerin endikasyonları

(Newman ve van Winkenhoff, 2006; Alaçam ve ark., 2102; <http://www.dentistry.ankara.edu.tr/ders/MD-03.doc> Erişim tarihi: 16 Eylül 2014)

Endikasyonlar	Bulgu ve semptomlar
Sistemik tutulum	<ul style="list-style-type: none">• Yüksek ateş, üşüme, titreme• Kırıklık, yorgunluk, halsizlik• Lenfadenopati• Trismus
Progresif enfeksiyon	<ul style="list-style-type: none">• Artmış şişlik• Selülit• Osteomyelit
Flare-up	<ul style="list-style-type: none">• Ağrı ve şişlik
Avülse diş replantasyonu	
Sodyum hipokloritin taşırılması	
Periapikal aktinomikozis	
İmmün yetmezliğin olduğu durumlar	

Kök kanalındaki dolaşımın eksikliği sistemik antibiyotik kullanımının endodontik enfeksiyonlarda etkisiz olmasına neden olabilmektedir. Bu durum nedeniyle mekanik şekillendirme ve lokal antimikrobiyal kullanımını sonrası antibiyotik kullanımı önerilmektedir (Reynaud Ag Geijersstam ve ark., 2006).

Endodontide bilinen ilk lokal antibiyotik kullanımı, 1951 yılında Grossman tarafından kullanılan PBSC diye adlandırılan (penisilin, basitrasin, streptomisin ve caprylate sodyum) poliantibiyotik patıdır (Grossman, 1951). PBSC içeriğinde yer alan penisilinin hedefi Gram-pozitif organizmalar, basitrasinin hedefi penisiline dirençli türler, streptomisinin hedefi Gram-negatif organizma türleri ve kabrilat sodyumun hedefi ise mayalardır (Mittal ve Jain, 2013). Her ne kadar klinik çalışmalar ile bu patın terapötik etkisinin varlığı kanıtlanırsa da bu karışımın, endodontik enfeksiyonlarda dominant olarak bulunan anaerop türlere karşı etkisiz

olduğu bildirilmiştir (Athanassiadis ve ark., 2007). Daha sonra PBSC' nin yapısındaki kabrilat sodyumun, nistatin ile yer değiştirilmiş ve antifungal etkiye sahip olan PBSN patı elde edilmiştir (Mohammadi, 2008; Kohli, 2010). Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi 1975 yılında PBSC' yi hassasiyet ve penisiline karşı alerji gelişimi nedeniyle endodontide kullanımını yasaklamıştır (Abdenour ve ark., 2004). Grossman' ın antibiyotik kullanımının önünü açmasıyla birlikte günümüze kadar birçok antibiyotik kombinasyonu ve türevleri endodontide tedavi amaçlı kullanılmaktadır.

Antibiyotikler endodontide sistemik ve lokal kullanımların yanısıra profilaksi sağlamak amacıyla da kullanılmaktadır. Profilaksi, bilinen bir enfeksiyonu olmayan hastalara, mikrobiyal kolonizasyonu engellemek ve postoperatif komplikasyon potansiyeli azaltmak amacıyla antibiyotik uygulanmasına denir (Newman ve van Winkenhoff, 2006). Amerikan Kalp Derneğine (AHA) göre daha önce geçirilen enfektif endokardit atağı, kalp kapağı protezi, aort daralması ve kalbin sol tarafındaki mevcut katater bakteriyemi açısından çok yüksek risk grubunu işaret etmektedir ve antibiyotik profilaksisi gerektirir. Ayrıca apeks çevresinde uygulanan cerrahi işlemlerde endokardit profilaksisi önerilmektedir. Bu durumda standart profilaksi rejimi; işlemden bir saat önce oral yolla alınacak 2 mg amoksisilindir. Penisilin alerjisi veya şüphesi olan durumlarda ise klindamisin, klaritromisin ya da azitromisin tercih edilmektedir (Dajani ve ark., 1997).

2.3.2.1. Ledermix

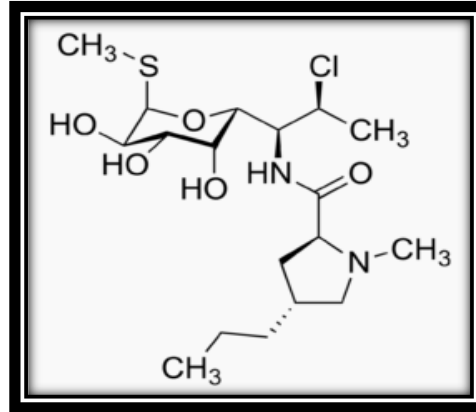
1960 yılında kortikosteroid içerikli Ledermix patı Schroeder ve Triadan tarafından geliştirilmiş bir glukokortikosteroid-antibiyotik bileşiğidir. Ledermix patı tetrasiklin, demeklosiklin HCl ve polietilen glikoz baz içersinde bir kortikosteroid türevi olan % 1 konsantrasyonda triamsinolon asetonid içermektedir (Athanassiadis ve ark., 2007). Bunlardan triamsinolon ve demeklosiklin dentin ve semente difüze olarak periodontal ve periapikal dokuya geçme özelliğine sahiptir (Abbott, 1990). Ledermix yapısındaki kortikosteroid sayesinde akut apikal periodontitisli olgularda postoperatif ağrıyla kontrol altına almada etkili bir medikamenttir (Ehrmann ve ark., 2003).

Apikal periodontitisli 88 dişte yapılan ve seans arasında kanal medikamenti olarak Ledermix, Septomixine ve kalsiyum hidroksitli kanal patı (Calasept) kullanılan bir çalışmada Gram-pozitif türlerin üç grupta da yaygın olarak görüldüğü ve kullanılan medikamentlerin benzer mikrobiyolojik sonuçlar doğurduğu tespit edilmiştir (Chu ve ark., 2006).

Ledermixin en büyük dezavantajlarından biri yapısındaki tetrasiklin nedeniyle yarattığı renklemedir. Ledermix patının yaratacağı renklenmeyi incelemek amacıyla 45 adet çekilmiş tek kök tek kanallı diş farklı ortamlarda tutulmuş ve meydana gelen renklenme değerlendirilmiştir. On iki haftanın sonunda güneş ışığına maruz kalan tüm gruplarda koyu gri-kahverengi renklenme gözlemlenmiştir. Pulpa odasının patla doldurulduğu gruplarda ise renklenmenin daha şiddetli olduğu tespit edilmiştir. Karanlık ortamda tutulan dişlerde ise renklenmenin olmadığı bildirilmiştir (Kim ve ark., 2000).

2.3.2.2. Klindamisin

Klindamisin *actinobacterium Streptomyces lincolnensis*' ten üretilen doğal bir antibiyotik olup bir linkozamid türevidir (Şekil 4). 1966 yılında Magerlein ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir.



Şekil 4: Klindamisin yapısı

Hidroklorür tuzu halinde bulunur ve suda iyi çözünür (Newman ve van Winkelhoff, 2006). Oldukça lipofiliktir ve diğer bir linkozamid türeviden olan linkomisinine kıyasla bakteri hücre penetrasyonu daha iyidir. Gram-negatif bakterilere karşı etkisizken Gram-pozitif bakterilerin 50-S ribozomlarında ribozomal translokasyonu inhibe ederek protein sentezini bozar ve bakteriyostatik etki gösterir

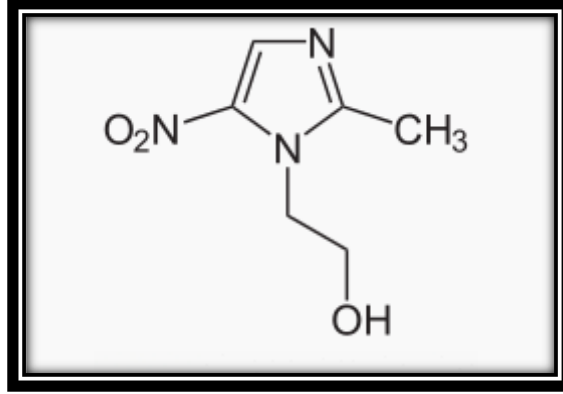
(Newman ve van Winkelhoff, 2006; <http://kimyaders.com>, en.wikipedia.org. Erişim tarihi: 16 Eylül 2014.). Klindamisin; *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Propionobacterium*, *Microaerophilic*, *Streptococci*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella* ve *Porphyromonas* gibi birçok endodontik patojene karşı oldukça etkili olduğu bildirilmiştir (Mittal ve Jain, 2013). Lin ve arkadaşları, hayvan dişleri üzerinde yaptıkları çalışmada klindamisin 400 µm derinliğinde dentin tübüllerine penetre olabildiğini ve antimikrobiyal etkiye sahip olduğunu göstermişlerdir (Lin ve ark., 2003). Bunun yanı sıra klindamisin salin ile karıştırılarak kök kanalına 14 gün süreyle uygulandığı bir başka çalışmada ise, klindamisinli patın kalsiyum hidroksitli pata kıyasla üstün bir antimikrobiyal etki göstermediği bildirilmiştir (Molander ve Dahlen, 2003).

2.3.2.3 Üçlü antibiyotik patı

Kök kanal enfeksiyonları kompleks yapıda polimikrobiyal enfeksiyonlar olduklarından tek bir antibiyotik kullanımı ile kök kanal sterilizasyonun sağlanabileceği düşünülmemektedir. Kombine antibiyotik kullanımı dirençli bakteri türlerinin oluşmasını engellemek amacıyla üretilmiştir. Üçlü antibiyotik patı ile yapılan ilk çalışma Sato ve arkadaşlarına aittir (Sato ve ark. 1996). Bu çalışmada minosiklin, metronidazol ve siprofloksasin karışımı kök kanallarına lokal olarak uygulandığında medikamentin dentine penetre olabildiği ve enfekte kök kanallarının bakterilerden arındırılabilirdiği bildirilmiştir.

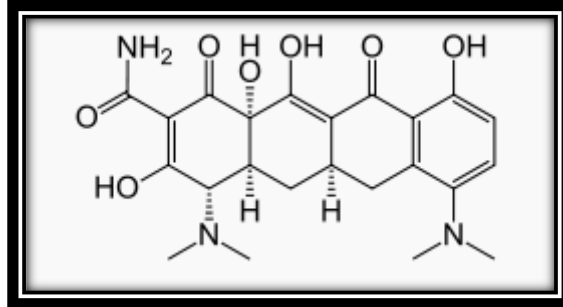
Metronidazol, anaerop bakterilere ve protozoonlara karşı geniş spektrumlu aktiviteye sahip olan bir nitroimidazol bileşigidir (Şekil 5). Metronidazol bakteri hücre duvarına sızar ve DNA'ya bağlanıp heliks yapısını bozarak hızla hücre ölümüne neden olur (Windley ve ark., 2005).

Bakterisit etkiye sahip metronidazol hem aerop hem de anaerop bakterilerin içine difüzyonla girebilir. Hücrenin içinde anaerop metabolik yollarda bulunan bir işlem vasıtasıyla 5-nitro pozisyonuna indirgenir. Hücre içinde metronidazol metabolitleri, DNA ile ve diğer makromoleküllerle reaksiyona girerek hücre ölümüne sebep olur (Newman ve van Winkelhoff., 2006).



Şekil 5: Metronidazolün yapısı

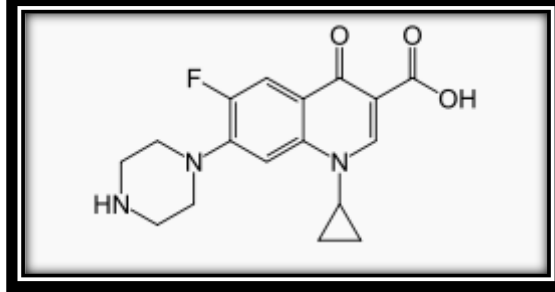
Minosiklin, tetrasiklin türevi olan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Şekil 6). Tetrasiklinler, Gram-pozitif ve Gram-negatif bakterilere, treponemalara, mikoplazmalara, klamidyalara, riketsiyalara ve protozoonlara karşı etkilidir. Bakteriyostatik etkiye sahip olan bu ilaçlar bakteri ribozomunun 30S alt birimine bağlanır ve aminoasil-t-RNA sentetazlarının, ribozomun akseptör kısmına bağlanmalarını spesifik olarak inhibe eder ve peptid zincirine aminoasit bağlanmasını imkansız hale getirir (Newman ve van Winkelhoff., 2006). Yıkım hücrelerinin inhibisyonunu sağlayarak antirezorptif aktivitenin oluşmasına neden olur (Bryson ve ark., 2002).



Şekil 6: Minosiklinin yapısı

Siprofloksasin kuvvetli bakterisit etkiye sahip ikinci kuşak bir kinolon türüdür (Şekil 7). DNA' nın kopyalandığı sırada, süpersarmal durumundaki molekül, transkripsiyon işleminin gerçekleşmesi için açılmış olmalıdır. Kinolonlar, bu işlemde sorumlu bakteriyel enzim olan DNA topoizomerazın etkisini bozar. Siprofloksasin oral yolla verildiğinde % 50-98 oranında absorbe olur (Newman ve van Winkelhoff., 2006). Yan etkilerinin olması ile birlikte uygun dozlarda

kullanıldığında klinik olarak güvenlidir (Black ve ark., 1990). Oral anaeroplara, Gram-pozitif aerobik mikroorganizmalar ve Gram-negatif enterobakterlere karşı olan etkisi nedeniyle endodonti alanında kullanılmaktadır (Ferreira ve ark., 2010).



Şekil 7: Siprofloksasinin yapısı

Siprofloksasin hidroklorid, metronidazol ve klindamisin hidroklorid' in insan dişeti fibroblastları üzerindeki sitotoksitelerinin hem doz hem de zaman aralıklarına göre araştırıldığı bir çalışmada her üç antibiyotiğin de doza bağlı toksisite gösterdiği, 24 saatin sonunda hücre canlılığının diğer zaman aralıklarından daha fazla olduğu ve üç antibiyotiğin de % 5 ve % 50 mg/l konsantrasyonlarındaki tüm zaman aralıklarında fibroblastların canlılıklarını korudukları gözlemlenmiştir (Ferreira ve ark., 2010).

Üçlü antibiyotik patının endodontide birçok kullanım alanı vardır. Günümüzde üçlü antibiyotik patı rejenerasyon vakalarında, periradiküler lezyonlu inatçı vakalarda ve kök rezorpsiyonlarında sıklıkla kullanılmaktadır (Takushige ve ark., 2004; Özan ve Er, 2005; Yassen ve ark., 2013).

Niigata Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Çürük Araştırma Birimi tarafından pulpal, dentinal ve periapikal enfeksiyonlar da dahil ağız içi tüm enfeksiyonlarda çoklu antibiyotik kullanımını öneren 'Lezyon Sterilizasyon ve Doku Tamiri' tedavisini geliştirmişlerdir (Hoshino ve Takushige, 1998). Anaeroplara karşı olan geniş bakterisit etkisi nedeniyle bu ilaç kombinasyonundaki ilk antibiyotik metronidazoldur. Ancak bazı bakterilerin metronidazole karşı dirençli olması nedeniyle siprofloksasin ve minosiklin de bu antibiyotiğe eklenmiştir. LSTR tedavisi uygulanan ve başarılı sonuçlar alındığı bildirilen birçok çalışma vardır (Takushige ve ark., 2004; Trope, 2008; Mozayeni ve ark., 2014).

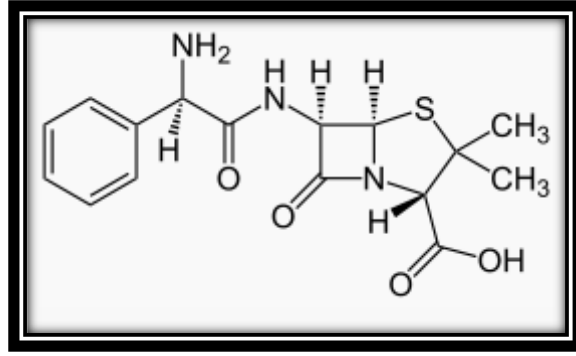
Üçlü patın en büyük dezavantajlarından biri dişte yarattığı renklenmedir. Çekilmiş dişlerle yapılan bir çalışmada üçlü pat, metronidazol, siprofloksasin ve minosiklin ara seans medikamenti olarak kullanılmıştır. Karanlık ortamda saklanan dişlerde en fazla renklenme üçlü patta görülmüştür. Benzer renklenme miktarı tek kullanılan antibiyotiklerden yalnızca minosiklinde gözlemlendiğinden üçlü pattaki renklenmenin sebebinin minosiklin olduğu düşünülmüştür (Kim ve ark., 2010).

Pulpal nekrozlu 31 kök kanalından izole edilen mikroorganizmaların % 88,9'unun zorunlu anaerop olduğu tespit edilen bir çalışmada antimikrobiyal duyarlılık paterni de incelenmiştir. Metronidazolün % 96,3 oranında bu zorunlu mikroorganizmalara etkili olduğu görülürken yalnızca iki izolatta dirence rastlanmıştır. Tetrasiklinin ise % 59,3 oranında mikrobiyal büyümeyi engellediği görülmüştür. Aynı çalışmada fakültatif anaerop izole edilme oranı % 51,8 olarak bildirilmiştir. İzole edilen bu fakültatif anaerop bakterilere metronidazol % 50, tetrasiklin ise % 94,1 oranında etkili bulunmuştur (Lana ve ark., 2001).

2.3.2.4. Ampisilin

Ampisilin bir penisilin türevidir. Penisilin ilk kez 1928 yılında Fleming tarafından keşfedilmiştir. Fleming, *Penicillium notatum* adındaki bir mantarın salgıladığı bir maddenin stafilokok kültürlerinde lizise neden olduğunu keşfetmiş ve bu antibakteriyel maddeye penisilin adı vermiştir.

Ampisilin, hücre duvarı sentezini inhibe ederek ve otoliz enzimlerini aktive ederek etki gösteren genişçe spektrumlu bir penisilin türevi antibiyotiktir. Bir beta laktam antibiyotiği olup aminopenisilin ailesinin bir parçasıdır (Şekil 8) (en.wikipedia.org. erişim tarihi: 20 Eylül 2014). Bu antibiyotik çekirdek kısmında beta laktam halkası içerir ve bir beta laktam halkası bir azot ve üç karbondan oluşur.



Şekil 8: Ampisilinin yapısı

E. faecalis' in ampisiline direnci ile ilgili yapılan çalışmalar çelişkilidir. *E. faecalis*' in % 47,3 oranında ampisiline dirençli olduğunu bildiren yayınların yanısıra, % 100 etkili olduğunu savunan çalışmalar da mevcuttur (Johnson ve ark., 2000; Sreeja ve ark., 2012).

1994-1995 yıllarında İsveçte kök kanal tedavisi yapılan hastaların kök kanalından izole edilen enterokokların fenotipik ve genotipik özelliklerinin incelendiği bir çalışmada 33 enterokok türü izole edilmiştir. Bunların beşinde tetrasiklin, birinde gentamisine karşı direnç gözlemlenirken ampisilin, benzylpenisilin, kloramfenikol, eritromisin, fusidik asit, kanamisin, rifampin, streptomisin ve vankomisine karşı tüm türlerin duyarlı olduğu tespit edilmiştir (Sedgley ve ark., 2005a).

Finlandiya ve Litvanya' da ortak olarak yürütülen ve kök kanalından izole edilen *E. faecalis*' lerin antibiyotik duyarlılıklarının incelendiği çalışmada tüm türlerin penisilin, ampisilin, glikopeptit ve linezoide karşı duyarlı olduğu görülmüştür. Aynı çalışmada rifampisine karşı yüksek oranda direnç gözlemlenirken, vankomisin ya da yüksek derece gentamisin direnci tespit edilmemiştir (Reynaud af Geijersstam ve ark., 2006).

2.3.2.5 Aminoglikozitler

Aminoglikozit antibiyotikler 60 yılı aşındır aminoglikozidik aminosislitoller olarak bilinmektedir (Begg ve Barclay, 1995). Aminoglikozit antibiyotik grubu; streptomisin, neomisin, kanamisin, gentamisin, sisomisin, netilmisin, amikasin, tobramisin, viomisin, spektinomisin ve paramomisin içerir (Akkan, 1997). Protein sentezini ve bakteri hücre duvarı bütünlüğünü değiştirerek antimikrobiyal etki

gösterirler (Vakulenko ve Mobashery, 2003). Geniş antimikrobiyal spektruma sahiptirler. Aminoglikozitlerin birçok antibiyotikle sinerjik etki göstermeleri onları antienfektif olarak tanımlamaktadır (Van hoek ve ark., 2011).

1940' ların başında ilk aminoglikozit olan streptomisin *Streptomyces griseus'* tan elde edilmiştir (Schatz ve Waksman, 1944). 1949 yılında neomisin, 1957 yılında ise kanamisin diğer *Streptomyces* türlerinden elde edilmiştir (Van hoek ve ark., 2011). Gentamisin ise 1960'lı yıllarda actinomycete *Micromonospora purpurea'dan* türetilmiştir (Van hoek ve ark., 2011).

Aminoglikozitlerin sitoplazmik membrandan aktif transportu yetersiz olduğundan, *E. faecalis* bunlara karşı oldukça dirençlidir (Aslangül ve ark., 2005). *E. faecalis'* in yüksek oranda gentamisine dirençli olduğu ilk olarak 1979 yılında tespit edilmiştir (Horodniceanu ve ark., 1979). Bu çalışmada tek başına etki gösteremeyen aminoglikozitlerin penisilin türleri ile kombine kullanımının sinerjik etki yaptığı ve enterokokal endokardit tedavisinde etkili olduğu bildirilmiştir. Eliopoulos ve arkadaşları, farklı aminoglikozit türlerinin (kanamisin, tobramisin, gentamisin, amikasin, streptomisin) ampisilin ile kombine uygulandığı durumlarda *E. faecalis'* in gösterdiği direnci inceledikleri çalışmalarında sadece gentamisin ve ampisilin kombinasyonunda iyileşme gözlemlediklerini bildirmişlerdir (Eliopoulos ve ark., 1988).

Çeşitli gıdalardan izole edilen 14 *E. faecalis* türü üzerinde çeşitli antibiyotiklerin duyarlılıklarını araştıran bir çalışmada 14 türün 12' sinde rifampisine, 9' unda siprofloksasine, 6' sında eritromisine, 5' inde tetrasikline direnç ile karşılaşırken 14 türün hepsinin ampisilin, gentamisin ve penisilinin karşı duyarlı olduğu bildirilmiştir (Sanchez Valenzuela ve ark., 2013).

Altı farklı antibiyotik ve kalsiyum hidroksitin selüloz membran filtre modelinde *E. faecalis* biofilmi üzerinde antimikrobiyal etkinliğinin kıyaslandığı bir çalışmada eritromisin, oksitetrasiklin ve kalsiyum hidroksit biyofilmi % 100 yok edebilirken, ampisilin, kotrimaksazol, vankomisin ve vankomisini takiben uygulanan gentamisinin yeterli etkinlik gösteremediği bildirilmiştir (Chai ve ark., 2007).

2.3.3. Laktoferrin

Laktoferrin; transferrin ailesinden 78-kDa demir bağlayan bir glikoproteindir (Orla, 2001). Çeşitli memeli hayvanların sütünde, gözyaşı, tükürük gibi ekzokrin sekresyonlarda, sinoviyal sıvıda, kan ve nötrofillerin sekonder granüllerinde bulunmaktadır (Dashper ve ark., 2012). Bu protein ayrıca polimorfonükleer nötrofillerin ikincil granüllerinden de salınmaktadır (Masson ve ark., 1969). İnsan sütünde en sık ratlanan ikinci proteindir (Hennart ve ark., 1991). Laktoferrinin polipeptit yapısı, intrajenik dublikasyon sırasında açığa çıkan iki homolog alana sahiptir (Metz-Boutigue ve ark., 1984). Proteinin kristal yapısı çözülür ve bu alanların her biri bir ferrik bir de karbonat anyona bağlanır (Anderson ve ark., 1989; Anderson ve ark., 1990). Bununla birlikte, her bir alan N-bağlı glikan artıklarına yapışan glikozillenmiş bir sahaya sahiptir (Spik ve ark., 1988).

Doğal bağışıklık sisteminde önemli bir rol oynadığı, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antitümöral, parasitidal ve antienflamatuvar etki gösterdiğini bildiren çalışmalar vardır (Orla, 2001; Orsi, 2004).

2.3.3.1. Laktoferrinin antibakteriyel etkisi

Laktoferrin, bakteriyostatik ve bakterisit olmak üzere iki farklı antibakteriyel etki mekanizmasına sahiptir.

2.3.3.1.A. Bakteriyostatik etki

Laktoferrin yüksek oranda demir bağlama kapasitesi sayesinde, Gram-negatif bakterilerin, Gram-pozitif bakterilerin ve bazı mantarların gelişimini engelleyerek bakteriyostatik etki göstermektedir (Bullen ve ark., 1978). Bakteriyostazis geçici bir antimikrobiyal etkidir ve bu etki bazı bakteriyel patojenlerin demiri konaktan geri çekmesi ile engellenebilmektedir. Bunu iki yolla gerçekleştirirler (Ratledge ve Dover, 2000).

Birinci yol, yüksek oranda ferrik iyonuna bağlanma kapasitesine sahip olan ve böylece elde ettiği demiri hücre içine özel membran reseptörleri ile taşıyabilen sideroforez adı verilen küçük şelatörleri sentezlemesidir (Braun ve Killmann, 1999). Sideroforezler yapısal olarak üç sınıfa ayrılırlar: hidrosimat, katekolat ve

hidroksikarboksilatlar. Bunların üretimi demirden yoksun olan ortamlarda kromozom ya da plasmide bağlı olarak gerçekleşir (Orsi, 2004).

İkinci yol, konak adaptasyonu oldukça fazla olan bazı bakteri türlerinin laktoferrinden demiri direk olarak uzaklaştırabilecek özel yollar geliştirebilmesidir. Bu işlem laktoferrinin ya da transferrinin yüzeyinden direkt olarak demiri uzaklaştırabilen ya da bağlayabilen özel dış membran reseptörlerinin işlevi ile gerçekleşir. Bu reseptörlerin sentezi bakteriyel demirin varlığına göre gerçekleşir (Orsi, 2004).

2.3.3.1.B. Bakterisit etki

Laktoferrin bakteristatik etkisinin yanı sıra bakterisit etkiye de sahiptir. Laktoferrinin N-terminalindeki katyonik saha bu bakterisidal etkiden sorumludur (Orla, 2001). Laktoferrinin bazı Gram-negatif ve Gram-pozitif bakterilere direkt bakterisit etkisi mevcuttur ve bu etki sadece ortamı demirden yoksun bırakma ile açıklanamaz. Apolaktoferrin aynı zamanda bakterinin canlılığını hızlı bir şekilde kaybetmesine neden olur ve bu etki ortama demir ilave edilse bile geri döndürülemez (Arnold ve ark., 1981).

Multifonksiyonel bir protein olan laktoferrinin yüzeyinde katyonik bir alan bulunur ve bu alan, Gram-negatif bakterilerden salınan LPS' nin yapısındaki anyonik Lipid A ile direk etkileşime geçerek bakterinin membranına hasar verir ve LPS' nin salınmasına neden olur. Ancak bu etkileşim ortamda var olan Mg^{2+} ve Ca^{2+} iyonları tarafından engellenebilir. Bu durumda laktoferrin ortamdaki Ca^{2+} iyonun direk bağlanarak EDTA gibi katyonik şelatör etkisi gösterir ve bakteri membranından LPS salınımını uyarır (Jenssen ve Hancock, 2009) . Salgılanan LPS ise hücrenin ölümüne sebebiyet verir (Ellison ve ark., 1988).

2.3.3.2. Laktoferrinin antifungal etkisi

Laktoferrinin antifungal etkisinin demir-şelasyon aktivitesinin yanı sıra *Candida* ile direkt etkileşime girebilmesinden dolayı olduğu kanıtlanmıştır (Valenti ve ark., 1986). Bu kandidasidal aktivite, laktoferrinin ve laktoferrinin peptit türevi olan laktoferrininin direkt olarak *Candida* hücrelerine bağlanabilmesi (Bellamy ve ark., 1993) ve hücre membranında etki göstererek hücre geçirgenliğini değiştirebilmesi yoluyla olur (Wakabayashi ve ark., 1996). Mantar enfeksiyonlarında azol içeren

antifungal ilaçların kullanılması *C. albicans*' in azole karşı direnç geliştirmesine neden olabilmektedir. Laktoferrin birleşiklerinin triazol ile kombine uygulanımı ile azole karşı direnç geliştirmiş *Candida* türlerinin patojeniteden sorumlu olan hif formlarının gelişimi inhibe edilebilir (Wakabayashi ve ark., 1998).

Laktoferrinin diş hekimliğinde oral kullanımı da mevcuttur. Shimizu ve arkadaşları, periodontal amaçlı laktoferrin ve laktoperoksidaz içeren tabletleri oral uyguladıkları çalışmalarında LF ve LPO' nun periodontal ve bakteriyolojik profillerinin zayıf olduğunu göstermişlerdir (Shimizu ve ark., 2011).

2.3.3.3. Laktoferrinin antiviral etkisi

Laktoferrin viral enfeksiyonun erken safhalarında virüs üzerinde inhibisyon etkisi gösterir. Ayrıca virüslerin reseptör olarak kullandıkları konak hücre moleküllerine bağlanarak da antiviral etki gösterebilirler. Laktoferrine karşı duyarlı olan birçok virüs mevcuttur (Orsi, 2004).

Herpes simplex virüs tip 1 ve 2, human sitomegalovirüs, HIV, Hepatit B virüsü, Hepatit C virüsü, rotavirüs, poliovirüs, adenovirüs, enterovirüs 71 bunların arasındadır. HIV enfeksiyonlarında laktoferrinin zidovudine ile birlikte kullanımının sinerjik etki yarattığı gözlemlenmiştir (Viani ve ark., 1999). Ayrıca sitomegalovirüs enfeksiyonu olgularında laktoferrinin anti-sitomegalovirüs ilacı ile kombine kullanımı da önerilmektedir (Van der Strate ve ark., 2001).

2.4. Mikroorganizma İzolasyon Yöntemleri

Mikrobiyolojide izolasyon, mikroorganizmanın saf olarak elde edilmesidir. Saf kültür, sadece tek bir mikroorganizma hücresinden çoğaltılmış olan mikroorganizma topluluğudur. İzolasyon amacıyla kullanılan tüm yöntemlerde sıvı veya katı besiyeri, genel veya selektif besiyeri kullanılır. Mikroorganizma izolasyonunun temel basamağı koloni elde edilmesidir. Koloni, katı besiyerinde tek bir hücrenin çoğaltılması sonunda meydana gelen milyonlarca hücrenin oluşturduğu yapı olarak tanımlanır. İzole edilen mikroorganizmanın türünün ve cinsinin belirlenmesine ise tanımlama denir. Tanımlamanın genel olarak üç basamağı vardır. Bunlar sırasıyla morfolojik ve fizyolojik özelliklerin belirlenmesi, biyokimyasal testler ve serolojik/toksin belirleme testleridir. Pratikte ise tanımlama için bakterinin morfolojik özellikleri, oksijen gereksinimi ve karbonhidrat kullanma şeklini ortaya koymak

gereklidir (<http://www.mikrobiyoloji.org/genelpdf/210010701.pdf> Erişim tarihi: 28 Eylül 2014).

2.4.1. Mikrobiyolojik kültür yöntemi

Mikrobiyolojik kültür yöntemi geleneksel bir tanı yöntemi olup mikrobiyolojinin temel ve basit tanısal yöntemlerden biridir. Kültür yöntemi, laboratuvar şartlarında yaratılan kültür ortamında mikrobiyal organizmanın üretilmesi ve çoğaltılması esasına dayanır. Bu yöntem ile mikroorganizmanın türü ve örnekte bulunma sıklığı belirlenebilir. Ancak kültüre edilemeyen bakterilerin varlığı, örnekten dilüsyon yolu ile agar ekim yapımı sırasında örneğin tamamının temsil edilememesi, sonuçların geç alınması ve mikroorganizmanın üremesi için gerekli çevresel şartların sağlanmasında zorluklarla karşılaşılması bu yöntemin dezavantajlarından (Siqueira ve Roças, 2003).

2.4.2. Moleküler yöntemler

Moleküler tanı yöntemleri, geleneksel tanı yöntemleri ile belirlenmesi zor olan enfeksiyöz hastalıkların patojenitesinin tanımlanmasında sıklıkla kullanılırlar. Moleküler yöntemler, kültür yöntemleri ile izole edilemeyen insan patojenlerinin ve mikrobiyotanın çok az sayıda olan türlerinin tespitinde oldukça önemli bir yer tutar.

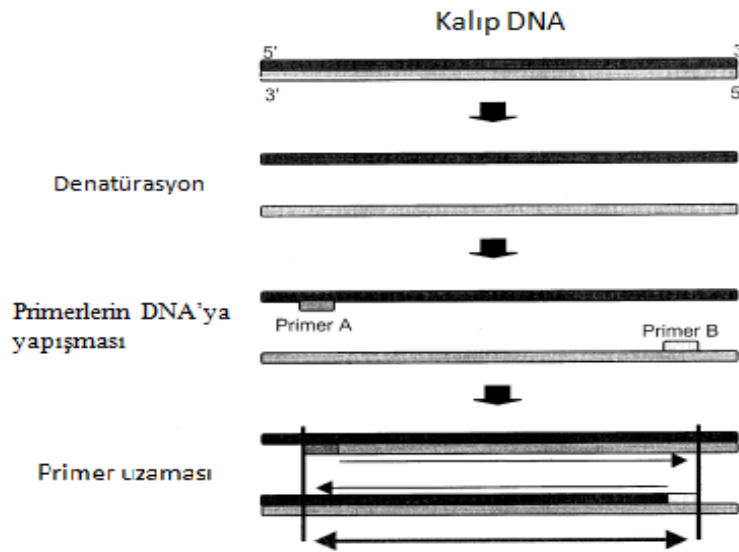
Günümüzde sıklıkla kullanılan moleküler teknikler PFGE (Darbeli Alan Jel Elektroforezi), PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu), MLST (Çoklu Lokus Dizilim Analizi), MALDI-TOF (Matriks Destekli Lazer Desorpsiyonu/Iyonizasyonu-Uçuş Süresi) ve 16S rDNA Dizilim Analizidir (Çetinkaya ve Ayhan, 2012).

PZR yöntemi 1983 yılında Kary Mullis tarafından tasarlanmıştır. Araştırmacı bu çalışması ile Nobel Kimya ödülünün sahibi olmuştur. PZR: in vitro koşullar altında bir çift sentetik primer kullanarak DNA' nın hedeflenen bölgesine özgü DNA parçasının çoğaltılması esasına dayanır (Siqueira Jr, 2005). Literatürlerde Sayımsal-Kinetik PZR ve Floresan Sayımsal-PZR adlarıyla rastlamak da mümkündür (Savlı ve Hatırnaz, 2004; Günel ve Aydın, 2009).

Polimeraz zincir reaksiyonu işleminde DNA' nın replikasyonunun yapılması amacıyla in vitro olarak bir tepkime karışımı hazırlanır. Bu tepkime karışımı hedeflenen bölgeye özgü bir çift primer, bu primerlere bağlanacak d NTP' ler

(A,G,C,T), iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı, uygun pH ve çoğaltılması hedeflenen DNA içermektedir. PZR işlemi üç basamaktan oluşur. Bu üç basamak bir PZR döngüsünü oluşturur ve bu döngüler tekrarlanır (Şekil 9) (Siqueira Jr ve Roças, 2003).

1. basamak hedef nükleik asitlerin denatürasyonudur. Çoğaltılacak olan DNA'nın tek zincirli hale gelebilmesi için DNA 90-95° C ısıya maruz bırakılır.
2. basamak primer tavlama aşamasıdır. Sıcaklık 50-70° C' ye düşürülür. Böylece primerler (15-30 nükleotid uzunluğundaki sentetik oligonükleotidler) tek zincir halindeki DNA'ya bağlanabilirler.
3. basamak primer-hedef bölge dubleksinin ekstansiyonu ve polimerizasyonudur. Ortama ısıya dayanıklı bir DNA polimeraz eklenir ve ortamdaki deoksिनükleotidlerin de bağlanmasıyla DNA sentezi gerçekleşir (70-75° C).



Şekil 9: Polimeraz zincir reaksiyonu basamaklarını gösteren diyagram (Siqueira ve Roças, 2003)

PZR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PZR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmelidir. Erime ısısı (T_m), bir amplifikasyon ürünü genin %50'sinin denatüre olduğu sıcaklık değeridir ve bu

değer genin dizisine ve % GC oranına bağlı olarak farklılık gösterir. Erime eğrisi yöntemi de bu özellikten yararlanarak, PZR sonunda elde edilen amplifikasyon eğrilerinin gen ürünü mü yoksa primer dimer ya da ortam kirliliğine bağlı bir eğri olup olmadığını belirler (Savlı ve Hatırnaz, 2004). Primer-dimerler küçük DNA ürünleri olup primerlerin birbirine bağlanması ya da DNA polimeraz enziminin spesifik olmayan nükleotidleri, kullanılmayan primerlerin uçlarına bağlanması neticesinde oluşur (Yıldırım ve ark., 2011).

İyi düzenlenmiş primerler doğru bölgelere bağlanarak amplifikasyon ya da genomik DNA kontaminasyonundan kaynaklanan yanlış pozitif sonuçları önleyebilir. İdeal bir amplifikasyon için, primer seçimi T_m sonucuna bakılarak yapılmalıdır ve primer boyları birbirine yakın olmalıdır. Genel olarak tek zincirli primerler 15-20 baz uzunluğunda ve G/C içerikleri arasındaki fark % 20 - % 70 arasında olmalıdır. T_m dereceleri 1-2° C' den fazla olmamalı ve maksimum T_m 58-60° C olmalıdır. Ayrıca 3' ucundaki son 5 bazda G-C bazlarının sayısını bir ya da ikiden fazla olmayacak şekilde biçimlendirmek de faydalıdır. Böylece DNA polimerazın non-spesifik uzantılandırmalarının önüne geçilebilir (Savlı ve Hatırnaz, 2004).

Günümüzde en sık kullanılan PZR (PCR) yöntemleri: Multiplex PCR, Nested PCR, Arbitrary primed PCR (AP-PCR), Reverse transcriptase PCR, Broad-range PCR ve Real-Time PCR (Gerçek zamanlı PZR, Q-PCR)'dir.

Bugün için yaygın olarak kullanılan 3 farklı Gerçek Zamanlı PZR sistemi piyasada mevcuttur. ABI Prism 7700, 96 delikli bir termal ısıtıcı içerir ve 500-660 nm floresan aralığını ölçebilme kapasitesine sahip bir sistemdir. Fazla sayıda örneği aynı anda analiz edebilir ve 2 saatlik bir süreç sonunda sonuçları verebilir. LightCycler, sıcak hava akımı ile ısınan bir kapalı sistem olup 20 dakikada sonuç verebilmesine rağmen yalnızca 32 reaksiyon gerçekleştirebilen bir sistemdir. BioRad Instruments'ın i-cycler adlı yöntemiyle bir 'thermal-cycler' cihazını optik bir modüle bağlayan, hem ABI 7700 hem de LightCycler' dan daha geniş bir dalga boyunda saptama yapabilme avantajına sahiptir. Ayrıca dört ayrı floresan bildiricisiyle alternatif Gerçek Zamanlı PZR seçeneklerine imkan sağlar. Üstelik

96 örneği ABI 7700' deki gibi gerçek zamanlı değil ardışık olarak tarayabilme imkanı da sağlamaktadır (Savlı ve Hatırnaz, 2004).

Gerçek Zamanlı PZR, ürünlerin kalitatif değerlendirmesinin yanı sıra amplifikasyon ürünlerinin kantitatif değerlendirmesini de yapabilen tek PZR yöntemidir. Diğer bir deyişle, hedef mikroorganizmanın sadece varlığını ya da yokluğunu göstermekle kalmaz sayısal olarak da bu mikroorganizmaların değerini verebilir. Üstün kopyalama yeteneği, hassasiyeti, PZR ürünlerinin işlem sırasında ekranda aynı anda görülebilmesi, 30-120 dakikada sonuç vermesi, kontaminasyon riskinin düşük olması, çok az miktardaki biyolojik bir ürünün özelliğini hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde ortaya koyabilmesi gibi üstün özellikleri nedeniyle günümüzde sıklıkla kullanılmaktadır (Song, 2005; Sedgley, 2005b; Günel ve Aydın, 2009). Üzerinde çalışma yapılan materyal çok az olsa bile Gerçek Zamanlı PZR ile çoğaltılabilir ve homojen bir DNA materyali haline getirilebilir (Schochetman ve Jones, 1988). Onkolojik çalışmalar, genetiği değiştirilmiş organizmalar, adli tıp, patojen tespiti, ilaç endüstrisi, DNA hasarı, genotipleme, bioterörizm, metilasyon araştırmaları ve doğum öncesi tanı çalışmaları Gerçek zamanlı PZR' in uygulama alanlarıdır (Günel ve Aydın, 2009).

Kök kanallarından mikroorganizmaların izolasyonu amacıyla kültür ve moleküler tekniklerin kullanıldığı ve başarı oranlarının karşılaştırıldığı birçok çalışma mevcuttur (Zoletti ve ark., 2006; Gomes ve ark., 2006; Dumani ve ark., 2008; Weckwerth ve ark., 2013). Dumani, yaptığı çalışmada birincil ve ikincil enfeksiyonlarda *E. faecalis* bulunma oranını kültür ve PZR yöntemi ile incelemiştir. Bu çalışmanın sonucunda hem birincil hem de ikincil enfeksiyonlu dişlerde *E. faecalis* bulunma oranlarının tespitinde kullanılan iki farklı yöntem arasında bir fark görülmediği bildirilmiştir (Dumani, 2008).

Gomes ve arkadaşları, 100 örnek ile yaptıkları (50 diş birincil enfeksiyon, 50 diş ikincil enfeksiyon) çalışmada PZR ve kültür metodunu kıyaslamışlardır. Kültür yöntemi ile birincil enfeksiyonlu dişlerin % 4' ünde ve ikincil enfeksiyonlu dişin % 42' sinde, PZR metodu ile birincil enfeksiyonlu dişlerin % 82' sinde ve ikincil enfeksiyonlu dişlerin % 76' sında *E. faecalis'* i izole etmişlerdir. Bu çalışmada *E.*

faecalis' e ikincil enfeksiyonlarda yüksek oranda rastlanılmasının sebebinin kural sızıntı olabileceği düşünülmüştür (Gomes ve ark., 2006).

Zoletti ve arkadaşları, 50 diş üzerinde yaptıkları çalışmada PZR ve kültür yöntemini kıyaslamışlardır. Kültür yöntemi ile 50 dişin % 16' sında *E. faecalis* izole edilirken, tür spesifik 16 S rRNA gen esaslı PZR kullanıldığında ise % 80 oranında *E. faecalis* izole edilmiştir. Bu çalışmada, periradiküler lezyonu olmayan 27 dişin kanal tedavileri tekrar edilmiş ve PZR yöntemi ile 22, kültür yöntemi ile 5 vakada *E. faecalis*' e rastlanmıştır. Bunun yanı sıra periradiküler kemik kaybı olan 23 dişte ise yapılan kanal tedavisi tekrarlarında PZR yöntem ile 18, kültür yöntemi ile 3 vakada *E. faecalis* izole edilmiştir. Bu çalışmada *E. faecalis*' i izole etmede PZR yönteminin kültür yönteminden daha etkili olduğu gözlemlenmiştir (Zoletti ve ark., 2006).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

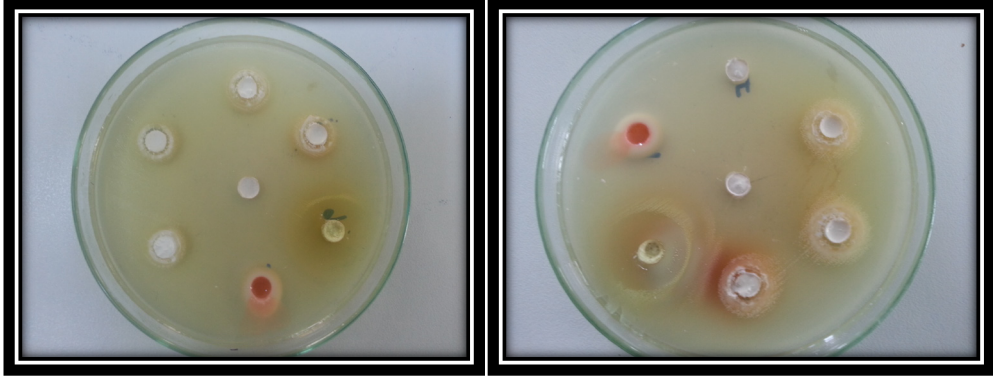
Bu araştırma Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı, Mikrobiyoloji Bilim Dalı ve Bioeksen Ar-Ge Teknolojileri laboratuvarlarında yapılmıştır. Çalışmamızda *E. faecalis* ve *C. albicans* suşları ile enfekte edilen diş köklerinde farklı kök kanal medikamentlerinin antimikrobiyal etkinlikleri in vitro olarak karşılaştırılmıştır.

Çalışmamızda 240 adet tek kök tek kanallı çekilmiş insan dişi kullanılmıştır. Dişler çekildikten sonra yüzeylerindeki organik artıklar temizlenip steril serum fizyolojik sıvısı içinde işlemler başlayıncaya kadar bekletilmiştir.

3.1.Ön Çalışmalar

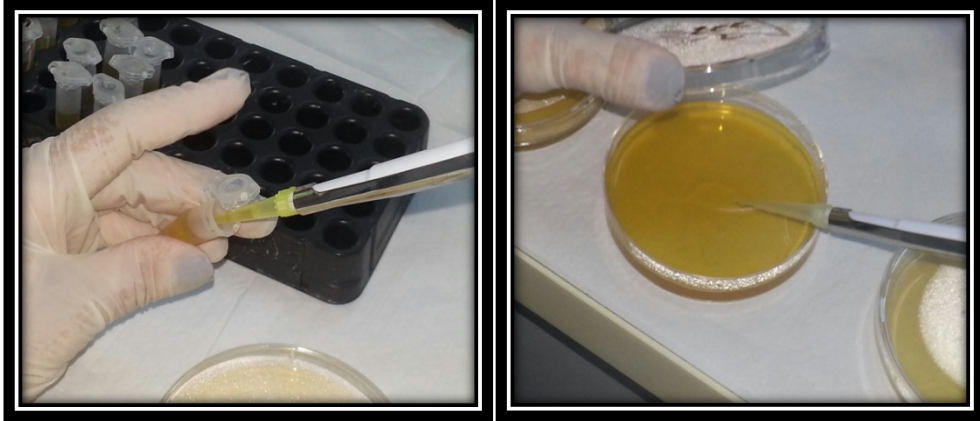
Bu çalışmada farklı kök kanal medikamentlerinin iki farklı mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkinliğini kıyaslamak amacıyla kullanılacak metodun ve kök kanal medikamentlerinin oranlarının belirlenmesi amacıyla toplam 12 adet pilot çalışma yapılmıştır. Bu yapılan pilot çalışmaların 2' si agar difüzyon yöntemi, 8' i kültür yöntemi ve 2' si de farklı PZR metodlarının denenmesi üzerinedir.

Bilindiği üzere agar difüzyon yönteminde örnek ile agar arasında uygun temasın sağlanması, inkübasyon süresi, ortam ısısının standardize edilmesi ve test edilecek materyalin yoğunluğu oldukça önemlidir. Tüm bunlar dikkate alınarak yapılan 2 adet agar difüzyon testi ile yeni geliştirilen kök kanal medikamentlerinin antimikrobiyal etkinlikleri denenmiştir. Daha sonra geliştirilen kök kanal medikamentinin rutin olarak kullanılabilmesi için akışkan bir kıvam sağlayabilecek şekilde oranları belirlenmiştir (Resim 1). Agar yöntemi ile bakterisit etki ile bakteriyostatik etkinin ayırt edilememesi nedeniyle difüzyon testi tek başına deney metodu olarak seçilmemiştir.



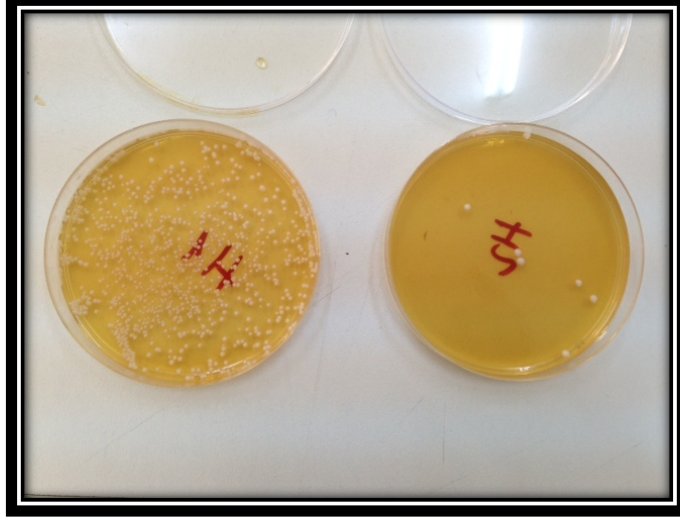
Resim 1: 48 saatin sonunda Agar difüzyon yöntemi ile elde edilen inhibisyon zonları

Yapılan 8 adet kültür yönteminde, kök kanallarının mikroorganizmalar ile enfekte edilme süreleri, kök kanalından örnek alma yöntemleri, petriye örneklerin ekimini takiben beklenen süre, kök kanallarından örnek almadan önce yapılan irigasyon miktarlarının denenmesi, etüv ortamında kök kanal ağzlarının geçici dolgu materyali ile kapatılması ya da açık bırakılması, dış köklerinin dış yüzünün tırnak cilası ile kaplanması, numunelerin tabanlarının nemli pamuk ile kaplanmasının önemi gibi birçok faktörün etkisi göz önüne alındığında, deneylerin sonucunu etkileyen üç adet sorunla karşılaşmıştır (Resim 2):



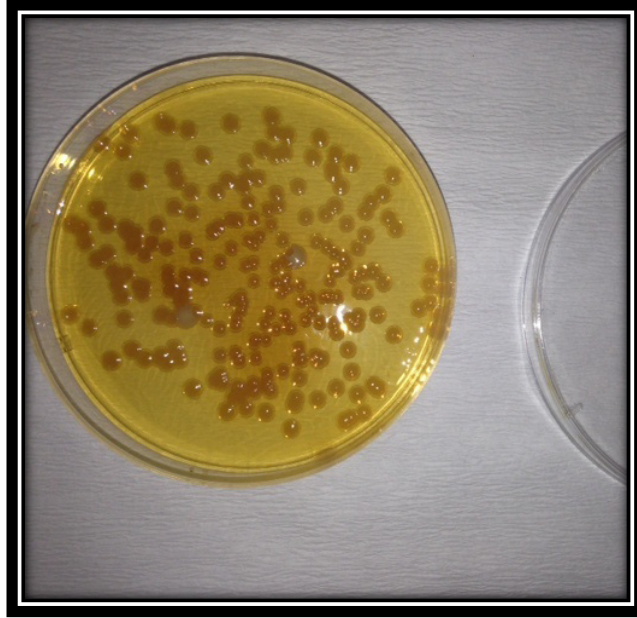
Resim 2: Kök kanalından alınan örneklerin petri kabına ekilmesi

1. Sorun: Elde edilen sonuçlar birbirleri ile uyumlu olmamış ve standardizasyon sağlanamamıştır (Resim 3).



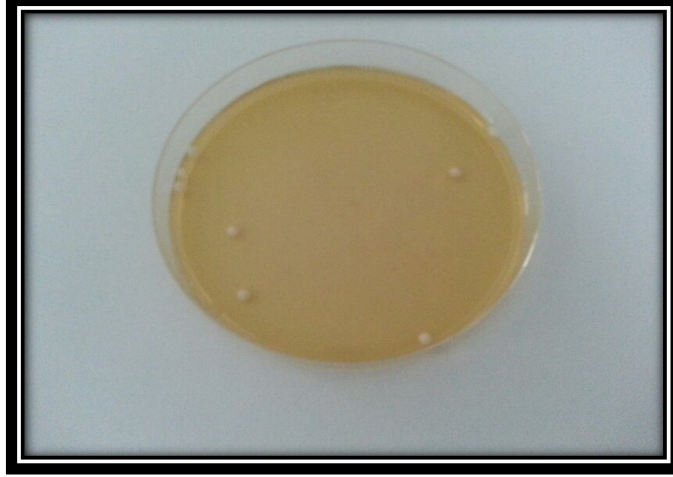
Resim 3: Aynı dişten alınan iki farklı örneğin kültür yöntemi ile besiyerine ekilmesi sonucu elde edilen mikroorganizma kolonizasyonu

2. Sorun: Uzun manipülasyon süresi hatalara yol açmış ve buna bağlı olarak kontaminasyon riskinin artmasına neden olmuştur (Resim 4).



Resim 4: *Candida albicans* ile enfekte edilen numunedan alınan örnekte meydana gelen kontaminasyon

3. Sorun: Paper point ile alınan örneklerde kanal medikamentlerinin besiyeri içeren petri kabına taşınabildiği ve buna bağlı olarak sonucun değiştiği gözlemlenmiştir (Resim 5).

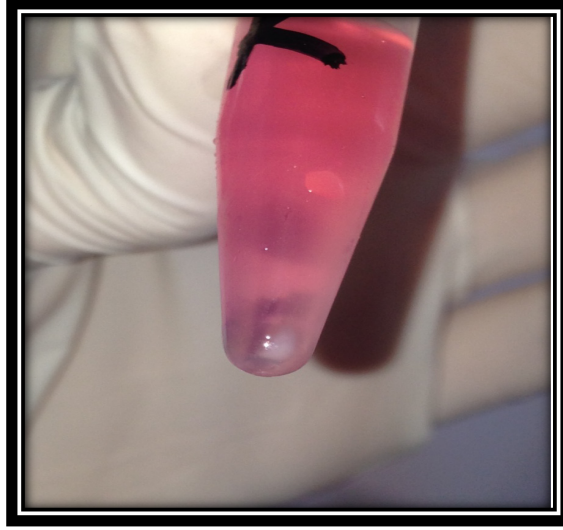


Resim 5: Kanal medikamentinin besiyerine taşınması sonucu meydana gelen üreme

Siqueira ve Roças da yaptıkları çalışmalarında, kök kanalından paper point ile örnek alınarak yapılan araştırmalarda hassasiyet oranı düşük olan tespit yöntemleri ile başarılı olunmadığını bildirmişlerdir (Siqueira ve Roças 2003).

Kültür yönteminde standardizasyon sağlanamamasının ardından daha net veriler elde etmek amacıyla moleküler yöntemler denenmiştir. Yaygın olarak kullanılan Universal PCR, tipe özgü PCR, Convention PCR ve AP-PCR yöntemleri mikroorganizmanın sadece varlığı ya da yokluğunu tespit edebildiklerinden çalışmamızda tercih edilmemiştir.

Yaptığımız ilk pilot PCR çalışmasında RNA üzerinden terstranskriptaz ile cDNA elde edilmesi denenmiştir (Resim 6) (RT-PCR). Buradaki amacımız canlı olan hücrelerin RNA' sı üzerinden çalışma kolaylığı olan DNA' yı elde etmektir. Terstranskriptaz PCR (RT-PCR) yöntemi, gen aktivitesini ve fonksiyonunu anlamamızı sağlayan bir yöntemdir (Song 2005). Ancak bir adet numunenin bir günde hazırlanabilmesi, RNA' nın kolay kaybedilebilmesi gibi çalışma zorlukları ve de maliyeti nedeniyle bu yöntem tercih edilmemiştir.

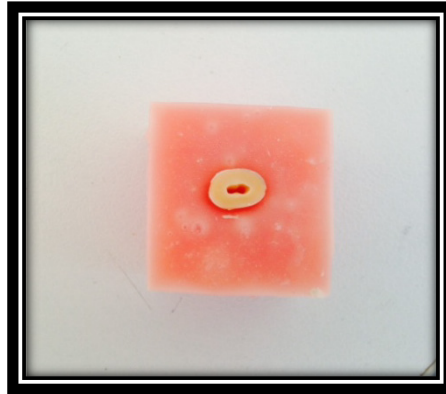


Resim 6: RT-PCR sonucu elde edilen DNA

Yapılan ikinci pilot PCR çalışmasında ise (Q-PCR) DNA izolasyonu ile ölü-canlı hücre ayrımı yapılmış ve kantitatif sonuçlar elde edilmiştir.

3.2. Çalışmada Kullanılan Deneysel Örneklerinin Hazırlanması

Çalışmamızda kullanılacak olan 240 adet tek kök tek kanallı insan dişleri kök boyları 15 mm olacak şekilde separe frezlerle kesilmiş ve eğe stoperlerini yerleştirebilmek adına düz platformlar oluşturulmuştur. Diş köklerinin yüzeyleri tırnak cilası ile kapatılmış ve apikalleri kompozit dolgu materyali ile kapatılmıştır. Silikon ölçü yardımı ile standart kalıplar oluşturulmuş ve akrilik karışımları hazırlanarak numuneler bu karışımlara kuronal 2 mm' lik kısmı dışarıda kalacak şekilde gömülmüştür (Resim 7).



Resim 7: Hazırlanan akrilik blok

Dişlerin endodontik giriş kavimleri açıldıktan sonra kök kanallarının mekanik preparasyonu Protaper Universal döner alet sistemi (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) (Resim 8) ve crown-down yöntemi ile F3'e kadar yapılmıştır. Şekillendirme esnasında her alet değişiminde % 2,5' lik NaOCl (Wizard, Rehber Chemistry, İstanbul, Turkey) solüsyonu ile kök kanalları yıkanmıştır. Kök kanal şekillendirme işlemi tamamlandıktan sonra kök kanalları % 17 EDTA ile yıkanmış ve 10 saniye kanalda bekletildikten sonra % 2,5' lik NaOCl solüsyonu ile yıkama işlemi tamamlanmıştır. Son yıkama serum fizyolojik ile yapılmıştır

Tüm çalışmamız boyunca aseptik şartlar sağlanmış ve kurutma kağıtları dahil otoklavlanmıştır (Resim 9).

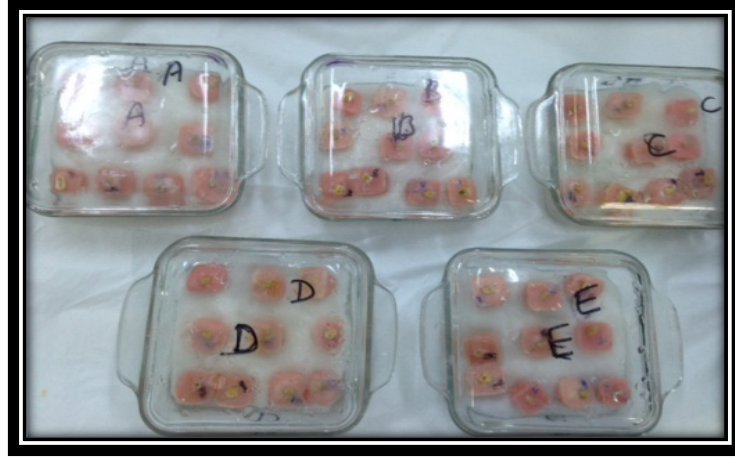


Resim 8: Protaper Universal Sistem



Resim 9: Otoklavlanan malzemeler

Hazırlanan dişler 10' arlı gruplara ayrılmış, ağız kapaklı cam kaplara yerleştirilmiş (Resim 10), tabanlarına pamuk peletler konulmuş ve otoklavda (Nüve, Model, Model OT 4060, Ankara, Türkiye) 1 atm basınçta 121° C' de 30 dakika steril edilmişlerdir.



Resim 10: Cam kaplara yerleştirilen numuneler

3.3. Deney ve Kontrol Gruplarının Oluşturulması

Çalışmamızda kullanılan 240 adet diş iki gruba ayrılmıştır. Daha sonra onarlı gruplar halinde deney ve kontrol grupları oluşturulmuştur.

A. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen grup (n:110)

1. grup (A1): Kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik (n:20)
2. grup (A2): Üçlü antibiyotik patı (metronidazol+siprofloksasin+minosiklin) + serum fizyolojik (n:20)
3. grup (A3): İkili antibiyotik pat (ampisilin + gentamisin) (n:20)
4. grup (A4): Modifiye üçlü pat (ampisilin + gentamisin + laktoferrin süspansiyonu) (n:20)
5. grup (A5): Laktoferrin süspansiyonu (n:20)
6. grup (AK):Pozitif kontrol grubu (n:10)

Negatif kontrol grubu n:10

Tablo 2: *E.faecalis* ile enfekte edilen gruplardaki numune sayıları

	GRUP 1		GRUP 2		GRUP 3		GRUP4		GRUP 5		KONTROL	
Gün:	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	P	N
Numune												
Sayısı:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

B. *Candida albicans* ile enfekte edilen grup (n:110)

1. grup (B1): Kalsiyum hidroksit + serum fizyolojik (n:20)
 2. grup (B2): Üçlü antibiyotik patı (metronidazol+siprofloksasin+minosiklin) + serum fizyolojik (n:20)
 3. grup (B3): İkili antibiyotik pat (ampisilin + gentamisin) (n:20)
 4. grup (B4): Modifiye üçlü pat (ampisilin + gentamisin + laktoferrin süspansiyonu) (n:20)
 5. grup (B5): Laktoferrin süspansiyonu (n:20)
 6. grup (B6):Pozitif kontrol grubu (n:10)
- Negatif kontrol grubu n:10

Tablo 3. *C. albicans* ile enfekte edilen gruplardaki numune sayıları

	GRUP 1		GRUP 2		GRUP 3		GRUP4		GRUP 5		KONTROL	
Gün:	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	3g.	7g.	P	N
Numune												
Sayısı:	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

3.4. Kök Kanallarının Enfekte Edilmesi

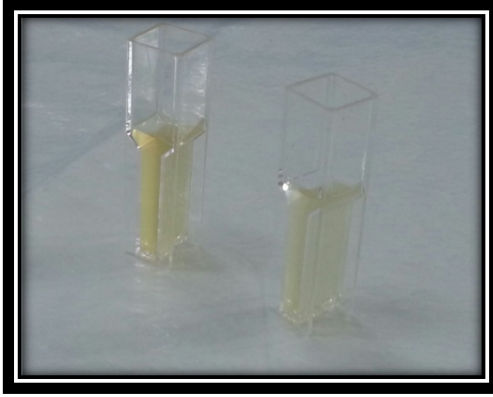
Numunelerin otoklavda sterilizasyonu tamamlandıktan sonra A grubundaki 110 adet örnek *E. faecalis* suşu ile enfekte edilmiştir. A grubundaki 10 adet örneğe sadece steril besiyeri inoküle edilmiş ve negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır. B grubundaki 110 adet örnek ise *C. albicans* suşu ile enfekte edilmiş ve B grubunda 10 adet örneğe sadece steril besiyeri inoküle edilerek negatif kontrol grubu olarak kullanılmıştır.

3.4.1. Kök kanallarının *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilmesi

A grubuna ait 110 adet dişin kök kanalını *Enterococcus faecalis* ile enfekte etmek için *E. faecalis*'in American Type of Culture Collection 29212 (ATCC 29212) standart suşu kullanılmıştır. *E. faecalis* suşu katı besiyeri olan Brain Heart Infusion Agar (BHIA)' da (LabM Limited, Lancashire BL9 7JJ, United Kingdom), pasajlanmış ve 37° C' de 24 saat etüvde (Nüve FN 500, Türkiye) bekletilmiştir. Daha sonra spektrofotometrede (Rayleigh Analytical Instruments, Beijing, China) 0,5 Mc Farland bulanıklık yoğunluğuna uygun olacak şekilde Brain Heart Infusion Broth (BHI) sıvı besiyerinde (LabM Limited, Lancashire BL9 7JJ, United Kingdom), bakteri süspansiyonu hazırlanmıştır (Resim 11, Resim 12).

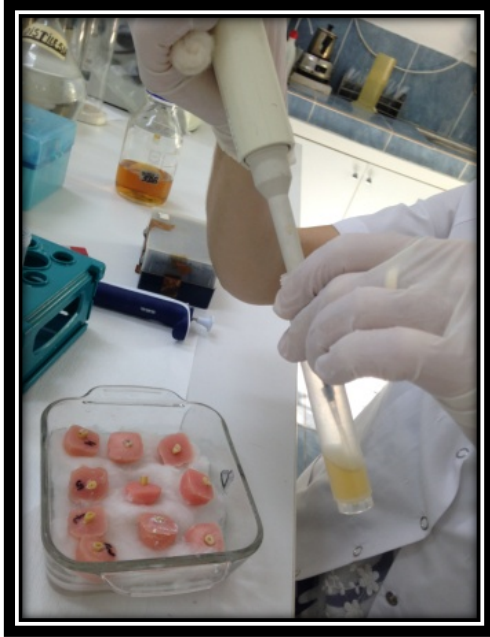


""Resim 11: BHI agar ve sıvı besiyeri



Resim 12: Spektrofotometrede hazırlanan süspansiyon

Steril bir mikropipet yardımıyla 10' ar μ l bakteri süspansiyonu kök kanallarına inoküle edilmiş ve 15 numara K tipi kanal aleti (MANI, Matsutain Seisakusho Co., Tochigi-Ken, Japan) yardımıyla mikroorganizmaların apikal bölgeye kadar ulaşması sağlanmıştır (Resim 13).



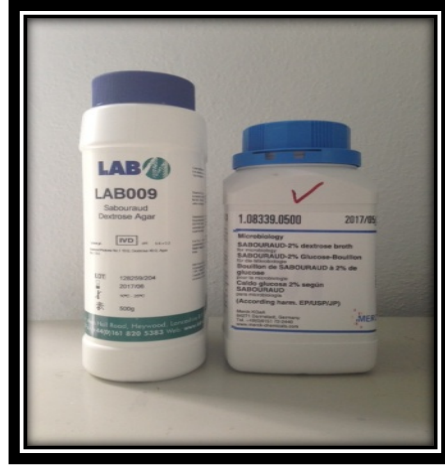
Resim 13: Bakteri süspansiyonun kök kanalına mikropipet ile inokülasyonu

Kök kanal ağızları geçici dolgu maddesi (Cavit, 3M Espe Dental Products, USA) ile kapatılmıştır. Nemli bir ortam oluşturmak için cam kapların tabanındaki pamuk

peletler steril serum fizyolojik ile ıslatılmış ve dişler 37°C’ de 24 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda kök kanallarına 10 µl daha, taze bakteri süspansiyonu eklenmiş ve toplamda 48 saatlik bir inkübasyon süresi sağlanmıştır. Etüvden 48 saatin sonunda çıkarılan numunelere deney materyalleri uygulanmıştır.

3.4.2. Kök kanallarının *Candida albicans* ile enfekte edilmesi

B grubuna ait 110 adet dişin kök kanalını *C. albicans* ile enfekte etmek için *C. albicans*’ ın American Type of Culture Collection 10231 (ATCC 10231) standart suşu kullanılmıştır. *C. albicans* suşu katı besiyeri olan Sabouraud Dextrose Agar (SDA)’ da (LabM Limited, Lancashire BL9 7JJ, United Kingdom) pasajlanmış ve ardından sıvı besiyeri olan Sabouraud Dextrose Broth (SDB) besiyerlerine (Merck Diagnostics, Darmstadt, Germany) ekilerek 24 saatlik taze kültürleri hazırlanmıştır (Resim 14).



""Resim 14: SD agar ve sıvı besiyeri

Üreyen sıvı kültürden spektrofotometrede 0.5 Mc Farland bulanıklık değerine göre süspansiyonlar hazırlanmıştır. Steril bir mikropipet yardımıyla 10 µl bakteri süspansiyonu kök kanallarına inoküle edilmiş ve 15 numara K tipi kanal aleti yardımıyla mikroorganizmaların kökün apikal bölümüne ulaşması sağlanmıştır. Kök kanal ağızları geçici dolgu maddesi ile kapatılmıştır. Nemli bir ortam oluşturmak için cam kapların tabanındaki pamuk peletler steril serum fizyolojik ile ıslatılmış ve dişler

37°C’ de 24 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. 24 saatin sonunda kök kanallarına 10 µl daha, taze bakteri süspansiyonu eklenmiş ve toplamda 48 saatlik bir inkübasyon süresi sağlanmıştır. Etüvden 48 saatin sonunda çıkarılan numunelere deney materyalleri uygulanmıştır.

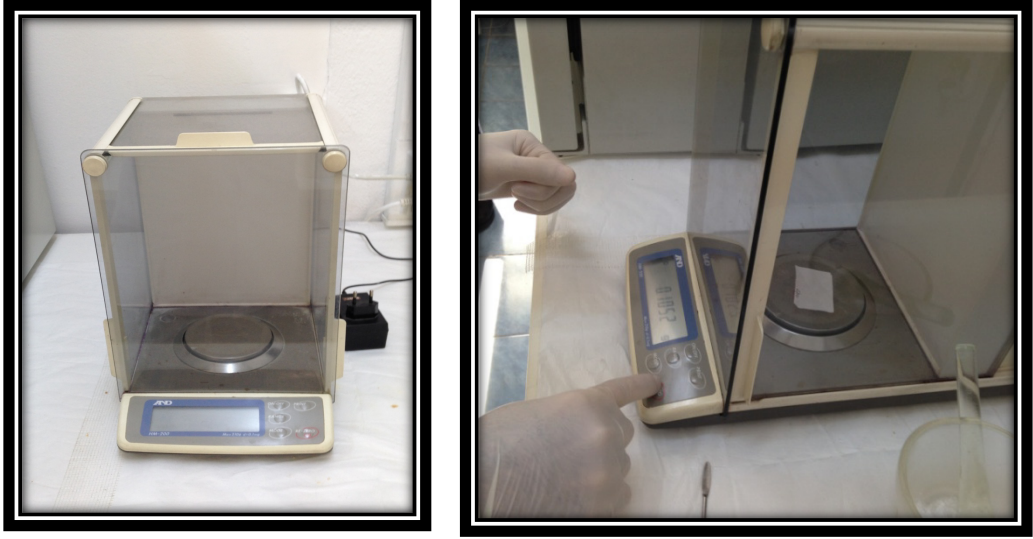
3.5. Kök Kanal Medikamentlerinin Uygulanması

3.5.1. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen kök kanallarına medikamentlerin uygulanması

A grubundaki dişler 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından etüvden çıkarılmıştır. Kök kanal ağızlarındaki geçici dolgu materyali uzaklaştırılmıştır. Deneyin bu aşaması ‘sıfırinci gün’ olarak adlandırılmıştır. Kullanılan tüm kök kanal medikamentleri cam havanda ezilerek (Resim 15) ve hassas terazide (Resim 16) tartılarak standardizasyonu sağlanmıştır.



Resim 15: Cam havanda ezilen medikament



Resim 16: Hassas terazi

Grup 1 (A1) ; Toz/sıvı oranı $\frac{1}{2}$ olacak şekilde kalsiyum hidroksit tozu (Sultan, NJ, USA) (200 mg) serum fizyolojik ile (400 μ l) karıştırılmış ve 25 no'lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır (Resim 17). Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.



Resim 17: Kalsiyum hidroksit ve serum fizyolojik

Grup 2 (A2); Toz/ sıvı oranı ½ olacak şekilde metronidazol (Flagyl, Eczacıbaşı, Türkiye), minosiklin (Minocin, Teofarma, Italy) ve siprofloksasinin (Cipro, Biofarma İlaç, Türkiye) her birinden eşit oranda (200 mg) kullanılarak serum fizyolojik ile (1200 µl) karıştırılmış ve 25 no' lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır (Resim 18, Resim 19). Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.



Resim 18: Hazırlanan üçlü antibiyotik patı



Resim 19: Üçlü patta kullanılan antibiyotikler

Grup 3. (A3); Ampisilin tozuyla (Alfasilin, Actavis, İstanbul, Türkiye) (200 mg) 160 mg Gentamisin sülfat ampul %2' nin (Genta, İE Ulagay, İstanbul, Türkiye) (125 µl) karışımı ile elde edilen pat, 25 no'lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır (Resim 20, Resim 21). Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.



Resim 20: Hazırlanan ikili pat



Resim 21: İkili ve modifiye üçlü patta kullanılan antibiyotikler

Grup 4. (A4); Ampisilin tozu (200 mg), 160 mg Gentamisin sülfat ampul %2 (125 µl) ve % 2' lik Laktoferrin süspansiyonu (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) (50 µl) karışımı ile elde edilen pat, 25 no'lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök

kanallarına uygulanmıştır. Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 5 (A5); Laktoferrinin, steril serum fizyolojik ile % 2' lik süspansiyonu her seferinde taze olarak bir eppendorf tüp içerisinde hazırlanmış ve tüpün dışı ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplanmıştır (Resim 22). Bu süspansiyon F3 açılı paper pointe (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) emdirilerek kök kanalına yerleştirilmiş ve üzeri geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.



Resim 22: Laktoferrin

Grup 6 (AK); Kontrol grubu olarak kullanılan bu grupta hazırlanan dişler 2 cc steril serum fizyolojik ile ıslatıldıktan sonra 3 adet steril paper point ile kök kanalından örnek alınıp steril boş eppendorf tüplere konmuştur.

Negatif kontrol grunda ise steril besiyeri inoküle edilen 10 dişten kontaminasyonu takip etmek amacıyla 2 cc steril serum fizyolojik ile kök kanallarının ıslatılmasını takiben 3 adet paper point ile örnek alınmış steril boş eppendorf tüplerine konmuştur.

3.5.2. *Candida albicans* ile enfekte edilen kök kanallarına medikamentlerin uygulanması

B grubundaki dişler 48 saatlik inkübasyon süresinin ardından etüvden çıkarılmıştır. Kök kanal ağızlarındaki geçici dolgu materyali uzaklaştırılmıştır. Deneyin bu aşaması 'sıfırıncı gün' olarak adlandırılmıştır. Kullanılan tüm kök kanal medikamentleri hassas terazide tartılarak standardizasyon sağlanmıştır.

Grup 1(B1); Toz/sıvı oranı $\frac{1}{2}$ olacak şekilde kalsiyum hidroksit tozu (200 mg) serum fizyolojik ile (400 μ l) karıştırılmış ve 25 no' lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır. Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 2 (B2); Toz/sıvı oranı $\frac{1}{2}$ olacak şekilde metronidazol, minosiklin ve siprofloksasinin her birinden eşit oranda (200 mg) kullanılarak serum fizyolojik ile (1200 μ l) karıştırılmış ve 25 no' lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır. Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 3 (B3); Ampisilin tozuyla (200 mg) 160 mg Gentamisin sülfat ampul % 2' nin (125 μ l) karışımı ile elde edilen pat, 25 no' lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır. Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 4 (B4); Ampisilin tozu (200 mg), 160 mg Gentamisin sülfat ampul % 2 (125 μ l) ve % 2 lik Laktoferrin süspansiyonu (50 μ l) karışımı ile elde edilen pat, 25 no' lu lentülo yardımıyla düşük devirde kök kanallarına uygulanmıştır. Kök kanal ağzındaki fazla pat steril bir pamuk pelet ile uzaklaştırılarak geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 5 (B5) ; Laktoferrinin, steril serum fizyolojik ile % 2' lik süspansiyonu her seferinde taze olarak bir eppendorf tüp içerisinde hazırlanmış ve tüpün dışı ışık almaması için alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu süspansiyon F3 açılı paper pointe emdirilerek kök kanalına yerleştirilmiş ve üzeri geçici dolgu materyali ile kapatılmıştır.

Grup 6 (BK); Kontrol grubu olarak kullanılan bu grupta hazırlanan dişler 2 cc steril serum fizyolojik ile ıslatıldıktan sonra 3 adet steril paper point ile kök kanalından örnek alınıp steril boş eppendorf tüplere konmuştur.

Negatif kontrol grunda ise steril besiyeri inoküle edilen 10 dişten kontaminasyonu takip etmek amacıyla 2 cc steril serum fizyolojik ile kök kanallarının ıslatılmasını takiben 3 adet paper point ile örnek alınmıştır. Alınan örnekler steril boş eppendorf tüplere konmuştur.

3.6. Deney ve Kontrol Gruplarından Örnek Alınması

3.6.1. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen dişlerden örnek alınması

A grubundaki *E. faecalis* ile enfekte edilen 110 diş, kök kanal medikamenti uygulanmasının ardından 2 alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt gruptaki dişlerden, medikament uygulanmasını takiben 3. günde örnekler alınmıştır. İkinci alt gruptaki dişlerden ise, medikament uygulanmasını takiben 7. günde örnekler alınmıştır.

3.6.1.1. Üçüncü günde (birinci alt grup) örnek alınan dişler

1. grup (3A1): Kalsiyum hidroksit patı 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (Resim 24) (n:10).

2. grup (3A2): Üçlü antibiyotik patı (metronidazol+siprofloksasin+minosiklin) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Üçlü patın kök kanalından uzaklaştırılması oldukça zor olduğu için PUI (pasif ultrasonik irigasyon) (NSK, Varios 970, NSK, Tokyo, Japan) yardımıyla kanal medikamenti kök kanalından uzaklaştırılmıştır (Resim 23). Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (Resim 24) (n:10).

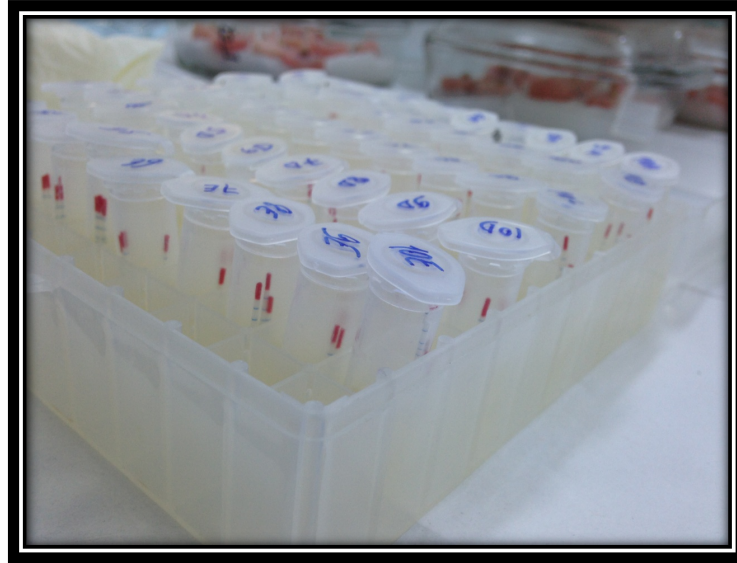


Resim 23: PUI ile kök kanalından antibiyotik patının uzaklaştırılması

3. grup (3A3): İkili antibiyotik pat (ampisilin + gentamisin) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (Resim 24) (n:10).

4. grup (3A4): Modifiye üçlü pat (ampisilin + gentamisin + laktoferrin süspansiyonu) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (Resim 24) (n:10).

5. grup (3A5): Kök kanallarındaki laktoferrin süspansiyonu içeren F3 paper point steril bir presel yardımıyla kanaldan uzaklaştırılmış ve serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (Resim 24) (n:10).



Resim 24: Kök kanalından paper point ile alınan örnekler

3.6.1.2. Yedinci günde (ikinci alt grup) örnek alınan dişler:

Grup 1 (7A1), Grup 2 (7A2), Grup 3 (7A3), Grup 4 (7A4) ve Grup 5 (7A5)' de üçüncü günde uygulanan yöntemlerle örnek alma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Üçüncü ve yedinci günlerde mikroorganizma kayıplarının yaşanmaması ve standardizasyonun sağlanması için farklı dişler kullanılmıştır ancak işlemler aynı

anda yürütülmüştür. Bu işlem sırasında 10 adet diş pozitif, 10 adet diş negatif grup olarak kullanılmıştır. Alınan örneklerden DNA izolasyonunun ardından Gerçek Zamanlı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.6.2. *Candida albicans* ile enfekte edilen dişlerden örnek alınması

B grubundaki *C. albicans* ile enfekte edilen 110 diş, kök kanal medikamenti uygulanmasının ardından 2 alt gruba ayrılmıştır. Birinci alt gruptaki dişlerden, medikament uygulanmasını takiben 3. günde örnekler alınmıştır. İkinci alt gruptaki dişlerden ise, medikament uygulanmasını takiben 7. günde örnekler alınmıştır.

3.6.2.1. Üçüncü günde (birinci alt grup) örnek alınan dişler

1. grup (3B1): Kalsiyum hidroksit patı 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (n:10).

2. grup (3B2): Üçlü antibiyotik patı (metronidazol+siprofloksasin+minosiklin) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Üçlü patın kök kanalından uzaklaştırılması oldukça zor olduğu için PUI (pasif ultrasonik irigasyon) yardımıyla kanal medikamenti kök kanalından uzaklaştırılmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (n:10).

3. grup (3B3): İkili antibiyotik pat (ampisilin + gentamisin) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (n:10).

4. grup (3B4): Modifiye üçlü pat (ampisilin + gentamisin + laktoferrin süspansiyonu) 30 numara K tipi eğe ile kök kanalından uzaklaştırılmış ve ardından serum fizyolojik ile kök kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (n:10).

5. grup (3B5): Kök kanallarındaki laktoferrin süspansiyonu içeren F3 paper point steril bir presel yardımıyla kanaldan uzaklaştırılmış ve serum fizyolojik ile kök

kanalları yıkanmıştır. Islak ve temiz kök kanallarından 3 adet steril paper point ile örnekler alınmış steril boş bir eppendorf tüpe konmuştur (n:10).

3.6.2.2. Yedinci günde (ikinci alt grup) örnek alınan dişler

Grup 1 (7A1), Grup 2 (7A2), Grup 3 (7A3), Grup 4 (7A4) ve Grup 5 (7A5)' de üçüncü günde uygulanan yöntemlerle örnek alma işlemi gerçekleştirilmiştir.

Üçüncü ve yedinci günlerde mikroorganizma kayıplarının yaşanmaması ve standardizasyonun sağlanması için farklı dişler kullanılmıştır ancak işlemler aynı anda yürütülmüştür. Bu işlem sırasında 10 adet diş pozitif, 10 adet diş negatif kontrol grup olarak kullanılmıştır. Alınan örneklerden DNA izolasyonunun ardından Gerçek Zamanlı PZR işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.7. DNA İzolasyonu

DNA izolasyonu öncesi ölü hücre DNA' larının ortamdaki uzaklaştırılması için Villarreal ve ark (2013) tarafından tanımlanan, DNaz-I ile işlem temelli yöntem kullanılmıştır. Numunenin üzerine 200 µl 0,1 U/ml DNaz-I eklenmiş ve 37°C de 15 dakika inkübasyon (INOVIA NDI-2E Blok Isıtıcı, İstanbul, Türkiye) yapılmıştır (Resim 25).

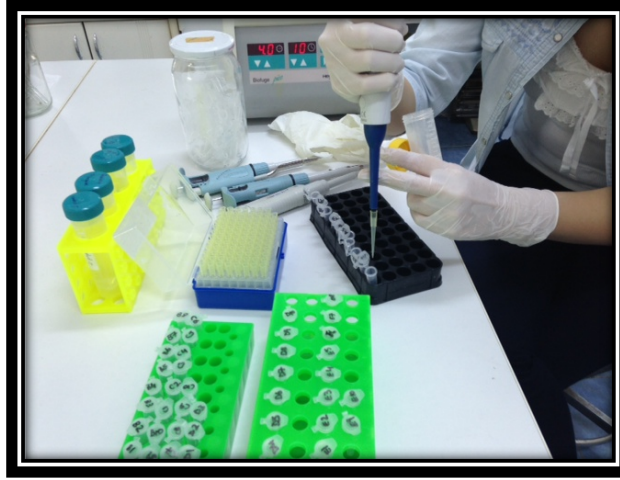


Resim 25: İnkübatör

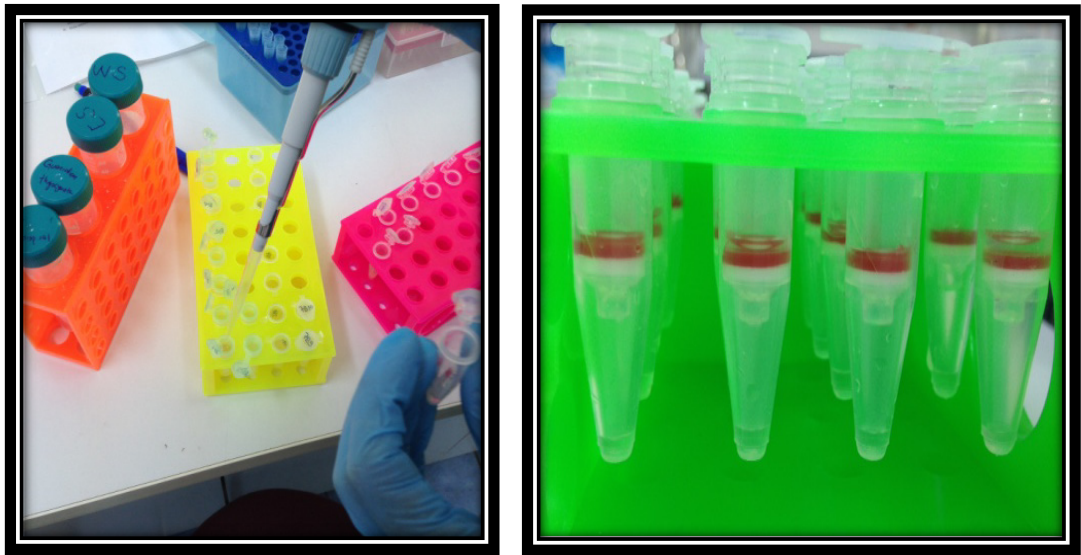


Resim 26: Vortex

İnkübasyon sonrası numune 3000 rpm’ de 1 dk homojenize edilmiştir (Vortex genie, Scientific Industries, New York, USA) (Resim 26). DNA izolasyonu için “Biospeedy™ DNA Isolation Kit” (Bioeksen Ltd Şti, Türkiye) kullanılmıştır. Homojenize edilen örneğe 400 µl bağlama çözeltisi (6 M Guanidine thiocyanate, 20 mM Tris-HCl, pH 8) eklenmiştir (Resim 27). Numune 10 dakika 95 °C’ de inkübe edildikten sonra 400 µl 2-propanol eklenmiş ve silika kolona yüklenmiştir (Resim 28).

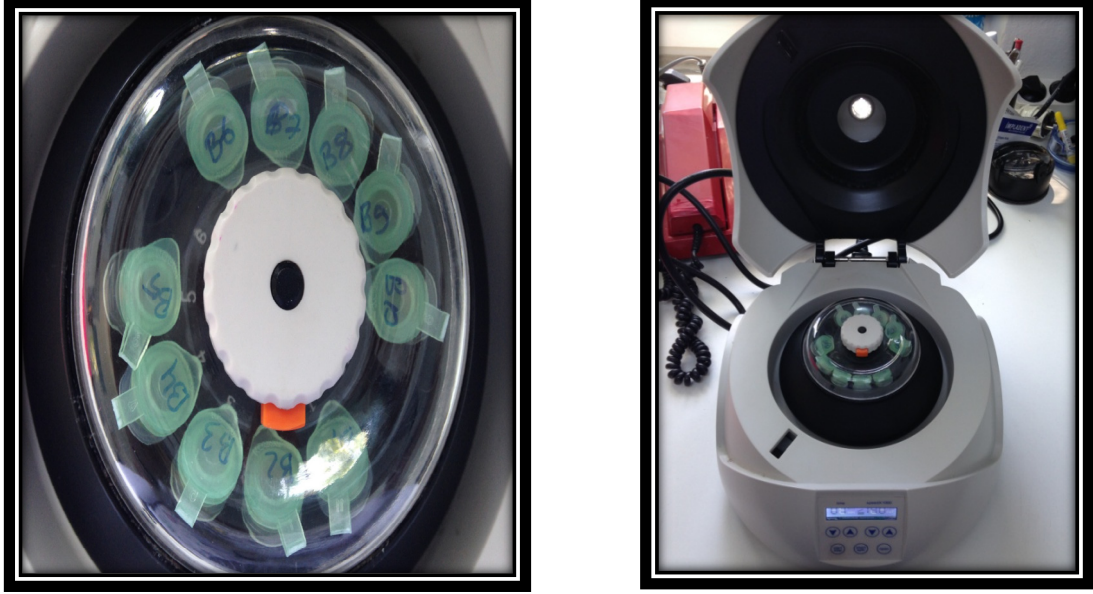


Resim 27: Örnekler e çözelti eklenmesi ve ön işlemler



Resim 28: Silika kolona yüklenen numuneler

13000 rpm 1 dk santrifüj (INOVIA MINO-14K Mikrosantrifüj, İstanbul, Türkiye) ile kolondan geçirilen numunedeki DNA' lar silika kolonda tutulmuş daha sonra iki defa yıkama çözeltisi (20 mM NaCl, 2 mM Tris-HCl, pH 8; 80% v/v Etanol) ile yıkanmıştır (Resim 29).



Resim 29: Santrifüje yerleştirilen numuneler

Daha sonra silika kolon santrifügasyonla kurutulmuştur (Resim 29). Silika kolonda tutunan DNA' lar 100 µl nükleaz içermeyen, steril, deiyonize su (pH 7) ile kolondan alınmış ve analize kadar -20 °C' de saklanmıştır.

3.7.1 Gerçek Zamanlı PZR (Q-PCR) metodu

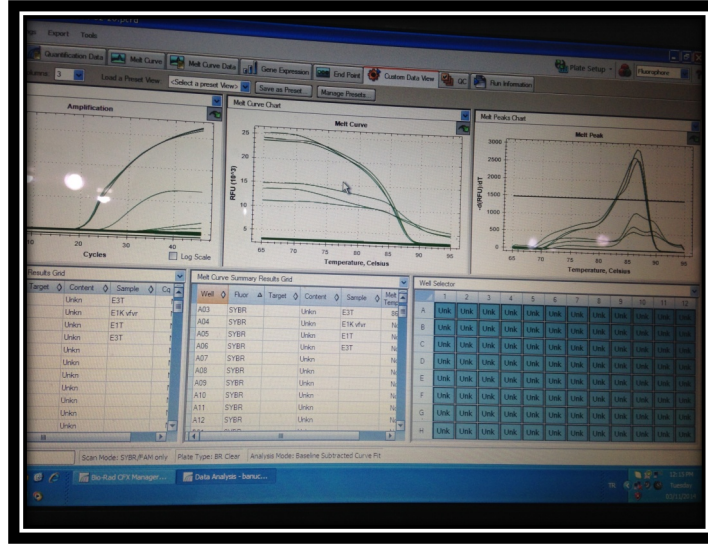
Q-PCR için “Biospeedy™ Real-Time PCR EvaGreen Master Mix” (Bioeksen Ltd Şti, Türkiye) kullanılmıştır. PCR' da DNA replikasyonu yapılması için in vitro olarak bir tepkime karışımı hazırlanır ve bu karışım hedeflenen bölgeye özgü bir çift primer içerir. Buna göre; *E. faecalis* hücreleri bakteriyel 16S rRNA genini hedefleyen BactF 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve BactR 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' primerleriyle hedeflenmiştir. *C.albicans* hücreleri fungal ITS bölgesini hedefleyen FungF 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' ve FungR 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3' primerleriyle

hedeflenmiştir. Bütün reaksiyonlarda Biorad CFX Connect (Bio-Rad Laboratories, Amerika) Real Time PCR cihazı kullanılmıştır (Resim 30).



Resim 30: Biorad CFX Connect Real Time PCR cihazı

Hazırlanan tepkime karışımı bölgeye özgü bir çift primerin yanı sıra primere bağlanacak dNTP'ler (A,C,G,T), iyon koşullarını sağlayan tampon karışımı, uygun pH ve çoğaltılması hedeflenen DNA içermelidir. Reaksiyon 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP mix, 1x Reaksiyon Tamponu, 0.1U Proof Reading Rekombinant Taq DNA Polimeraz, 1x EvaGreen, 4 ng/μl kalıp DNA ve her bir primerden 0.5 μM içermektedir. Cihazda optimizasyon sağlanmış, Tablo 4' te verilen ısı döngüsü programı uygulanmıştır.



'Resim 31: Cihazdan elde edilen bilgilerin bilgisayar ekranındaki görüntüsü

Q-PCR sırasında sadece istenilen ürünün çoğaltıldığını belirlemek için 65°C - 95°C arasında erime eğrisi analizi yapılmıştır (Resim 31). Q-PCR dataları CFX Manager Software 3.0' da analiz edilmiştir. $2^{-\Delta Ct}$ yöntemi ile farklı numunelerdeki aynı hedef genlerin birbirlerine relatif miktarları hesaplanmıştır (Livak ve Schmittgen, 2001).

Tablo 4: Q-PCR Isı Döngüsü Programı

Tespit Formatı		Reaksiyon Hacmi		
SYBR Green		20 µl		
Programlar				
Program İsmi	Döngü Sayısı	Analiz Modu		
Ön-İnkübasyon	1			
Çoğalma	45	Sayım		
Erime Eğrisi	1	Erime Eğrisi		
Soğuma	1			
Sıcaklık Hedefleri				
Hedef (°C)	Okuma Modu	Bekletme (hh:mm:ss)	Hız (°C/s)	Okuma (°C başına)
<i>Ön İnkübasyon</i>				
95		00:05:00	4,8	–
<i>Çoğalma</i>				
95		00:00:15	4,8	–
53		00:00:20	2,5	–
72	Tek	00:00:40	4,8	–
<i>Erime Eğrisi</i>				
95		00:00:05	–	–
65		00:01:00	–	–
95	Sürekli	–	0.5	10
<i>Soğuma</i>				
35	Tek	00:00:10	2,5	–

3.8. İstatistiksel Analiz

Farklı grupların tek bir mikroorganizma türü üzerindeki etkinliklerinin istatistiksel olarak öneminin analizi için 2-kuyruklu t-testleri Minitab 17 (Minitab Ltd, İngiltere) yazılımı kullanılmıştır. Özgürlük derecesi (df) 18, $t=2.101$ ve alfa seviyesi (p) 0.05 olarak alınmıştır. Aynı grubun farklı iki mikroorganizma üzerindeki etkinliğinin istatistiksel olarak öneminin analizi için ise 1-kuyruklu t-testleri Minitab 17 (Minitab Ltd, İngiltere) yazılımı kullanılmıştır. Özgürlük derecesi (df) 18, $t=1,7341$ ve alfa seviyesi (p) 0.05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

Çalışmamızda elde edilen bulgular *C. albicans* ile enfekte edilen ve *E. faecalis* ile enfekte edilen olmak üzere iki ayrı grupta değerlendirilmiştir. Kök kanal medikamenti uygulamasını takiben her iki grupta 3. günde varlığını sürdüren canlı DNA hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra sıfırıncı güne göre relatif azalma oranları tespit edilmiştir. Elde edilen bulguların her bir kök kanal medikament grubu için (Grup 1: Ca(OH)₂+serum fizyolojik, Grup 2: 3P+serum fizyolojik, Grup 3: 2P+serum fizyolojik, Grup 4: M2P+serum fizyolojik, Grup 5: Laktoferrin) ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Bulgular hem gruplar arasında hem de aynı grup içinde kıyaslanmıştır. Kök kanal medikamenti uygulamasını takiben her iki grupta 7. günde varlığını sürdüren canlı DNA hücrelerin izolasyonu gerçekleştirilmiş, daha sonra sıfırıncı güne göre relatif azalma oranları tespit edilmiştir. Her bir kök kanal medikament grubu için elde edilen bulguların ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanarak karşılaştırılmıştır.

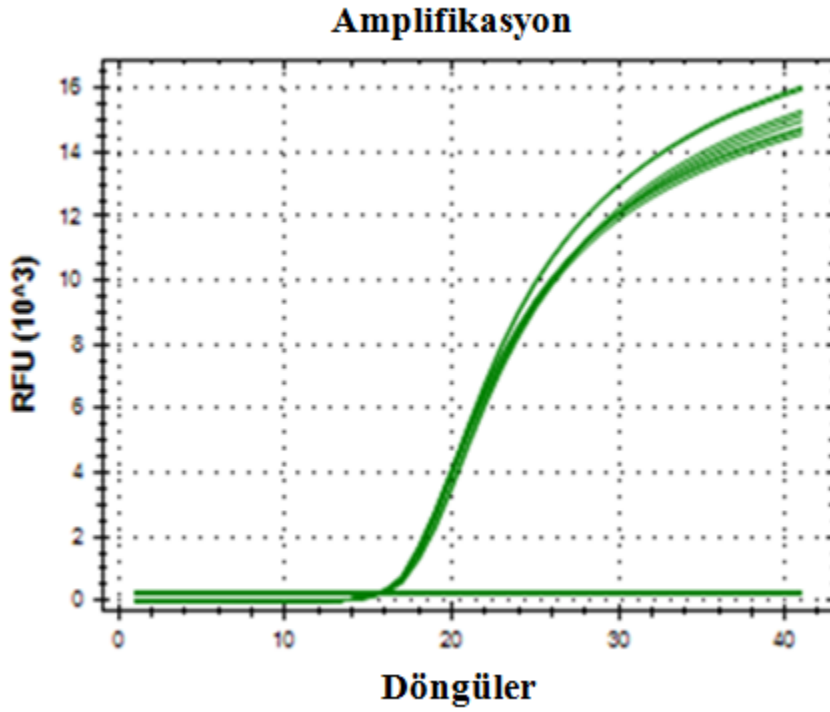
Kanal medikamenti uygulamasını takiben sıfırıncı güne göre 3. ve 7. gündeki relatif canlı DNA hücre azalmaları arasındaki farklar gruplar arasında kıyaslanmıştır.

4.1. *Candida albicans* ile Enfekte Edilen Örneklerden Elde Edilen Bulgular

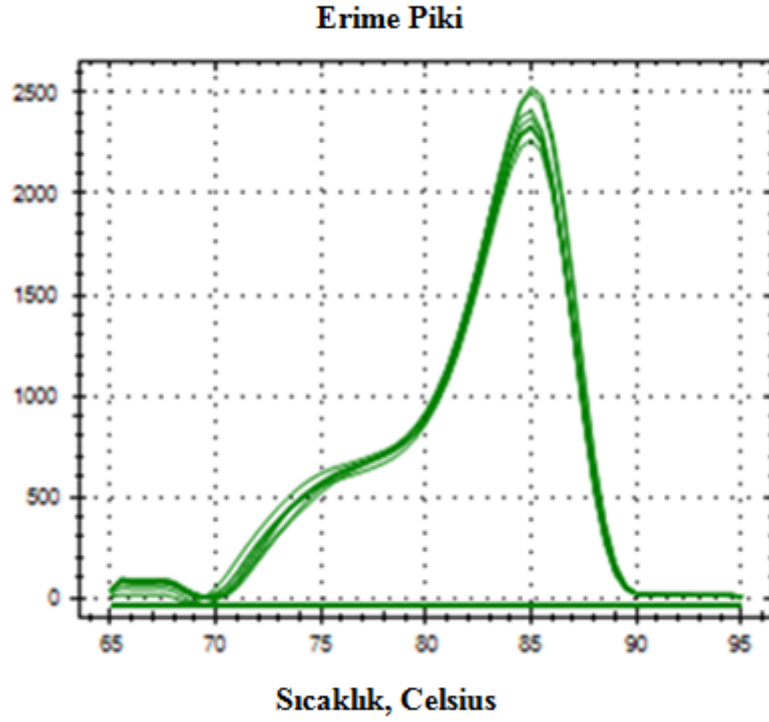
C. albicans ait Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 10, Şekil 11, Şekil 12, Şekil 13, Şekil 24, Şekil 25' de gösterilmiş, elde edilen eşik döngü (Ct) sayıları Tablo 6-Tablo10' da verilmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı “erime eğrisi” yöntemi ile kontrol edilmiştir. Çalışmamızın bulgularında, her bir numune için tek erime pikinin elde edilmesi PCR' da tek hedef çoğaltıldığını, elde edilen değerlerin yaklaşık 85° C olması bu hedefin primer dimer değil, çalışılan gen bölgesi olduğunu göstermektedir.

4.1.1. *Candida albicans* ile enfekte edilen örneklerden 0. günde elde edilen bulgular

C. albicans American Type of Culture Collection 10231 (ATCC10231) suşu ile enfekte edilen dişlerden 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda örnekler alınmış ve sıfırıncı günde kök kanalındaki mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. *C. albicans*'ın sıfırıncı gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 10-11' de gösterilmiştir. Elde edilen eşik döngü sayıları (Ct) Tablo 6' da verilmiştir.



Şekil 10: *C. albicans* 0. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

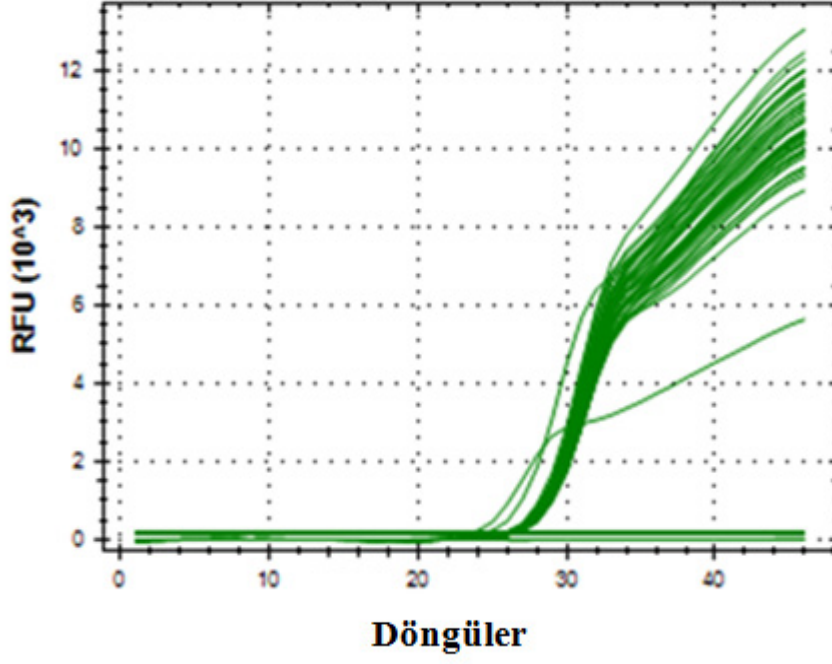


Şekil 11: *C. albicans* 0. gün Q-PCR DNA erime pikleri

4.1.2. *Candida albicans* ile enfekte edilen örneklerden 3. günde elde edilen bulgular

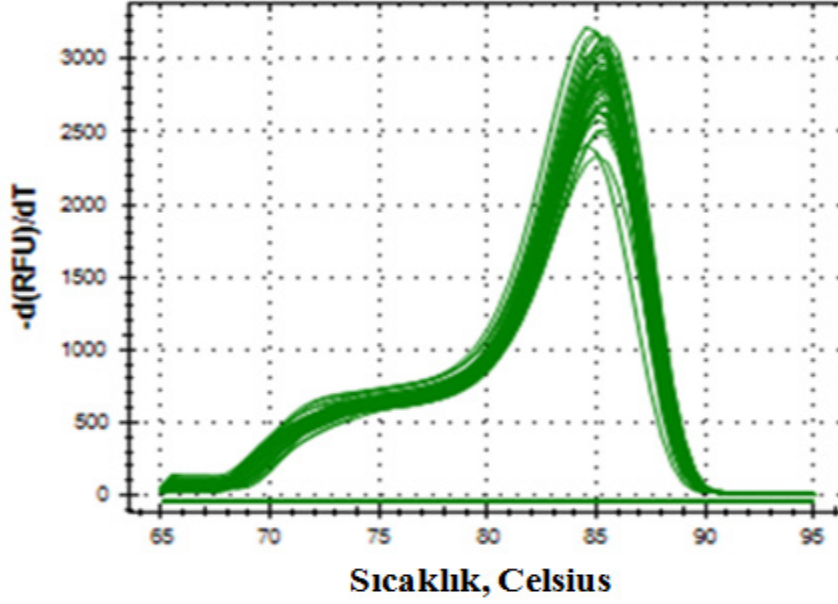
C. albicans ile enfekte edilmiş ve sonrasında beş farklı kök kanal medikamenti uygulanmış grupların 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 12, Şekil13' te gösterilmektedir. Elde edilen ortalama ve standart sapmaları Tablo 5' te gösterilmektedir. Buna göre Grup 2' nin *C. albicans*' ı yok etmede en etkili grup olduğu tespit edilmiştir.

Amplifikasyon



Şekil 12: *C. albicans* 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri

Erime Piki



Şekil 13: *C. albicans* 3. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Tablo 5: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapmaları

	Ortalama	Standart sapma
Grup 1 Ca(OH) ₂	99,849	±0,182
Grup 2 3P	99,915	±0,023
Grup 3 2P	99,892	±0,056
Grup 4 M3P	99,898	±0,020
Grup 5 Laktoferrin	99,900	±0,016

Tablo 6: *C.albicans* ile enfekte edilen dişlerde 3. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

	KONTROL	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1	15,92	25,65	25,41	26,04	26,17	25,96
2	15,83	23,06	25,93	25,7	25,51	25,59
3	15,58	25,81	26,08	26,08	25,51	25,55
4	15,72	25,69	26,03	25,46	25,73	25,73
5	15,51	25,6	26,08	26,15	25,54	25,67
6	15,47	25,69	26,04	24,05	25,37	25,59
7	15,6	25,95	25,9	25,7	25,25	25,5
8	16,06	25,57	25,9	25,93	25,6	25,59
9	15,48	25,84	25,81	25,58	25,78	25,53
10	15,41	25,7	25,8	25,61	25,77	25,7

Tablo 7: *C. albicans* ile enfekte edilen gruplarda 3. gündeki relatif hücre miktarları

Relatif hücre miktarı (%)					
Numune no	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,12	0,14	0,09	0,08	0,09
2	0,67	0,09	0,11	0,12	0,12
3	0,08	0,07	0,07	0,10	0,10
4	0,10	0,08	0,12	0,10	0,10
5	0,09	0,07	0,06	0,10	0,09
6	0,08	0,07	0,26	0,10	0,09
7	0,08	0,08	0,09	0,12	0,10
8	0,14	0,11	0,11	0,13	0,14
9	0,08	0,08	0,09	0,08	0,09
10	0,08	0,07	0,09	0,08	0,08

Çalışmamızda *C. albicans* ile enfekte edildikten sonra Ca(OH)₂ uygulanmış olan Grup 1' de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 23,06-25,95 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,849± 0,182 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7).

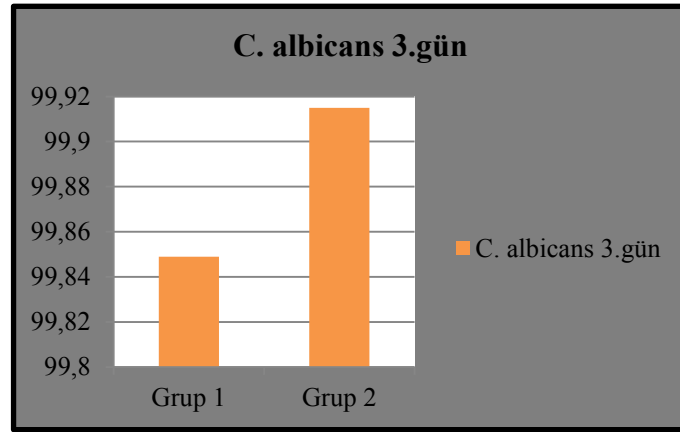
C. albicans ile enfekte edildikten sonra üçlü pat (minosiklin+siprofloksasin+metronidazol) uygulanmış olan Grup 2' de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 25,41-26,08 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,915± 0,023 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7).

C. albicans ile enfekte edildikten sonra ikili pat (ampisilin+gentamisin) uygulanmış olan Grup 3' de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 24,05-26,15 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,892± 0,056 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7).

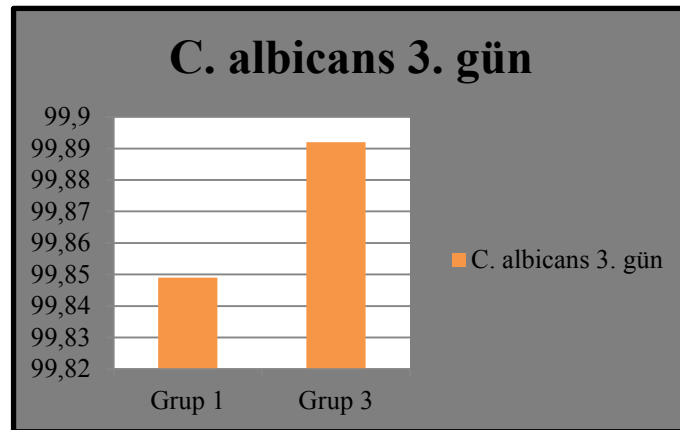
C. albicans ile enfekte edildikten sonra modifiye üçlü pat (ampisilin+gentamisin+laktoferrin) uygulanmış olan Grup 4' te 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 25,25-26,17 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da %99,898± 0,020 olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7).

C. albicans ile enfekte edildikten sonra laktoferrin süspansiyon uygulanmış olan Grup 5' de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 25,5- 25,96 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da $99,900 \pm 0,016$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 5, Tablo 6, Tablo 7).

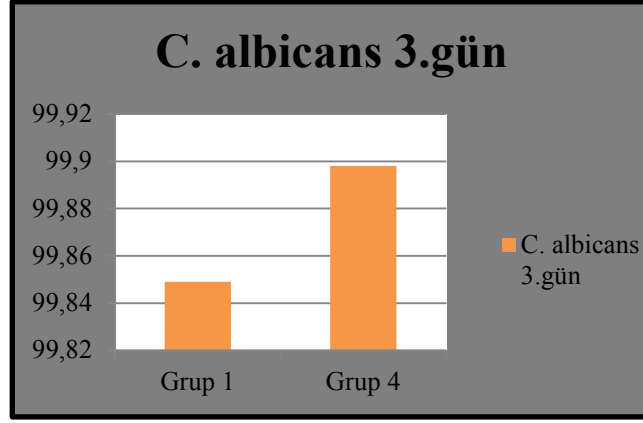
Üçüncü günün sonunda Grup 1' de % 99,849 oranında *C.albicans* eredike edilirken Grup 2' de bu oran % 99,915 ($t= 0,28$), Grup 3' te % 99,892 ($t= 0,5$), Grup 4' de % 99,898 ($t= 0,42$) ve Grup 5' de % 99,900 ($t= 0,40$) olarak hesaplanmıştır (Tablo 6- Tablo 7). Buna göre gruplar arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (Tablo 7) (Şekil 14, Şekil 15, Şekil 16, Şekil 17).



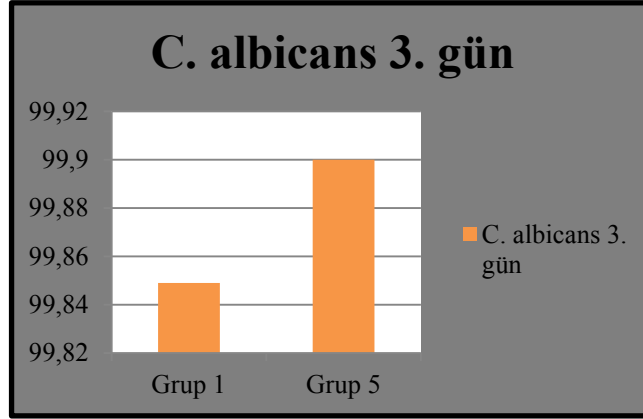
Şekil 14: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 15: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

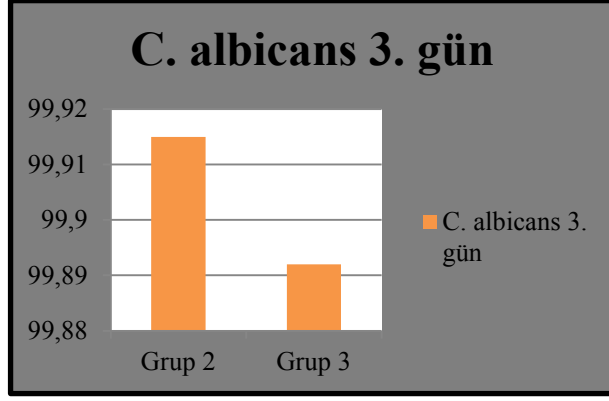


Şekil 16: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

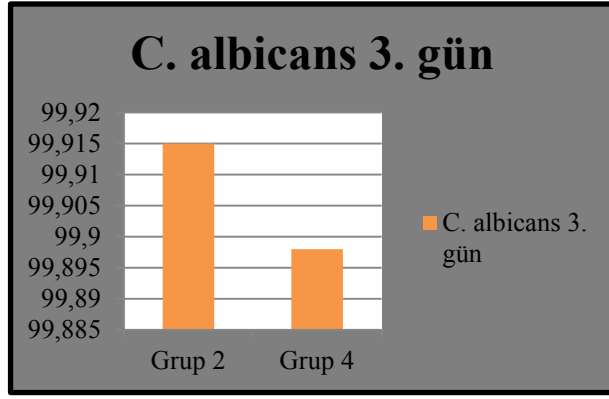


Şekil 17: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

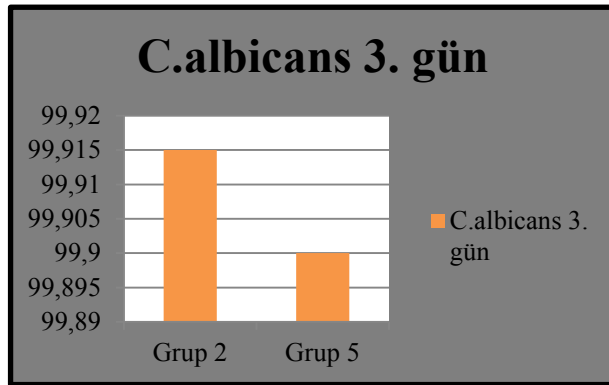
Yedinci günde Grup 2 ile Grup 3' ün *C. albicans*' ı yok etme oranları arasındaki fark $t = 0,25$ olarak hesaplanmıştır. Grup 4 ve Grup 5' in, Grup 2' ye kıyasla *C. albicans*' ı yok etme oranları arasındaki fark Tablo 7' de gösterilmiştir. Buna göre gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığı tespit edilmiştir (Şekil 18, Şekil 19, Şekil 20).



Şekil 18: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

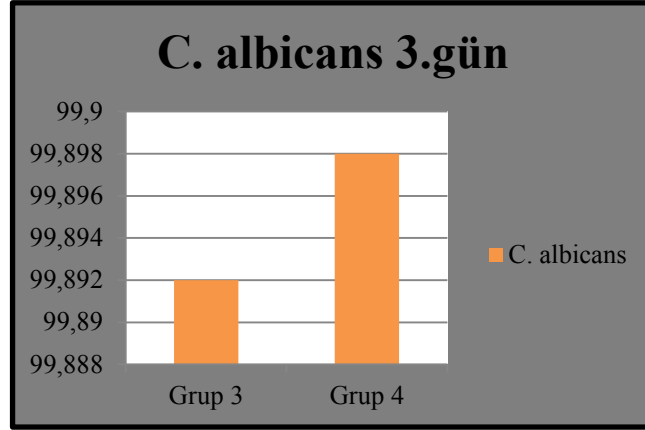


Şekil 19: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

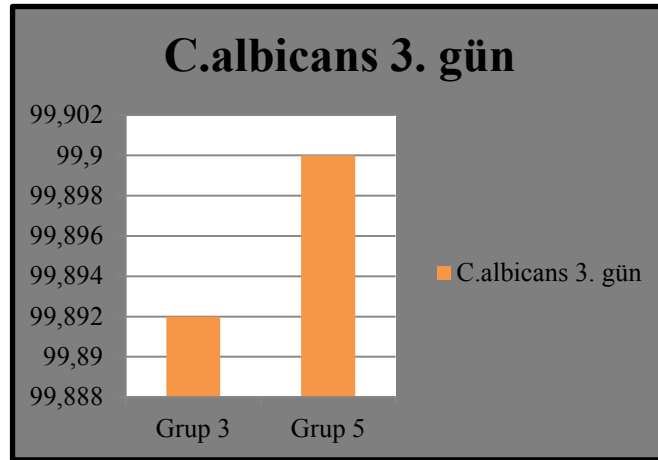


Şekil 20: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

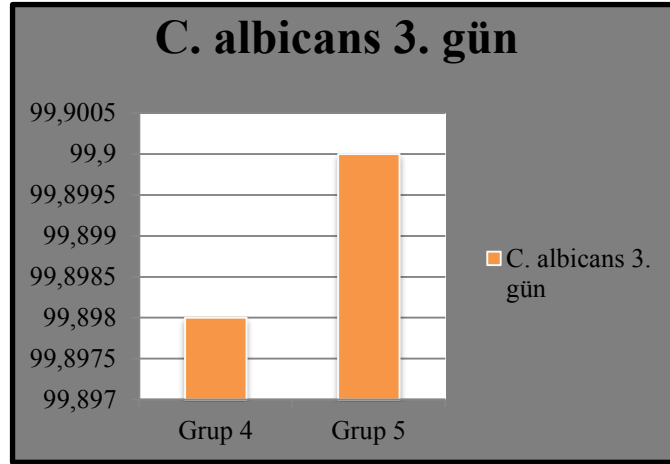
C. albicans ile enfekte edilmiş örneklerin 3. gün Ct değerleri ve relatif hücre azalma ortalamaları Tablo 6- Tablo 7' de gösterilmiştir. Buna göre Grup 3, Grup 4 ve Grup 5' in *C. albicans*' ı yok etme sonuçları arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 8) (Şekil 21, Şekil 22, Şekil 23).



Şekil 21: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 22: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



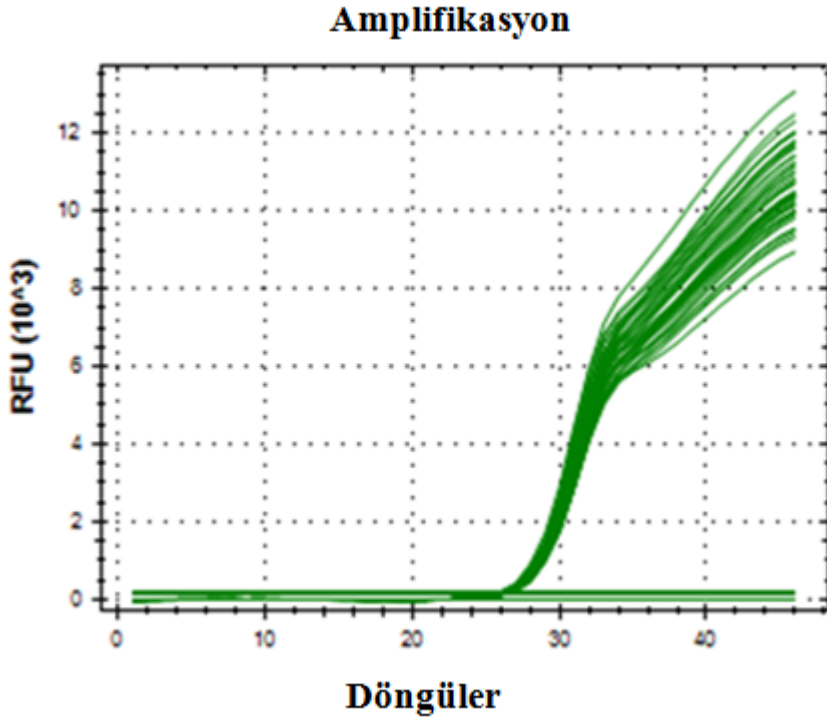
Şekil 23: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Tablo 8: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerde 3. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları (%) arasındaki kıyaslama

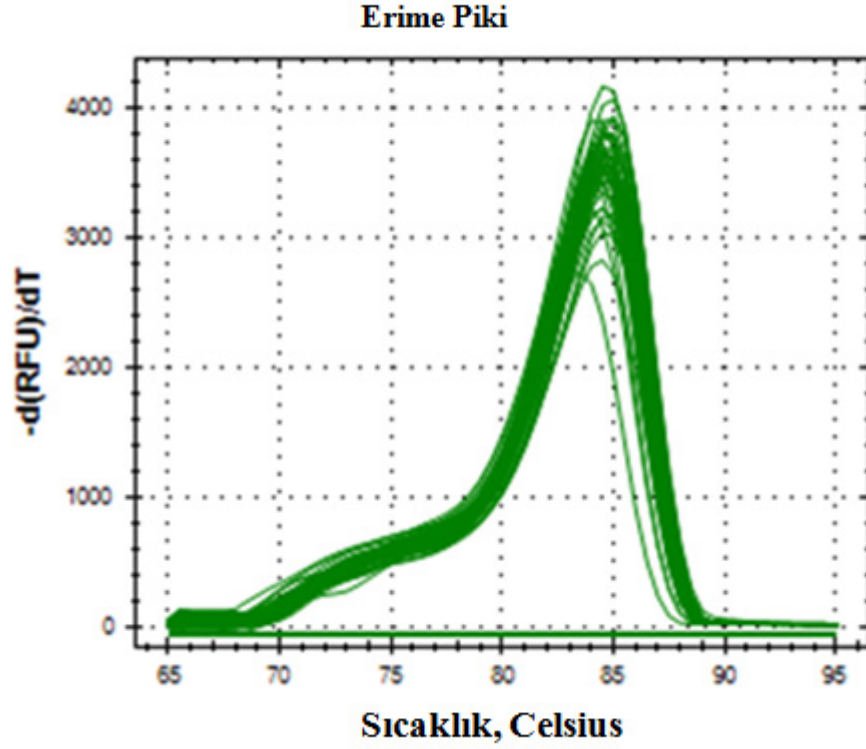
3. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi (t=2.101, df=18, p<0,05)				
	t			
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 2	0,28			
Grup 3	0,50	0,25		
Grup 4	0,42	0,01	0,75	
Grup 5	0,40	0,11	0,63	0,81

4.1.3. *Candida albicans* ile enfekte edilen örneklerden 7. günde elde edilen bulgular

C. albicans ile enfekte edilmiş ve sonrasında beş farklı kök kanal medikamenti uygulanmış gruplarında 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 24-25’ de, elde edilen ortalama ve standart sapmaları Tablo 9’ da gösterilmektedir. Buna göre 7. günde Grup 2 ve Grup 3, *C. albicans*’ ı en fazla yok eden ara seans medikamentidir.



Şekil 24: *C. albicans* 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri



Şekil 25: *C. albicans* 7. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Tablo 9: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

	Ortalama	Standart sapma
Grup 1 Ca(OH) ₂	99,986	±0,004
Grup 2 3P	99,988	±0,003
Grup 3 2P	99,988	±0,004
Grup 4 M3P	99,986	±0,003
Grup 5 Laktoferrin	99,986	±0,003

Tablo 10: *C.albicans* ile enfekte edilen dişlerde 7. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

	KONTROL	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1	15,92	28,49	28,29	28,89	28,32	28,49
2	15,83	28,09	28,69	28,59	28,34	28,38
3	15,58	28,63	28,93	29,01	28,56	28,63
4	15,72	28,53	28,97	28,34	28,36	28,49
5	15,51	28,42	28,89	29,01	28,23	28,42
6	15,47	28,52	28,92	28,54	28,1	28,35
7	15,6	28,84	28,78	28,77	28,46	28,38
8	16,06	28,42	28,73	28,4	28,65	28,36
9	15,48	28,67	28,69	29,06	28,6	28,57
10	15,41	28,61	28,6	29,1	28,84	28,34

Tablo 11: *C. albicans* ile enfekte edilen gruplarda 7. gündeki relatif hücre miktarları

Numune No;	Relatif hücre miktarı (%)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
2	0,02	0,02	0,01	0,02	0,02
3	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
4	0,01	0,01	0,02	0,02	0,01
5	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
6	0,01	0,01	0,01	0,02	0,01
7	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
8	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
9	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
10	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

C. albicans ile enfekte edildikten sonra Ca(OH)₂ uygulanmış olan Grup 1' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 28,09- 28,84 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,986 ± 0,004 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

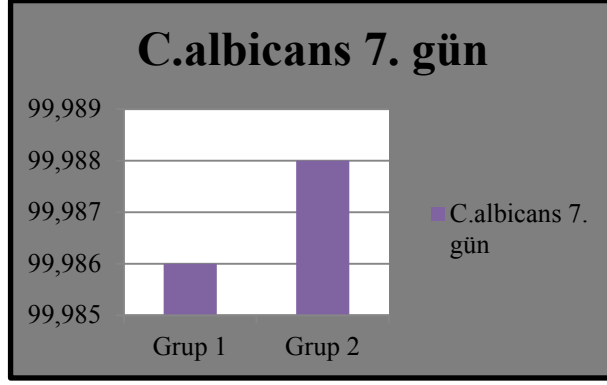
C. albicans ile enfekte edildikten sonra üçlü pat (minosiklin+siprofloksasin+metronidazol) uygulanmış olan Grup 2' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 28,29- 28,97 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,988± 0,003 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

C. albicans ile enfekte edildikten sonra ikili pat (ampisilin+gentamisin) uygulanmış olan Grup 3' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 28,34- 29,1 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,988± 0,004 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

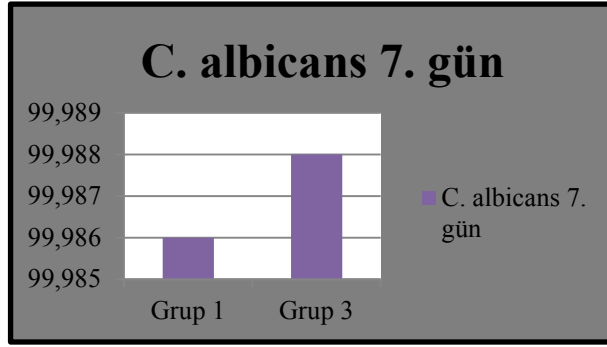
C. albicans ile enfekte edildikten sonra modifiye üçlü pat (ampisilin+gentamisin+laktoferrin) uygulanmış olan Grup 4' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 28,1- 28,84 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,986± 0,003 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

C. albicans ile enfekte edildikten sonra laktoferrin süspansiyon uygulanmış olan Grup 5' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 28,34- 28,63 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 99,986± 0,003 olarak hesaplanmıştır (Tablo 9, Tablo 10, Tablo 11).

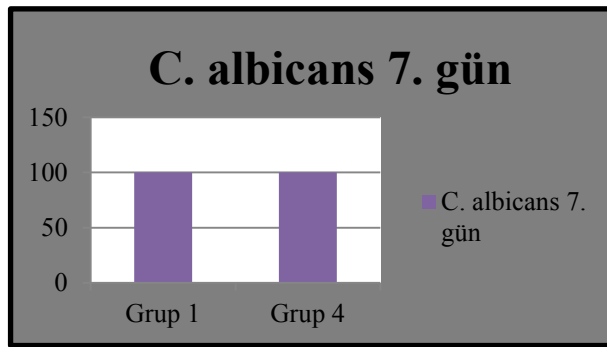
Yedinci günde Grup 1 ile Grup 2' nin *C. albicans*' ı yok etme oranları arasındaki fark t= 0,19 olarak hesaplanmıştır. Grup 3, Grup 4 ve Grup 5' in, Grup 1' e kıyasla *C. albicans*' ı yok etme oranları arasındaki fark Tablo 12' de gösterilmiştir (Şekil 26, Şekil 27, Şekil 28, Şekil 29). Buna göre gruplar arasında istatistiksel farkın olmadığı tespit edilmiştir.



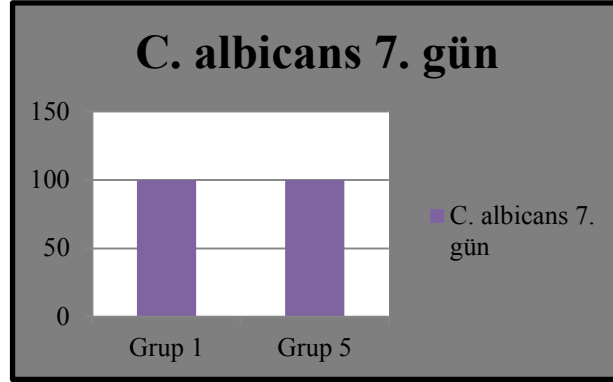
Şekil 26: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 27: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

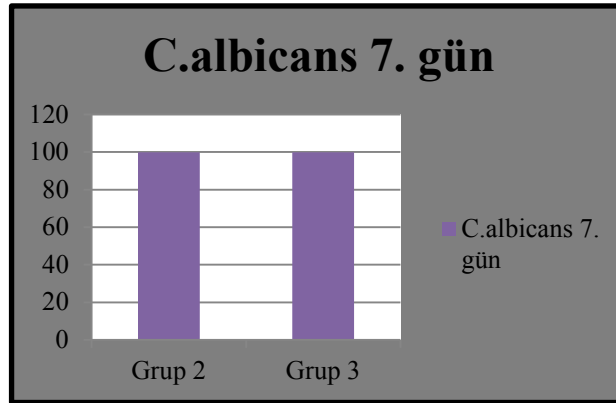


Şekil 28: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

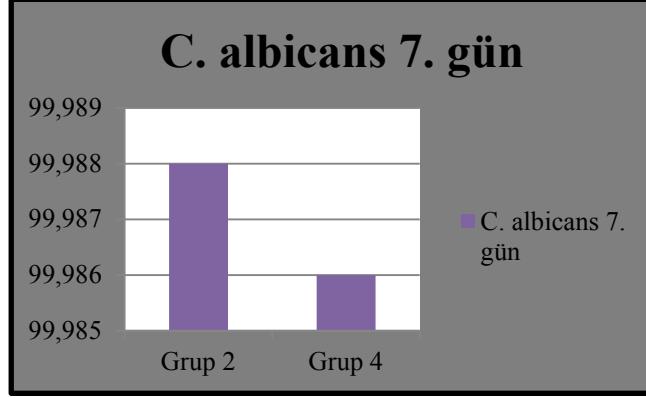


Şekil 29: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

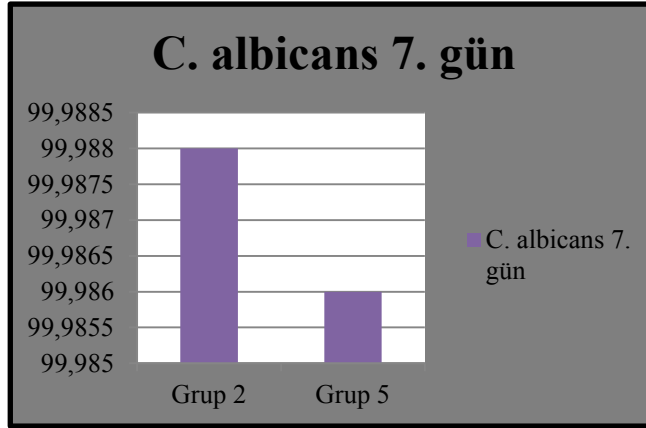
Kök kanal medikamenti olarak serum fizyolojik ile karıştırılmış üçlü patın kullanıldığı Grup 2 ile serum fizyolojik ile karıştırılmış ampisilin gentamisin kullanıldığı Grup 3' ün yedinci günde *C. albicans*' ı yok etme oranları arasındaki fark $t= 0,97$ olarak hesaplanmıştır. Grup 4 ve Grup 5' e ait bulgular Tablo 12' de gösterilmektedir. Buna göre gruplar arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Şekil 30,Şekil 31, Şekil32).



Şekil 30: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

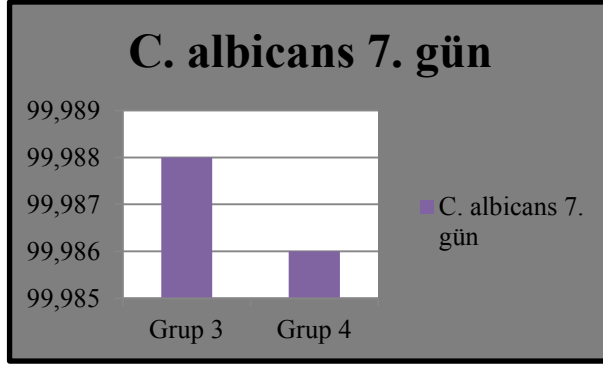


Şekil 31: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

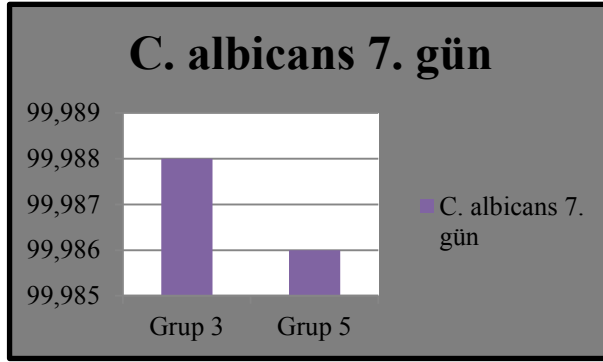


Şekil 32: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

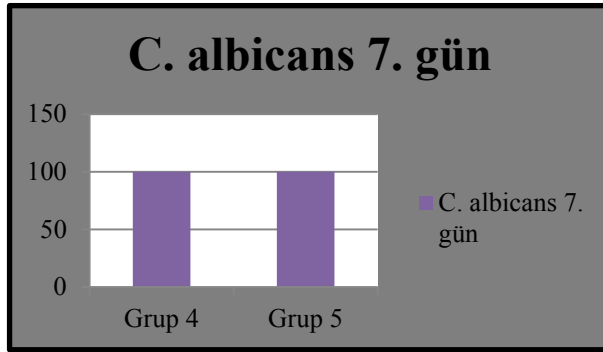
C. albicans ile enfekte edilmiş örneklerin 7. gün Ct değerleri ve relatif hücre azalma ortalamaları Tablo 10-Tablo 11' de gösterilmektedir. Buna göre Grup 3, Grup 4 ve Grup 5' in *C. albicans*' ı yok etme sonuçları arasında istatistiksel fark tespit edilmemiştir (Tablo 12) (Şekil 33, Şekil 34, Şekil 35).



Şekil 33: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 34: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



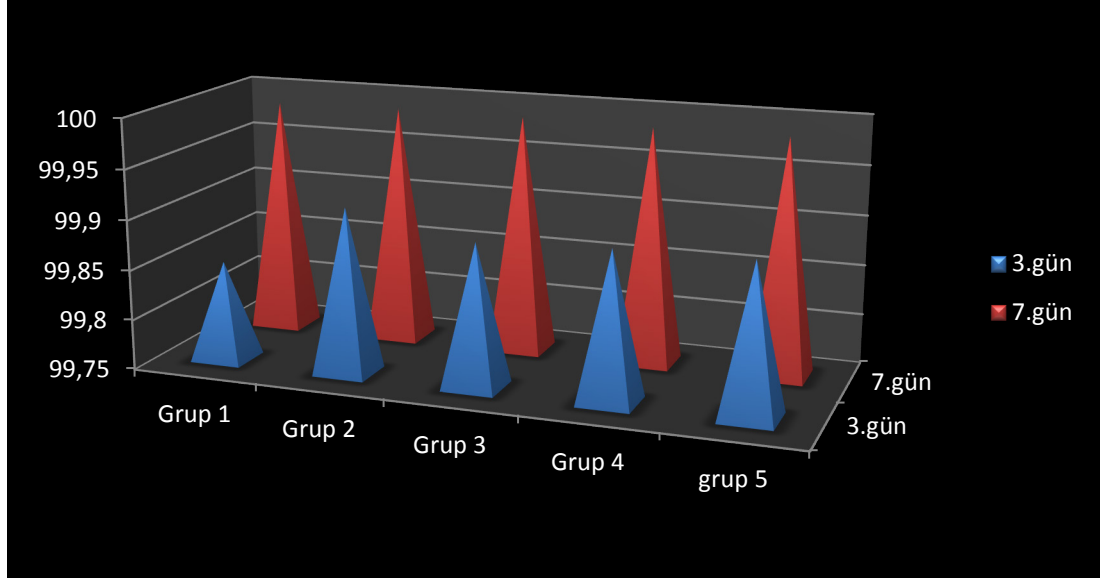
Şekil 35: *C. albicans* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Tablo 12: *C. albicans* ile enfekte edilmiş örneklerde 7. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları arasındaki kıyaslama

7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi (t= 2,101, df= 18, p<0,05)				
	t			
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 2	0,19			
Grup 3	0,33	0,97		
Grup 4	0,68	0,01	0,10	
Grup 5	0,69	0,06	0,11	0,97

4.1.4. *Candida albicans* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalma oranları arasındaki farkın kıyaslanması

C. albicans ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma oranlarının ortalama (%) ve standart sapma değerleri Tablo 5' te, 7. günde relatif hücre azalma oranlarının ortalama (%) ve standart sapma değerleri ise Tablo 9' da gösterilmiştir. *C. albicans* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün hücre azalma oranları arasındaki farkın kıyaslanması amacıyla yapılan testin sonuçları Tablo 13' de sunulmuştur (Şekil 36). Buna göre ara seans medikamentlerini (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) kök kanalında 3 gün yerine 7 gün bekletmek *C. albicans*' in yok edilmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır.



Şekil 36: Deney gruplarının 3 ve 7. günde *C. albicans*' ı eridike etme oranları

Tablo 13: *C. albicans* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi ($t= 2,101$, $df= 18$, $p<0,05$)

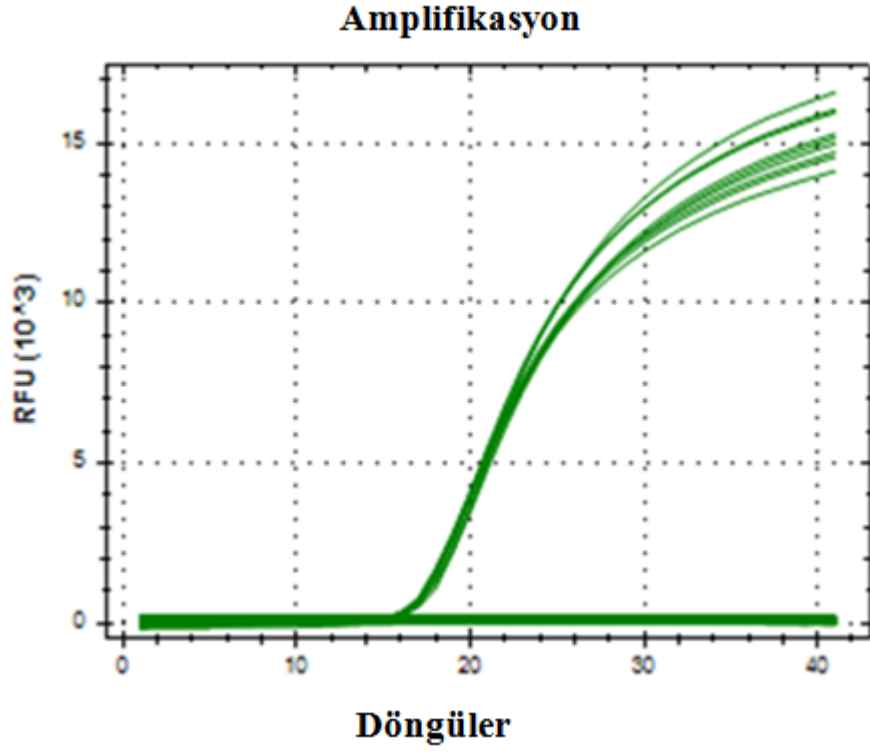
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
t=	0,04071924	0,00000335	0,00042520	0,00000017	0,00000002

4.2. *Enterococcus faecalis* ile Enfekte Edilen Örneklerden Elde Edilen Bulgular

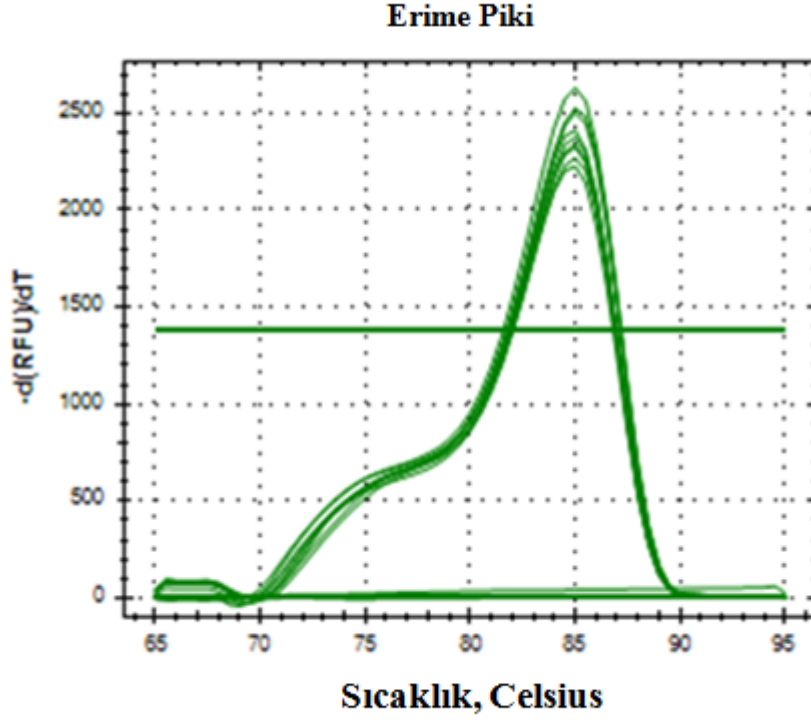
E. faecalis Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 37, Şekil 38, Şekil 39, Şekil 40, Şekil 51, Şekil 52' de, Ct değerleri de Tablo 15 ve Tablo 19' da gösterilmiştir. PCR sonucu elde edilen ürünlerin gerçek PCR ürünü olup olmadığı "erime eğrisi" yöntemi ile kontrol edilmelidir. Çalışmamızın bulgularında, her bir numune için tek erime pikinin elde edilmesi PCR' da tek hedef çoğaltıldığını, elde edilen değer yaklaşık 85° C olması bu hedefin primer dimer değil, çalışılan gen bölgesi olduğunu göstermektedir. Grup 5' teki 9 numaralı örneğin 7. gün numunesinde elde edilen PCR ürünü 81,5° C' de pik verdiği için analiz dışı bırakılmıştır.

4.2.1. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen örneklerden 0. günde elde edilen bulgular

E. faecalis American Type of Culture Collection 29212 (ATCC 29212) suşu ile enfekte edilen kök kanallarından 48 saatlik inkübasyon süresinin sonunda alınan örneklerde sıfırıncı günde mikroorganizma varlığı tespit edilmiştir. *E. faecalis*' in sıfırıncı gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 37, Şekil 38' de gösterilmiştir.



Şekil 37: *E. faecalis* 0. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri



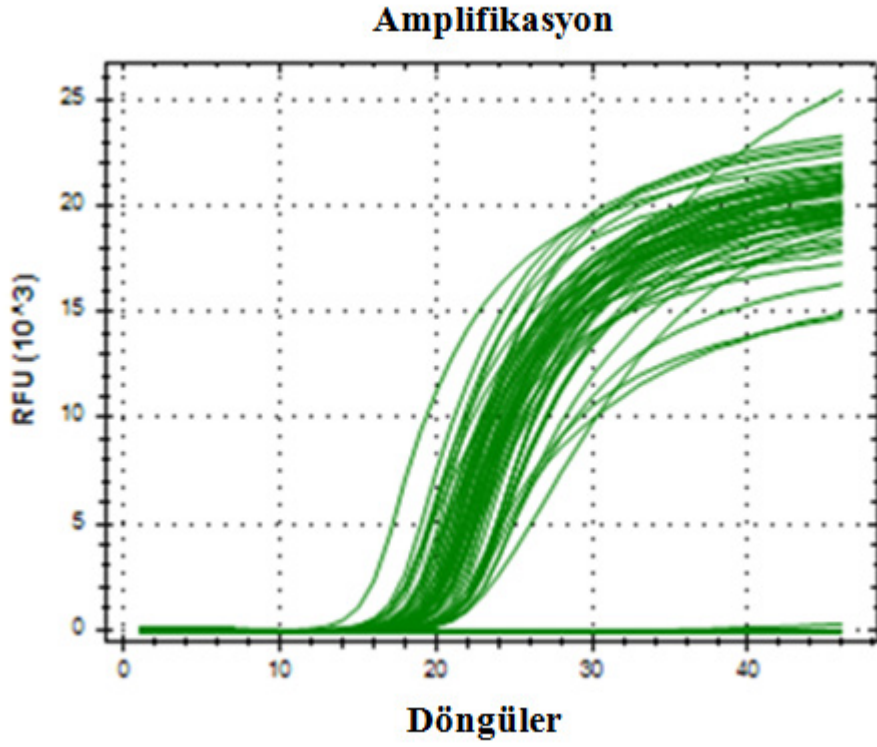
Şekil 38: *E.faecalis* 0. gün Q-PCR DNA erime pikleri

4.2.2. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen örneklerden 3. günde elde edilen bulgular

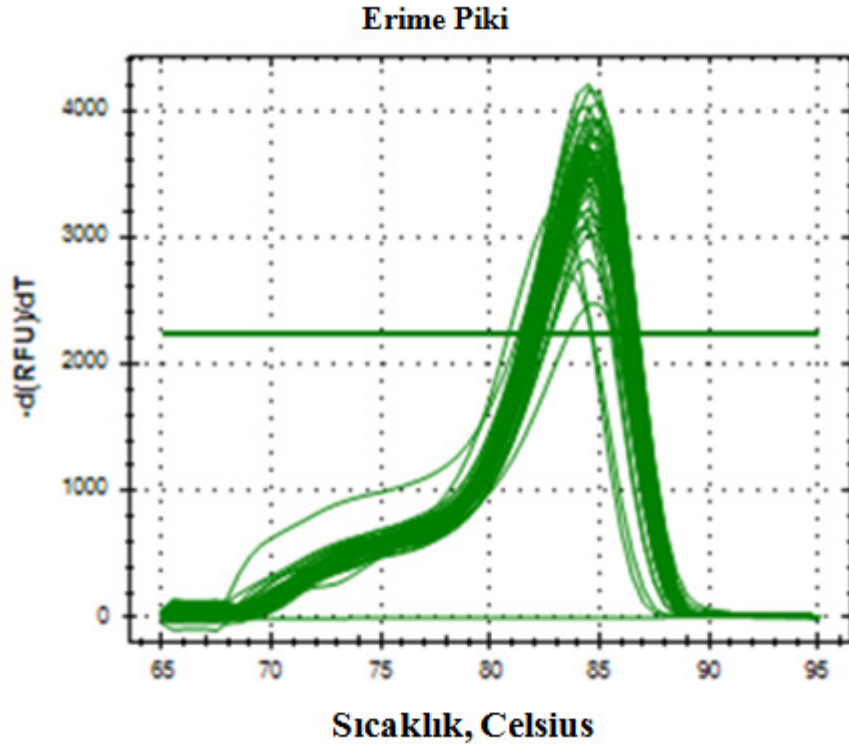
E. faecalis ile enfekte edilmiş ve sonrasında beş farklı kök kanal medikamenti uygulanmış gruplarda 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri Şekil 39, Şekil 40' da, elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 14' de gösterilmektedir. Üçüncü gün sonuçlarına göre Grup 1' in, *E.faecalis*' i yok etmede % 97,618 oranıyla en etkili grup olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 14: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

	Ortalama	Standart sapma
Grup 1 Ca(OH) ₂	97,618	±2,033
Grup 2 3P	96,947	±2,082
Grup 3 2P	91,673	±6,121
Grup 4 M3P	89,505	±8,880
Grup 5 Laktoferrin	89,943	±7,794



Şekil 39: *E. faecalis* 3. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri



Şekil 40: *E.faecalis* 3. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Tablo 15: *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerde 3. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

	KONTROL	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1	15,96	20,79	19,79	20,17	19,52	19,76
2	15,88	21,17	20,17	20,29	18,60	17,96
3	15,77	20,79	22,94	19,40	17,45	17,91
4	15,82	23,25	20,78	20,03	20,40	18,77
5	15,71	19,47	22,20	20,22	20,10	20,16
6	15,67	22,42	21,95	19,14	20,72	21,01
7	15,63	22,20	20,33	20,71	19,19	19,80
8	15,99	21,40	20,88	18,65	22,27	18,94
9	15,78	21,62	20,43	20,05	18,88	20,71
10	15,61	22,92	22,48	17,77	18,19	19,85

Tablo 16: *E. faecalis* ile enfekte edilen gruplarda 3. gündeki relatif hücre miktarları

Relatif hücre miktarı (%)					
Numune no:	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup5
1	3,52	7,02	5,42	8,49	7,18
2	2,56	5,13	4,70	15,21	23,66
3	3,08	0,69	8,07	31,14	22,70
4	0,58	3,22	5,40	4,18	12,91
5	7,36	1,11	4,38	4,77	4,57
6	0,93	1,29	9,05	3,03	2,46
7	1,05	3,85	2,95	8,48	5,54
8	2,36	3,37	15,80	1,28	12,97
9	1,75	3,98	5,17	11,66	3,27
10	0,63	0,85	22,33	16,70	5,31

E. faecalis ile enfekte edildikten sonra Ca(OH)₂ uygulanmış olan Grup 1’de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 19,47- 23,25 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 97,618± 2,033 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16).

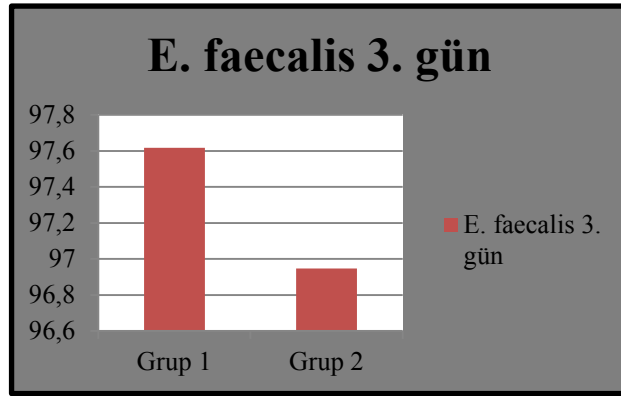
Buna göre *E. faecalis* ile enfekte edildikten sonra üçlü pat uygulanmış olan Grup 2’de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 19,79- 22,94 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 96,947± 2,082 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16).

Buna göre *E. faecalis* ile enfekte edildikten sonra ikili pat uygulanmış olan Grup 3’de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 17,77-20,71 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 91,673± 6,121 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16).

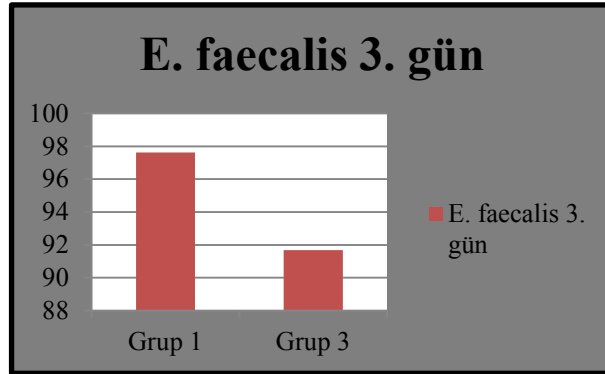
Buna göre *E. faecalis* ile enfekte edildikten sonra modifiye üçlü pat uygulanmış olan Grup 4’ de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 17,45- 22,27 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 89,505± 8,880 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16).

Buna göre *E. faecalis* ile enfekte edildikten sonra laktoferrin uygulanmış olan Grup 5' de 3. gün sonunda eşik döngü sayıları 18,77- 21,01 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % 89,943± 7,794 olarak hesaplanmıştır (Tablo 14, Tablo 15, Tablo 16).

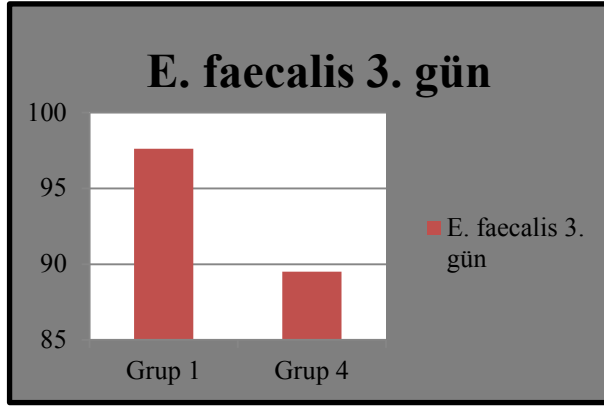
Üçüncü günün sonunda Grup 1 ve Grup 2' nin *E. faecalis*' i yok etme oranları arasındaki fark t=0,48 olarak hesaplanmıştır. Grup3, Grup 4 ve Grup 5' in, Grup 1' e kıyasla elde edilen sonuçları Tablo 17' de gösterilmiştir. Buna göre gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 41, Şekil 42, Şekil 43, Şekil 44).



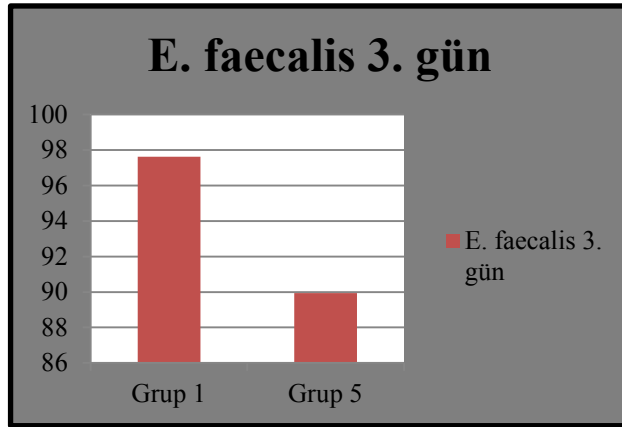
Şekil 41: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 42: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

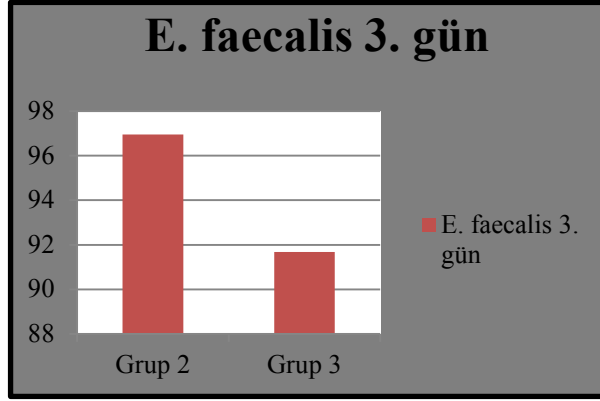


Şekil 43: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

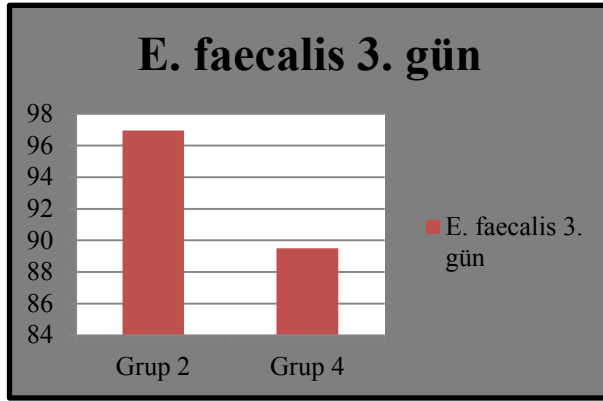


Şekil 44: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

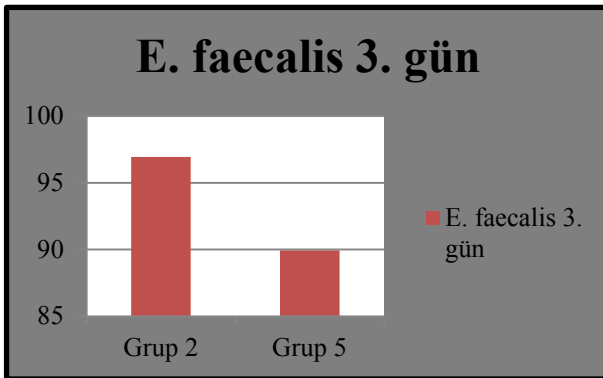
Grup 2 ve Grup 3' ün *E. faecalis*' i yok etme oranları arasındaki fark $t= 0,03$ olarak hesaplanmıştır. Grup 4 ve Grup 5' in, Grup 2' ye kıyasla *E. faecalis*' i yok etme oranları arasındaki fark Tablo 17' de gösterilmiştir. Buna göre gruplar arasında istatistiksel bir fark bulunmamıştır (Şekil 45, Şekil 46, Şekil 47).



Şekil 45: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

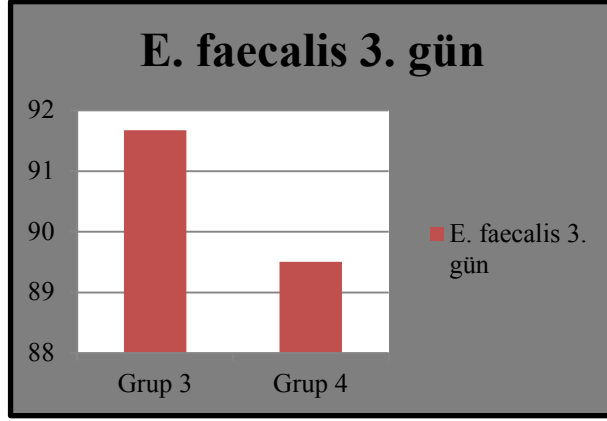


Şekil 46: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

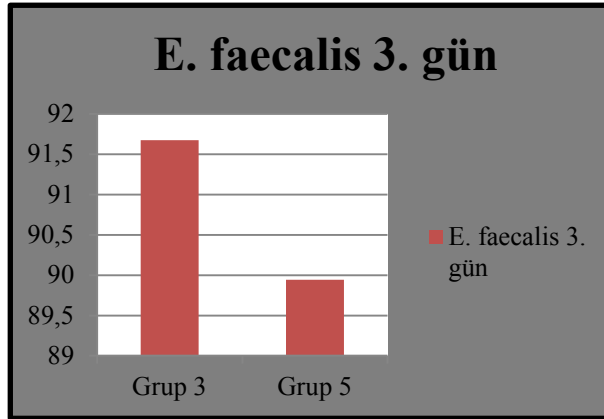


Şekil 47: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

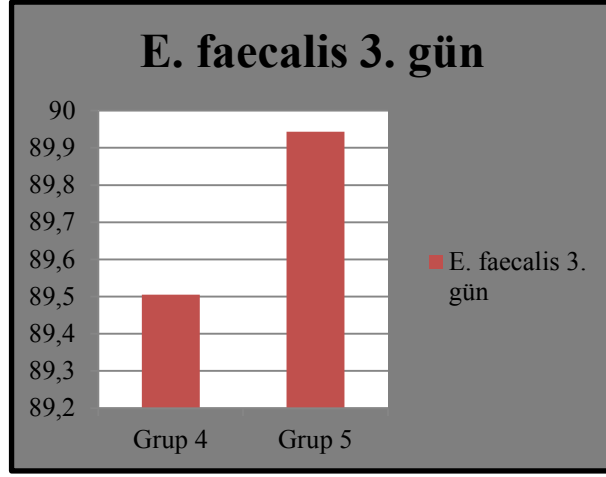
E. faecalis ile enfekte edilen gruplarda 3. gün Ct değerleri ve relatif hücre miktarları Tablo 15 ve Tablo 16’ da gösterilmiştir. Buna göre Grup 3, Grup 4 ve Grup 5’ in *E. faecalis*’ i yok etme oranları arasında istatistiksel bir fark saptanmamıştır (Şekil 48, Şekil 49, Şekil 50).



Şekil 48: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 49: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



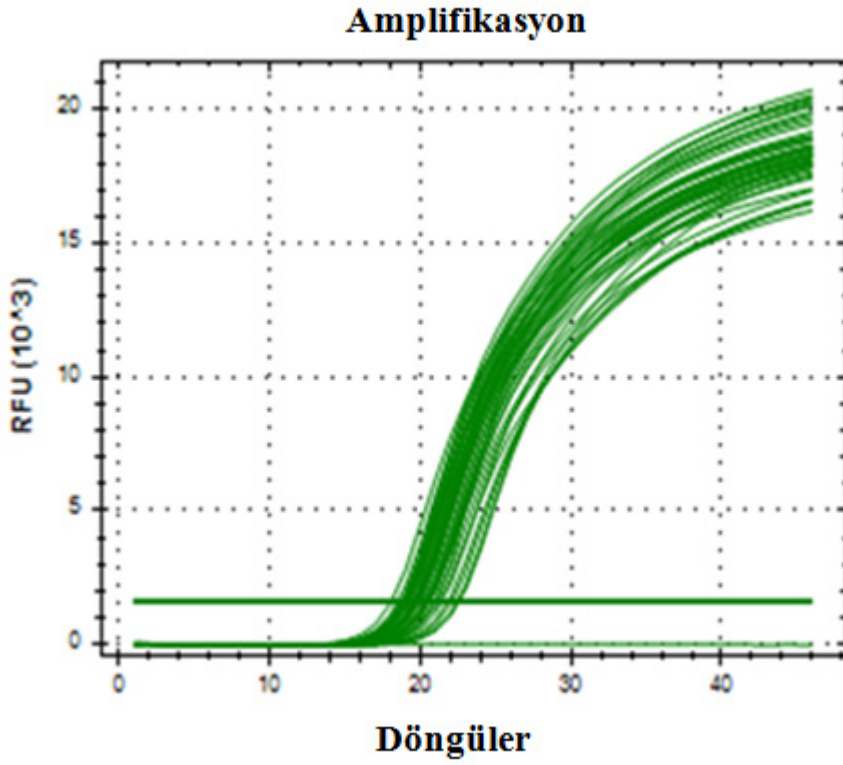
Şekil 50: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde üçüncü günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Tablo 17: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerde 3. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları (%) arasındaki kıyaslama

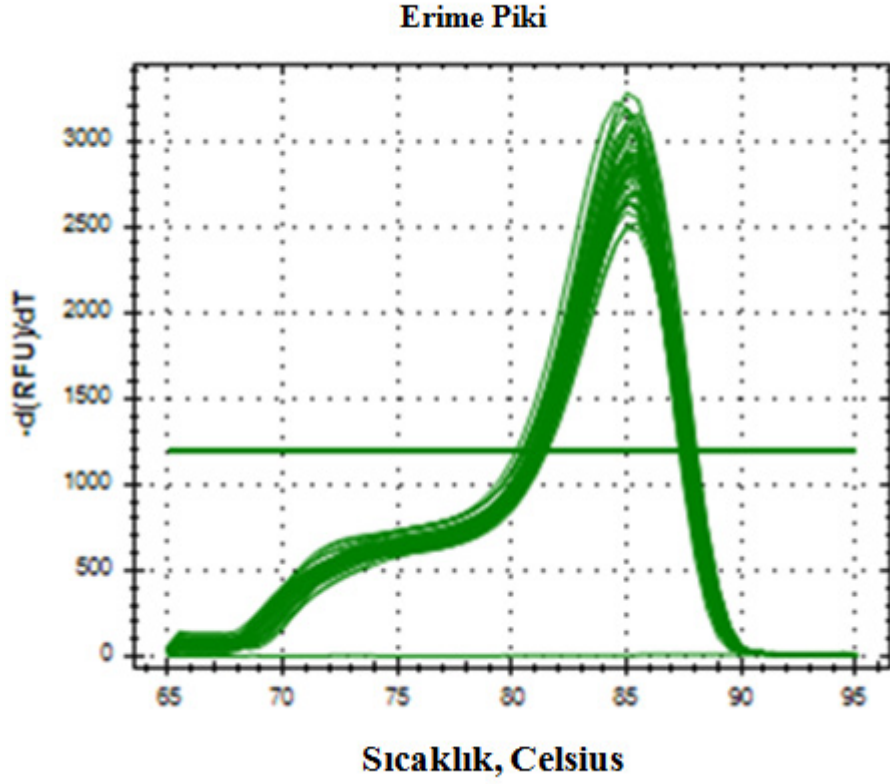
3. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi ($t=2.101$, $df=18$, $p<0,05$)				
	t			
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 2	0,48			
Grup 3	0,01	0,03		
Grup 4	0,02	0,02	0,53	
Grup 5	0,01	0,02	0,67	0,91

4.2.3. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen örneklerden 7. günde elde edilen bulgular

E. faecalis ile enfekte edilmiş ve sonrasında beş farklı kök kanal medikamenti uygulanmış gruplarda 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri ve erime pikleri Şekil 51- Şekil 52' de, elde edilen ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 18' de gösterilmiştir. Tüm antiseptikler yedi gün içerisinde *E. faecalis* hücrelerinin % 92,5' inden fazlasını öldürmeyi başarmıştır.



Şekil 51: *E. faecalis* 7. gün Q-PCR DNA çoğalma eğrileri



Şekil 52: *E. faecalis* 7. gün Q-PCR DNA erime pikleri

Tablo 18: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde relatif hücre azalma ortalamaları (%) ve standart sapma değerleri

	Ortalama	Standart sapma
Grup 1 Ca(OH) ₂	98,389	±1,854
Grup 2 3P	96,918	±2,157
Grup 3 2P	96,798	±2,111
Grup 4 M3P	94,062	±4,114
Grup 5 Laktoferrin	92,509	±4,674

Tablo 19: *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerde 7. gün deney gruplarının ve kontrol grubunun Ct değerleri

	KONTROL	GRUP 1	GRUP 2	GRUP 3	GRUP 4	GRUP 5
1	15,96	26,08	19,81	20,99	19,45	19,57
2	15,88	24,67	20,44	20,79	18,75	19,56
3	15,77	22,41	22,80	22,54	18,86	20,47
4	15,82	23,52	22,99	22,07	20,69	19,19
5	15,71	19,65	22,58	21,18	20,12	20,71
6	15,67	22,06	21,87	20,47	20,49	21,58
7	15,63	22,37	20,95	20,95	20,05	19,37
8	15,99	21,81	20,32	20,97	22,98	19,64
9	15,78	21,79	20,24	20,73	20,57	
10	15,61	21,02	20,26	19,14	20,14	18,11

* Grup 5-9. numune 7. gün elde edilen PCR ürünü 81.5 °C'de pik verdiği için analiz dışı bırakılmıştır.

Tablo 20: *E. faecalis* ile enfekte edilen gruplarda 7. gündeki relatif hücre miktarları

Numune no;	Relatif hücre miktarı (%)				
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
1	0,09	6,92	3,05	8,88	8,17
2	0,23	4,25	3,32	13,70	7,81
3	1,00	0,77	0,92	11,74	3,86
4	0,48	0,69	1,31	3,42	9,69
5	6,49	0,85	2,25	4,72	3,12
6	1,19	1,36	3,60	3,54	1,67
7	0,94	2,50	2,51	4,66	7,50
8	1,77	4,97	3,17	0,79	7,97
9	1,55	4,53	3,23	3,61	
10	2,36	3,97	8,65	4,32	17,64

Çalışmamızda *E. faecalis* ile enfekte edildikten sonra Ca(OH)_2 uygulanmış olan Grup 1' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 19,65- 26,08 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % $98,389 \pm 1,854$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20).

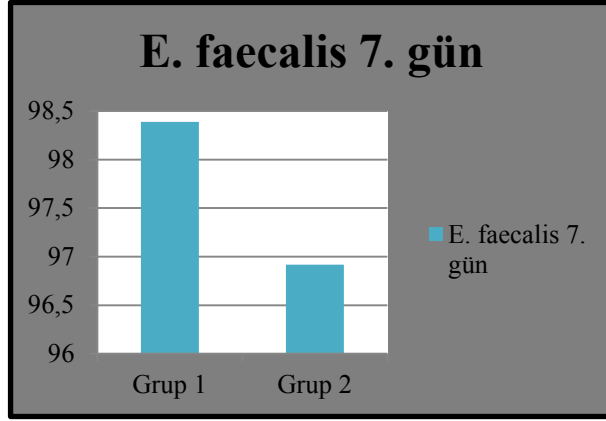
E. faecalis ile enfekte edildikten sonra üçlü pat uygulanmış olan Grup 2' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 19,81- 22,99 arasında değişmiş ve % hücre miktarının azalma ortalaması da % $96,918 \pm 2,157$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20).

E. faecalis ile enfekte edildikten sonra ikili pat uygulanmış olan Grup 3' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 19,14- 22,54 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % $96,798 \pm 2,111$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20).

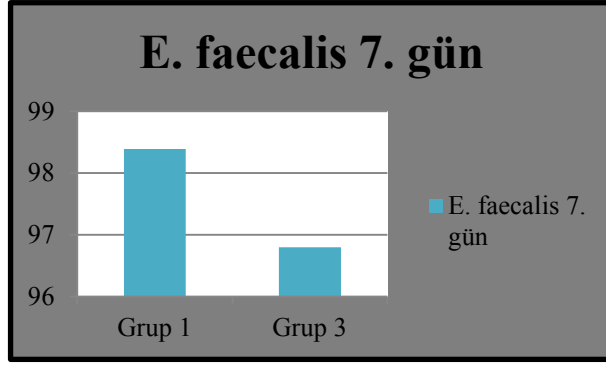
E. faecalis ile enfekte edildikten sonra modifiye üçlü pat uygulanmış olan Grup 4' te 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 18,75- 22,98 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % $94,062 \pm 4,114$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 18, Tablo 19, Tablo20).

E. faecalis ile enfekte edildikten sonra laktoferrin uygulanmış olan Grup 5' de 7. gün sonunda eşik döngü sayıları 18,11- 21,58 arasında değişmiş ve hücre miktarının azalma ortalaması da % $92,509 \pm 4,674$ olarak hesaplanmıştır (Tablo 18, Tablo 19, Tablo 20).

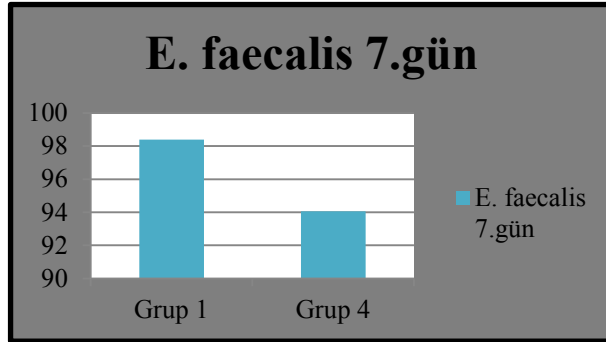
E. faecalis ile enfekte edilen gruplarda 7. gün elde edilen Ct değerleri, relatif hücre miktarları ve farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları arasındaki fark Tablo 19, Tablo 20, Tablo 21' de gösterilmiştir. Buna göre gruplar arasında *E. faecalis*' i yok etme oranları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (Şekil 53-Şekil 62).



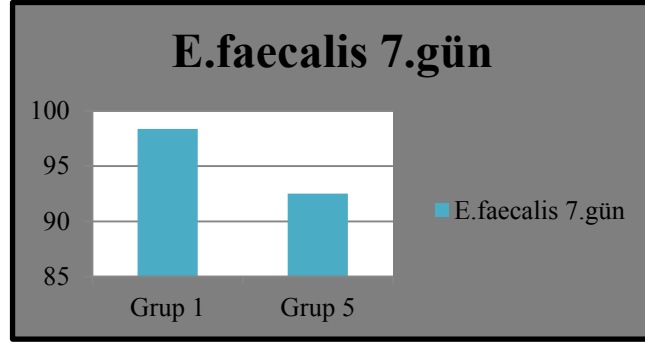
Şekil 53: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 2 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



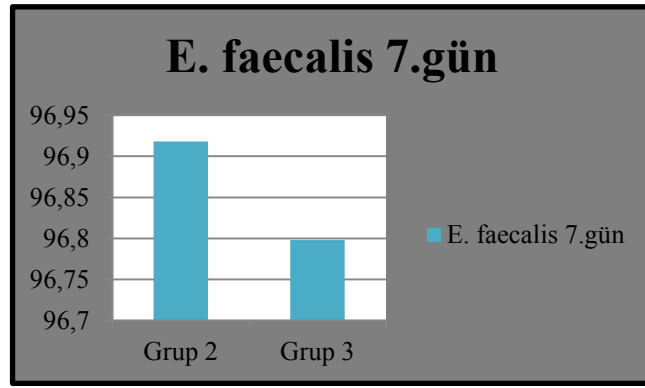
Şekil 54: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



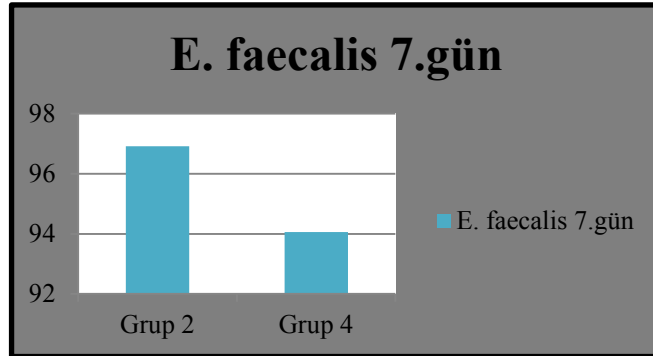
Şekil 55: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



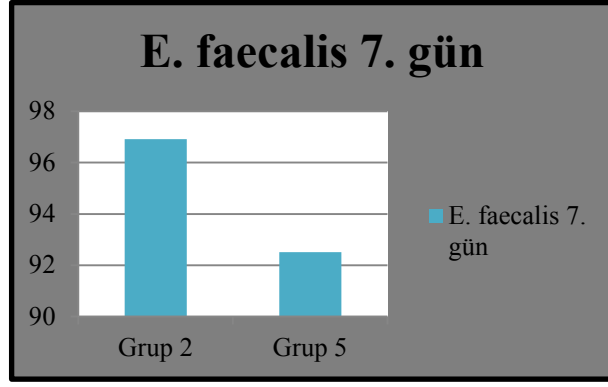
Şekil 56: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 1 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



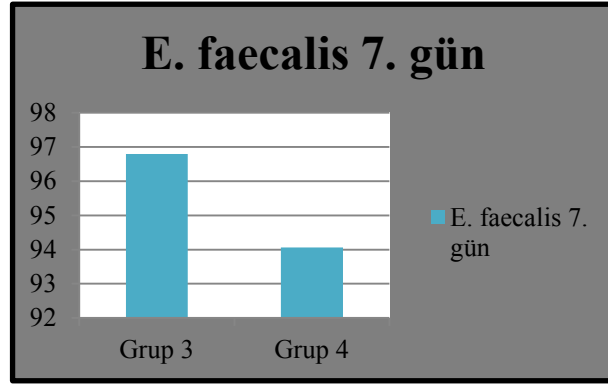
Şekil 57: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 3 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



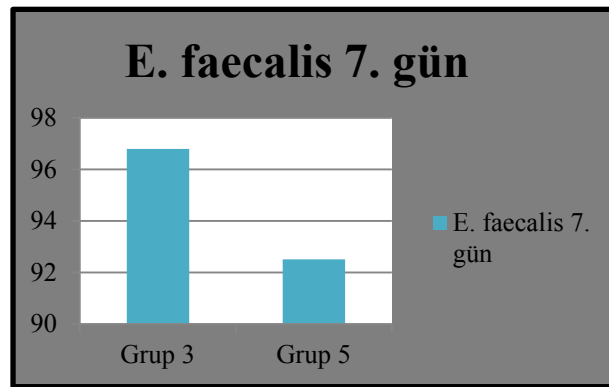
Şekil 58: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



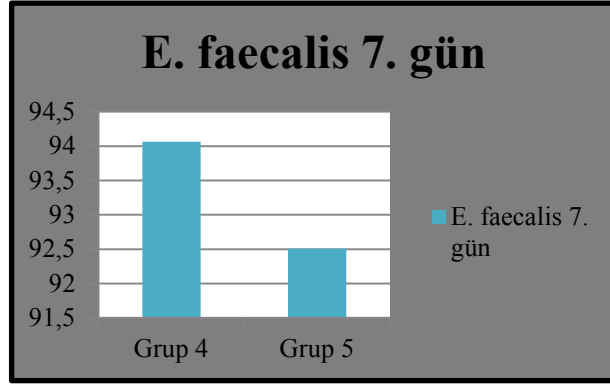
Şekil 59: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 2 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 60: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 4 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 61: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 3 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik



Şekil 62: *E. faecalis* ile enfekte edilip Grup 4 ve Grup 5 medikamentleri uygulanan dişlerde yedinci günde yok edilen mikroorganizma oranlarına ilişkin grafik

Tablo 21: *E. faecalis* ile enfekte edilmiş örneklerin 7. günde farklı kök kanal medikamenti uygulanmış olan gruplardaki hücre azalma oranları arasındaki kıyaslama

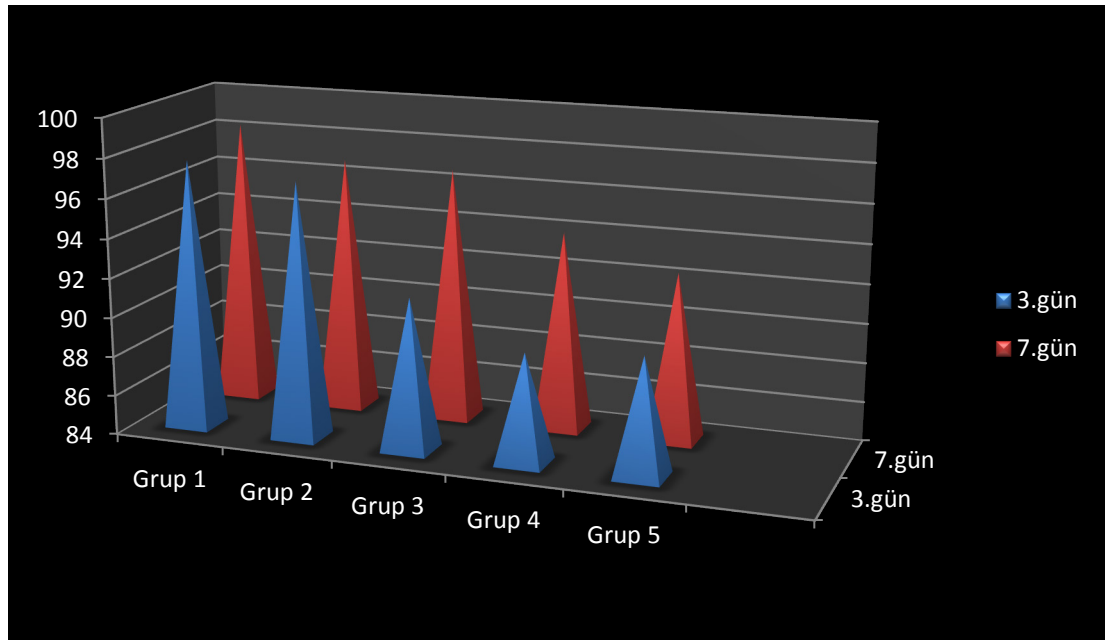
7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi (t=2.101, df=18, p<0,05)				
	t			
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4
Grup 2	0,12			
Grup 3	0,14	0,90		
Grup 4	0,01	0,04	0,08	
Grup 5	0,01	0,03	0,03	0,46

4.2.4. *Enterococcus faecalis* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalma oranları arasındaki farkın kıyaslanması

E. faecalis ile enfekte edilmiş örneklerin 3. günde relatif hücre azalma oranlarının (%) ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 14' te, 7. günde relatif % hücre azalma oranlarının ortalama ve standart sapma değerleri ise Tablo 18' de gösterilmiştir. Buna göre ara seans medikamentlerini (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) kök kanalında 3 gün yerine 7 gün bekletmek *E. faecalis*' in yok edilmesinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık yaratmamıştır (Tablo 22, Şekil 63).

Tablo 22: *E. faecalis* ile enfekte edilen örneklerin 3. ve 7. gün azalmaları arasındaki farkın 2-kuyruklu t-testi ($t= 2,101$, $df= 18$, $p<0,05$)

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
t=	0,38717406	0,97614066	0,02914106	0,16525757	0,39266484

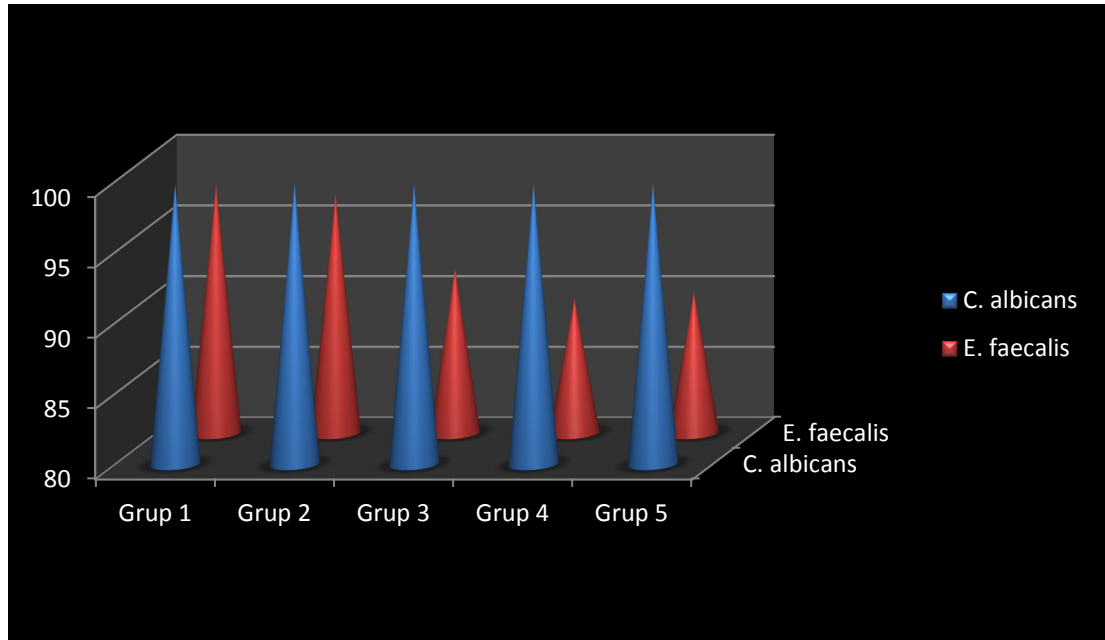


Şekil 63: Deney gruplarının 3 ve 7. günde *E. faecalis*' i yok etme oranları.

4.3. Kök kanal medikamentlerinin 3. günde *Candida albicans* ve *Enterococcus faecalis* üzerindeki etkilerinin karşılaştırılması

Beş farklı kök kanal medikamentinin *C. albicans* ve *E. faecalis* üzerindeki üçüncü gün etkilerinin kıyaslanması amacıyla 1-kuyruklu t-testleri Minitab 17 (Minitab Ltd, İngiltere) yazılımı kullanılmış ve $t= 1,7341$, özgürlük derecesi $df= 18$ ve alfa seviyesi (p)= 0,05 olarak alınmıştır. Buna göre medikamentlerin iki farklı mikroorganizma üzerindeki etkinliklerinin istatistiksel değerlendirilmesi ve grafikleri aşağıdaki gibidir (Şekil 64, Tablo 23).

Grupların 3. günde *C. albicans*' ı ve *E. faecalis*' i yok etme oranları Tablo 5, Tablo 7, Tablo 14, Tablo 16' da gösterilmiştir. Buna göre tüm grupların (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) 3. günde *E. faecalis*' e kıyasla *C.albicans* üzerindeki etkisi daha fazla olmuştur. Diğer bir deyişle, kalsiyum hidroksitin, üçlü patın, ikili patın, modifiye üçlü patın ve laktoferrin süspansiyonunun iki mikroorganizma üzerindeki etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur ($p<0,05$).



Şekil 64: Deney gruplarının 3. günde *C. albicans* ve *E. faecalis*' i yok etme oranları

Tablo 23: Kanal medikamentlerinin 3. günde mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerinin 1-kuyruklu-t-testi ile karşılaştırılması (t= 1,7341, df= 18, p<0,05)

t					
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
3.gün	3,141454011	4,099296369	3,860177659	3,364717929	3,672988558

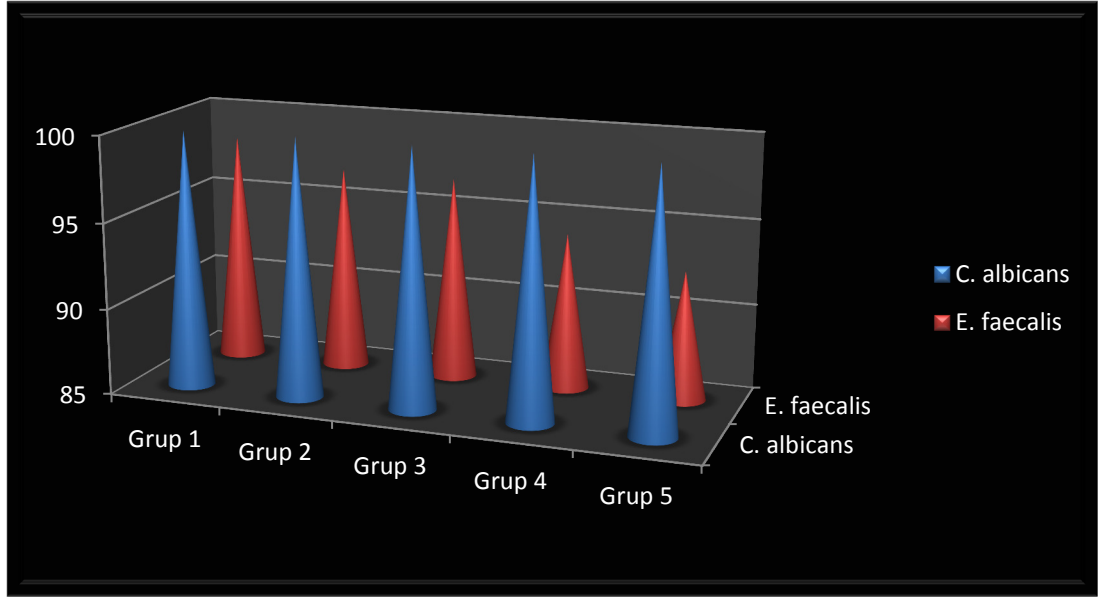
4.4. Kök Kanal Medikamentlerinin 7. günde *Candida albicans* ve *Enterococcus faecalis* Üzerindeki Etkilerinin Karşılaştırılması

Beş farklı kök kanal medikamentinin *C. albicans* ve *E. faecalis* üzerindeki yedinci gün etkilerinin kıyaslanması amacıyla 1-kuyruklu t-testleri Minitab 17 (Minitab Ltd, İngiltere) yazılımı kullanılmış ve t= 1,7341, özgürlük derecesi df= 18 ve alfa seviyesi p=0,05 olarak alınmıştır. Buna göre medikamentlerin iki farklı mikroorganizma üzerindeki etkinliklerinin istatistiksel değerlendirmesi ve grafiği aşağıdaki gibidir (Tablo 24, Şekil 65).

Grupların 7. günde *C. albicans*' ı ve *E. faecalis*' i yok etme oranları Tablo 9, Tablo 11, Tablo 18, Tablo 20' da gösterilmiştir. Buna göre tüm grupların (Grup 1, Grup 2, Grup 3, Grup 4 ve Grup 5) 7. günde *E. faecalis*' e kıyasla *C. albicans* üzerindeki etkisi daha fazla olduğu saptanmıştır. Diğer bir deyişle, kalsiyum hidroksitin, üçlü patın, ikili patın, modifiye üçlü patın ve laktoferrin süspansiyonunun iki mikroorganizma üzerindeki etkisi arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmuştur (p<0,05).

Tablo 24: Kanal medikamentlerinin 7. günde mikroorganizmalar üzerindeki etkinliklerinin 1-kuyruklu-t-testi ile karşılaştırılması (t= 1;7341, df= 18, p<0,05)

t					
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
7.gün	2,476236088	4,091383244	4,345076352	4,139755004	5,180989714



Şekil 65: Deney gruplarının 7. günde *C. albicans* ve *E. faecalis*' i yok etme oranları

5.TARTIŞMA

Pulpal ve periapikal hastalıklarının esas sebebi mikroorganizmalardır. Bu nedenle kök kanal tedavisinde başarı elde edebilmek için bu mikroorganizmaların kök kanal sisteminden uzaklaştırılması gerekmektedir. Kök kanallarının mekanik olarak şekillendirilmesinin ardından yıkama solüsyonları ile yıkanması ve ara seans gerektiren durumlarda ise medikamentlerin kullanılması bu amaçlardır. Kullanılacak olan kök kanal medikamentinin kök kanal sisteminin bütün ayrıntılarına diffüze olabilmesi, çabuk etki göstermesi, yıkanarak kanaldan kolaylıkla uzaklaştırılabilmesi, kolay uygulanabilmesi, eksüda varlığında aktivitesini koruyabilmesi ve en önemlisi kanalda bulunan mikroorganizmalara antimikrobiyal etki gösterebilmesi aranan özelliklerdir.

Kök kanal medikamentlerinin antimikrobiyal etkinliklerinin belirlenmesinde çeşitli yöntemler mevcuttur. Agar difüzyon testi, kültür yöntemi ve moleküler yöntemler bu amaçla en sık tercih edilen yöntemlerdir (Adl ve ark., 2012; Athanassiadis ve ark, 2009; Yılmaz, 2008; Aksoy, 2008; Dumani, 2008).

Agar difüzyon testi uygulanan yöntemler içerisinde en basit yöntemdir. Agar difüzyon yönteminde örnek ile agar arasında uygun kontakın sağlanması, inkübasyon süresi, ortam ısısının standardize edilmesi ve test edilecek materyalin yoğunluğu oldukça önemlidir. Ancak bu yöntem ile test edilen materyalin bakteriyostatik mi yoksa bakterisit mi etki gösterdiği tespit edilememektedir (Aksoy 2008).

Kültür yöntemi ise kök kanal medikamentlerinin ve irigasyon ajanlarının etkinliğini incelemeye, kök kanal mikroflorasının tespitinde kullanılmaktadır (Dumani 2008, Aksoy 2008). Kültür yöntemi fenotipik (soyserimsel) bir inceleme yöntemidir. Fenotipik yöntemleri nicelleştirmek zordur, genellikle belirsizdir ve bazı türler fenotipik olarak benzer ya da farklı davranışlar gösterebilirler. Kültür yönteminde örnekten dilüsyon yolu ile agara ekim yapılmaktadır. Ancak bu durumda dilüsyona bağlı olarak örneğin tamamı temsil edilemeyebilir. Ayrıca birçok

mikroorganizma için gerekli olan çevresel şartları sağlamak da kolay değildir. Bu nedenle kültüre edilemeyen ya da canlılığı devam etmeyen bakteriler kültür yöntemleri ile tespit edilemezler (Siqueira ve Roças 2003). Bunun yanında uzun dönem açlık periyodunda kalan hücrelerin gözlenebilir bir faza girdiği halde mikrobiyolojik kültür yöntemleri ile tespit edilemediği bilinmektedir. Bu faza ‘Gözlenebilen Ancak Kültüre Edilemeyen Faz- VBNC’ adı verilir. Whiteside ve Oliver, yaptıkları çalışmada sıcaklık yükselmesi ile *Vibrio vulnificus*’ un canlanabildiğini göstermişlerdir (Whiteside ve Oliver, 1997). Bu yüzden VBNC fazına giren bakterilerin hücre bölünme yeteneğini yeniden kazanabileceği düşünülmektedir (Aksoy 2008).

Lleo ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada Garda gölünden (İtalya) aldıkları filtre edilmiş suda, ortam şartları mikroorganizmanın aleyhine geliştiğinde *E. faecalis*’ in VBNC fazına girerek canlı kalabildiğini ve aktif gelişimini devam ettirebilme kapasitesine sahip olduğunu ilk defa göstermişlerdir. Bu çalışmada *E. faecalis*’ i VBNC’ ye sürükleyen en büyük etkenin ortamdaki besin konsantrasyonu olduğu belirtilmiştir. Ortam ısısı ve inokulum hacmi ise sadece VBNC fazına ulaşılan süreyi değiştirmektedir. Bu çalışmada *E. faecalis*’ in aktif metabolik fonksiyonuna devam ettiğini göstermek için, ortama radyoaktif amino asiti eklenmiş ve bunu proteine çevirmesi izlenmiştir. Bu amaçla PZR yöntemleri kullanılmıştır. VBNC fazına geçen *E. faecalis*’ lerin ortam besin yönünden zengin olduğunda ve oda sıcaklığında bekletildiğinde ($22^{\circ} \text{C} \pm 1$) tekrar gelişme gösterdiği tespit edilmiştir (Lleo ve ark., 1998).

Moleküler tanı yöntemleri ise, kültür yöntemleri ile keşfedilmesi zor olan patojenlerin tespitinde önemli bir yer tutar. Bu teknikler sayesinde dünya genelindeki hastalıkların tanısı konulmaya çalışılmaktadır. Günümüzde sıklıkla ve güvenle kullanılan bu yöntemler içerisinde en sık kullanılanı polimeraz zincir reaksiyonudur. Son on yıl içinde farklı amaçlarla PZR yönteminin kullanıldığı birçok makale yayınlanmıştır. Halen kullanım alanı olan birçok PZR yöntemi mevcuttur. Nested PCR, Broad-range PCR, Real Time PCR (Gerçek Zamanlı PZR, Q-PCR) Multiplex PCR bunlar arasında sayılabilir. Bunlar içinde hem kalitatif hem de kantitatif sonuç verebilen tek yöntem Gerçek-Zamanlı PZR yöntemidir. Biz de çalışmamızda tüm

kültür yöntemleri irdelendikten sonra kültüre edilemeyen, VBNC fazına giren türleri de görebilmek ve nicel veriler elde edebilmek amacıyla Q-PCR yöntemini kullandık.

Günümüzde kök kanal medikamenti olarak sıklıkla kalsiyum hidroksit kullanılmaktadır. Kalsiyum hidroksit, bakterisit etkisi ve bakteriyel endotoksinleri nötralize etme kapasitesi sayesinde en çok tercih edilen intrakanal medikamenti olmuştur. Kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisi, aköz ortamda yüksek oranda saldığı reaktif hidroksil iyonlarının protein, DNA ve hücre membran transportasyonu etkilemesi ile ilişkilidir (Yılmaz 2008; Moahmmadi ve Dummer 2011). Ancak kalsiyum hidroksitin antimikrobiyal etkisini yetersiz bulan çalışmalar da mevcuttur (Adl ve ark. 2012; Adl ve ark., 2014, Mozayeni ve ark., 2014). Bu nedenle halen endodontide yeni kanal içi medikamentlerin arayışı devam etmektedir. Üçlü kanal patı birçok çalışmada kalsiyum hidroksite alternatif olarak kullanılmıştır (Adl ve ark. 2012; Mozayeni ve ark. 2014). Ancak üçlü kanal patının renklenmeye sebep olması (Lenherr ve ark., 2012), dentinin mikrosertlik ve kırılma direncini azaltması (Berkhoff ve ark., 2014), kök kanalından uzaklaştırılmasının zor olması (Arslan ve ark., 2014; Berkhoff ve ark., 2014) ve karıştırılma oranlarının belirsizliği (Trope, 2008) dezavantaj olarak öne sürülmektedir. Biz de çalışmamızda bu durumu göz önüne alarak kalsiyum hidroksit ve üçlü pata alternatif olabilecek kök kanalından kolay uzaklaştırılabilen, biyouyumlu, kullanımı ve hazırlanması kolay, kokusuz ve antimikrobiyal etkiye sahip yeni medikamentlerin geliştirilmesini amaçladık. Çalışmamızda, literatür incelemelerinde intrakanal medikamenti olarak kullanımına rastlanılmamış olan ampisilin, gentamisin ve laktoferrin materyallerinin antimikrobiyal etkinliklerini araştırdık.

Kanal içi medikamentlerini yerleştirmeden öncesinde ve sonrasında kök kanalından uzaklaştırılması için kullanılan irigasyon protokollerini incelediğimizde değişik yöntemlerin kullanıldığını görüyoruz. Arslan ve arkadaşları, farklı irigasyon protokolleri ile TAP' nin kök kanalından uzaklaştırılabilirliğini inceledikleri çalışmalarında distile su, % 1 NaOCl, % 2,5 NaOCl, % 100 etanol, % 17 EDTA ve % 1 NaOCl ile birlikte PUI yöntemlerini kullanmışlardır. Kök kanalları Protaper Universal sistem ile F5' e kadar genişletilmiş, ardından uzunlamasına ikiye bölünmüş ve apikal segmentte standardize bir oyuk hazırlanarak TAP ile doldurulduktan sonra kök parçaları bir araya getirilmiş ve irigasyon işlemleri

uygulanmıştır. Bu çalışmada PUI ile birlikte % 1 NaOCl uygulamasının TAP' nin uzaklaştırılmasında en etkili yöntem olduğu ancak hiçbir irigasyon protokolünün TAP' yi kök kanalından tamamen uzaklaştıramadığı gösterilmiştir (Arslan ve ark 2014).

Kanal içi medikamentlerinin kök kanalından uzaklaştırılabilme oranlarının incelendiği başka bir çalışmada temizlenemeyen medikamentin penetrasyon oranını belirlemek amacıyla özel radyoaktif izotoplar kullanılmıştır. Bu amaçla 28 gün boyunca kök kanalında bulunan TAP ve Ca(OH)_2 ' nin, Endo-Activator, PUI, Endo-Vac ve şırınga ile standart irigasyon prosedürü yardımıyla kök kanalından uzaklaştırılmasına çalışılmıştır. Hiçbir irigasyon prosedürünün kök kanalından TAP' yi tamamen uzaklaştıramadığı, hatta TAP' nin ortalama % 85 oranında kök kanal duvarlarında kaldığı görülmüştür. Radyoaktif olarak işaretlenen TAP' nin yaklaşık % 50 oranında 350 µm derinliğinde dentine penetre olduğu gözlemlenmiştir. Radyoaktif olarak işaretlenen kalsiyum hidroksitin ise % 5 - % 7,5 oranında kök kanal duvarlarında kaldığı ve artık medikamentin de çoğunlukla 50 µm dentin derinliğinde olduğu tespit edilmiştir (Berkhoff ve ark., 2014).

Bu çalışmalardan da anlaşıldığı üzere TAP' yi kök kanalından tamamen uzaklaştırmak çok kolay görülmemektedir. Bu durum göz önüne alınarak çalışmamızda, üçlü patın kök kanalından temizlenmesi için araştırmalarda başarısı vurgulanan PUI yöntemi 30 saniye süreyle uygulanmıştır. Diğer gruplarda ise 27 gauge irigasyon iğnesi kullanarak çalışma boyunun 2 mm gerisinden 30 saniye boyunca yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

Üçlü antibiyotik patı ve kalsiyum hidroksit aynı zamanda rejeneratif endodonti çalışmalarında da sıklıkla kullanılan medikamentlerdir. Rejeneratif endodonti, pulpa nekrozu nedeniyle kök oluşumunun tam olarak gerçekleşmediği dişlerde kullanılan yararlı bir tedavi yöntemidir. Rejeneratif tedavilerin temel özelliği intrakanal medikamentlerinin kullanılmasıdır. Althumairy ve arkadaşları, TAP ve kalsiyum hidroksitin apikal papilla kök hücrelerinin (SCAP) canlılıkları üzerindeki etkilerini araştırmışlardır. Yaklaşık olarak 1000 mg/ml konsantrasyonunda kullanılan TAP' nin apikal papilla kök hücrelerinin canlı kalmasını engellediğini, kalsiyum hidroksitin ise bu kök hücrelerin canlılığını ve çoğalmasını teşvik ettiğini saptamışlardır

(Althumairy ve ark 2014). Ruparel ve arkadaşları da yaptıkları çalışmalarında kanal medikamenti olarak kullanılan TAP, DAP, modifiye üçlü pat (siprofloksasin, metronidazol ve sefaklor), Augmentin ve kalsiyum hidroksitin SCAP üzerindeki etkilerini incelemişlerdir. Bu çalışmada antibiyotikli tüm karışımların kök hücrelerin canlılığına zarar verici etki yarattığı ve yalnızca kalsiyum hidroksit kullanılan grupta kök hücre proliferasyonu gözlemlendiği tespit edilmiştir (Ruparel ve ark., 2012). Bu çalışmanın sonuçları Althumairy ve ark.'nın (2014) bulguları ile de uyumludur.

Gerek rejeneratif tedavilerde gerekse kök kanal tedavisinin ara seanslarında kanal medikamenti olarak kullanılan üçlü kanal patının dişte renklenmeye neden olabileceği saptanmıştır. Lenherr ve arkadaşları, intrakanal medikamentlerinin diş yüzeyinde yarattıkları renklenme oranlarını inceledikleri çalışmalarında 1, 3, 6 ve 12 aylık takipler yapmışlardır. Bir yılın sonunda en az renklenme sırasıyla AH plus, Ca(OH)₂, Ultracal ve WMTA' da, en fazla renklenme ise üçlü pat ve Ledermix gruplarında gözlemlenmiştir (Lenherr ve ark., 2012).

*Ultracal: baryum sülfat içeren hazır kalsiyum hidroksit preparatıdır.

Akçay ve arkadaşları, 70 adet keser dişi mine-sement birleşiminin on milimetre altından keserek standart numuneler elde ettikleri çalışmalarında kök kanallarına minosiklinli TAP, doksisisiklinli TAP, amoksisilinli TAP, sefaklorlu TAP, kalsiyum hidroksit, ikili antibiyotik patı yerleştirmişler ve bir grubu da kontrol amacıyla boş bırakmışlardır. Üç hafta sonunda meydana gelen renklenme oranları incelendiğinde minosiklinli, doksisisiklinli ve sefaklorlu TAP' nin renklenmeye neden olduğu belirlenirken, kalsiyum hidroksit ve ikili antibiyotik patın olduğu gruplarda ise renklenmenin olmadığını ortaya konmuştur (Akçay ve ark., 2014).

Çalışmamızda kullanılan numunelerin kök yüzeyleri incelendiğinde 7 günün sonunda TAP içeren grupta gözle görülebilir derecede renklenme belirlenmiştir. Diğer gruplarda ise kök yüzeylerinde ve kanal ağızlarında herhangi bir renklenmeye rastlanılmamıştır. Tüm bunlar göz önüne alındığında tedavide kullanılacak kanal medikamentinin seçiminde, antimikrobiyal etkinliğinin yanında renklenme ve kök kanalından temizlenebilirliği gibi diğer faktörler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Adl ve arkadaşları, 60 adet çekilmiş tek kök tek kanallı insan dişlerini kullandıkları çalışmalarında kökün orta üçlüsünden 6 mm uzunluğunda bloklar elde

etmiş ve bu blokların kök kanalları 1, 2 ve 3 nolu Gates Glidden driller ile şekillendirildikten sonra *E. faecalis* ile kontamine edilmiştir. Steril salinin negatif kontrol olarak kullanıldığı çalışmada TAP ve Ca(OH)₂ deney gruplarında kök kanalında 7 gün süreyle bekletilmiştir. Daha sonra GG4 ve GG 5 numara driller ile 100 µm ve 200 µm dentin derinliğinden örnekler alınmış ve negatif kontrol grubunda *E. faecalis*' in 200 µm dentin derinliğine penetre olduğu gösterilmiştir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre TAP, 7. günün sonunda dentin duvarlarını dezenfekte etmede kalsiyum hidroksitten daha etkili bulunmuştur (Adl ve ark., 2014).

Haapasalo ve arkadaşları, farklı kök kanal medikamentlerinin *E. faecalis* üzerindeki etkinliklerini inceledikleri çalışmalarında çekilmiş yirmi yaş dişlerinin köklerini iki metal blok arasında ezerek 1-4 mm boyutlarında dentin tozları elde etmişlerdir. Kök kanal medikamenti, dentin tozu ve bakteri süspansiyonunun her birinden 50 µl karıştırarak 1 ve 24 saatlik süreyle 37° C' de inkübasyonu sağlanmıştır. Cfu sayımı sonrasında dentin tozunun kalsiyum hidroksitin etkisini inhibe ettiği görülmüş ve bu durumun kullanılan medikamentin yoğunluğuna ve kök kanalında kalış süresine bağlı olduğu bildirilmiştir (Haapasalo ve ark., 2000).

TAP ve kalsiyum hidroksitin de olduğu beş farklı kök kanal medikamentinin antimikrobiyal etkinliğini incelediğimiz çalışmamızda dentin blokları yerine boyları ve kanal çapları standardize edilmiş diş kökleri kullanılmıştır. Döner sistem ile genişletilen ana kök kanalları, mikropipet yardımı ile kontamine edilmiş ve paper point ile örnek alınarak inceleme yapılmıştır. Günümüzde en az yanılma payına sahip, kantitatif sonuç verebilen bir yöntem olarak kabul edilen Gerçek-Zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. DNA izolasyonu ile de sadece canlılığı devam eden hücrelerin başlangıca göre relatif azalma oranları tespit edilmiştir. Araştırmamız antimikrobiyal etkinliğin incelendiği bir çalışma olup TAP ile Ca(OH)₂ arasında 3. ve 7. günlerde antimikrobiyal etkinlik açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. İki grup arasında istatistiksel fark bulunamamasının sebebi seçilen taşıyıcıyla ilgili olabilir. TAP' nin genel kullanımında visköz bir taşıyıcı olan propilen glikol kullanılmaktadır. Ancak propilen glikolün de kendine ait bir antimikrobiyal etkinliği mevcuttur. Bu nedenle gruplar arası standardizasyonu sağlayabilmek için serum fizyolojik çözeltisi tüm kök kanal medikamentlerine taşıyıcı olarak seçilmiştir. Bu nedenle TAP' nin çalışmalardaki bilinen etkisi azalmış

olabilir. Bir diğer olasılık ise mikroorganizma sayımı yapmadan önce ortamdaki ölü DNA hücrelerinin uzaklaştırılmış olmasıdır. Yapılan moleküler çalışmalarda hücre ölümü sonrası DNA molekülünün ortamdaki diğer bakteri ve mantarların nükleaz saldırıları ile karşılaştığı ve oksidasyon-hidroliz gibi olaylar neticesinde geri dönüşümsüz olarak zarara uğradığı varsayılarak ortamdaki gerek canlı gerekse ölü tüm DNA'ların sayımı yapılmaktadır. Halbuki biz çalışmamızda, ölü DNA hücrelerini ortamdan izole ederek sadece patojen özellikteki mikroorganizmaların sayımını yaptık. Bir diğer olasılık ise kök kanalından örnek alma yöntemlerine bağlı oluşabilen farklılıklardır. Gates glidden driller ve kurutma kağıtları bu amaçla en sık kullanılan yöntemlerdir. Gates glidden ile yapılan in vitro çalışmalarda, kök kanal preparasyonu tamamen bu drillerle yapılmaktadır. Bu yöntem ile alınan örneklerde yalnızca dentin penetrasyonu incelenmekte ve ana kök kanalı değerlendirilememektedir. Ancak bu drillerin kullanımına bağlı oluşacak smear tabakasının oluşumu ve uygulanan kök kanal preparasyonu nedeniyle rutin kök kanal tedavisini taklit edemediğini düşünmekteyiz. Bu nedenle çalışmamızda sadece paper point kullanarak ana kök kanalından örnek alma işlemini gerçekleştirdik. Burada kullanılan medikamentler ile dentin penetrasyonunun da inceleneceği yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Elli adet çekilmiş tek kök tek kanallı insan dişleri üzerinde yapılan başka bir çalışmada Ca(OH)₂, CHX jel, TAP, nanosilver (NS)' in *E. faecalis* üzerindeki antimikrobiyal etkinliği incelenmiştir. İntrakanal medikamentleri kök kanalında 7 gün bekletildikten sonra üç farklı yöntem ile örnekler alınmış ve 24 saatlik inkübasyon süresinin ardından kültür yöntemi ile incelenmiştir. Paper point ile alınan örneklerde *E. faecalis*' e karşı en etkili antimikrobiyal CHX jel, en az etkili ise kontrol grubu (normal salin) bulunmuştur. 2 numara Gates Glidden ile dentin duvarından alınan örneklerde ise TAP en etkili, NS ise en az etkili ajan olarak tespit edilmiştir. 4 numara Gates Glidden ile dentin duvarından alınan örneklerde ise TAP' in en etkili, kontrol grubunun ise en az etkili antimikrobiyal ajan olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmada kanal medikamentlerinin karıştırılma oranları belirtilmemiştir (Mozayeni ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda ise hem üçüncü hem de yedinci günde Ca(OH)₂ ve TAP' nin pozitif kontrol gruba kıyasla yüksek oranda mikroorganizma eliminasyonu sağladığı ancak aralarında istatistiksel olarak anlamlı

bir farklılığın olmadığı görülmüştür. Bu konuda daha hassas bir yöntem olan Gerçek-Zamanlı PZR yöntemini kullanarak daha gerçekçi sonuçlar bulduğumuzu düşünmekteyiz.

Kök kanallarındaki mevcut mikroorganizmaların tespiti için kök kanalından örnek alınması ile ilgili birçok yöntem vardır. Bu yöntemler arasında en sık kullanılan yöntem kök kanalından steril paper pointler ile örnek alınmasıdır. Bu yöntemi kullanarak kök kanalından örnek elde eden ve moleküler tekniklerle bakteri varlığını tespit eden birçok çalışma mevcuttur (Fouad ve ark. 2005; Roças ve Siqueira 2011). Berber ve arkadaşları, kök kanalından *E. faecalis*' in uzaklaştırılabilirliğini inceledikleri bir çalışmada kök kanallarını irige edip 3 adet steril paper point ile deney örnekleri almışlardır. Alınan örnekleri BHI+ kanlı agar besiyerlerine ektikten sonra CFU sayımını yapmış aynı zamanda kontaminasyon varlığını da doğrulamışlardır. Ayrıca dentin tübül penetrasyonundan emin olmak için örnekleri SEM' de incelemişlerdir (Berber ve ark., 2006). Aksoy (2008) ise, süt ve daimi dişlerdeki *E. faecalis*' in izolasyonunu, kültürel ve moleküler yöntemlerle tanımlanmasını amaçladığı çalışmasında kök kanallarından paper pointler ile örnek almıştır. Elde edilen örneklerin seri dilüsyonları yapıldıktan sonra agar içeren petrilere aktarılmıştır. Elde edilen kültürlerin saflığı Gram boyama, katalaz üretimi, agar üzerinde oluşan koloni morfolojisi ve biyokimyasal identifikasyon kiti kullanılarak belirlenmiştir.

Siqueira ve Roças (2003), kök kanalının anatomisi nedeniyle alınan örneklerde az sayıda bulunabilen bakterilerin bile PZR yöntemi ile incelenebildiğini bildirmişlerdir. Aynı araştırmacılar kök kanalından örnek alma prosedürünün etkinliğini; kullanılan paper point sayısına, boyutuna, absorpsiyon gücüne ve kök kanalında yerleşebilirliğine bağlı olduğunu düşünmektedirler.

Bizim çalışmamızda da kanal içi medikament serum fizyolojik irigasyonu ile uzaklaştırdıktan sonra ıslak kök kanalına 25 numara paper point yerleştirilmiş ve 60 saniye beklendikten sonra ilk örnek alınıp eppendorf tüpe konmuştur. Bunu takiben 2 kez daha aynı işlem yapılarak toplamda 3 adet örnek alınmıştır. Yapmış olduğumuz ön çalışmalarda, Protaper Universal sistem ile F3' e kadar mekanik şekillendirmesini yaptığımız köklerde 30 numara paper pointin apikal bölgeye temasını yeterli

görmediğimizden örnek alma işlemi daha ince olan ve apikale rahatlıkla yerleşen 25 numara paper point ile yapılmıştır. Çalışmamızda kök kanalından örnek alma prosedürünün etkinliğini ve güvenilirliğini arttırmak amacıyla 3 adet paper point kullanılmıştır.

Bu tür çalışmalarda paper point ile örnek alma işlemlerinde kök kanalı ıslatılarak ve paper pointin kök kanalında bekletilme süresi arttırılarak örnek alma işlemi etkin hale getirilmeye gayret edilir. Ancak paper point ile sadece ana kök kanalından örnek alınabilir. Bu nedenle yeni geliştirilmiş kök kanal medikamentlerinin etkinliğini incelemek için ileri tetkikler ve yeni araştırmalara ihtiyaç bulunmaktadır. Kanal medikamentlerinin kökün koronal, orta ve apikal üçlüdeki antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmek adına diş kökünden kesitler alınabilir ve elde edilen veriler Taramalı Elektron Mikroskopunda incelenebilir. Ayrıca günümüzde Gates Glidden driller yardımıyla dentin tübüllerine yerleşen mikroorganizmaların penetrasyon derinliği incelenmektedir. Bununla birlikte, yeni formülize edilen medikamentlerin uzun ve kısa dönem antimikrobiyal etkinliklerini incelemek için örnek alma aralıkları değiştirilebilir. Yaptığımız çalışma ile yeni araştırmalar için farklı bakış açıları oluşturduğumuzu düşünüyoruz.

Endodontik enfeksiyonlarda kök kanalından ve kök kanalı kaynaklı apselerden paper point ile elde edilen örneklerle yapılan bir çalışmada PZR yöntemi kullanılmış ve kök kanalından alınan 24 örnekte % 21 oranında *C. albicans* tespit edilirken, 19 apsedan elde edilen örneklerin hiçbirinde *C. albicans'* a rastlanılmamıştır (Baumgartner ve ark., 2000).

Akdeniz ve arkadaşları, dişlerinde çürük olan 13 ve çürüğü olmayan 20 çocuk ile yaptıkları bir çalışmada hem ağız boşluğundan hem de kök kanalından örnekler almışlardır. Yapılan incelemede kök kanallarında % 61, 5 oranında *C. albicans'* a rastlanılmıştır (Akdeniz ve ark., 2002).

Weckwerth ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, Endodonti kliniğine başvuran 65 hastanın oral kavitesinden alınan örneklerde % 46, 15 oranında *C. albicans'* a rastlanıldığını bildirmişlerdir. Bu çalışmada *C. albicans*, Saboraud agar kültür yöntemi ile 6, 12, 24 ve 48 saat süreyle direkt doymuş kalsiyum hidroksite maruz bırakıldığında sadece 48 saat sonunda total inhibisyonun olduğu gözlemlenmiştir.

Aynı çalışmada farklı pH' larda hazırlanan $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ' in *C. albicans* üzerindeki etkinliği de incelenmiş ve yalnızca pH 12,5' te total inhibisyon gözlemlenmiştir. Ayrıca bu çalışmada *C. albicans*' ların tüm pH aralıklarında canlı oldukları gözlemlenmiştir (Weckwerth ve ark., 2012).

Kalsiyum hidroksit ve klorheksidinli kanal patlarının intratübüler *C. albicans* üzerindeki antimikrobiyal etkinliğinin incelendiği diğer bir çalışmada Gates Glidden driller yardımıyla kök kanalından 0-100-200 μm derinliğinde örnekler alınmıştır. 200 μm derinliğinde kullanılan tüm medikamentlerin antimikrobiyal etkinlikleri açısından istatistiksel bir farkın olmadığı gözlemlenmiştir (Delgado ve ark., 2013).

Propolis, üçlü pat, % 2' lik klorheksidin jel ve propilen glkol ile karıştırılmış kalsiyum hidroksitin *C. albicans* üzerine antimikrobiyal etkinliğinin 1 ve 7 günlük süreçlerde incelendiği başka bir çalışmada kök kanalından 200 μm ve 400 μm derinliğinden örnekler alınmıştır. Birinci günün sonunda 200 μm derinliğinden alınan örneklerde CHX en fazla antifungal etki gösterirken, yedinci günün sonunda CHX, TAP ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ arasında antifungal etki açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunamamıştır. Birinci ve yedinci günün sonunda 400 μm derinliğinden alınan örneklerde en iyi etki CHX kullanılan grupta gözlemlenmiştir. $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ve TAP kullanılan gruplar arasında ise anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (Chua ve ark., 2014). Bizim çalışmamızda da 7. günün sonunda kök kanalında TAP ve $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ' nin *C. albicans* üzerinde benzer etki gösterdiği saptanmıştır.

Günümüzde enfeksiyona neden olan, tespiti zor ya da imkansız patojenlerin belirlenmesi için moleküler yöntemler tercih edilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu da günümüzde sıklıkla kullanılan moleküler yöntemlerdendir. Polimeraz zincir reaksiyonları oldukça güvenilir, hassas, hızlı yöntemlerdir (Song, 2005, Siqueira ve Roças, 2003). Ancak oldukça spesifik olan bu yöntemlerin fazla hassas olmasına bağlı olarak yanlış-negatif ya da yanlış-pozitif sonuçlar da elde edilebilmektedir.

Yanlış-pozitif sonuçlar kontaminasyona bağlıdır. Bu kontaminasyon daha önceki çalışmadan kalan DNA' ya, belli enfeksiyonların çalışmalarında normal floradaki DNA' ya ve/veya kültür ya da diğer hücrelerden gelen eksojen DNA' ya bağlı olabilir. Kontamine DNA tek başına ya da patojen bakteri ile birlikteyken herhangi

bir klinik öneme sahip değildir. Ancak PZR işleminde kullanılan yüksek oranda korunmuş oligonükleotid primerin kontamine DNA ile koamplifikasyona uğraması problem yaratabilir. Bu sorun özellikle Broad-range rDNA-PCR' da mevcuttur (Song 2005). Bizim çalışmamızda ise Gerçek-Zamanlı PZR yöntemini kullanarak DNA ile kontaminasyonu önlemek adına paper point ile alınan örnekler bir kereye mahsus kullanılan steril eppendorf tüplere konulmuştur. *E. faecalis* hücreleri Lane (1991) tarafından tanımlanan, bakteriyel 16S rRNA genini hedefleyen BactF 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' ve BactR 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CCG CA-3' primerleriyle hedeflenmiştir. *C. albicans* hücreleri Schoch ve ark.. (2012) tarafından tanımlanan, fungal ITS bölgesini hedefleyen FungF 5'- TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC -3' ve FungR 5'- GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G -3' primerleriyle hedeflenmiştir. Ayrıca elde edilen erime piklerinin aynı olması kontaminasyonun olmadığını göstermektedir. Bu nedenle çalışmamızda *E. faecalis* ile enfekte edilen örneklerden 7. günün sonunda Grup 5' in 9 numaralı örneğinden elde edilen erime piki 81,5 ° C olarak tespit edilmiş ve çalışmadan çıkarılmıştır.

Aksoy (2008), 5-13 yaşları arasındaki çocuklarda in vivo olarak yaptığı çalışmada kültür yöntemi ile 45 süt dişinden 9' unda (%20) , 38 daimi dişten 11'inde (%28), PCR yöntemi ile ise süt dişlerinden 10'unda (%22), daimi dişlerin 12' sinde (%26) *E. faecalis* izole etmişlerdir. Bu çalışmada *E. faecalis*' in kültür yöntemi ile saptanma oranı % 24 iken, moleküler yöntemle saptanma oranı % 26' dır. Diğer bir deyişler bu çalışmada *E. faecalis*' in saptanmasında kullanılan iki yöntem arasında istatistiksel olarak bir fark bulunmamıştır. Bunun sebebi mikroorganizmaların sadece varlığını tespit eden universal PCR, türe özgü PCR ve AP-PCR yöntemlerinin kullanılmış olmasıdır.

Franzetti ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada, *E. faecalis* ve *E. faecium*' u hem fenotipik hem de özgü primerler ile genotipik olarak tanımlamışlardır. Fenotipik olarak *E. faecium* olarak tanımlanan 44 suştan 22'si *E. faecalis*, API 20 STREP ile *E. faecalis* olarak tanımlanan 16 izolatın ise 3' ü türe spesifik primerler kullanıldığında *E. faecium* olarak tanımlanmıştır. Bu çalışmada moleküler yöntem ile kültür yöntemi arasında ciddi bir farkın olduğu gözlemlenmiştir (Franzetti ve ark., 2004).

Sedgley ve arkadaşları, yaptıkları klinik çalışmada oral mikrofloradaki *E. faecalis* görülme oranını Q-PCR ve mikrobiyolojik kültür yöntemi ile incelemişlerdir. Otuz hastanın 7' si endodontik tedaviye başlanacak olan, 10' u endodontik tedavisi devam eden, 10' u kanal tedavisi tekrarı olan ve 3' ü de kontrol hastasından oluşmaktadır. Q-PCR yöntemi ile alınan oral örneklerin % 17' sinde 114-490 hücre/ ml konsantrasyonlarında *E. faecalis*' e rastlanırken, mikrobiyolojik kültür yöntemiyle % 7 oranında 30-240 CFU/ml konsantrasyonlarında *E. faecalis*' e rastlanılmamıştır ve kültür yönteminin *E. faecalis*' in tespitinde yeterli olmadığı bildirilmiştir (Sedgley ve ark., 2005b).

Bizim yaptığımız ön çalışmalar neticesinde de kültür yönteminin kanal içi medikamentlerinin antimikrobiyal etkinliklerinin tespit etmede etkin bir yöntem olmadığı sonucuna varıldığından mikroorganizmaların gerek kalitatif gerekse kantitatif sonuçlarını kıyaslayabileceğimiz Gerçek-Zamanlı PZR yöntemi seçilmiştir.

Çok küçük hacimlerdeki örneklerin bile PZR reaksiyonunu oluşturabildiği, ortamda PZR reaksiyonun engelleyen substratlardan elde edilen bileşiklerin varlığı ve de örnekteki PZR inhibitörlerinin yeterince uzaklaştırılmaması nedeniyle yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. Ayrıca alınan örneklerdeki hücrelerden yeterince DNA elde edilememesi de sonucun yanlış çıkmasına neden olabilmektedir (Song 2005). Bizim çalışmamızda örnek hacmini arttırabilmek amacıyla her bir kök kanalında 3 örnek alınmıştır. Yapılan ön çalışmalar neticesinde el edilen örneklerin steril besiyeri içeren eppendorf tüplere konması PZR reaksiyonunu zorlaştırmıştır. Ortamdaki bu substrat fazlalığı PZR hassasiyetini etkilemiştir. Bu nedenle pilot çalışmadan yola çıkarak deneylerimizdeki örnekler boş steril eppendorf tüplere konmuştur ve DNA izolasyonu anında gerçekleştirilmiştir. Ayrıca çalışmamızda DNA izolasyonu öncesi ölü hücre DNA' larının ortamdan uzaklaştırılması için Villarreal ve ark. (2013) tarafından tanımlanan, DNaz-I ile işlem temelli yöntem kullanılmıştır.

Gomes ve arkadaşları, kök kanallarından izole ettikleri 100 izolatu hem fenotipik hem de moleküler düzeyde incelemişlerdir. Fenotipik olarak 100 izolatu 23' ü, PZR sonucuna göre ise 100 izolatu 79' u *E. faecalis* olarak tanımlanmıştır. Bu durumu

göz önüne alarak çalışmamızda daha hassas ve güvenilir bir yöntem olan Gerçek Zamanlı PZR yöntemini kullandık (Gomes ve ark., 2006).

Ara seans kanal medikamentlerinin kullanılması gereken durumlarda, kök kanal medikamentlerinin pat formuna getirilip kök kanalına yerleştirilebilmesi için sıvı taşıyıcı maddeler kullanılmaktadır. Bunlar genel olarak suda çözünebilen, visköz ve yağ bazlı taşıyıcılar olmak üzere üçe ayrılır. Steril su veya salin günümüzde en sık kullanılan taşıyıcılardır (Mohammadi ve Dummer, 2011). Kullanılan taşıyıcı, kanal medikamentinin antimikrobiyal etkinliğini etkiler ve elde edilen kanal patının viskozitesi arttıkça iyonik ayrışma da o oranda artış gösterir.

Polietilen glikol, düşük toksisitesi, immunojenitesi, antijenitesi ve aköz ortamlarda yüksek oranda çözünebilirliği ile ideal bir taşıyıcı olma özelliğindedir (Athanassiadis ve ark., 2007). Ancak PEG antimikrobiyal etkiye sahip bir taşıyıcıdır (Chirife ve ark., 1983). Carreira ve arkadaşları 2007 de yaptıkları çalışmalarında, iki farklı kök kanal medikamenti ile polietilen glikol ve natrosol taşıyıcıların *E. faecalis* ve *C. albicans* dahil 23 farklı mikroorganizma zinciri üzerindeki antimikrobiyal etkinliklerini değerlendirmişlerdir. Bu çalışmada polietilen glikolün antimikrobiyal etkisi gözlemlenmiştir (Carreira ve ark., 2007). Bu nedenle, çalışmamızda sadece kök kanal medikamentinin antimikrobiyal etkinliğini belirlemeyi amaçladığımız için taşıyıcı olarak antimikrobiyal etkinliği olmayan ve günümüzde yaygın olarak kullanılan steril serum fizyolojik solüsyonu kullanılmıştır.

Salin solüsyonları kök kanal medikamenti taşıyıcısı olmakla birlikte kök kanal irigasyon materyali olarak da kullanılmaktadır. Berber ve arkadaşları, irigasyon solüsyonları ve farklı şekillendirme tekniklerinin kök kanalından ve dentin tübüllerinden *E. faecalis*' i uzaklaştırma oranlarını inceledikleri çalışmalarında, mekanik şekillendirmeyi takiben irigasyon solüsyonu olarak salin kullanımının kök kanalından % 98 oranında bakteri eliminasyonu sağladığını belirtmişlerdir. Çalışmada, bu etkinin, irigasyon solüsyonunun hacmi ve irigasyon sıklığı kadar irigasyon iğnesinin ulaştığı derinliğe de bağlı olduğu vurgulanmıştır (Berber ve ark., 2006). Çalışmamızda enfekte edilen kök kanalının irigasyon solüsyonu ile değil yalnızca medikament kullanımı ile elimine edilme oranının tespit edilmesi amacıyla izotonik salin (% 0,9 NaCl çözeltisi) solüsyonu kullanılmıştır. Yıkama işlemini etkin

hale getirebilmek için her bir kanal 5 cc salin ile irige edilmiş ve kök kanalları Protaper Universal ile F3' e kadar mekanik olarak genişletilmiştir.

Enfekte kök kanalların dezenfeksiyonu amacıyla günümüze kadar birçok kök kanal medikamenti kullanılmıştır. Günümüzde birçok antibiyotik ve antibiyotik kombinasyonunun etkinliğinin değerlendirildiği in vitro ve in vivo çalışmalar yapılmaktadır. Penisilin, siprofloksasin, metronidazol, tetrasiklin ve aminoglikozitler etkinliği en çok incelenen antibiyotiklerdir. Ancak çalışmaların sonuçları çelişkilidir.

Pinheiro ve arkadaşları, kök kanal tedavili ve periapikal lezyonunda iyileşme görülmemiş olan 30 diş üzerinde yaptıkları çalışmalarında toplamda 55 bakteri türü izole etmişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre izole edilen tüm türler benzilpenisilin, amoksisilin ve klavulanat ile kombine edilmiş amoksisiline duyarlıdır. En fazla izole edilen tür olan *E.faecalis* ise genel olarak azitromisin ve eritromisine dirençli bulunmuştur (Pinheiro ve ark., 2003b). Pinheiro ve arkadaşları 2004 yılında yaptıkları bir başka çalışmada inatçı periapikal lezyonlu kök kanal tedavili dişlerden izole edilen 21 tür *E. faecalis*' in tamamı amoksisilin, amoksisilin-klavulanik asit, vankomisin ve moksifloksasine duyarlı bulunmuşken, % 95,2' sinin kloramfenikole, % 85,7' sinin tetrasiklin ve doksisisikline, % 80,9' unun siprofloksasine duyarlı oldukları tespit edilmiştir. Aynı çalışmada izole edilen tüm *E. faecalis* izolatlarına karşı en az etkiyi eritromisin ve azitromisin göstermiştir (Pinheiro ve ark., 2004). Aksoy' un 2008 de yaptığı çalışmada, asemptomatik nekrotik 83 dişten aldığı örneklerde tespit ettiği 72 izolatın 20' sini kesin olarak *E. faecalis* olarak tanımlamıştır. Uygulanan antibiyotik duyarlılık testlerinin sonucuna göre 20 izolattan 18' inin metronidazole, 14' ünün kanamisine, 3' ünün ampisiline, 1' inin vankomisine, 1' inin tetrasiklin ve klindamisine karşı yüksek oranda dirençli olduğu tespit edilmiştir. Bu sonuçlara göre, *E. faecalis* enfeksiyonlarında eritromisin ve azitromisin antibiyotiklerinin seçiminin yeterli olmadığı, penisilin türevi antibiyotiklerin ise oldukça etkili olduğu görülmektedir. Bu durumu göze alarak çalışmamızda ikili pat ve modifiye üçlü pat uygulamasında bir penisilin türevi olan ampisilin kullanılmış ve anlamlı sonuçlar elde edilmiştir.

İsveç' te 55 hasta üzerinde yapılan bir çalışmada kök kanallarına ara seans medikamenti olarak kalsiyum hidroksit uygulanmış ve 3 haftanın sonunda kök

kanallarından birinci örnek (S1) alınmıştır. Bunu takiben 28 dişe tetrasiklin+ kalsiyum hidroksit, 27 dişe ise eritromisin+ kalsiyum hidroksit uygulanmış ve bir ay sonunda kök kanallarından ikinci örnek (S2) alınmıştır. Çalışmanın sonuçlarına göre Ca(OH)₂+tetrasiklin patının % 77 oranında, eritromisinli patın ise % 99 oranında enterokoklara etkili olduğu saptanmıştır. Bu çalışmaya göre eritromisinin kalsiyum hidroksit ile kombine kullanımı enterokoklar üzerinde çok etkilidir. Ancak bizce çalışmada aynı dişler üzerinde iki farklı kanal medikamentinin denenmesi çalışmanın hassasiyetini saptırabilir. S1 örneklerinde kalsiyum hidroksitin kök kanalından tam olarak uzaklaştırılamaması söz konusudur. Sonrasında farklı bir kanal medikamentinin uygulanması ise antimikrobiyal etkinliğin kesin olarak belirlenememesine neden olabilir. Bu nedenle çalışmamızda hem üçüncü hem de yedinci gün örnekleri için ayrı dişler kullanılmıştır. Ancak çalışmanın standardizasyonu için medikament uygulanımı ve örnek alım işlemleri aynı anda yürütülmüştür (Molander ve Dahlen, 2003).

Hastane enfeksiyonları her yıl önlenabilir birçok ölüme sebebiyet vermektedir. Enterokok türlerinin bu enfeksiyonlardaki rolü oldukça büyüktür. Antibiyotiklere karşı oluşan direnç enterokokal enfeksiyonların tedavisini zorlaştırmaktadır. Tayvan’ da yapılan bir çalışmada 26 farklı hastaneden ayakta tedavi gören ve yatan hastalardan alınan örneklerde *E. faecalis* ve *E. faecium* izolatlarının 2002-2010 yıllarındaki antibiyotik dirençleri karşılaştırılmış ve *E. faecalis* ampisiline % 99,8, penicisilin G’ ye % 99,6, gentamisine % 52,1, streptomisine % 68,9, siprofloksasine % 77,0, tetrasikline % 10,5, rifampine % 30,2 oranında duyarlı bulunmuştur. Aynı çalışmada *E. faecalis*’ in çoklu ilaç rezistans profilinin rifampin/eritromisin/tetrasiklin olduğu bildirilmiştir (Wang ve ark., 2013). Sekiz yıl boyunca takibi yapılan bu çalışmadan yola çıkarak enterokokal enfeksiyonların tedavisinde ampisilin, penisilin G ve gentamisin kullanımının oldukça etkili olduğu sonucuna varılabilir. Sande ve İrwin de penisilin ve ampisilin birlikte kullanımının endokardit ve viridan streptokoklara etkili olduğunu göstermişlerdir (Sande ve İrwin, 1974). Aslangül ve arkadaşları, bazı ciddi enterokokal enfeksiyonların tedavisinde, hücre duvarı aktif ajanların (aminoglikozitle birlikte kullanılan penisilin ya da glikopeptit gibi) bakterisidal kombinasyonlarının sinerjik kullanımının gerekliliğini savunmuşlardır (Aslangül ve ark., 2005). Sinerjizm; iki antibiyotığın birlikte

kullanıldığında elde edilen etkinin tek kullanımlarına göre daha üstün olduğu bir birlikteliktir. Ampisilin & gentamisin, penisilin G & streptomisin sinerjik etki gösteren antibiyotiklerdir. Ampisilin ve gentamisinin birlikte kullanımında ortaya çıkan bu sinerjik etki permeabilite artışı yoluyla olmaktadır (Aydın, 2000). Biz de çalışmamızda bakterisit antibiyotik grubundan bu iki antibiyotiği (bir penisilin türevi olan ampisilini ve bir aminoglikozit olan gentamisin) kombine kullanarak sinerjik bir etki elde ettik.

Günümüzde en sık kullanılan antibiyotik kombinasyonu ise metronidazol, minosiklin ve siprofloksasinden oluşan üçlü pattır. Üçlü kanal patının intrakanal medikamenti olarak çeşitli oranlarda kullanıldığı çalışmalar vardır. Sato ve arkadaşları, her bir antibiyotikten 0,5 mg karıştırılmasını önermiştir (Sato ve ark., 1996). Trope, revaskularizasyon amacıyla kullandığı üçlü patı: metronidazol, minosiklin, siprofloksasin (1:1:1) + taşıyıcı (macrogol krem/propilen glikol= 1:1) olarak hazırlamıştır. Bu çalışmada kaygan bir kanal patı elde etmek için toz/ likit oranı 5/1 olarak önerilmiştir (Trope, 2008). Adl ve arkadaşları, çeşitli kanal medikamentlerinin antimikrobiyal etkinliğini agar difüzyon testi ile inceledikleri çalışmalarında üçlü antibiyotik patını her birinden eşit oranda ve 1 ml salin ile karıştırarak hazırlamışlardır (Adl ve ark., 2012). Yassen ve arkadaşları endodontite rejenerasyon amacıyla kullanılan medikamentlerin kök kırılganlığı ve radiküler dentinin mikrosertliği üzerine etkilerini inceledikleri bir çalışmada üçlü kanal patı ve kalsiyum hidroksiti steril salin ile karıştırarak kullanmışlardır. Bu çalışmada üçlü pat karışımı hazırlanırken metronidazol, siprofloksasin ve metronidazolün her birinden eşit oranda kullanılmıştır (Yassen ve ark., 2013). Yapılan tüm çalışmaların sonucunda üçlü pat etkili bulunmuştur.

Çalışmamızda incelenen tüm literatür çalışmalarına paralel olarak üçlü patın içindeki her bir antibiyotikten eşit oranda karıştırmayı tercih ettik. Yapılan çalışmalarda taşıyıcı seçimi ve toz/ likit oranları arasındaki fark göze çarpmaktadır. Kalsiyum hidroksit ve üçlü pat grubunda medikamente ait antimikrobiyal etkiyi takip edebilmek adına taşıyıcı olarak salin solüsyonu seçilmiştir. Ön çalışmaların ışığında akıcı, lentülo ile uygulanabilir bir pat elde edebilmek için toz/ likit oranı ½ olarak belirlenmiştir. Bu oran Yılmaz 2008' in çalışmasındaki oranlarla da uyumludur. %2' lik laktoferrin süspansiyonun hazırlanmasında ise yine salin solüsyonu kullanılmıştır.

Gentamisin içeren gruplarda ise gentamisinin sıvı olması nedeniyle taşıyıcı kullanılmasına gerek görülmemiştir.

Laktoferrin antimikrobiyal, antienflamatuar, antifungal, antiprotozoal etkisi nedeniyle tıpta pek çok alanda kullanılmaktadır. Tükürükte dahi bulunan laktoferrin diş hekimliğinin birçok dalında çalışmalara konu olmuştur. Diş macunlarının içeriğine eklenmiştir. Laktoferrinin çürük oluşumundaki etkisi, protez stomatiti hastalarında tedavide kullanımı, periodontal hastalıklarda diş eti cebi sıvısındaki varlığı, laktoferrin ile kaplanmış dental implantlarda bakteri invazyonun engellenebilirliği üzerine yapılan birçok çalışma vardır. Ancak yapılan literatür taramalarında endodontide kullanımına sadece bir literatürde rastlanılmıştır. Bu çalışmada *E. faecalis* kaynaklı biofilm tabakasının biokütlesi üzerindeki etkilerini incelemek amacıyla laktoferrin irigasyon solüsyonu olarak kullanılmıştır. Farnesolün, xylitolün ve laktoferrinin irigasyon solüsyonu olarak tek başına ve kombine kullanımları denenmiştir. Bu çalışmada üçünün kombine kullanımının bakteriye ait biofilm tabakasının biokütlesinin azaltılmasında maksimum etkili olduğu bildirilmiştir (Alves ve ark., 2012). Ammons ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada diyabet hastalarının kronik yaralarından iki farklı mikroorganizma izole edilmiş ve bu iki mikroorganizmaya ait biofilm tabakası üzerinde laktoferrin/ xylitol hidrojelinin gümüş kaplamalı bariyerli pansuman ile birlikte kullanımın antimikrobiyal etkinliğini incelenmiştir. Sonuçta pansuman materyali ile laktoferrinin kombine kullanımının antimikrobiyal bir etkiye sahip olduğu saptanmıştır (Ammons ve ark., 2011). Protez hastalarında protez stomatitini engellemek için biyouyumlu bir materyal elde etmek amacıyla yapılan bir çalışmada katyon değiştirici rezin içeren doku sabitleyicilerine tükürükte de bulunan laktoferrinin bağlanması sağlanmış ve *C. albicans'* a karşı antimikrobiyal bir etki elde edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada laktoferrin eklenerek elde edilen materyalin; sitotoksik etkisinin olmağı, fibroblastlar üzerinde zararlı etkiye sebebiyet vermediği ve fiziksel özelliklerinin yeterli olduğu vurgulanmıştır (Yamamoto ve ark., 2009).

Yapılan bazı çalışmalarda laktoferrinin süspansiyon olarak kullanıldığı görülmüştür (Ammons ve ark., 2009; Ammons ve ark., 2011; Alves ve ark., 2012). Bunun nedeni çok hafif ve/veya çok pahalı bir toz olması olabilir. Alves ve arkadaşları laktoferrini % 0,1 süspansiyon formunda kök kanal irigantı olarak

kullanmışlardır (Alves ve ark., 2012). Biofilm tabakası üzerindeki etkisinin incelendiği çalışmalarda ise % 2' lik süspansiyon formu kullanılmıştır (Ammons ve ark., 2009; Ammons ve ark., 2011). Kanal içi medikamenti olarak kullanımında daha yoğun bir konsantrasyonun gerekliliğinden çalışmamızda % 2' lik süspansiyon olarak kullanımı tercih edilmiştir. Çalışmamızda elde edilen süspansiyonu kanal içine taşıyabilmek için açılı paper point konlar kullanılmıştır. Laktoferrinin kombine kullanımında pat formu elde edilebildiğinden paper point kullanımına ihtiyaç duyulmamıştır.

Laktoferrin ile yapılan çalışmalarda laktoferrinin kombine kullanımı tercih edilmiş ve başarılı bulunmuştur. Bu nedenle çalışmamızda laktoferrinin yeni denenen patlardan biri olan ampisilin ve gentamisin ile kombine uygulananın daha başarılı olacağını düşündük. *C. albicans* üzerindeki etkinlikleri incelendiğinde, sıfırıncı güne kıyasla hem üçüncü hem de yedinci günde ampisilin/gentamisin/laktoferrin içeren Grup 4' ün, ampisilin/gentamisin içeren Grup 3' e kıyasla daha fazla mikroorganizma eliminasyonu sağladığı görülmüştür. *E. faecalis* üzerindeki etkinlikleri incelendiğinde ise sıfırıncı güne kıyasla hem üçüncü hem de yedinci günde, ampisilin/gentamisin içeren Grup 3' ün, ampisilin/gentamisin/laktoferrin içeren Grup 4' e kıyasla daha fazla mikroorganizma eliminasyonu sağladığı görülmüştür.

İnatçı periapikal lezyonlarda mantarların varlığının tespit edilmesinden bu yana antifungal ilaçların endodontik tedavide kullanımı özen kazanmıştır (Şen ve ark., 1995). Laktoferrinin bu çalışmaya dahil edilme sebeplerinden biri de antifungal etkinliğidir. Çalışmamızda kök kanalı içersinde 7 gün bekletilen laktoferrinin % 99, 986 oranında *C. albicans*' ı yok edebildiği görülmüştür.

Tüm bu verilerin ışığında, hem *E. faecalis* hem de *C. albicans* ile enfekte edilen gruplarda kullanılan medikamentler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farkın olmadığı tespit edilmiştir. Ancak geliştirilen ikili pat ve modifiye üçlü patın kanalda kalış süresi arttıkça her iki mikroorganizma üzerindeki antimikrobiyal etkisinin de artabildiği saptanmıştır. Bu nedenle yeni geliştirilen medikamentlerin kök kanalına uygulanım sürelerinin geliştirileceği yeni çalışmaların yapılması gerektiğini düşünmekteyiz. Bununla birlikte, laktoferrinin tek başına süspansiyon formununun

kullanıldığı grubun antimikrobiyal etkinliği diğer gruplara oldukça yakındır. Hazırlanmasının kolay olması, paper pointe emdirilerek kök kanalına uygulanması, uygulamanının hızlı olması ve kök kanalından hızlıca uzaklaştırılabilmesi yeni geliştirilen bu medikamentin uygulanımını cazip hale getirmektedir.

5.1. Sonuçlar

- I. Kök kanalında 3 ve 7 gün bekletilen kanal içi medikamentlerinin, kök kanalında beklediği süre arttıkça antimikrobiyal etkinliği de artmaktadır.
- II. Araştırmamızda kullanılan tüm kök kanal medikamentlerinin *E. faecalis* mikroorganizmasını azaltmada etkili olduğu ancak gruplar arasında istatistiksel bir farkın bulunmadığı görülmüştür.
- III. *E. faecalis* ile enfekte edilmiş grupta 3. ve 7. günlerde en fazla antimikrobiyal etki kalsiyum hidroksit grubunda elde edilmiştir ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- IV. *E. faecalis* ile enfekte edilmiş grupta 3. günde en az antimikrobiyal etkiyi ampisilin+gentamisin+laktoferrin kombinasyonunun gösterdiği bulunmuştur. Ancak 7. gün sonunda hem ampisilin+gentamisin, hem de ampisilin+gentamisin+laktoferrin gruplarında antimikrobiyal aktivitede hızlı bir artış elde edilmiştir.
- V. Araştırmamızda kullanılan tüm kök kanal medikamentlerinin *C. albicans* mikroorganizmasını azaltmada etkili olduğu ancak gruplar arasında istatistiksel bir farkın bulunmadığı görülmüştür.
- VI. *C. albicans* ile enfekte edilmiş grupta 3 ve 7. günde en fazla antimikrobiyal etki üçlü pat grubunda görülmüştür ancak istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.
- VII. İntrakanal medikamentlerinin hepsi *E. faecalis*' e kıyasla *C. albicans*' a daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir ve bu sonuç istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

6. KAYNAKLAR

AAE. Guidelines of American Association of Endodontists for the treatment of traumatic dental injuries. 211 E. Chicago Ave., Suite 1100, Chicago, IL 60611-2691 Revised 10/04: American Association of Endodontists:2004.

Abbott PV. Medicaments: aids to success in endodontics. Part 1. A review of literature. *Aus Dent J.* 1990; 35: 438-448.

Abdenour M, Stashenko P, Scime M., Gilad J, Goodson M. Characterization of an antibiotic impregnated delivery system as an intracanal medicament in endodontic therapy and method. US patent 2004. 6,712,610 (30 Mart 2004)

Adl A, Shojaee NS, Motamedifar MM. A comparison between the antimicrobial effects of triple antibiotic paste and calcium hydroxide against *Enterococcus Faecalis*. *Iran Endod J.* 2012; 7(3): 149-155.

Adl A, Hamed S, Sedigh Shams M, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iran Endod J.* 2014; 9(2): 123-126.

Ahmetoğlu F, Keleş A, Yalçın M, Şimşek N. Effectiveness of different irrigation systems on smear layer removal: A scanning electron microscopic study. *Eur J Dent.* 2014; 8(1): 53-57.

Akçay I, Türk BT, Pişkin B, Şen BH, Öztürk T. Evaluating the antimicrobial efficacy of root canal irrigants against *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*: in vitro study. *EU Diş Hek Fak Derg.* 2010; 31: 47-52.

Akçay M, Arslan H, Yasa B, Kavruk F, Yasa E. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J Endod.* 2014; 40(6): 845-848.

Akdeniz BG, Koparal E, Şen BH, AteşM, Denizci AA. Prevalance of *Candida albicans* in oral cavities and rootcanals of children. *J Dent Child* 2002; 69: 289-292.

Akkan AG. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri. Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu. 2-3 mayıs 1997, İstanbul, s;53-62.

Aksoy S.Ç. 2008. Süt dişi kanallarında *enterococcus faecalis* izolasyonu, kültürel ve moleküler yöntemlerle tanılanması ve antibiyotik duyarlılık profillerinin saptanması. Ege Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans Tezi.

Alaçam T, Aydın M, Tınaz C, Ömürlü H, Can H, Uzel İ, Yıldırım S, Endodonti. 1. Basım, Özyurt matbaacılık, İstanbul; 2012;s:405-512.

Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod.* 2014; 40(4): 521-525.

Alves FR, Silva MG, Roças IN, Siqueira JF Jr. Biofilm biomass disruption by natural substances with potential for endodontic use. *Braz Oral Res.* 2013; 27(1): 20-25.

Ammons MCB, Ward LS, Fisher ST, Wolcott RD, James GA. In vitro susceptibility of established biofilms composed of a clinical wound isolate of *Pseudomonas aeruginosa* treated with lactoferrin and xylitol. *Int J Antimicrob Agents.* 2009; 33(3): 230-236.

Ammons MCB, Ward LS, James GA. Anti-biofilm efficacy of a lactoferrin/xylitol wound hydrogel used in combination with silver wound dressings. *Int Wound J* 2011; 8: 268–273.

Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rumball SV, Baker EN. Apolactoferrin Structure demonstrates ligand-induced conformation change in transferrins. *Nature.* 1990; 344(6268): 784-787.

Anderson BF, Baker HM, Norris GE, Rice DW, Baker EN. Structure of human lactoferrin: crystallographic structure analysis and refinement at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol.* 1989; 209 (4): 711-734.

Arnold RR, Russell JE, Champion WJ, Gauthier JJ: Bactericidal activity of human lactoferrin: influence of physical conditions and metabolic state of the target microorganism 1981. *Infect Human:* 32; 655-660.

Arslan H, Çapar ID, Saygılı G, Uysal B, Gök T, Ertaş H, Topçuoğlu HS. Efficacy of various irrigation protocols on the removal of triple antibiotic paste. *Int Endod J.* 2014; 47(6): 594-599.

Ashraf H, Asnaashari M, Darmiani S, Birang R. Smear layer removal in apical third of root canals by two chelating agents and laser: a comparative in vitro study. *Iran Endod J.* 2014; 9(3): 210-214.

Aslangul E, Ruimy R, Chau F, Garry L, Andreumont A, Fantin B. Relationship between the level of acquired resistance to gentamicin and synergism with amoxicillin in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(10): 4144-4148.

Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aus Dent J.* 2007; 52: 64-82.

Aydın M, Endodontik Mikrobiyoloji. ed, Alaçam T. Endodonti. Bölüm 13, Ankara; 2000, p:313-396.

Baik JE, Kum KY, Yun CH, Lee JK, Lee K, Kim KK, Han SH. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008; 34: 1355-1359.

Baik JE, Jang KS, Kang SS, Yun CH, Lee K, Kim BG, Kum KY, Han SH. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod.* 2011; 37(2): 191-196.

Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF-alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod Journal.* 1997; 30: 155–159.

Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of *Candida albicans* in infections of endodontic origin. *J Endod* 2000; 26: 695-698.

Beer F, Buchmair A, Wernisch J, Georgopoulos A, Moritz A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals- an in vitro study. *Lasers Med Sci.* 2012; 27: 361-364.

Begg EJ, Barclay ML. Aminoglycosides- 50 years on. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1995; 39: 597-603.

Bellamy W, Wakabayashi H, Takase M, Kavase K, Shimamura S, Tomita M. Killing of *Candida albicans* by lactoferricin B, a potent antimicrobial peptide derived from the N-terminal region of bovine lactoferrin. *Med Microbiol Immunol.* 1993; 182; 97-105.

Berber BV, Gomes BPF, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentration of NaOCl and instrumentation

techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J.* 2006; 39: 10-17.

Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod.* 2014; 40(8): 1172-1177.

Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod.* 1997; 23; 725-727.

Black A, Redmond AOB, Steen HJ, Oborska IT. Tolerance and safety of ciprofloxacin in pediatric patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1990; 26: 25-29.

Booth IR. Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microb Rev.* 1985; 49: 359-378.

Braun V, Killmann H. Bacterial solutions to the iron supply problem. *Trends Biochem Sci.* 1999; 24: 104-109.

Bryson E, Levin L, Banchs F, Abbott P, Trope M. Effect of immediate intracanal placement of Ledermix paste on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dental Traumatology.* 2002; 18: 316-321.

Bullen JJ, Rogers HJ, Griffiths E. Role of iron in bacterial infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1978; 80: 1-35.

Carreira C de M, dos Santos SS, Jorge AO, Lage-Marques JL. Antimicrobial effect of intracanal substances. *J Appl Oral Sci* 2007; 15(5): 453-458.

Chai WL, Hamimah H, Cheng SC, Sallam AA, Abdullah M. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* biofilm to antibiotics and calcium hydroxide. *J Oral Sci.* 2007; 49(2): 161-166.

Chirife J, Herszage L, Joseph A, Bozzini JP, Leardini N, Kohn ES. In vitro antibacterial activity of concentrated polyethylene glycol 400 solutions. *Antimicrob Agents Chemother.* 1983; 24: 409–412.

Chong B, Ford TP. The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J.* 1992; 25(2): 97-106.

Chu FC, Leung WK, Tsank PC, Chow TW, Samaranayake LP. Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings. *J Endod.* 2006; 32(1): 17-23.

Chua EG, Parolia A, Ahlawat P, Pau A, Amalraj FD. Antifungal effectiveness of various intracanal medicaments against *Candida albicans*: an ex-vivo study. *BMC Oral Health.* 2014; 14: 53.

Çalışkan K. 2006 Endodontide Tanı ve Tedaviler. 2. Basım, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, s: 157-400.

Çalt S, Serper A. Time dependent effects of EDTA on dentin structures. J Endod. 2002; 28: 17-19.

Çetinkaya E, Ayhan K. Mikrobiyolojide kullanılan bazı moleküler teknikler. Karaelmas Fen ve Mühendislik Dergisi. 2012; 2 (1): 53-62.

Dajani AS, Taubert KA, Wilson W, Bolger AF, Bayer A, Ferrieri P. Prevention of bacterial endocarditis. Recommendations by the American Heart Association. JAMA. 1997;227: 1794-1801.

Dashper SG, Pan Y, Veith PD, Chen YY, Toh EC, Liu SW, Cross KJ, Reynolds EC. Lactoferrin inhibits Porphyromonas gingivalis proteinases and has sustained biofilm inhibitory activity. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(3): 1548-1556.

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

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, de Moraes IG, Garcia RB, Duarte MA, Bramante CM, Torres SA, Garlet GP, Campanelli AP, Bernardineli

N. Antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on intratubular *Candida albicans*. *Int J Oral Sci.* 2013; 5(1): 32-36.

Dumani A 2008. Periapikal lezyonlu dişlerde *Enterococcus faecalis* ve *Candida albicans*'ın bulunma sıklığı ve antimikrobiyal duyarlılıklarının test edilmesi. Çukurova üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Diş Hastalıkları ve Tedavisi Anabilim Dalı Doktora Tezi.

Egan MW, Spratt DA, NG YL, Lam JM, Moles DR, Gulabivala K. Prevalence of yeast in saliva and root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int Endod J.* 2002; 35: 321-329.

Ehrmann EH, Messer HH, Adams GG. The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. *Int Endod J.* 2003; 36: 868-875.

Eliopoulos GM, Wennersten C, Zigelboim-Daum S, Reiszner E, Goldmann D, Moellering Jr RC. High-level resistance to gentamicin in clinical isolates of *Streptococcus (Enterococcus) faecium*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1988; 31(10): 1528-1532.

Ellison RTD, Giehl TJ, La Force FM: Damage of the outer membrane of enteric gram-negative bacteria by lactoferrin and transferrin. *Infect Human.* 1988; 56: 2774-2781.

Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *J Endod.* 1999; 25: 416-418.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int End J.* 2002; 35: 221-228.

Fabretti F, Theilacker C, Baldassarri L, Kaczynski Z, Kropec A, Holst O, Huebner J. Alanine esters of enterococcal lipoteichoic acid play a role in biofilm formation and resistance to antimicrobial peptides. *Infect Immun.* 2006; 74: 4164-4171.

Fabricius L, Dahlen G, Ohman AE, Möller AJ. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closures. *Scand J Dent Res.* 1982; 90(2): 134-144.

Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J.* 2005; 55(5): 293-301.

Ferreira MB, Myiagi S, Nogales CG, Campos MS, Lage-Marques JL. Time and concentration dependent cytotoxicity of antibiotics used in endodontic therapy. *J App Oral Sci.* 2010; 18(3): 259-263.

Figdor D, Daviest JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 234-239.

Fouad AF, Zerella J, Barry J, Spangberg LS. Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2005; 99(1):112-118.

Franzetti L, Pompei M, Scarpellini M, Galli A. Phenotypic and genotypic characterization of Enterococcus spp. of different origins. Curr Microbiol. 2004; 49(4): 255-260.

Gang N, Gang A. Review of Endodontics and Operative Dentistry. 1th ed. Jitendar P Vij, New Delhi, India, 2008, p: 24-61.

Gang N, Gang A. Textbook of Endodontics. 1th ed. Jitendar P Vij, New Delhi, India, 2007, p: 164-180.

Gerek M. ND-YAG lazerin kök kanalındaki çeşitli mikroorganizmalar üzerine etkisinin in vitro olarak incelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora tezi-2008.

Gomes BPF, Souza SFC, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Valdrighi L, Souza-Filho FJ. Effectiveness of 2 % chlorhexidine gel and calcium hydroxide against Enterococcus faecalis in bovine root dentine in vitro. Int Endod J. 2003; 36: 267-275.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Souza ELR, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(2): 71-76.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Souza ELR, Jacinto RC, Zaia AA. Enterococcus faecalis in dental root canals detected by culture and by polymerase chain reaction analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad and Endod.* 2006; 102: 247-253.

Gordon S, Swenson JM, Hill BC. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. Enterococcal Study Group. *J Clin Microbiol.* 1992; 30: 2373-2378.

Grossman LI. Polyantibiotic treatment of pulpless teeth. *J Am Dent Assoc.* 1951; 43, 265-278.

Guerisoli DM, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. *Int Endod J.* 2002; 35: 418-421.

Günel T, Aydın K. "Real-Time PCR" ve Uygulama Alanları. *Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi.* 2009; 2(2): 43-45.

Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res.* 1987; 66: 1375-1379.

Haapasalo H, Siren E, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J.* 2000; 33(2): 126-131.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics.* 2005; 10: 77-102.

Hargreaves KM, Cohen S.(2011). *Pathways of the Pulp.* 10th ed. Mosby, St Louis, p:316-319.

Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod.* 1988; 14: 125-127.

Haynes K. Virulence in *Candida* species. *Trends Microbiol.* 2001; 9: 591-596.

Hennart PF, Brasseur DJ, Delogne-Desnoeck JB, Dramaix MM, Robyn CE. Lysozyme, lactoferrin, and secretory immunoglobulin A content in breast milk: influence of duration of lactation, nutrition status, prolactin status, and parity of mother. *Am J Clin Nutr.* 1991; 53(1): 32-39.

Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.* 1990; 16(7): 331-334.

Horodniceanu T, Bougueleret L, El-Solh N, Bieth G, Delbos F. High-level, plasmid-borne resistance to gentamicin in *Streptococcus faecalis* subsp. *zymogenes*. *Antimicrob Agent Chemother.* 1979;16 (5): 686-689.

Hoshino E, Takushige T. LSTR 3Mix-MP method- better and efficient clinical procedure of lesion sterilization and tissue repair (LSTR) therapy. *Dental Review.* 1998; 666: 57-106.

Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ. Influence of *Enterococcus faecalis* proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 121-126.

Jenssen H, Hancock REW. Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie.* 2009; 91: 19-29.

Johnson AP, Warner M, Hallas G, Livermore DM. Susceptibility to quinupristin/dalfopristin and other antibiotics of vancomycin-resistant enterococci from the UK, 1997 to mid-1999. *J Antimicrob Chemother.* 2000; 46(1): 125-128.

Kayaoğlu G, Erten H, Bodrumlu E, Orstavik D. The resistance of collagen-associated, planktonic cells of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *J Endod.* 2009; 35: 46-49.

Kim ST, Abbott PV, McGinley P. The effects of Ledermix paste on discoloration of mature teeth. *Int Endod J.* 2000; 33(3): 227-232.

Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010; 36: 1086-1091.

Kohli A. *Text book of Endodontics.* Elsevier, India, 2010.s: 178.

Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MAR, de M. Farias L. Microorganisms isolated from root canals presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. *Oral Microbiol Immunol.* 2001; 16(2): 100-105.

Lane DJ. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: Stackebrandt E, Goodfellow M. (Eds.), *Nucleic acid techniques in Bacterial systematics.* Wiley, Chichester, England, pp. 205–248.

Lee LW, Lan WH, Wan GY. A evaluation of chlorhexidine as an endosonic irrigan. *J Formos Med Assoc.* 1990; 89: 491-497.

Lenherr P, Allgayer N, Weiger R, Filippi A, Attin T, Krastl G. Tooth discoloration induced by endodontic materials: a laboratory study. *Int Endod J.* 2012; 45: 942-949.

Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, Utrilla LS, Assed S. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod.* 1993; 19: 348–352.

Leonardo MR, Silveira FF, Silva LAB, Tanomaru Filho M, Utrilla LS. Calcium hydroxide root canal dressing. Histopathological evaluation of periapical repair at different time periods. *Braz Dent J.* 2002; 13: 17-22.

Leonardo RM, Silva RA, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxins (LPS) in endodontics. *Journal of Applied Oral Science.* 2004; 12: 93–98.

Lima RK, Guerreiro-Tanomaru JM, Faria-Junior NB, Tanomaru-Filho M. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medicaments against *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2012; 45(4): 311-316.

Lin S, Levin L, Peled M, Weiss EI, Fuss Z. Reduction of viable bacteria in dentinal tubules treated with clindamycin or tetracycline. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96: 751-756.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *methods*, (2001); 25(4): 402-408.

Lleo MM, Tafi MC, Canepari P. Nonculturable *Enterococcus faecalis* cells are metabolically active and capable of resuming active growth. *Syst Appl Microbiol.* 1998; 21(3): 333-339.

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

Masson PL, Heremans JF, Schonke E. Lactoferrin, an iron-binding protein in neutrophilic leukocytes. *J Exp Med.* 1969; 130:643-658.

Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod.* 2003; 29(3): 194-200.

Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, Montreuil J, Jolles P. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem.* 1984; 145:659-676.

Mittal N, Jain J. Antibiotics as an intracanal medicament in endodontics: A review. *Ind J Dent.* 2013; 4(1): 29-34.

Mohammadi Z. An update on the antibiotic-based root canal irrigation solutions. *Iran Endod J.* 2008; 3(2): 1-7.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and application of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011; 44: 697-730.

Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in Endodontics: A review. *Chonnam Med J.* 2012; 48: 133-140.

Molander A, Dahlen G. Evaluation of the antibacterial potential of tetracycline or erythromycin mixed with calcium hydroxide as intracanal dressing against *Enterococcus faecalis* in vivo. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 96(6): 744-750.

Mozayeni MA, Haeri A, Dianat O, Jafari AR. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Iran Endod J.* 2014; 9(3): 195-198.

Murray BE. The life and time of *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev.* 1990; 3(1):46-65.

Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long term light and electron microscopic follow up study. *J Endod.* 1990; 16: 580-588.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod.* 2002; 28: 694–696.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. PH changes in root dentin over a 4 week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod.* 1993; 19: 302-306.

Orla M. Conneely. Antiinflammatory activities of lactoferrin: Review. *Journal of the American College of Nutrition (JACN)* 2001; 20(5): 389-395.

Orsi N. The antimicrobial activity of lactoferrin: Current status and perspectives. *Biometals.* 2004; 17(3): 189-196.

Orstavik D. Root canal disinfection: a review of concepts and recent developments. *Aust Endod J.* 2003; 29: 70–74.

Özan Ü, Er K. Endodontic treatment of a large cyst-like periradicular lesion using a combination of antibiotic drugs: a case report. 2005; 31(12): 898-900.

Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2001; 34: 429-434.

Peciuliene V, Maneliene R, Balcikonyte E, Drukteinis S, Rutkunas V. Microorganisms in root canal infections: a review. *Stomatologija*. 2008; 10(1): 4-9.

Peters LB, Wesselink PR, Von Wirkllhoff AJ. Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J*. 2002; 35: 698-702.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 133-163.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Souza ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with peri-apical lesions. *Int Endod J*. 2003a; 36: 1-11.

Pinheiro ET, Gomes PBFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root cana microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003b; 18: 100-103.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Drucker DB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Antimicrobial susceptibility of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2004; 37(11): 756-763.

Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J.* 2001; 34: 184-188.

Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus Faecalis* - the root canal survivor and 'star' in post treatment disease. *Endodontic Topics.* 2003; 6: 135-159.

Ratledge C, Dover LG. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2000; 54: 881-941.

Rehman K, Saunders WP, Foye RH. Calcium ion diffusion from calcium-hydroxide-containing materials in endodontically treated teeth: an in vitro study. *Int Endod J.* 1996; 29:271-279.

Reynaud Af Geijersstam AH, Ellington MJ, Warner M, Woodford N, Haapasalo M. Antimicrobial susceptibility and molecular analysis of *Enterococcus faecalis* originating from endodontic infections in Finland and Lithuania. *Oral Microbiol Immunol.* 2006; 21(3): 164-168.

Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scientific American.* 1992; 267; 26-33.

Roças IN, Jung IL-Y, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod* 2004 b; 30: 504-508.

Roças IN, Siqueira JF Jr. In vivo antimicrobial effects of endodontic treatment procedures as assessed by molecular microbiologic techniques. *J Endod*. 2011; 37(3): 304-310.

Roças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004a; 30: 315-320.

Ruff ML, McClanahan SB, Babel BS. In vitro antifungal efficacy of four irrigants as a final rinse. *J Endod* 2006; 32: 331-333.

Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*, 2012; 38: 1372-1375.

Sanchez Valenzuela A, Lavilla Lerma L, Benomarn, Galvez A, Perez Pulido R, Abriouel H. Phenotypic and molecular antibiotic resistance profile of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from different traditional fermented foods. *Foodborne pathog*. 2013; 10(2): 143-149.

Sande MA, Irwin RG. Penicillin aminoglycoside synergy in experimental *Streptococcus viridans* endocarditis. *J Infected Dis*. 1974; 129 (5): 572- 576.

Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloksasin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.* 1996; 29: 118-124.

Savlı H, Hatırnaz Ö. Quantitative real time-polymerase chain reaction and gene expression analysis in haematology: a review. *Turkiye Klinikleri J Med Sci* 2004; 24:653-660.

Schatz A, Waksman SA. Effect of streptomycin and other antibiotic substances upon *Mycobacterium tuberculosis* and related organisms. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1944; 57, 244–248.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W: Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proc Natl Acad Sci.* 2012; 109(16): 6241-6246.

Schochetman G, Jones KW. Polymerase Chain Reaction. *J. Infect. Dis.* 1988; 158: 1154-1157.

Sedgley CM, Molander A, Flannagan SE, Nagel AC, Appelbe OK, Clewell DB, Dahlen G. Virulence, phenotype and genotype characteristics of endodontic *Enterococcus* spp. *Oral Microbiol Immunol.* 2005a; 20(1): 10-19.

Sedgley CM, Nagel AC, Shelburne CE, Clewell DB, Appelbe O, Molander A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. *Arch Oral Biol.* 2005b; 50(6):575-583.

Shimizu E, Kobayashi T, Wakabayashi H, Yamauchi K, Iwatsuki K, Yoshie H. Effects of orally administered lactoferrin and lactoperoxidase-containing tablets on clinical and bacteriological profiles in chronic periodontitis patients. *Int J Dent.* 2011 doi: 10.1155/2011/405139.

Siqueira J, Lopes H. Mechanism of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J.* 1999; 32(5): 361-369.

Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94: 281-293.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. *J Dent.* 2003; 31: 333- 339.

Siqueira JF Jr, Roças IN. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 85-94.

Siqueira JF Jr, Şen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Rad and Endod.* 2004; 97: 632-641.

Siqueira JF Jr. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1-- current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod.* 2005; 31: 411- 423.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res.* 2009; 88(11): 969-981.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997; 30: 91-95.

Sjögren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wink K. Factors affecting the long term results of endodontic treatment. *J Endod,* 1990; 16: 498-504.

Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing. *Int Endod J.* 1991; 24: 119-125.

Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988; 3: 47-52.

Song Y. PCR-based diagnostics for anaerobic infections. *Anaerobe,* 2005; 11: 79-91.

Spik G, Coddeville B, Montreuil J. Comparative study of the primary structures of sero-,lacto- and overtransferrin glycans from different species. *Biochimie*. 1988; 70(11): 1459-1469.

Sreeja S, Babu PRS, Prathab AG. The prevalence and the characterization of the enterococcus species from various clinical samples in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res*. 2012; 6(9): 1486-1488.

Sundqvist G, Figdor D, Sjögren U. Microbiology analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative retreatment. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path*. 1998; 85: 86-93.

Şen BH, Pişkin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11: 6-9.

Şen BH, Safavi KE, Spangberg SW. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canals. *J Endod* 1999; 25: 235-238.

Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J*. 2004; 37: 132-138.

Tannock GW, Cook G. Enterococci as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore MR Ed. *The Enterococci pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance*. Washington DC, ASM press 2002; 101-132.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru-Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int End J.* 2003; 36: 733-739.

Taylor JK, Jeansonne BG, Lemon RR. Coronal leakage; effects of smear layer, obturation technique and sealer. *J Endod.* 1997; 23(8): 508-512.

Theilacker C, Kaczynski Z, Kropec A, Fabretti F, Sange T, Holst O, Huebner J. Oposonic antibodies to *Enterococcus faecalis* strain 12030 are directed against lipoteichoic acid. *Infect Immun.* 2006; 74: 5703–5712.

Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod.* 1990; 16(12): 566-569.

Trope M, Delano EO, Ørstavik D. Endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: single vs. multivisit treatment. *J Endod.* 1999; 25: 345–350.

Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *J Endod.* 2008; 34: 13-17.

Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 16: 430-450.

Valenti P, Visca P, Antonini G, Orsi N. Interaction between lactoferrin and ovotransferrin and *Candida* cells. *FEMS Microbiol Lett.* 1986; 33: 271-275.

Van der Strate BWA, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DKF. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001; 52(3), 225–239.

Van hoek AH, Mevius D, Guerra B, Roberts AP, Aarts HJ. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. *Front Microbiol.* 2011; 2(203): 1-27.

Viani RM, Gutteberg TJ, Lathey JL, Spector SA. Lactoferrin inhibits HIV-1 replication in vitro and exhibits synergy when combined with zidovudine. *AIDS.* 1999; 13, 1273–1274.

Victorino FR, Bramante CM, Zapato RO, Casaroto AR, Garcia RB, Moraes IG, Hidalgo MM. Removal efficacy of propolis paste dressing from the root canal. *J Appl Oral Sci.* 2010; 18: 621-624.

Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012; Aug; 4(Suppl 2): 230-233.

Villarreal JV, Jungfer C, Obst U, Schwartz T. DNase I and Proteinase K eliminate DNA from injured or dead bacteria but not from living bacteria in microbial reference systems and natural drinking water biofilms for subsequent molecular biology analyses. *J Microbiol Methods.* 2013; 94(3): 161-169.

Wakabayashi H, Hiratani T, Uchida K, Yamaguchi H. Antifungal spectrum and fungicidal mechanism of an N-terminal peptide of bovine lactoferrin. *J Infect Chemother.* 1996; 1: 185-189.

Wakabayashi H, Abe S, Teraguchi S, Hayasawa H, Yamaguchi H. Inhibition of hyphal growth of azole-resistant strains of *Candida albicans* by triazole antifungal agents in the presence of lactoferrin-related compounds. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998; 42(7): 1587-1591.

Waltimo TMT, Haapasalo M, Zehnder M, Meyer J. Clinical aspects related to endodontic yeast infections. *Endodontic Topics*. 2004; 9: 66–78.

Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, Olsen I, Haapasalo MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30: 96-101.

Wang JT, Chang SC, Wang HY, Chen PC, Shiau YR, Lauderdale TL; TSAR Hospitals. High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 75(4): 406-411.

Weckwerth PH, Carnietto C, Weckwerth AC, Duarte MA, Kuga MC, Vivan RR. In Vitro susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. *Braz Dent J*. 2012; 23(3): 192-198.

Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *Int Endod J*. 2002; 35: 166-171.

Whiteside MD, Oliver JD. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the Viable but Nonculturable State. *Appl Environ Microbiol.* Mar 1997; 63(3): 1002–1005.

Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.* 2005; 31: 439-443.

Yamamoto D, Shinohara Y, Nagadome H, Terada Y. Development of tissue conditioner capable of binding with an antimicrobial protein lactoferrin. *J Prosthodont Res.* 2009; 53(3): 136-141.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992; 18: 501–504.

Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J.* 2013; 46(7): 688-695.

Yıldırım A, Kandemir N, Sönmezoğlu ÖA, Güleç T. Buğdayda polimeraz zincir reaksiyonu ve olası sorunların optimizasyonu. *Anadolu J Agr Sci.* 2011; 26(1): 36-39.

Yılmaz E. Çeşitli Kök Kanalı Medikamentlerinin Mikroorganizmalar Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn-Vitro Olarak İncelenmesi. İstanbul Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Endodonti Anabilim Dalı Doktora Tezi. 2008.

Zoletti GO, Siqueira JF Jr, Santos KR. Identification of *Enterococcus faecalis* in root-filled teeth with or without periradicular lesions by culture-dependent and in-dependent approaches. *J Endod.* 2006; 32, 722-726.

Hasta Bilgilendirme Formu

Çalışmamız gönüllülük esasında dayanmaktadır. Katılımınızdan önce size araştırma hakkında bilgi vermek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılım kararınızı veriniz.

Çalışmamıza katılmak zorunlu değildir. İstedığınız zaman bu çalışmadan çıkabilirsiniz. Çalışmamızda herhangi bir maddi ve manevi risk bulunmamaktadır. Yaptığımız ‘Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin Enterococcus Faecalis ve Candida Albicans Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması’ isimli çalışmamızda, endodontik tedavi sırasında ara seanslarda kullanılan kanal içi ilaçların mikroorganizmalar üzerindeki etkileri çekilmiş dişler üzerinde incelenecektir. Bu amaçla, endikasyonu uzman hekimler tarafından konulup çekilen dişinizin kök kanalı bu araştırmada kullanılacaktır.

Bu çalışmadan elde edilen sonuçlar bilimsel nitelikli yayınlarda ve diş hekimliği öğrencilerinin eğitimlerinde kullanılabilir. Bu amaç dışında kullanılmayacaktır ve başkalarına verilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığımız için size herhangi bir ek ödeme yapılmayacaktır.

Çalışma hakkında aklınıza takılan sorularınız olduğunda aşağıda iletişim bilgileri verilen araştırma hekiminizi aramaktan ve sorularınız sormaktan lütfen çekinmeyiniz.

İletişim bilgileri: Arş. Gör. Dt. Burçin ARICAN ÖZTÜRK

Adres: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Nişantaşı Kampusu,
Büyük Çiftlik Sk. No:6 34365 Nişantaşı / Şişli / İSTANBUL

E-mail: burcin.arican@marmara.edu.tr

HASTA ONAY FORMU

Araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri içeren metni okudum (veya bu metin bana okundu). Bunlar hakkında bana yazılı ve sözlü açıklamalar yapıldı. Bu form ile ilgili soru soracak zaman ve fırsatım oldu. Tüm sorularım cevaplandı. Çekilen dişimin “Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin Enterococcus Faecalis ve Candida Albicans Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması” isimli araştırmada kullanılacağını biliyorum. Bu koşullarla, söz konusu çalışmaya kendi rızamla, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın katılmayı kabul ediyorum. Tıbbi tarihçemi de içeren, kendim hakkımda verdiğim her türlü bilginin doğruluğunu da teyit ediyorum.

Gönüllünün:

Adı-Soyadı

İmza

Adres:

Tel:

Tarih:

Gönüllü 18 yaşından küçük ise velisinin:

Adı-Soyadı

İmza

Görevi:

Tel:

Tarih:

Olur alma işlemine başından beri tanıklık eden kuruluş görevlisinin:

Adı-Soyadı

İmza

Görevi:

Tel:

Tarih:

Açıklama yapan araştırmacının:

Adı-Soyadı:

İmza

Tarih:

Bilimsel yayınlar:

Cimilli H, Aydemir S, Arıcan B, Mumcu G, Chandler N, Kartal N. Accuracy of the Dentaport ZX apex locator for working length determination when retreatment molar root canals. Aust Endod J. 2014 Apr;40(1):2-5.

Kongre Bildirileri:

Cimilli H, Aydemir S, Arıcan B, Mumcu G, Kartal N. Accuracy of Dentaport ZX for determining the working length in retreatment cases *ex vivo*. 15. Avrupa Endodontoloji Topluluğu Biental Kongresi ESE ROMA 14-17 EYLÜL 2011.

Arıcan B, Küçükkeleş E, Cimilli H, Kartal N. Rezidüel Kist Tedavisinde Cerrahi İle Kombine Uygulanan Endodontik Yaklaşım; 6 Aylık Vaka Takibi. Türk Endodonti Derneği 11. Uluslararası Kongresi 27-28 Nisan 2012.

Baştürk FM, Gerni PM, Arıcan B, Işıklı H, Berker YG. Diş Hekimine Gitme Sıklığı İle Yaş, Cinsiyet, Eğitim Durumu Ve Sigara Kullanımı Arasındaki İlişkiler: Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Kliniğine Başvuran Hastalar Üzerinde Bir Çalışma. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 50. Yıl Kongresi 30 Ağustos- 1 Eylül 2012.

Türkaydın DE, İriboz E, Tarçın B, Arıcan B, Günday M. Endodontik Tedavi Sırasında Karşılaşılabilecek Komplikasyonlar Ve Çözüm Yolları: Olgu Sunumları. Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi 50. Yıl Kongresi 30 Ağustos- 1 Eylül 2012.

Tarçın B, Öveçoğlu HS, İriboz E, Arıcan B. Microleakage and Bond Strength of Three Glass Ionomer Restoratives. The 5th International Congress On Adhesive Dentistry 14-15 Haziran 2013.

Sönmez S, Arıcan B, İriboz E, Türkaydın DE, Öveçoğlu HS. Quality of Root-Canal Treatments Performed by Undergraduate Students in University of Marmara. FDI Dünya Diş Hekimliği Kongresi. 28-31 Ağustos 2013.

Arıcan B, Kaplan T, İriboz E, Gümrü S, Öveçoğlu HS. Comparison of The Antimicrobial Effects of Six Different Intracanal Medicaments on *Enterococcus faecalis*. FDI Dünya Diş Hekimliği Kongresi. 28-31 Ağustos 2013.

Projeler:

Türk Toplumunda Periapikal Radyolusensliğe Sahip Nekroz Dişlerde Tedavi Öncesi ve Sonrası Bakteriyel Mikrofloranın Değerlendirilmesi. TÜBİTAK. 1002- HIZLI DESTEK PROGRAMI. (Araştırmacı). (Devam etmekte).

ÖZGEÇMİŞ

Adı	BURÇİN	Soyadı	ARICAN ÖZTÜRK
Doğum Yeri	GİRESUN	Doğum Tarihi	03.09.1986
Uyruğu	T.C	Tel	0 532 604 89 76
E-mail	burcin.arican@marmara.edu.tr	brcn-86@hotmail.com	

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi	2010
Lise	İstanbul Köy Hizmetleri Anadolu Lisesi	2004

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
Diş Hekimi	Dentistanbul Diş Hastanesi	2011-2012
Araştırma Görevlisi	Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı	2011-

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
ingilizce	Çok iyi	iyi	iyi

Yabancı Dil Sınav Notu

YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
	79,75							

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı	93,529	93,109	92,405

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Windows Word, Excel,Power Point	iyi



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

PROJENİN ADI: Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin Enterococcus Faecalis ve Candida Albicans Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ: Prof.Dr. Hesna Sazak ÖVEÇOĞLU
PROJEDEKİ ARAŞTIRICILAR: Burçin Arıcan
ONAY TARİHİ VE ONAY SAYISI: 05.04.2013-9

Sayın Prof.Dr. Hesna Sazak ÖVEÇOĞLU

45 protokol nolu "Farklı Kök Kanal Medikamentlerinin Enterococcus Faecalis ve Candida Albicans Üzerine Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması" isimli projeniz Enstitümüzün Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

F. Arıcıoğlu.

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Komisyon Başkanı

İnci Alıcan

Prof. Dr. İnci ALICAN

Levent Kabasakal

Prof. Dr. Levent KABASAKAL

Neşe Bahçecik

Doç. Dr. Neşe BAHÇECİK

Asım Cingi

Doç. Dr. Asım CİNGİ

Murat Çekir

Yrd. Doç. Dr. Murat ÇEKİR

Serap Akyüz

Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Aysel Pehlivan

Prof. Dr. Aysel PEHLİVAN

Oğuzhan Deyneli

Doç. Dr. Oğuzhan DEYNELİ

Pınar Ay

Doç. Dr. Pınar AY

Zübeyir Sari

Yrd. Doç. Dr. Zübeyir SARI

Yrd. Doç. Dr. Tolga GÜVEN