Şeyma Nur PEKTAŞ İNAL

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

2025- ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

FARKLI BİYOFİLMLER İÇEREN KÖK KANALLARINDA ŞEKİLLENDİRİLMESİ ESNASINDA APİKALDEN TAŞAN BAKTERİ MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Şeyma Nur PEKTAŞ İNAL

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kürşat ER

2025- ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

FARKLI BİYOFİLMLER İÇEREN KÖK KANALLARINDA ŞEKİLLENDİRİLMESİ ESNASINDA APİKALDEN TAŞAN BAKTERİ MİKTARLARININ BELİRLENMESİ

Şeyma Nur PEKTAŞ İNAL

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kürşat ER

2025- ANTALYA

ONAY SAYFASI

Şeyma Nur PEKTAŞ İNAL tarafından sunulan bu çalışma jürimiz tarafından **oy birliği/oy çokluğu** ile Endodonti Anabilim Dalında Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

.../…...../……

İmza

Üye : Prof. Dr. Kürşat ER
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi .....
Endodonti Anabilim Dalı)

Üye : Prof. Dr. Alper KUŞTARCI
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi .....
Endodonti Anabilim Dalı)

Üye : Doç. Dr. Damla KIRICI
(Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi .....
Endodonti Anabilim Dalı)

Bu tez, ……/……./……... tarih ve ……/…….. sayılı Yönetim Kurulu kararıyla belirlenen ve yukarıda imzaları bulunan jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

Diş Hekimliği Fakültesi
Kurum Yöneticisi

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Arş. Gör. Şeyma Nur PEKTAŞ İNAL

İmza

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Kürşat ER

İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim ve tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerini benimle cömertçe paylaşan, her zaman yol gösterici ve destekleyici tutumuyla bana ilham veren tez danışmanım Prof. Dr. Kürşat ER'e,

Eğitimim boyunca gerekli tüm imkan ve olanakları sağlayan sayın Prof. Dr. Alper KUŞTARCI'ya, klinik deneyimlerini ve bilgilerini bizimle her zaman paylaşan hocalarım Doç. Dr. Damla KIRICI ve Doç. Dr. Öznur GÜÇLÜER'e,

Kliniğe ilk adımımı attığımdan beri her zaman yanımda olan, her türlü deneyimini ve bilgisini benimle paylaşan hocalarım Öğr. Gör. Hatice HARORLI ve Doç. Dr. Simay KOÇ DEVECİ'ye,

Tez çalışmamın laboratuvar aşamalarında Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde görevli olan; teknik bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren hocalarım; Prof. Dr. Ahmet Yılmaz ÇOBAN ve Dr. Kübra YILDIRIM'a,

Eğitim sürecini birlikte paylaştığımız, bilgi ve deneyim alışverişinde bulunduğumuz, zorlu dönemlerde birbirimize destek olarak bu süreci daha anlamlı kılan değerli eş kıdem arkadaşlarım ve dostlarım Esen ERCAN ve Melis DEĞERMENCİ'ye ve bu süre boyunca çalıştığım tüm çalışma arkadaşlarıma ve personele,

Bu süreçte manevi desteğini her zaman yanımda hissettiğim, sabırları ve sevgileriyle bana güç veren annem, babam, canım ablalarım ve kardeşime,

Hayatımın her alanında olduğu gibi bu süreçte de yanımda olan, inancı ve desteğiyle her zorluğu birlikte aşmamı sağlayan, başarılarımı içtenlikle kutlayan sevgili eşim Mehmet Reşat İNAL'a,

Bu tezin yazım sürecinde, klavyenin üzerine oturarak çalışmama kısa molalar verdiren, sevgisiyle motivasyonumu artıran kedim Simba'ya,

Tüm kalbimle teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, kök kanal sisteminde dentin tübüllerine yerleşen *Enterococcus faecalis (E. faecalis)*, *Candida albicans (C. albicans)* ve bu iki mikroorganizmaların (MO) birlikte bulunduğu miks biyofilm ortamlarında, kök kanal şekillendirmesi sırasında meydana gelen apikal mikrobiyal taşmanın nicel olarak değerlendirmektir.

Yöntem: Bu çalışma 54 adet çekilmiş insan alt küçük azı dişi kullanılmıştır. Dişler otoklavda steril edildikten sonra, *E. faecalis*, *C. albicans* ve her iki MOyı içeren miks kültür ile kontamine edildi. Yedi gün süreyle inkübasyona bırakılan dişlerde biyofilm oluşumu sağlandıktan sonra, her gruptan rastgele seçilen bazı dişler kontrol grubu olarak ayrıldı ve kök kanal şekillendirilmesi yapılmadı. Geriye kalan tüm dişler deney grubunu oluşturdu, bu grupta kök kanal şekillendirmesi mekanik olarak gerçekleştirildi. Daha sonra tüm dişler steril distile su ile irige edilerek apikalden taşan sıvı bakteriyel ekim ve koloni oluşturan birim (CFU) sayımına tabi tutuldu. Gruplardaki dişlerin yarısında optik dansite (OD) tayini, yarısında ise kristal viyole (KV) ile boyama sonrası ışık mikroskobunda morfolojik inceleme ile biyofilm yapısı değerlendirildi.

Bulgular: *E. faecalis* ve miks biyofilm gruplarında, *C. albicans* grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek koloni sayıları tespit edildi ($P < 0.05$). Kontrol ve deney grupları karşılaştırıldığında, tüm MO türlerinde deney grubunda koloni sayılarında istatistiksel olarak anlamlı azalma gözlendi.

Sonuç: Mekanik şekillendirmenin biyofilm uzaklaştırmada etkili olduğu, *E. faecalis*'in tekli ve miks biyofilm ortamlarında baskınlığını koruduğu, *C. albicans*'ın ise daha düşük üreme gösterdiği bulunmuştur. Bulgular, çoklu biyofilm modelleriyle yapılacak ileri çalışmaların endodontik tedaviye direnç mekanizmalarının anlaşılmasında önemli olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: biyofilm, bakteri, dentin tübülü, apikal ekstrüzyon, *E. faecalis*, *C. albicans*, miks biyofilm

ABSTRACT

DETERMINATION of the AMOUNT of BACTERIA EXTRUDED APICALLY DURING the SHAPING of ROOT CANALS CONTAINING DIFFERENT BIOFILMS

Objective: The aim of this study was to quantitatively evaluate apical microbial extrusion during root canal shaping in dentinal tubules colonized by *Enterococcus faecalis(E. faecalis)*, *Candida albicans (C. albicans)*, and a mixed biofilm formed by both microorganisms.

Method: In this study, 54 extracted human mandibular premolars were used. After being sterilized in an autoclave, the teeth were contaminated with *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, or a mixed culture containing both microorganisms. Following a seven day incubation period to allow biofilm formation, a subset of randomly selected teeth from each group was allocated as the control group, in which no root canal shaping was performed. The remaining specimens constituted the experimental group and underwent mechanical root canal shaping.

Subsequently, all samples were irrigated with sterile distilled water, and the apically extruded fluid was collected for microbial culturing and CFU enumeration. In half of the specimens, OD (optical density) measurement was performed, while in the other half, biofilm morphology was evaluated using light microscopy following crystal violet staining.

Results: In both the *E. faecalis* and mixed biofilm groups, significantly higher colony counts were observed compared to the *C. albicans* group ($P < 0.05$). When control and experimental groups were compared, all microbial species exhibited a statistically significant reduction in colony counts in the experimental group.

Conclusion: Mechanical instrumentation was found to be effective in biofilm removal, with *E. faecalis* maintaining its dominance in both single and mixed biofilm models, while *C. albicans* exhibited lower growth. These findings indicate that further studies using multi-species biofilm models are essential to better understand resistance mechanisms in endodontic treatment.

Keywords: biofilm, bacteria, dentinal tubule, apical extrusion, *E. faecalis*, *C. albicans*, mix biofilm

İÇİNDEKİLER

ÖZET

ABSTRACT

İÇİNDEKİLER

TABLOLAR DİZİNİ

ŞEKİLLER DİZİNİ

RESİMLER DİZİNİ

SİMGELER ve KISALTMALAR

1. GİRİŞ……...1

2. GENEL BİLGİLER……5

2.1. Kök Kanal Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojisi ……5

2.1.1. MO'ların Pulpaya Ulaşma Yolları**……..6**

2.2. Kök Kanalındaki Mikrobiyal Ekosistem……..7

2.2.1. Anaerobik Ortam.…**……7**

2.2.2. MO'lar Arası Etkileşim**……8**

2.2.3. Besin Mevcudiyeti**……...9**

2.3. Kök Kanallarının Mikrobiyal Florası ……10

2.4. Enterekokların Biyolojik Özellikleri ve Endodontik Açıdan Önemi……12

2.4.1. *E. faecalis* Virülans Faktörleri **……12**

2.4.2. *E. faecalis'*in Endodontik Tedavideki Rolü**……14**

2.5. *Candida albicans'*ın Biyolojik Özellikleri ve Endodontik Açıdan Önemi……14

2.5.1. *Candida Albicans*'ın Virülans Faktörleri**……15**

2.5.2. *Candida Albicans*'ın Endodontik Açıdan Önemi **……16**

2.6. Biyofilm ……17

2.6.1. Endodontik Biyofilm **……...19**

2.6.2. Biyofilmin Mikrobiyal Kompozisyonu**……20**

2.6.2.1. Biyofilmdeki Tür Sayısı**……...20**

2.6.2.2. Biyofilm Doğrulama Yöntemleri**……26**

2.7. KKT'de Biyomekanik Preparasyonun Önemi……..28

2.7.1. NiTi Kök Kanal Aletlerinin Gelişimi ve Klinik Uygulamaları……..31
2.7.2. Çalışmamızda Kullanılan NiTi Kök Kanal Aletlerinin Genel Özellikleri……..34

2.8. Kök Kanal Preparasyonunun Periapikal Dokulara Etkisi……..34

3. GEREÇ VE YÖNTEM……36
3.1. Etik Kurul Onayı ve Araştırma Merkezi……36
3.2. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması ……...36
3.3. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Seçimi ve Hazırlanması……36
3.4. Bakteri Ekimi ve Biyofilm Oluşumu……...39
3.4.1. Biyofilm Gelişiminin Takibi ve Koloni Sayımı……41

3.5. Kök Kanal Şekillendirme ve Apikal Ekstrüzyonun Değerlendirilmesi……..43
3.5.1. Kök Kanal Preparasyon Yönteminin Uygulanışı……...44

3.6. KV ile Biyofilm Miktarı Tayini……..47

3.7. OD Ölçümü ile Biyofilm Miktarı Tayini……...47

3.8. TEM ile Biyofilm Morfolojisinin Değerlendirilmesi……48

3.9 İstatiksel Analiz……49

4. BULGULAR……51

5. TARTIŞMA ……65

6. SONUÇ VE ÖNERİLER……82
KAYNAKLAR……83
EKLER
EK-1. ETİK KURUL KARARI
Ek 1. Etik kurul onay belgesi

TABLOLAR DİZİNİ

Çizelge 1. Kök kanalından izole edilen bakterilerin türleri ve görülme yüzdeleri

Tablo 1. Kontrol grubunda ölçümlerin farklı bakteri gruplarına göre karşılaştırma sonuçları

Tablo 2. Deney grubunda ölçümlerin farklı bakteri gruplarına göre karşılaştırma Sonuçları

Tablo 3. Genel (deney+kontrol) düzeyde ölçümlerin bakteri gruplarına göre karşılaştırma sonuçları

Tablo 4. *E. faecalis* grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

Tablo 5. *C.albicans* grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

Tablo 6. Miks grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

Tablo 7. Tekli ve miks gruplarda *E. faecalis* koloni oluşumunun karşılaştırılması

Tablo 8. Tekli ve miks gruplarda *C. albicans* koloni oluşumunun karşılaştırılması

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları

Şekil 2. NiTi transformasyon grafiği. (Mf: son martensite, Ms: başlangıç martensite, Af: son austenite, As: başlangıç austenite)

Şekil 3. Silikon ölçü materyali ile sabitlenmiş Eppendorf tüpleri içindeki diş örnekleri

Şekil 4. Dilüsyonların hazırlanması ve yaygın ekimi

Şekil 5. Bakteri yoğunluğu hesaplama formülü

Şekil 6. Kontrol grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

Şekil 7. Deney grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

Şekil 8. Genel düzeyde ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

Şekil 9. *E. faecalis* grubunda ölçümlerin deney kontrol arası karşılaştırılması, çizgi grafiği

Şekil 10. *C. .albicans* grubunda ölçümlerin deney kontrol arası karşılaştırılması, çizgi grafiği

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Perfect Super System Advanced Kit eğe seti

Resim 2. Deneyde kullanılacak dişlerin seçimi

Resim 3. Dişlerin meziyo-distal radyografisi

Resim 4. Kavite düzenlemesi yapılmış diş örnekleri

Resim 5. Dijital kumpas ile boy belirlenmesi

Resim 6. Silikon ölçü materyali ile sabitlenmiş Eppendorf tüpleri içindeki diş örnekleri

Resim 7. Sterilizasyon sonrası etüve alınan diş numuneleri

Resim 8. TSB ortamının değiştirilmesi

Resim 9. Örnek dişlerin 37 °C'de 7 gün inkübe edilmesi

Resim 10. (*a*), (*b*) Deney düzeneği için hazırlanan steril cam tüpler

Resim 11. Çalışmada kullanılan EndoRadar Pro Endo-Motor cihazı

Resim 12. Çalışmada kullanılan şırınga ve 30 G ucu kapalı yandan açık iğne ucu

Resim 13. Steril distile su ile irigasyon sonrası taşan sıvı

Resim 14. (*a*) Antibiyotik içeren SDA (*b*) BEA

Resim 15. 96 kuyucuklu mikrotitre plakasına alınmış biyofilm çözeltisi

Resim 16. Örneklerin TEM incelenmesi için hazırlanması

Resim 17. Örneklerin iletken hale gelmesi için, Polaron SC7620 Sputter Coater cihazı ile altın paladyum ile kaplanması

Resim 18. Kullanılan TEM cihazı

Resim 19. *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerin bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu

Resim 20. *C. albicans* ile enfekte edilen dişlerin bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu

Resim 21. Miks grup - *E. faecalis* bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu

Resim 22. Miks grup- *C. albicans* bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu

Resim 23. 8000-10000X büyütmede kök kanal dentini üzerinde oluşan 7 günlük biyofilm TEM görüntüleri : **A-B**: *E. faecalis (A)* kontrol *(B)* deney grubu **C-D:** *C. albicans. (C)* kontrol *(D)* deney grubu **E-F:** Miks *(E)* kontrol *(F)* deney grubu

Resim 24. OD ölçümü için kullanılan bir diş örneği- ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü

Resim 25. *E. faecalis* grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu

Resim 26. *C. albicans* grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu

Resim 27. Miks grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

Ark.	Arkadaşları
ATCC	American Type Culture Collection
BEA	Bile Eskülin Agar
BHI	Brain Heart Infusıon
C. albicans	*Candida Albicans*
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CFU	Koloni oluşturan birimler
Dk	Dakika
E. faecalis	*Enterococcus Faecalis*
EDTA	Etilendiamintetraasidik asit
EPS	Hücre dışı polimerik matriks
G	Gauge
ISO	International Organization for Standardization
Jelatinaz.	GelE
KKT	Kök Kanal Tedavisi
KLTM	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop
KV	Kristal viyole
MO	Mikroorganizma
NiTi	Nikel titanyum
OD	Optik dansite
TEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PI	Propidyum iyodür
Rpm	Devir/Dakika
SDA	Sabouraud Dekstroz Agar
SH	Sodyum Hipoklorit
Sn	Saniye
TSB	Tryptic Soy Broth
UV	Ultraviyole

VBNC	Yaşayabilir ancak kültürlenemez
3B	3 Boyutlu
%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
±	Artı-Eksi
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
+	Artı
-	Eksi

1. GİRİŞ

Endodontik tedavinin başarısı; doğru teşhis konulması, kök kanallarının etkin bir şekilde temizlenmesi, şekillendirilmesi ve dezenfekte edilmesinin yanı sıra hem apikal hem de koronal bölgelerde sızdırmazlığı sağlayacak biçimde doldurulmasına bağlıdır.

Kök kanal şekillendirme süreci yalnızca mekanik bir işlem olarak değerlendirilmemekte; biyolojik ilkelerle birlikte ele alındığından, bu işlem ‘‘*biyomekanik preparasyon”* olarak adlandırılmaktadır (1). Farklı kök kanal eğeleri ve teknikleriyle gerçekleştirilen biyomekanik preparasyon, yalnızca nekrotik ya da enfekte pulpa dokusu ile MO’ların ve toksinlerin uzaklaştırılmasını değil, aynı zamanda kanalın apikal foramen bölgesinde en dar çapta olacak şekilde, koronalden apikale doğru daralan konik bir formda şekillendirilmesini de kapsamaktadır (2).

Kök kanallarının şekillendirilmesi, endodontik tedavinin başarı oranını doğrudan etkileyen temel aşamalardan biridir (3). Bu nedenle, kök kanal anatomisinin sahip olabileceği tüm varyasyonların klinisyenler tarafından iyi bilinmesi, etkili bir şekillendirme süreci ve buna bağlı olarak başarılı bir tedavi açısından kritik önem taşımaktadır (4).

Pulpa ve periapikal dokuların patolojisinde MO’lar temel etkenlerdir ve bunların büyük bir kısmı anaerobik bakteri türlerinden oluşmaktadır. Endodontik tedavilerde başarısızlıkların temel nedeni olarak, kök kanal sisteminde varlığını sürdüren bakteriler ve bu bakterilerin çevre dokulara yayılması gösterilmektedir (5).

Pulpa dokusunun, diğer organlara kıyasla sınırlı bir vaskülarizasyona sahip olması nedeniyle, burada meydana gelen enfeksiyonlar bağışıklık sistemince etkili bir şekilde elimine edilememekte, bu durum pulpal nekroz ile sonuçlanmakta ve çevresel koşullara adapte olabilen kompleks mikrobiyal bir floraya zemin hazırlamaktadır. Bu MO’lar, apikal delta, isthmus ve dentin tübülleri gibi bölgeleri de içine alacak şekilde tüm kök kanal sistemini istila edebilmektedir (6). Endodontik tedavinin amacı, mevcutsa enfeksiyonun ortadan kaldırılması, yoksa da oluşumunun önlenmesi yoluyla periapikal dokuların sağlığının korunmasıdır.

E. faecalis, daha önce kanal tedavisi uygulanmış ve kronik periapikal lezyonlar gösteren dişlerden sıklıkla izole edilen bir patojendir (7,8). Bu MO, endodontik tedavi sırasında kullanılan antimikrobiyal irigantlara karşı dirençli olması, zorlu çevre koşullarında dahi canlılığını sürdürebilmesi ve beslenme gereksinimlerinin minimal olması nedeniyle tedavi sonrası inatçı enfeksiyonlarda sıkça karşımıza çıkmaktadır (9). Nitekim bazı çalışmalarda, tedaviye rağmen iyileşme sağlanamayan olguların %77'sinde *E. faecalis* varlığı bildirilmiştir (10).

Bu doğrultuda, *E. faecalis*'in kök kanal sisteminden elimine edilmesine yönelik olarak farklı irigantları ve enstrümantasyon sistemlerinin etkinliğini değerlendiren çok sayıda çalışma literatürde yer almaktadır (11–13). Kök kanal içeriğinin periapikal dokulara taşınmasının, yalnızca MO mevcudiyeti nedeniyle değil, aynı zamanda preparasyon sırasında bu içeriğin apikal foramen yoluyla çevre dokulara yayılması sonucunda da başarısızlığa katkı sağladığı belirtilmektedir (14).

*C. albicans***,** sağlıklı bireylerin ağız florasında kommensal olarak bulunan, fırsatçı bir maya türüdür. Ağız boşluğu, dil dorsumu, diş yüzeyleri, mukoza ve periodontal cepler gibi birçok bölge, *C. albicans* için uygun habitatlar sunmaktadır. Normal immünolojik denge ve mikrobiyal flora dengesinde herhangi bir bozulma olmadıkça*, C. albicans* genellikle patojenik özellik göstermez. Ancak, lokal veya sistemik faktörlerin etkisiyle (örneğin immünsüpresyon, antibiyotik kullanımı, ağız kuruluğu, diyabet gibi durumlar), bu MO patojen hale gelerek enfeksiyonlara neden olabilir (15,16).

C. albicans'ın virülansını artıran başlıca faktörler arasında biyofilm oluşturma yeteneği, epitel hücrelerine ve proteine zengin yüzeylere yapışma kapasitesi, hidrolitik enzim üretimi (proteaz, fosfolipaz), morfolojik dönüşüm (maya-hif formu geçişi) ve konak bağışıklık sisteminden kaçma mekanizmaları yer almaktadır (17,18). Bu özellikleri sayesinde *C. albicans*, yalnızca yüzeyel mukozal enfeksiyonlara değil, aynı zamanda endodontik enfeksiyonlar gibi daha derin ve dirençli enfeksiyonlara da neden olabilmektedir.

Özellikle tedaviye dirençli endodontik vakalarda, kök kanal sisteminde *C. albicans*'ın varlığı bildirilmiş; dentin tübüllerine penetre olabilme ve irigantlara karşı direnç geliştirebilme kapasitesi, bu organizmanın endodontik başarısızlıklardaki potansiyel

rolünü ortaya koymuştur (19). Bu nedenle *C. albicans*, hem oral floradaki fırsatçı patojen rolü hem de endodontik enfeksiyonlardaki önemi nedeniyle dikkatle ele alınması gereken bir MO'dır.

İyatrojenik olarak gerçekleşen aşırı preparasyonlar; periodontal ligament ve alveolar kemikte hasara yol açabilmekte, apikal daralmanın kaybı, açık apeks oluşumu, yetersiz apikal tıkanma ve ağrıya neden olabilecek postoperatif komplikasyonlarla ilişkilendirilmektedir (20,21). Aşırı preparasyonun sonucunda irigantları, enfekte debris, MO'lar ve bunların toksinlerinin foramen apikaleden geçerek periapikal dokulara ulaşması, bu bölgelerde hasara neden olabilmektedir (22).

Martin ve Cunningham (23), manuel preparasyona kıyasla endosonik sistemlerin apikal bölgeye daha az debris taşmasına neden olduğunu bildirmiştir. Ruiz-Hubard ve ark. (24) ise step-back, crown-down ve step-down tekniklerini karşılaştırmış; hiçbir tekniğin apikal debris taşmasını tamamen engelleyemediğini, en fazla taşmanın ise step-back tekniği ile gözlendiğini rapor etmiştir.

Prati ve ark. (25) nikel titanyum (NiTi) döner sistemler ile K-tipi paslanmaz çelik eğeleri karşılaştırdığı çalışmada, her iki sistemin apikal, orta ve koronal bölgelerde oluşturduğu smear tabakası, pulpal ve inorganik debris ile yüzey profili parametreleri değerlendirilmiş, gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu çalışmanın bulguları, geleneksel el eğeleriyle yapılan preparasyonların, NiTi döner sistemlerle karşılaştırıldığında benzer sonuçlar verdiğini göstermektedir.

Son yıllarda hem eğe dizaynlarında hem de preparasyon tekniklerinde yaşanan gelişmeler sayesinde, biyomekanik preparasyon daha etkili ve güvenli hale getirilmiş; komplikasyonların önlenmesi, maksimum kanal dezenfeksiyonu ve şekillendirmesi hedeflenmiştir (20,23,26,27).

NiTi alaşımların endodontik eğe üretiminde kullanılmaya başlanmasıyla birlikte, döner sistemlerin güvenilirliği ve etkinliği artmış, bu alaşımların yüksek torsiyonel direnç ve esneklik özellikleri sayesinde rotasyonel hareketli sistemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır (28).

Rotasyonel sistemler, kök kanallarının kısa sürede genişletilmesi, ideal kanal formunun korunması, işlem süresinin kısalması ve preparasyon sırasında oluşan

artıkların uzaklaştırılmasındaki avantajları nedeniyle klinikte tercih edilmektedir. Motorlu NiTi eğelerin, manuel sistemlere kıyasla daha başarılı kanal şekillendirmesi sağladığı birçok çalışmada ortaya konmuştur (3, 29-31).

Bu çalışmanın amacı; *E. faecalis*, *C. albicans* gibi farklı MO'lar tarafından oluşturulan biyofilm modelleriyle kontamine edilmiş kök kanallarında, kök kanal preparasyonu sırasında apikal ekstrüzyon yoluyla taşan mikrobiyal yükün kantitatif olarak *in vitro* analizidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Kök Kanal Enfeksiyonlarının Mikrobiyolojisi

MO'lar, insan vücudunun tüm yüzeylerinde doğal olarak kolonize olmuş durumdadır. Kolonizasyon, MO'ların biyokimyasal ve fiziksel çevre koşulları uygun olduğunda konak üzerinde yerleşip çoğalmasıyla gerçekleşir. Ortalama olarak insan vücudunda yaklaşık 10^{13} ökaryotik hücre bulunduğu, buna karşın vücutta yaklaşık 10^{14} bakterinin yaşadığı tahmin edilmektedir (32). Normal flora, konak ile MO'lar arasında kurulan simbiyotik ilişkinin bir sonucu olarak oluşur. Ancak, bazı koşullarda, normal oral floraya ait MO'lar fırsatçı patojen haline gelebilir. Bu tür MO'lar, pulpa ya da periapikal gibi steril vücut bölgelerine ulaştıklarında enfeksiyon ve hastalığa neden olabilirler. Bu patojenik etki, doğrudan MO'ların varlığı kadar, konağın bu organizmalara verdiği immün yanıt ile de ilişkilidir. Konak savunması hem özgül olmayan (doğal) hem de özgül (adaptif) immün sistem elemanlarıyla devreye girer (33).

Pulpa dokusu hastalıkları ve periapikal lezyonların gelişiminde temel etiyolojik faktör MO'lardır (8,34). Oral mikrobiyolojinin öncülerinden Miller, 1894 yılında yaptığı çalışmalarla pulpa hastalıklarında bakteriyel varlığı ilk kez ortaya koymuştur (34). 1965 yılında Kakehashi ve ark. (35) bakterilerin pulpa ve periradiküler hastalıkların temel nedeni olduğu açıkça ortaya konmuştur. Bu araştırmada, steril (germ free) koşullarda tutulan farelerde pulpa dokusu açık bırakıldığında herhangi bir patolojik değişiklik gözlenmezken, oral flora ile kontamine edilen grupta pulpa nekrozu ve periapikal lezyonların geliştiği saptanmıştır. Araştırmacılar, bir dokuda MO varlığının veya yokluğunun, doku sağlığını ve patolojisini belirleyen temel unsur olduğunu ileri sürmüşlerdir (35). Möller ve ark. ise, 1981 yılında maymunlar üzerinde gerçekleştirdikleri çalışmada, yalnızca bakterilerle kontamine edilen devitalize pulpalarda periapikal lezyon geliştiğini göstermişlerdir (36).

Ağız boşluğunda kültürlenebilen bakteri türlerinin sayısı 300'ün üzerinde olmasına rağmen, enfekte kök kanallarında genellikle sınırlı sayıda MO saptanabilmektedir (9). Bu MO'lar arasında en sık izole edilen türler şunlardır: *Streptococcus*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*,

Peptostreptococcus, *Bacteroides* ve *Lactobacillus* spp. (9,37). Enfekte kök kanallarında genellikle 1 ila 12 farklı bakteri türü tespit edilmekte olup, bu MO'ların yoğunluğu 10^2 ila 10^8 koloni oluşturan birim (CFU/mL) arasında değişmektedir (38).

2.1.1. MO'ların Pulpaya Ulaşma Yolları

MO'lar kök kanal sistemine çeşitli yollar aracılığıyla ulaşabilir. Bu yollar başlıca koronal, retrograd ve anakorezis olmak üzere üç ana grupta incelenebilir.

Koronal Yol: Pulpaya mikrobiyal girişin en yaygın yolu çürük kaynaklıdır. Bakteriler, dentin tübülleri aracılığıyla ilerleyerek çoğalma imkânı bulurlar. Bakteri çapları genellikle 1 μm'den küçükken, dentin tübüllerinin çapı 1–4 μm arasında değişmektedir. Mine veya sement tabakası ortadan kalktığında, bu açık tübüller MO'lar için geçit haline gelir. Sağlıklı bir pulpa, mikrobiyal invazyona karşı doğal bariyerlerle korunur. Bu bariyerler arasında odontoblastlar, mineralize kristaller ve çeşitli makromoleküller yer alır. Ancak, bakteriler ve onların toksik ürünleri, pulpa odasına doğrudan ulaşmasalar bile inflamatuar yanıtları tetikleyerek pulpada dolaylı hasarlara yol açabilir. Nitekim, bazı çalışmalarda açık dentin tübüllerine komşu pulpada inflamasyonun oluştuğu gösterilmiştir (39,40). Bu inflamasyon bazen nekroz ile sonuçlanabilirken, çoğu zaman tamir mekanizmalarıyla iyileşme gözlenebilir (41).

Travma nedeniyle açığa çıkan sağlıklı pulpalarda dahi, inflamasyonun 2 hafta sonunda yalnızca 2 mm derinliğe kadar ilerlediği bildirilmiştir (42). Öte yandan, nekrotik pulpa dokusu daha hızlı bakteri invazyonuna maruz kalır. Odontoblastların yokluğu, dentin tübüllerinin savunmasız kalmasına ve MO'ların pulpaya daha kolay erişmesine neden olabilir (41). Ayrıca, restoratif işlemler, travmalar veya gelişimsel anomaliler sonucunda pulpanın doğrudan açıldığı durumlar da mikrobiyal girişe zemin hazırlar (41).

Retrograd Yol: Enfekte kök kanallarındaki MO'lar, lateral ve aksesuar kanallar, furkasyon bölgeleri ya da apikal foramen aracılığıyla çevre dokulara ulaşabilir. Bu durumun periodontal ataşmanları etkileyebileceği düşünülmektedir. Ancak, periodontal hastalıkların doğrudan pulpal hastalıkları tetikleyip tetiklemediği

tartışmalı bir konudur (43–45). Periodontal tedavi sırasında sement dokusunun uzaklaştırılması, dentin tübüllerini ağız florasına açık hale getirerek bakteriyel geçişe olanak tanır. Yapılan bir çalışmada (46) kök yüzeyinin düzeltilmesinden sonra açık dentin tübüllerinden bakteri penetrasyonu sonucu pulpal inflamasyon ve termal hassasiyet geliştiği bildirilmiştir. Kobayashi ve ark. (47) ileri düzey periodontal hastalığı bulunan bireylerde, kök kanalındaki bakteriler ile periodontal ceplerdeki bakterileri karşılaştırmış ve her iki bölgedeki MO'ların benzerliğine dayanarak, periodontal sulkusun kök kanal enfeksiyonları için potansiyel bir kaynak olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Anakorezis: MO'ların pulpaya ulaşmasında bir diğer potansiyel yol da anakorezistir. Bu mekanizmada, MO'lar kan veya lenf dolaşımı aracılığıyla inflamasyonun olduğu pulpal bölgelere taşınır. Diğer bazı çalışmalarda, benzer bir yöntemle bakterilerin kedilerin doldurulmamış kök kanallarında izole edilemediği bildirilmiştir (48). Anakorezis olgusu hayvan deneylerinde gösterilmiş olsa da, klinik olarak ciddi hastalıklarla güçlü bir ilişkisinin olmadığı düşünülmektedir (41). Bununla birlikte, özellikle travmaya uğramış dişlerde anakorezisin enfeksiyon kaynağı olabileceği göz ardı edilmemelidir (49).

2.2. Kök Kanalındaki Mikrobiyal Ekosistem

Kök kanal sistemindeki MO'ların çoğalması ve kolonizasyonu, çeşitli ekolojik faktörlerden etkilenmektedir. Bu faktörler, kök kanal enfeksiyonlarında görülen mikrobiyal popülasyonun zamanla değişkenlik göstermesine neden olur.

Mikrobiyal kompozisyonu belirleyen başlıca etkenler şunlardır; *(1)* Anaerobik çevre koşulları, *(2)* MO'lar arasındaki etkileşimler, *(3)* Besin kaynaklarının varlığı.

2.2.1. Anaerobik ortam

Kök kanal çevresinin, anaerobik MO'ların belirli oranlarda çoğalmasına olanak tanıyan seçici bir habitat olduğu gösterilmiştir (38). Anaerob bakterilerin gelişimini etkileyen üç temel faktör bulunmaktadır;

Oksijen konsantrasyonu: Anaerob bakteriler enerji üretimlerini fermantasyon yoluyla gerçekleştirirler. Bu MO'lar moleküler oksijeni kullanamazlar; hatta oksijen onlar

için toksik etki oluşturabilir. Kapalı bir sistem olan kök kanalında oksijen düzeyi, apeks yönünde azalmaktadır. Pulpal nekrozun süresi uzadıkça, oksijenin tüketimi artmakta ve anaerob bakteriler için daha uygun bir çevre oluşmaktadır. Bu koşullar, zorunlu anaeroblar ile fakültatif MO'ların çoğalmasını desteklemektedir (50).

Süperoksit radikalleri ve peroksitler: Aerob bakteriler, metabolik süreçleri sırasında oluşan toksik süperoksit radikalleri ve peroksitleri etkisiz hale getirebilecek enzimlere sahiptir. Süperoksit dismutaz enzimi süperoksit radikallerini hidrojen peroksite ve oksijene dönüştürürken, katalaz enzimi hidrojen peroksiti su ve oksijene ayırır. Ancak zorunlu anaeroblar bu enzimlerden yoksundur. Mikroaerofilik bakteriler düşük oksijenli ve karbondioksitli ortamlarda çoğalırken, fakültatif anaeroblar her iki ortamda da üreyebilirler ve her iki enzime de sahiptirler (51).

Oksido-redüksiyon potansiyeli (Eh): Anaerob MO'ların üremesinde bir diğer belirleyici faktör ise ortamın oksido-redüksiyon potansiyelidir. Ortamdaki indirgen maddelerin fazlalığı Eh değerini düşürür ve bu durum anaerobların gelişimi için elverişli bir ortam oluşturur (52).

2.2.2. MO'lar Arası Etkileşim

Enfekte kök kanallarından elde edilen örneklerde bazı MO'ların sıklıkla birlikte bulundukları gözlenmektedir (9). MO'lar arası etkileşimler, endodontik ortamda polimikrobiyal bir floranın oluşmasında belirleyici rol oynamaktadır (33). Bu etkileşimler pozitif (sinerjik) ya da negatif (antagonistik) yönde olabilir.

Sundqvist'in (9) 1992 tarihli çalışmasında, *Fusobacterium nucleatum*'un *Peptostreptococcus anaerobius*, *Camplyobacter rectus* ve *Porphyromonas endodontalis* ile sinerjik ilişkiler içinde olduğu rapor edilmiştir. Benzer şekilde, *Provettella intermedia, Peptostreptecoccus micros* ve *Eubacterium* türleri arasında pozitif korelasyon tespit edilmiştir (50).

Buna karşılık bazı streptokok türleri, *Capnocytophaga achracea* ve *Veillonella parvula* gibi bakterilerin diğer türlerle negatif ilişkiler içinde olduğu ya da bağımsız yaşadıkları belirlenmiştir (9). *Actinomyces israelii*'nin yalnızca *Propionibacterium propionicum* ile sinerjik bir ilişkisi olduğu gösterilmiştir (9). *Fusobacterium nucleatum*'un *Porphyromonas gingivalis* ile birlikte oluşturduğu enfeksiyonlarda,

sinerjik etkileşim sonucunda ciddi yumuşak doku yıkımına ve nekroza yol açtığı Feuille ve ark. (53) fare modeli üzerinde yaptığı çalışmada ortaya konmuştur.

Dahlen ve ark. (54) enfekte maymun dişlerinden izole edilen 8 farklı bakteri türünün, değişik kombinasyonlarda çeşitli inflamatuvar tepkilere neden olduğu gösterilmiştir. Özellikle *Peptostreptococcus anaerobius*, *Prevotella oralis* ve *Fusobacterium necrophorum*'un birlikte bulunduğu kombinasyon, en yoğun lezyon oluşumunu sağlamış, buna karşın bu MO'lar tek başlarına veya farklı kombinasyonlarda daha zayıf etkiler göstermiştir (55).

2.2.3. Besin Mevcudiyeti

Kök kanal ortamında bulunan besin türü ve miktarı, mikrobiyal kolonizasyon üzerinde önemli rol oynar. Pulpa dokusunun parçalanması sonucu açığa çıkan maddeler ve doku sıvıları, bakteriler için besin kaynağı oluşturmaktadır (9,50).

Bu çevresel faktörler, amino asit ve peptitleri fermente edebilen anaerob bakterilerin çoğalmasına olanak tanırken, karbonhidratları temel enerji kaynağı olarak kullanan bakterilerin gelişimini sınırlandırmaktadır. Bu nedenle, ağız ortamına açık kök kanallarının koronal kısmında fakültatif anaeroblar (örneğin streptokoklar), apikal kısımlarında ise zorunlu anaeroblar baskın hale gelmektedir (56).

Ter Steeg ve Van Der Hoeven (57), kök kanal florasının dinamik yapısını inceledikleri çalışmalarında, subgingival plak MO'larının serum içindeki çoğalma evrelerini üç fazda değerlendirmişlerdir. İlk fazda, düşük karbonhidrat içeriği sakkarolitik bakteriler tarafından kullanılmış ve laktik ile formik asit oluşumu gözlenmiştir. İkinci fazda, proteinlerin hidroliziyle açığa çıkan amino asitlerin fermentasyonu başlamış ve bu evrede *Provetella intermedia*, *Veillonella parvula*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Eubacterium* türleri baskın hale gelmiştir. Üçüncü fazda ise protein yıkımı belirginleşmiş ve *Peptostreptococcus micros*, *Fusobacterium nucleatum* ve *Eubacterium* öne çıkmıştır (57). Aynı araştırma grubunun diğer bir çalışmasında, *Peptostreptococcus micros*'un serum ortamında baskın tür olduğu bildirilmiştir (58). Bu durumun, *Peptostreptococcus micros*'un sahip olduğu peptitaz aktivitesi ile serum proteinlerini parçalayarak amino asit üretme yeteneğiyle ilişkili olabileceği düşünülmektedir (57).

Bazı MO'ların metabolik ürünleri, diğer türler için besin kaynağı oluşturabilir (55). Siyah pigmentli anaerobik çomaklar *(Provetella ve Porphyromonas spp.*), gelişim için K vitamini ve hemine ihtiyaç duyarlar. Bu maddeler, diğer bakteriler tarafından üretilebilir. Örneğin, *Campylobacter rectus*'un hemin üretimi yoluyla *Porphyromonas* türlerinin üremesini desteklediği rapor edilmiştir (59).

2.3.Kök Kanal Mikroflorası

Kök kanal tedavisinin (KKT) başlangıç nedeni ne olursa olsun, tüm etyoloji bakteri ve bakteri ürünlerinin mikrosızıntısına dayanır. Kök kanalındaki irritasyon kaynaklarının uzaklaştırılması ve mikrosızıntının ortadan kaldırılması ile periodontal dokuların, önceki sağlıklı durumlarına getirilmesi amaçlanır (60). Enfekte kök kanallarına ve periapikal bölgeye girebilen ve hastalık yapabilen MO'ların büyük bir kısmı bakterilerdir ve bu bakterilerin çoğunluğu anaerobik özellik gösterir (61).

KKT sonrasında periapikal lezyonların iyileşmemesinin başlıca nedeni, kök kanallarında kalan MO'ların periapikal dokuları irrite etmesidir (61). Son yıllarda yapılan çalışmalarda, tekrarlayan tedavi gerektiren vakalarda, kök kanallarında düşük miktarda Gram pozitif fakültatif bakteri türlerine rastlanmıştır (25,62,63).

Bakteri Türü	Yüzde
Fusobacteirum nucleatum	%48
Streptococcus türleri	%41
Bacteroides türleri	%35
Peptostreptococcus micros	%34
Prevotella intermedia	%34
Eubacterium alactolyticum	%34
Lactobacillus türleri	%32
Peptostreptococcus anaeobius	%31
Eubacterium lentum	%31
Fusobacterium türleri	%29
Campylobacter türleri	%25
Peptostreptococcus türleri	%15
Actinomyces türleri	%11
Eubacterium timidum	%11
Capnocytophaga ochracea	%11
Eubacterium brachy	%9
Selenomonas sputigena	%9

Veillonella parvula	%9
Porphyromanas endodontalis	%9
Prevotella buccae	%9
Prevotella oralis	%8
Propionibacterium propionicum	%8
Prevotella denticola	%6
Prevotella loescheii	%6
Eubaterium nodatum	%6
Porphyromonas gingivalis*	
Bacteroides üreolyticus*	
Bacteroides gracilis*	
Lactobacillus minitus*	
Lactobacillus catenaforme*	
Enterococcus faecalis (*E. faecalis)**	
Peptostreptococcus prevotii*	
Eikenalla corrodens*	
Enterobacter agglomerans*	

Çizelge 1. Kök kanalından izole edilen bakterilerin türleri ve görülme yüzdeleri (*düşük yoğunlukta izole edilen bakteri türleri) (6,61).

Streptokoklar, hareketsiz, fakültatif, gram pozitif kok zincirleri olarak tanımlanır. Bu genus, hemolitik özelliklerine göre; koyun kanını güçlü bir şekilde hemoliz eden (β-hemolitik), zayıf hemoliz eden (α-hemolitik) ve hiç hemoliz etmeyen (non-hemolitik) streptokoklar olmak üzere üç gruba ayrılır. Kök kanalı enfeksiyonlarında genellikle karşılaşılan streptokok türleri, α-hemolitik streptokoklardır (29). Ayrıca, streptokoklar hücre duvarındaki C karbonhidratlarına göre sınıflandırılabilir. Lancefield (64) sınıflamasına göre, klinik olarak önemi olan ilk dört grup streptokok, bu şekilde tanımlanmıştır (1). *Streptokoklar*, zincir oluşturmayabilirler ve karbonhidratları aside dönüştürerek ortamın pH'ını 4.1 ile 4.6 arasında düşürebilirler.

Bu özellikleri, kök kanalı enfeksiyonlarının ilk evresinde bu MO'ların bulunmasına olanak tanır (1).

2.4. *Enterokokları*n Biyolojik Özellikleri ve Endodontik Önemi

Enterokoklar, Gram pozitif ve kok morfolojisinde bakteriler olup genellikle tekli, ikili ya da kısa zincirler halinde izlenmektedir. Hem oksijenli hem de oksijensiz koşullarda gelişebilmeleri nedeniyle fakültatif anaerob bakteriler sınıfına girerler. Bu MO'lar, pH 9.6'ya kadar yüksek alkaliniteye sahip ortamlarda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında hayatta kalabilirler. Sofra tuzu, deterjan, ağır metaller, etanol, asit ve kuruluğa karşı belirgin dirençleri bulunmaktadır (65). Ağız boşluğunun çeşitli bölgelerinde doğal mikrobiyota üyesi olarak bulunabilirler (66).

Günümüze kadar tanımlanmış en az 23 Enterokok türü mevcuttur (65). Bunlar arasında; *E. faecalis ve E. faecium*, insan gastrointestinal sistemi ve üriner sistem enfeksiyonlarında en sık izole edilen türlerdir. Özellikle *E. faecalis*, endokardit gibi ciddi enfeksiyonlara neden olabilen patojen bir tür olup *E. faecium*'a kıyasla daha yaygın olarak karşımıza çıkmaktadır (67).

2.4.1. *E. faecalis*'in Virülans Faktörleri

Enterokokların enfeksiyon oluşturma yeteneği, sahip oldukları çeşitli virülans faktörleri ile ilişkilidir. Bu faktörler, konak hücre yüzeylerine ve ekstrasellüler matrikse bağlanmalarına, doku invazyonuna, bağışıklık sisteminden kaçmalarına ve toksik etki oluşturmalarına olanak sağlar. Başlıca virülans faktörleri şunlardır; *(1)* Enterokokal yüzey proteinleri, *(2)* Jelatinaz enzimi, *(3)* Sitolizin toksini, *(4)* Ekstrasellüler süperoksit üretimi, *(5)* Kapsüler polisakkaritler, *(6)* Antibiyotik direnç genleri, *(7)* Biyofilm oluşturma kapasitesi (68).

Hartke ve ark. (69) *E. faecalis* üzerinde gerçekleştirdiği çalışmada, bu virülans faktörlerinin bakterinin konak bağışıklık sistemine karşı savunma geliştirmesinde, fagositozu engellemesinde, biyofilm üretimini kolaylaştırmasında ve antibiyotik direnci geliştirmesinde önemli rol oynadığı belirtilmiştir. Bu virülan faktörler;

Yüzey adhezinleri ve ekstrasellüler matriks bağlayıcı proteinler*: E. faecalis*, konak hücrelerine ve ekstrasellüler matriks proteinlerine bağlanabilen yüzey proteinlerine

sahiptir. Bu proteinler, bakterinin enfekte dokuya tutunmasını ve biyofilm başlangıcını kolaylaştırır. Özellikle enterokokal yüzey proteinleri (Esp) ve aggregation substance (AS), hücre adezyonunda kilit rol oynar. Esp'nin aynı zamanda biyofilm matürasyonunda da görev aldığı gösterilmiştir (70,71).

Ekstraselüler enzimler*: E. faecalis*, çevre dokuların yapısal bütünlüğünü bozan çeşitli enzimler salgılayarak invazyon kapasitesini artırır; *(1)* Jelatinaz (GelE): Kollajen, fibronektin ve benzeri protein yapıların yıkımını sağlar. Ayrıca, immün sistem hücrelerine karşı toksik etki oluşturabilir, *(2)* Hyaluronidaz: Bağ dokusunun ana komponentlerinden biri olan hyaluronik asidi parçalayarak doku penetrasyonunu kolaylaştırır (72).

Sitolizin*: E. faecalis* tarafından salgılanan sitolizin, hem konak hücrelerini (örneğin eritrositleri ve nötrofilleri) hem de diğer bakterileri hedef alabilen hemolizin benzeri bir toksindir. Sitolizin, enfekte bölgedeki mikrobiyal rekabet avantajını artırırken, konak immün yanıtını da zayıflatır (73).

Biyofilm oluşturma yeteneği*: E. faecalis*, özellikle kök kanal sisteminde dentin yüzeylerine tutunarak kompleks biyofilm yapıları oluşturabilir. Biyofilm formasyonunda esp, gelE, fsr gibi genlerin ekspresyonu önemli rol oynamaktadır. Biyofilmler, antibiyotik ve irrigasyon solüsyonlarına karşı dirençli mikro ortamlar oluşturur ve *E. faecalis*'in persistan enfeksiyonlardaki rolünü güçlendirir (74).

Süperoksit üretimi ve oksidatif stres toleransı*: E. faecalis*, oksidatif stres altında bile hayatta kalabilen nadir fakültatif anaerobik bakterilerden biridir. Ekstrasellüler süperoksit üretimi, fagositik hücrelerin oksidatif öldürme mekanizmalarına karşı savunma sağlar. Bu özellik, organizmanın uzun süreli kronik enfeksiyonlarda canlı kalmasına katkı sunar (75).

Kapsül ve hücre duvarı yapıları*:* Bazı *E. faecalis* suşları, kapsüler polisakkaritler üretir. Bu yapılar fagositozu engelleyerek immün sistemden kaçış sağlar. Ayrıca, hücre duvarındaki teikoik asit ve lipoteikoik asit yapıları, immün yanıtta inflamatuar sitokin salınımını uyarabilir (76).

Antibiyotik direnç genleri*: E. faecalis*, özellikle β-laktamlar, aminoglikozidler ve glikopeptitler gibi antibiyotiklere karşı direnç genlerini taşıyabilir. Bu genler sıklıkla

plazmid veya transpozonlar üzerinde taşınmakta ve kolayca aktarılabilmektedir. Direnç genleri, virülansın dolaylı fakat önemli bir bileşenidir (77).

2.4.2. *E. faecalis'*in Endodontik Tedavide Rolü

Kök kanal enfeksiyonlarının ortadan kaldırılması amacıyla gerçekleştirilen şekillendirme ve antimikrobiyal irigasyon işlemleri, kök kanal sisteminin yalnızca %50–70 oranında etkili şekilde dezenfekte edilmesini sağlamaktadır, bu durum, bir kısım bakterilerin canlı kalabildiğini göstermektedir (78,79). Özellikle *E. faecalis*, önceden endodontik tedavi uygulanmış ve kronik periapikal lezyon sergileyen dişlerden sıklıkla izole edilmektedir (8).

E. faecalis, tedavi sonrası nüks eden endodontik enfeksiyonların en önemli etkeni olarak kabul edilmektedir. Yapılan bir çalışmada (80), tam periapikal iyileşmenin gözlendiği olguların %94'ünde bakteriyel kültürlerin negatif olduğu, buna karşın pozitif kültür saptanan vakaların %68'inde iyileşmenin tamamlanmadığı bildirilmiştir. Benzer şekilde, başka bir araştırmada (10), KKT'ye rağmen iyileşme göstermeyen vakaların %77'sinde *E. faecalis* izole edilmiştir. Başka çalışmalarda ise (81,82), *E. faecalis*'in enfekte kök kanallarında biyofilm içinde 12 aya kadar yaşayabildiği ortaya konmuştur.

Bu nedenle, *E. faecalis*'in kök kanal sisteminden etkin biçimde uzaklaştırılmasına yönelik olarak farklı irigantlar ve enstrümantasyon tekniklerinin etkinliğini araştıran birçok çalışma gerçekleştirilmiştir (11,12).

2.5 *C. albicans'*ın Biyolojik Özellikleri ve Endodontik Önemi

C. albicans, dimorfik özellik gösteren hem maya hem de filamentöz formda büyüyebilen bir fungal MO'dır. Normal şartlarda ağız mukozası, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde kommensal olarak bulunmakta olup, konak bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla birlikte fırsatçı patojen hâline gelebilmektedir (83). *C. albicans* düşük redoks potansiyeline sahip ortamlarda yaşamını sürdürebilmekte ve dentin yüzeylerine kolaylıkla adezyon sağlayarak biyofilm formasyonu oluşturabilmektedir (84). Ayrıca, dentin tübüllerine penetre olabilmesi ve birçok antimikrobiyal ajana karşı dirençli olması nedeniyle endodontik enfeksiyonlarda klinik olarak önem arz etmektedir (85).

Güncel literatürde, *C. albicans*'ın özellikle tedavi edilmiş ancak iyileşmemiş periapikal lezyonların etiyopatogenezinde rol oynadığı bildirilmiştir (86). Bu MO'nın *in vitro* koşullarda kalsiyum hidroksit gibi yaygın olarak kullanılan antimikrobiyal ajanlara karşı yüksek direnç gösterdiği bildirilmiştir (87).

2.5.1 *C. albicans*'ın Virülans Faktörleri

*C. albicans'*ın patojenitesini belirleyen başlıca virülans faktörleri aşağıda sıralanmıştır; *(1)* Hif ve pseudohif formasyon kapasitesi, *(2)* Hücre yüzey adhezinleri (ALS ailesi), *(3)* Ekstraselüler hidrolitik enzimler (proteazlar, fosfolipazlar), *(4)* Fenotipik switching özelliği, *(5)* Biyofilm oluşturma yeteneği, *(6)* Antifungal direnç mekanizmaları (88).

Bu virülans faktörleri, *C. albicans'ın* konak epitel yüzeylerine bağlanmasını, doku invazyonunu, fagositozdan kaçışını ve çevresel stres koşullarında yaşamını sürdürebilmesini mümkün kılmaktadır. Bağışıklık sisteminin baskılandığı durumlarda bu özellikler daha baskın şekilde ortaya çıkmakta ve tedaviye dirençli enfeksiyonların oluşmasına neden olmaktadır (89).

Hif ve pseudohif oluşumu: *C. albicans,* çevresel koşullara bağlı olarak mayadan ipliksi (filamentöz) formlara dönüşebilir. Bu morfolojik dönüşüm, konak dokulara penetrasyon için kritik öneme sahiptir. Hif formundaki yapılar, epitel ve endotel hücrelerine daha güçlü invazyon sağlar ve fagositoza karşı direnç kazandırır (90).

Adhezin molekülleri (ALS ve HWP Aileleri): *Candida*'nın konak hücrelerine bağlanmasını sağlayan en önemli virülans faktörlerinden biri yüzey adhezinleridir. Özellikle Agglutinin-Like Sequence (ALS*)* gen ailesi (özellikle ALS1*,* ALS3) ve Hyphal Wall Protein 1 (HWP1)*, Candida'*nın mukozal yüzeylere ve dentin yüzeyine sıkıca tutunmasını sağlar (91,92).

Ekstraselüler hidrolitik enzimler: *C. albicans,* çevresel dokuları yıkıma uğratarak invazyonunu kolaylaştırmak amacıyla çeşitli enzimler salgılar: Aspartil proteinazlar (SAP gen ailesi): Konak proteinlerini parçalayarak doku penetrasyonuna katkı sağlar. Fosfolipazlar: Hücre membranlarını yıkarak konak hücre hasarına neden olur. Hemolizinler: Konak hücrelerinden demir elde edilmesini sağlar (93).

Biyofilm oluşturma kapasitesi: Morfolojik olarak maya ve hif formları arasında geçiş yapabilmesi, dentin duvarlarına tutunarak biyofilm oluşturma yeteneğini artırır. Bu biyofilmler, antifungal ajanlara ve endodontik irigantlara (örn. sodyum hipoklorit (SH), etilendiamintetraasidik asit (EDTA)) karşı direnç sağlar (88). Biyofilmler içerisinde organizmalar korunaklı bir matris içinde bulunur ve metabolik olarak farklılaşır. Bu yapılar özellikle endodontik sistemde irigantların etkisini büyük ölçüde sınırlar (90).

Fenotipik değişim**:** *C. albicans*, çevresel stres faktörlerine adaptasyon sağlamak için fenotipik değişim (yüzey proteinlerinin ekspresyonunda değişiklik) mekanizmasını kullanır. Bu özellik, bağışıklık sisteminden kaçışı kolaylaştırır ve antifungal direnç gelişimini destekler (94).

Antifungal direnç gelişimi: *C. albicans,* özellikle azol grubu antifungallere karşı direnç geliştirme potansiyeline sahiptir. Bu direnç, gen ekspresyonunun modülasyonu, hedef enzim mutasyonları ve ilaçların hücre dışına atılmasını sağlayan efflux pompalarının aktivasyonu yoluyla sağlanabilir (88).

2.5.2. *C. albicans*'ın Endodontik Açıdan Önemi

C. albicans, özellikle başarısız KKT'ye sahip dişlerden izole edilen nadir fakat dirençli patojenlerden biridir. Endodontik sistemde biyofilm oluşturarak irigantların penetrasyonunu zorlaştırır ve çevresel stres faktörlerine karşı direncini artırır (88). Ayrıca, bakteriyel patojenlerle birlikte polimikrobiyal enfeksiyon yapısı içinde bulunabilir ve bu sinerjistik ilişkiler enfeksiyonun şiddetini artırabilir (95).

Çeşitli çalışmalarda, *C. albicans*'ın, KKT sonrasında da kök kanal sisteminde hayatta kalabildiği ve özellikle rekürren enfeksiyon vakalarında izole edilebildiği gösterilmiştir (87). *C. albicans*, hem primer apikal periodontitis hem de tedavi

sonrası persistan enfeksiyonlarda en sık izole edilen mantar türüdür. Persistan enfeksiyonlardaki görülme oranı, primer enfeksiyonlara göre daha yüksektir (88). Baumgartner ve ark. (83) enfekte kök kanalında (daha önce tedavi edilmemiş) *C. albicans* oranı %21 olarak bulunmuştur. Bu nedenle, *C. albicans*'ı hedef alan irigasyon stratejilerinin geliştirilmesi, endodontik başarıyı artırmak adına önem taşımaktadır (96). Kök kanalı enfeksiyonlarında fungal biyofilm oluşumunu önleyici veya var olan biyofilmleri ortadan kaldırıcı yeni antimikrobiyal yaklaşımlar ve tedavi modaliteleri üzerine araştırmalar büyük önem taşımaktadır.

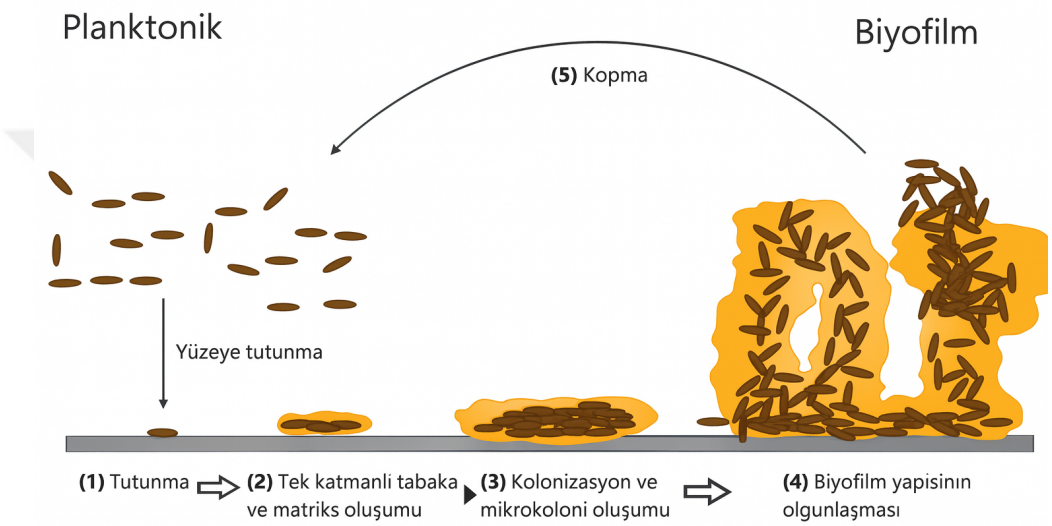
2.6 Biyofilm

Biyofilm, MO'ların bir yüzeye sıkıca tutunarak, kendi sentezledikleri ekstrasellüler polimerik maddeler (EPS) ile çevrelenmiş hareketsiz, çok hücreli mikrobiyal topluluklar olarak tanımlanmaktadır (97). Biyofilm matriksindeki EPS moleküllerinin organizasyonu, MO'lar arasındaki moleküler etkileşimlere bağlı olarak biyofilmin hem mekanik özelliklerini hem de fizyolojik aktivitelerini belirlemektedir.

Biyofilm oluşumu için üç temel bileşenin varlığı gereklidir: sıvı bir ortam, mikrobiyal hücreler ve katı bir yüzey. Oluşum süreci dört temel aşamada gerçekleşir. İlk aşamada, planktonik makromoleküller yüzeye adsorbe olur ve organik ya da inorganik bileşenlerle etkileşime girerek yüzeye bağlanır. İkinci aşamada, MO'lar fimbria ve pilus gibi adezyon yapıları aracılığıyla yüzeye tutunur; bu bağlantı, zamanla polimer üretimiyle daha da güçlenir. Üçüncü aşamada, yüzeye bağlanan MO'lar metabolik aktivitelerini sürdürerek çoğalır ve yapısal olarak organize, karmaşık bir mikrobiyal topluluk meydana getirir. Son aşamada ise, biyofilm içerisindeki bazı MO'lar bulundukları ortamdan ayrılarak çevreye dağılır (98).

MO'ların türü ve çevresel koşullar gibi etkenler, biyofilm içerisindeki gelişim süreçlerini ve organizasyon yapılarını doğrudan etkileyebilmektedir. Bazı MO'lar, biyofilmin yüzey tabakalarından ayrılarak sistemden uzaklaşabilir. Bu ayrılma süreci, biyofilm gelişiminin dinamik bir parçası olup sürekli olarak devam eder; böylece MO'ların farklı yüzeylere taşınarak yeni koloniler oluşturmaları mümkün hâle gelir (99).

Quorum sensing, bakteriyel hücreler arasında kimyasal sinyaller aracılığıyla iletişimin kurulmasını sağlayan ve bu etkileşim sonucunda komşu hücrelerde gen ekspresyonunun modülasyonuna neden olan bir düzenleyici mekanizmadır. Bu hücreler arası sinyal iletimi, biyofilm içerisinde bulunan bakterilerin fenotipik özelliklerinde önemli değişikliklere yol açarak, koloni davranışlarını ve organizasyon yapısını etkilemektedir (100).



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları (101)

Biyofilm içerisinde yer alan bakterilerin, planktonik formdaki bakterilere oranla konak savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal ajanlara karşı yaklaşık 1000 kat daha dirençli olduğu bildirilmektedir (102). Bu direnç, biyofilmin yapısal ve fizyolojik özelliklerine bağlı olarak gelişmekte olup, çeşitli mekanizmalarla açıklanmaktadır; *(1)* EPS, antimikrobiyal maddelerin biyofilm içine difüzyonunu engelleyen fiziksel bir bariyer işlevi görmektedir, *(2)* Biyofilm içerisindeki bakteriler, planktonik hücrelere kıyasla daha düşük metabolik aktiviteye ve daha yavaş büyüme hızına sahiptir, *(3)* Mikrobiyal hücreler, quorum sensing mekanizması aracılığıyla, biyofilm ortamına adaptasyonu yüksek ve faydalı olan türlerin çoğalmasını desteklemektedir, *(4)* EPS yapısı, pH değişimleri, ultraviyole (UV) ışınları, ozmotik stres ve sıcaklık dalgalanmaları gibi çevresel faktörlere karşı bakterilere koruyucu bir ortam sunmaktadır (103,104).

2.6.1.Endodontik Biyofilmin Özellikleri

Endodontik biyofilmler genellikle kök kanal duvarlarına tutunmuş şekilde, özellikle apikal bölgelerde yoğunlaşır. Biyofilmler kanal duvarına tek veya çok katmanlı olarak yayılabilir ve dentin tübüllerine penetre olabilir. Histolojik ve mikroskobik çalışmalar, enfekte kök kanallarında sıkça biyofilm varlığını göstermiştir (105,106). Bu yapılarda MO'lar genellikle polimikrobiyal karakterdedir ve hem kok hem çubuk, hem de filamentöz formlar gözlemlenmiştir.

Endodontik biyofilmler, yalnızca yüzeysel katmanlarda değil, aynı zamanda dentin tübüllerinin derinliklerinde de yerleşim gösterebilir. Ricucci ve Siqueira tarafından yapılan histobakteriyolojik analizlerde (106), apikal bölgelerdeki işlenmemiş kök kanallarının %80'inde biyofilm varlığı saptanmıştır. Bu biyofilmler çoğunlukla çok katmanlı olup, bakteriyel hücrelerin ekstrasellüler matriks içerisinde düzensiz dağılım gösterdiği belirlenmiştir.

Endodontik enfeksiyonlarda gözlenen biyofilmler, yerleşim yerlerine ve klinik durumlarına göre farklı şekilde sınıflandırılabilir; *(1)* İntraradiküler mikrobiyal biyofilmler**:** Endodontik enfeksiyona sahip dişlerin kök kanal sistemi içerisinde gelişen mikrobiyal topluluklardır. Bu biyofilmler genellikle pulpa nekrozu ile ilişkili olarak gözlemlenir (107), *(2)* Ekstraradiküler mikrobiyal biyofilmler**:** *"Kök yüzeyi biyofilmleri"* olarak da adlandırılan bu yapılar, enfekte dişlerin kök apeksine bitişik kök yüzeylerinde bulunur. Ekstraradiküler biyofilm oluşumu, özellikle kronik apikal apse ve sinüs yolu varlığı gibi durumlarla ilişkilidir (108,109), *(3)* Periapikal mikrobiyal biyofilmler**:** Endodontik enfeksiyonlu dişlerin periapikal dokularında bulunan biyofilmlerdir. Bu biyofilmler, kök kanalı ile doğrudan ilişkili olabileceği gibi, bağımsız şekilde de varlık gösterebilir (110), *(4)* Biyomateryal kaynaklı biyofilmler**:** Bakterilerin, kök kanalı tedavisinde kullanılan biyomateryallerin yüzeyine tutunarak oluşturduğu biyofilm tabakalarıdır. Biyomateryalin kök kanal içinde kalmasına bağlı olarak intraradiküler, kök kanalından apikal bölgeye taşması durumunda ise ekstraradiküler biyofilm olarak adlandırılırlar (111).

Endodontik biyofilmlerin morfolojik özelliklerine ek olarak, mikrobiyal kompozisyonu da önemlidir. Primer kök kanal enfeksiyonlarında genellikle Gram (-)

anaeroblar baskındır. Ancak, tedavi sonrası persistan enfeksiyonlarda Gram (+) fakültatif anaeroblar özellikle *E. faecalis* daha sık izole edilmektedir (9,10,112).

2.6.2. Biyofilmin Mikrobiyal Kompozisyonu

2.6.2.1. Biyofilmdeki Tür Sayısı

Literatürde biyofilm modellerinde kullanılan MO tür sayısı büyük oranda değişiklik göstermektedir. Yapılan çalışmaların çoğunda, biyofilmler yalnızca tek bir MO türü ile oluşturulmuştur (117). İki türün yer aldığı çift türlü biyofilm modeli uygulanmış, üç ila beş tür içeren biyofilm sistemleri ise sınırlı sayıda çalışmada tercih edilmiştir (117). Ayrıca, araştırmacılar (113) insan ağız florasından elde edilen bakterilerle oluşturulan ancak mikrobiyal kompozisyonu ayrıntılı olarak belirtilmemiş çok türlülüğe sahip biyofilm kültürleri kullanılmıştır.

Peters ve ark. (113) çekilmiş dişlerin kök kanalları *in situ* olarak enfekte edilmiştir. Bu amaçla, koronal kısmı uzaklaştırılmış, hazırlanmış ve sterilize edilmiş dişler bir tutucu içerisine yerleştirilmiş ve bir gönüllü tarafından bir hafta süreyle ağız içinde taşınmıştır. Benzer şekilde, Ordinola-Zapata ve ark. (114) dentin örneklerini ortodontik bir apareye sabitleyip gönüllüler tarafından 72 saat boyunca ağızda taşınmasını sağlamışlardır.

Çalışmaların bazılarında (115) insan ağız bölgesinden alınan mikrobiyal örnekler başlangıç kültürü olarak kullanılarak çok türlü biyofilm oluşturulmuştur. Örneğin, Lin ve ark. (115) çekilmiş tek köklü dişleri inoküle etmek için insan subgingival plak örneğini kullanmıştır. Schaudinn ve ark. (116) ise enfekte kök kanallı üç farklı dişten alınan örnekleri karıştırarak sterilize edilmiş dişleri inoküle etmiştir.

Monotür biyofilm içeren çekilmiş dişlerin kök kanalları, gerçek *in vivo* durumu yeterince yansıtmamaktadır. Gerçekte enfekte kök kanalları, kompleks metabolik iş birlikleri ve mikrobiyal etkileşimlerin yer aldığı polimikrobiyal enfeksiyonlar barındırır (19).

Monotür ve çok türlü biyofilm modelleri**:** Monotür biyofilm model sistemleri; sadelik, standardizasyon ve kontrol açısından avantajlar sunar. Bu tür sistemler kolayca kurulabilir, yüksek tekrarlanabilirlik sağlar ve aynı anda çok sayıda deneysel

uygulama yapılmasına olanak tanır. Ancak, çok sayıda gerekçe çok türlü (multispecies) biyofilm modellerinin tercih edilmesini desteklemektedir (117).

Öncelikle, doğadaki hemen hemen tüm biyolojik sistemler, birden fazla türden oluşan mikrobiyal topluluklar şeklinde organize olmuştur. Bu durum enfekte kök kanallarında da benzerdir. Ayrıca, Madsen ve ark. (118) çok türlü biyofilm yapılarının, aynı türlerin tek başına oluşturduğu biyofilmlere göre daha fazla biyokütle (biofilm biomass) ürettiği gösterilmiştir. Bu durum, çok türlü toplulukların genellikle daha kalın ve daha dirençli biyofilmler oluşturduğunu ortaya koymaktadır.

Çok türlü biyofilmler, yalnızca biyokütle açısından değil, aynı zamanda enfeksiyon sırasındaki virülans açısından da daha etkilidir (119). Bu biyofilmler, konak bağışıklık sistemine karşı da tek türlü biyofilmlerden daha fazla direnç gösterir. Türler arası iş birliği, enfeksiyon bölgesindeki mikrobiyal ortamı değiştirme ve konak bağışıklık tepkisini modifiye etme yeteneği kazandırır (120,121).

Buna ek olarak, çok türlü biyofilmlerin antimikrobiyal tedavilere karşı daha fazla direnç gösterdiği de çok sayıda çalışmada ortaya konmuştur. Bu direnç hem antibiyotikler hem de dezenfektanlar için geçerlidir (122–124). Örneğin, Ozok ve ark. (125) tarafından yapılan bir çalışmada, çift türlü biyofilm modellerinin, SH ile yapılan irigasyona karşı monotür biyofilmlere göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir.

Bu antimikrobiyal direnç artışının bir nedeni, çok türlü biyofilmlerdeki EPS yapısının farklılık göstermesidir. Ayrıca, miks biyofilm içerisindeki bazı türlerin diğer türlerin hayatta kalmasını destekleyen koşullar sağlaması da direnç gelişimini artırır. Örneğin, aerob bakteriler, ortamda bulunan oksijeni tüketerek biyofilmin daha derin katmanlarında anaerob bakterilerin yaşamını sürdürmesini mümkün kılar (126).

Sonuç olarak, çok türlü biyofilmler; daha fazla yapısal karmaşıklık, klinik gerçekliğe daha yüksek benzerlik, artmış metabolik kapasite, çevresel strese karşı artan tolerans ve biyofilm eliminasyonuna karşı daha fazla direnç sunar. Ancak, bu kompleks yapı, deneysel uygulamalar açısından bir dizi zorluğu da beraberinde getirir (117).

Çok türlü bir biyofilm kültürü kurmak, daha fazla başlangıç kültürü, farklı besiyeri tipleri ve daha fazla işlem basamağı gerektirir. Bu nedenle, bu sistemler genellikle

zaman alıcı ve maliyetlidir. Ayrıca, aynı biyofilm ortamında birden fazla türü bir araya getirmek, her bir türün eşit başarıyla çoğalacağı anlamına gelmez. Mikrobiyal topluluklar içerisinde türler arasında sinerjistik (karşılıklı fayda sağlayan), kompetitif (birbirini baskılayan) ya da nötr (birbirinden etkilenmeyen) etkileşimler olabilir (127).

Bu nedenle, çok türlü biyofilm modellerinin geliştirilmesi genellikle ön denemeler gerektirir. Bu denemeler, ortaya çıkan biyofilmin gelişim sürecini ve mikrobiyal kompozisyonunu değerlendirmek amacıyla yapılır. Model sistemdeki tür çeşitliliği ve yapısal karmaşıklık arttıkça, deneylerin tekrarlanabilirliği genellikle azalır. Yani, çok türlü bir biyofilm modelini oluşturmak yalnızca kurulum açısından değil, içerdiği türlerin oranlarının doğru biçimde kantitatif olarak belirlenmesi açısından da oldukça zahmetlidir.

Substrat materyali: Laboratuvar ortamında biyofilm üretiminde, MO'ların gelişeceği yüzey (substrat) oldukça kritik bir rol oynar. Substratın yüzey pürüzlülüğü, kimyasal bileşimi ve topografyası gibi fiziksel ve kimyasal özellikleri hem biyofilmin başlangıç adezyonunu hem de yapısal organizasyonunu etkileyebilir. Bu nedenle, substrat seçimi, modelin biyolojik geçerliliği açısından önemli bir parametredir (117).

Endodontik biyofilm modellerinde kullanılan başlıca substratlar arasında insan dentini**,** sığır dentini**,** sentetik materyaller (örneğin: cam, polistiren) ve nadiren epoksi reçineler bulunmaktadır. Bu materyallerin her birinin avantaj ve dezavantajları mevcuttur. Bunlar;

İnsan dentini: En sık tercih edilen substrat materyalidir. Bu materyal, kök kanal sisteminin gerçek yapısal ve kimyasal özelliklerini taklit etmesi bakımından değerlidir. Hidroksiapatit içeriği, dentin tübüllerinin varlığı ve yüzeyin doğal yapısı, biyofilmlerin in vivo ortamda nasıl geliştiğini anlamak açısından uygun bir ortam sağlar. Ancak insan dentininin temini etik, lojistik ve yasal açıdan kısıtlıdır. Ayrıca, bireyler arası biyolojik farklılıklar (örneğin yaş, mine kalınlığı, dentin permeabilitesi) sonuçların standardizasyonunu zorlaştırabilir.

Sığır (bovine) dentini: İnsan dentinine benzerlik gösterdiği için alternatif substrat olarak kullanılır. Daha kolay ve ucuz elde edilebilmesi nedeniyle tercih edilir. Ancak, insan dentininden farklı olarak daha geniş tübül çapına ve farklı yüzey morfolojisine sahiptir. Bu farklılıklar, mikrobiyal kolonizasyon dinamiklerini etkileyebilir.

Cam, polistiren ve diğer sentetik yüzeyler: Bu tür yüzeyler, standardizasyonu kolaylaştırması ve ucuz oluşuyla öne çıkar. Özellikle mikrotiter plaklar (örneğin 96 kuyucuklu) yüksek verimli deneyler için uygundur. Ancak, bu yüzeyler dentin ile biyolojik ya da kimyasal benzerlik taşımaz. Dolayısıyla biyofilmin davranışları bu ortamlarda in vivo durumu yansıtmayabilir (117).

Epoksi ve kompozit reçineler: Daha az kullanılan materyaller arasında yer alır. Genellikle kök kanal yapısının anatomik olarak modellenmesi amacıyla tercih edilirler. Fakat kimyasal doğaları nedeniyle mikrobiyal adezyon ve biofilm oluşumu farklılık gösterebilir.

Seçilen substrat, yalnızca biyofilm gelişimini değil, aynı zamanda irigantların difüzyonunu ve etki düzeyini de etkileyebilir. Örneğin, dentin, irigantların kimyasal etkisini azaltan tamponlayıcı bir yüzey oluşturabilir. Bu nedenle irigasyon çalışmalarında substrat etkisinin kontrol altında tutulması büyük önem taşır.

Kısacası, substrat materyali seçimi, endodontik biyofilm modellerinin tasarımında temel belirleyicilerden biridir. Gerçek dentin kullanımı modelin klinik geçerliliğini artırsa da standardizasyon açısından sentetik materyaller daha avantajlı olabilir. Bu nedenle, deneyin amacı ve analiz yöntemi substrat seçiminde dikkate alınmalıdır (117).

İnkübasyon koşulları: Biyofilm gelişimi, yalnızca substratın türüne değil, aynı zamanda MO’ların büyüme ortamına da büyük ölçüde bağlıdır. Bu nedenle inkübasyon süresi, ortam koşulları ve atmosferik parametreler, kök kanal biyofilm model sistemlerinin başarıyla oluşturulmasında kritik rol oynar (117).

İnkübasyon süresi: İnkübasyon süresi açısından farklılıklar mevcuttur; süreler bir günden 70 güne kadar değişmektedir. Çok sayıda çalışma biyofilmleri bir haftadan kısa sürelerle kültürlerken, birçok çalışmada ise örnekler birkaç hafta boyunca inkübe edilmiştir.

Farklı çalışmalarda biyofilm yaşındaki bu değişkenlik çarpıcıdır. Bu, bu parametrenin ve göreceli öneminin araştırmacılar arasında çok farklı şekillerde yorumlandığını göstermektedir. Biyofilm oluşumu, bakterilerin yüzeye tutunmasıyla başlar; bunu mikrokoloni gelişimi, EPS salgılanması, biyofilmin farklı olgunlaşma evreleri ve dağılması takip eder (128).

'Genç' (birkaç saatten birkaç güne kadar) ve *'yaşlı'* biyofilmler karşılaştırıldığında, biyofilm biyokütlesi/kalınlığı, hücre sayısı ve antimikrobiyal direnci açısından farklar gözlenebilir. De Meyer ve ark. (129) tarafından yürütülen bir çalışmada, *E. faecalis* ve *S. mutans*'tan oluşan çift türlü bir biyofilm 48, 72 ve 168 saat boyunca inkübe edilmiştir. Kültür yöntemiyle değerlendirildiğinde, 48 ve 72 saatlik biyofilmler arasında toparlanan hücre sayısı açısından anlamlı bir fark bulunmamış; ancak 168 saatlik inkübasyonun ardından belirgin şekilde daha az hücre elde edilmiştir.

Seneviratne ve ark. (130) mikrotitre plaklarda *E. faecalis* biyofilmleri geliştirmiş ve 72 saatte maksimum hücre sayısına ulaşıldığını, 7. günde bu sayının azaldığını göstermiştir. Biyofilm yapısına ilişkin olarak Shen ve ark. (131), kolajen kaplı hidroksiapatit disklerde geliştirilen çok türlü biyofilmlerin Taramalı Elektron Mikrokobu (TEM) ile incelenmesi sonucunda, 2 günlük biyofilmlerin kalınlığını 57 µm, 3 haftalık biyofilmlerin 155 µm ve 6 haftalık biyofilmlerin ise 190 µm olduğunu raporlamıştır. Benzer şekilde, Phee ve ark. (132), 96 saatlik *Pseudomonas aeruginosa* biyofilmlerinin, 24 saatlik biyofilmlere kıyasla anlamlı derecede daha fazla biyokütle içerdiğini belirtmiştir. Bu eğilim, Sjollema ve ark. (133) tarafından yapılan çalışmayla da örtüşmektedir; bu çalışmada biyofilmlerdeki toplam bakteri sayısı arttıkça canlı bakteri oranının azaldığı gösterilmiştir.

Biyofilm yaşının antimikrobiyal tedavilerin etkinliği üzerindeki etkisi de çeşitli çalışmalarda araştırılmıştır. Bu çalışmalar, olgun biyofilmlere karşı uygulanan tedavilerin genellikle daha az etkili olduğunu göstermektedir. Stojicic ve ark. (134)

farklı dezenfektan ajanların polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki etkisini araştırmış ve 3 haftalık gelişimden sonra biyofilm bakterilerinin, 1 ya da 2 haftalık gelişime sahip biyofilmlere göre dezenfektanlara karşı daha az duyarlı olduğunu bulmuştur. Araştırmacılar, biyofilm matürasyonunun modellerinde 2 ile 3 hafta arasında gerçekleştiğini ve kullanılan her biyofilm modeli için bu zaman çizelgesinin bilinmesinin önemini vurgulamışlardır.

Lim ve ark. (135), ışıkla aktive edilen dezenfeksiyon ve kimyasal dezenfeksiyonun 4 günlük ve 4 haftalık *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki etkisini karşılaştırmıştır. Dört haftalık örneklerde bakteri yaşam oranı, 4 günlük örneklere kıyasla anlamlı ölçüde daha yüksek bulunmuştur.

Chau ve ark. (136) hidroksiapatit diskler üzerinde oluşturulan 22, 46, 70 ve 94 saatlik *E. faecalis* biyofilmlerinde SH'nin antibakteriyel etkinliğini araştırmış ve SH'nin minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu ile biyofilm yaşı arasında doğrusal bir ilişki olduğunu belirlemiştir. Genel olarak veriler, *E. faecalis* biyofilmlerine karşı SH'in antibakteriyel etkinliğinin, biyofilm yaşı arttıkça tüm test edilen konsantrasyonlarda azaldığını göstermiştir.

Mikrobiyoloji literatüründe de benzer ilişkiler bulunmuştur: biyofilmin matürasyon evresi ile antimikrobiyal ajanlara karşı direnç düzeyi arasında paralellik vardır (137).

Bu veriler, biyofilmin olgunlaşma evresinin biyofilm araştırmalarında önemli bir parametre olduğunu ortaya koymakta, ancak biyofilmin uygun/gerekli inkübasyon süresine ilişkin genellenebilir bir öneri oluşturmanın zor olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, her biyofilm çalışmasından önce kapsamlı bir biyofilm büyüme kinetiği analizi yapılması ve kullanılan modelde biyofilmin hangi evrede olduğunu belirlemek son derece önemlidir.

Besiyeri: Biyofilm gelişimi için Brain-Heart Infusion (BHI) besiyeri sıklıkla kullanılmaktadır. Diğer sık kullanılan besiyerleri arasında Tryptic Soy Broth (TSB), all culture broth, Todd Hewitt broth ve yapay tükürük yer almaktadır. BHI hayvansal kaynaklı bir ortam iken, TSB bitkisel kökenlidir. Bu besiyerlerinin tamamı, çok çeşitli mikrobiyal türlerin büyümesini destekleyen yüksek besin değerine sahip genel amaçlı kültür ortamlarıdır (117).

Besin içermeyen fizyolojik tuz çözeltisinin (salin) kullanımına yalnızca bir çalışmada (138) rastlanmıştır.

E. faecalis hücrelerinin, daha besleyici ortamlara kıyasla fosfat tamponlu salinde (PBS) geliştirildiğinde dentine daha iyi tutunduğu gösterilmiştir (139). Ancak, salin gibi besinsiz çözeltiler *in vivo* koşulları yansıtmamaktadır.

Besin varlığı açısından değerlendirildiğinde, kök kanal biyofilmleri iki farklı ortamda gelişebilir: tedavi edilmemiş kök kanalı ya da tedavi görmüş kök kanalı. Bu iki ortam, MO'ların besine erişimi ve besin varlığı açısından birbirinden önemli ölçüde farklılık gösterir. Enfeksiyonun başlangıcında, kök kanalına invazyon gerçekleştiren bakteriler primer enfeksiyona neden olur. Bu dinamik sürecin evreleri, MO'lar için besin teminini ve kullanılabilirliğini belirleyecektir.

Büyüme ortamı ve atmosferik koşullar: Biyofilm oluşumu genellikle statik veya dinamik sistemlerde gerçekleştirilir. Statik sistemler, besiyerinin hareketsiz olduğu ve biyofilmin sabit bir yüzey üzerinde büyüdüğü sistemlerdir. Bu sistemler genellikle daha basit, düşük maliyetli ve kullanımı kolaydır. Ancak, gerçek endodontik ortamda bulunan sıvı akışı ve mekanik stresler bu modellerde yer almaz.

Dinamik sistemler ise, akış sistemleri ya da peristaltik pompalarla sıvı hareketinin sağlandığı daha kompleks ortamlardır. Bu modeller, kök kanal içinde irigasyon veya eksüda akışı gibi doğal sıvı hareketlerini taklit etmede daha başarılıdır. Ancak, bu tür sistemler hem kurulumu hem de kontrolü açısından daha zordur (117).

2.6.2.2. Biyofilm Doğrulama Yöntemleri

Enfekte kök kanallarının tedavisindeki temel hedef, kanal içindeki mikrobiyal yükü azaltmaktır. Bu, MO'ların, bunlara ait yan ürünlerin ve debrisin ideal biçimde

uzaklaştırılmasını gerektirir. Zira bakteriyel patojenlerin apikal patolojilere neden olabildiği göz önünde bulundurulduğunda, kök kanalındaki biyofilmin etkin biçimde elimine edilmesi büyük önem taşımaktadır (140). Biyofilmin varlığını tespit etmek amacıyla mikrobiyolojik kültür yöntemleri, moleküler analizler ve mikroskobik görüntüleme teknikleri kullanılmaktadır.

Mikrobiyolojik kültür testleri: Mikrobiyolojik kültür, numunelerdeki MO sayısını belirlemeye yönelik bir örnekleme ve kültürleme sürecidir. Bu yöntemde, kök kanalı içerisine sıvı bir ortam eklenir ve ardından endodontik eğelerle mekanik kazıma uygulanarak biyofilm çözülmeye çalışılır ya da kağıt konlar aracılığıyla sıvı örnek emdirilir (117). Ancak bu yöntemle, kanalın apikal, orta ve koronal bölgeleri arasında ayrım yapmak mümkün olmamaktadır.

Kültürleme aşamasında, agar plakları üzerinde koloni gelişimi gözlenir ve bu koloniler üzerinden CFU sayımı yapılır (141). Bu teknik yalnızca in vitro koşullarda kültürü yapılabilen MO'ları tespit edebilir (117).

TEM: TEM, endodontik alanda yüksek çözünürlüklü yüzey ve yapısal görüntüleme sağlayarak biyofilm analizinde sıkça başvurulan bir tekniktir. Bu cihaz, dentin tübüllerinin yapısal özelliklerinin, kök kanal dolgu materyallerinin yüzeye adaptasyonunun, biyofilm organizasyonunun ve kök kanal morfolojisinin detaylı şekilde incelenmesine olanak tanır (106,142).
Ancak TEM analizinin temel sınırlılığı; fiksasyon, dehidratasyon ve metal kaplama gibi işlem basamaklarının biyofilmin orijinal yapısında bozulmalara yol açabilecek olmasıdır (141).

Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (KLTM): KLTM, biyofilmin floresan boyalarla işaretlenmesini takiben numunenin yaklaşık 200 µm derinliğe kadar çok ince optik kesitler halinde görüntülenmesini sağlayan ileri düzey bir mikroskobik analiz yöntemidir. Bu optik kesitler, biyofilmin farklı derinlik katmanlarından elde edilerek özel yazılımlar aracılığıyla üst üste bindirilmekte ve 3B bir biyofilm modeli oluşturulmaktadır (117).

Son yıllarda KLTM, endodontik çalışmalarda yaygın şekilde kullanılmaktadır. Özellikle irigantların biyofilmler üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi, kanal dolgu

materyallerinin dentin içerisine penetrasyon derinliğinin değerlendirilmesi ve retreatment işlemleri sonrası kalan dolgu artığının tespiti gibi çeşitli uygulama alanlarına sahiptir (143–145).

Bu teknikle elde edilen görüntüler; biyofilmin kalınlığı, hacmi ve hücre dağılımı gibi kantitatif verilerin belirlenmesine olanak tanır. Biyofilm analizlerinde sıklıkla canlı ve ölü hücreleri ayırt edebilen floresan boyalar kullanılır. En yaygın kullanılan boyama kombinasyonu SYTO-9 ve propidyum iyodür (PI)'dir. SYTO-9, canlı bakterileri yeşil floresan ile; PI ise ölü bakterileri kırmızı floresan ile işaretlemektedir (146).

Işık mikroskobu: Işık mikroskobu, biyofilmlerin morfolojik yapısının ve kök kanalı içerisindeki dağılımının değerlendirilmesinde kullanılan temel görüntüleme araçlarından biridir. Geniş büyütme aralığı sayesinde, biyofilmin genel organizasyonu ile MO'ların morfolojik özellikleri gözlemlenebilir. Ancak bu yöntemle canlı ve ölü hücreler arasında ayrım yapılması mümkün değildir (117). KV ile boyama yöntemi hem canlı hem de ölü hücreleri kapsayan toplam biyokütlenin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılır. KV ile boyanan biyofilm, çözündürüldükten sonra spektrofotometrik olarak değerlendirilir (147).

Moleküler teknikler: Moleküler yöntemler, özellikle kültür yöntemiyle tespit edilemeyen MO'ların saptanmasında önemli bir rol oynar. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR), hedef DNA dizilerini enzimatik olarak çoğaltarak belirli bir bakteriyel türün varlığını ya da yokluğunu tespit etmeye olanak sağlar (148). Bu teknik, kültürü mümkün olmayan türler ve *"viable but non-culturable"* (VBNC) olarak adlandırılan canlı fakat kültürlenemeyen bakterilerin tanımlanmasında etkili bir yöntemdir (117).

2.7.KKT'de Biyomekanik Preparasyonun Önemi

KKT'nin başarısı; doğru teşhis koyma, kök kanallarının etkin bir biçimde temizlenmesi, şekillendirilmesi, dezenfeksiyonu ve apikal ile koronal bölgeden sıkı bir tıkama sağlayacak şekilde doldurulmasına bağlıdır (2). Kök kanallarının temizlenmesi ve şekillendirilmesi, KKT'nin temel aşamalarından biri olarak kabul edilmektedir (149,150). Bu süreç, kanal içinde yer alan organik kalıntıların

giderilmesi ve daimi kök kanal dolgusunun yerleştirilmesi için uygun bir kanal formunun oluşturulması anlamına gelir (151). Günümüzde tüm güvenilir endodontik yöntemler, kök kanallarının tam olarak temizlenmesi, dezenfekte edilmesi ve doldurulması ilkelerine dayanır.

Preparasyon aşaması yalnızca mekanik bir işlem olarak değil, aynı zamanda biyolojik ilkeler doğrultusunda değerlendirilerek biyomekanik preparasyon olarak adlandırılmaktadır (61). Farklı kök kanal eğeleri ve tekniklerle yapılan biyomekanik preparasyon, kanal içerisindeki nekrotik ve enfekte pulpa dokusunun, bakteriler ve toksinler gibi immünolojik faktörlerin uzaklaştırılmasının yanı sıra, kanalın apikal foramende en dar bölümüne kadar konik bir formda, koronalden apikale doğru şekillendirilmesini de kapsar (14).

Kök kanallarının şekillendirilmesi, KKT'nin başarısını etkileyen kritik aşamalardan birini oluşturmaktadır (3). Bu nedenle, kök kanalının anatomisinin olası farklı varyasyonlarının klinisyenler tarafından bilinmesi, kanalın şekillendirilmesi ve dolayısıyla tedavi başarısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (4). Ayrıca, KKT'nin başarısı, dikkatli bir biyomekanik temizlik ve şekillendirmeden sonra, kök kanalının içindeki bakteri, bakteri ürünleri ve doku sıvılarının hareketini engellemek için toksik olmayan ve stabil bir malzeme ile kök kanal boşluğunun üç boyutlu olarak doldurulmasına dayandığı bildirilmiştir (152,153).

KKT'deki başarısızlıkları inceleyen Mayo ve ark. (154) tedavi başarısızlıklarının %58'inden fazlasının, kök kanal sisteminin yetersiz şekillendirilmesinden kaynaklandığını ve bunun da tam dolumun sağlanamamasına yol açtığını belirtmişlerdir.

Pulpa ve periapikal doku hastalıklarında önemli bir rol oynayan MO'ları ve nekrotik doku kalıntılarını büyük ölçüde ortamdan uzaklaştıran kök kanal preparasyonu, periapikal irritasyonu ortadan kaldırmak ve kök kanalının doldurulabilmesi için gereken uygun formu sağlamak adına kritik bir adımdır. Bununla birlikte, kök kanal preparasyonu, kök kanallarının eğriliği, darlığı ve anatomik özellikleri gibi faktörlerden etkilenebilir. Bu nedenle, kök kanal preparasyonu, KKT'nin zorlayıcı aşaması olarak önemini korumaktadır (155).

Özellikle dar ve eğri kök kanallarında, büyük ve esnek olmayan paslanmaz çelik eğelerin kullanılması, orijinal kanal kurvatüründe sapmalara yol açmakta ve istenmeyen şekil değişikliklerine sebep olmaktadır. Bu tür olumsuzlukları ortadan kaldırmak amacıyla, farklı materyallerin kullanımı gündeme gelmiştir. Bu alanda oldukça umut verici sonuçlar, yüksek elastisiteye ve şekil hafızasına sahip NiTi esaslı kök kanal aletleriyle elde edilmiştir (3,156).

Son yıllarda, kök kanal eğeleri ve preparasyon tekniklerindeki gelişmeler ve yeni uygulamalar, kök kanallarının biyomekanik preparasyonunda kolaylıklar sağlamış ve karşılaşılan komplikasyonları ortadan kaldırmaya yönelik önemli adımlar atılmıştır (20,23,27,61).

Temizleme ve şekillendirme sırasında, canlı veya nekrotik pulpa dokusunun tamamen çıkarılmasının yanı sıra, bakteriler ve yan ürünlerle kontamine olan dentin de kök kanallarından uzaklaştırılmalıdır. Ayrıca, kök kanallarındaki düzensizliklerin giderilmesi ve antibakteriyel irigantlar kullanılarak kanal dezenfeksiyonunun sağlanması gerekmektedir. Kök kanal preparasyonu, orijinal kanal şekline tam uyum sağlayacak şekilde ve kanal dolgu maddelerinin kolayca uygulanmasına olanak tanıyacak şekilde tamamlanmalıdır. Ancak bu şekilde hazırlanan kök kanalları, sızdırmaz bir şekilde doldurulabilir (3,151). Bu amaçla, biyomekanik preparasyon önemli bir aşama olarak öne çıkmaktadır.

Bu amaçla, biyomekanik preparasyon ile elde edilmek istenen mekanik ve biyolojik prensipler şu şekilde özetlenebilir*: (1)* Kanal içindeki vital veya nekrotik dokuların tamamen uzaklaştırılması, *(2)* İrrigasyon ve medikasyon için yeterli alanın sağlanması, *(3)* Kök kanalının orijinal formunun korunarak takibinin sağlanması, *(4)* Kök kanalının, kök ucundan koronale doğru düzgün ve genişleyen konik bir formda şekillendirilmesi, *(5)* Kök kanal çapının, kök ucundan başlayarak giderek artması ve kanal girişinde en geniş çapına ulaşması, *(6)* Apikal kanal anatomisinin orijinal konumunun ve bütünlüğünün korunması, *(7)* Kanal sistemi ve kök yapısına iatrojenik hasarın verilmesinden kaçınılması, *(8)* Kanal doldurma işleminin kolaylaştırılması, *(9)* Temizleme ve şekillendirme işlemlerinin tek bir seansta tamamlanması, *(10)* Kanal preparasyonu sırasında oluşan artıkların periapikal bölgeye itilmesinin engellenerek, periapikal dokularda irritasyon ve/veya enfeksiyon riskinin önlenmesi,

(11) Dişin uzun dönem ağız içinde fonksiyonunu sürdürebilmesi için yeterli miktarda kök kanal dentini bırakmak (29,151).

Biyomekanik preparasyon sırasında yapılan kök kanal dezenfeksiyonunun amacı, kanal içindeki bakterileri ve bunların yan ürünlerini uzaklaştırarak, periapikal dokulara geçişlerini engellemek ve bu dokularda hastalık oluşumunu önlemek ya da devam eden hastalığın iyileşmesini sağlamaktır. Bakterilerden arındırılmış bir kök kanalı elde edebilmek için, çeşitli el eğeleri veya döner eğe sistemleri ile mekanik temizlik ve şekillendirme esnasında antibakteriyel özelliklere sahip irigantlar kullanılarak kimyasal temizlik yapılmaktadır. Bu şekilde, enfekte kök kanallarından enfekte dentin dokusu, pulpa artıkları, nekrotik dokular ve MO'lar uzaklaştırılabilir. Birçok araştırmacı, biyomekanik temizliğin bu aşamasının önemini vurgulamıştır (157,158).

2.7.1. NiTi Kök Kanal Eğelerinin Gelişimi ve Klinik Uygulamaları

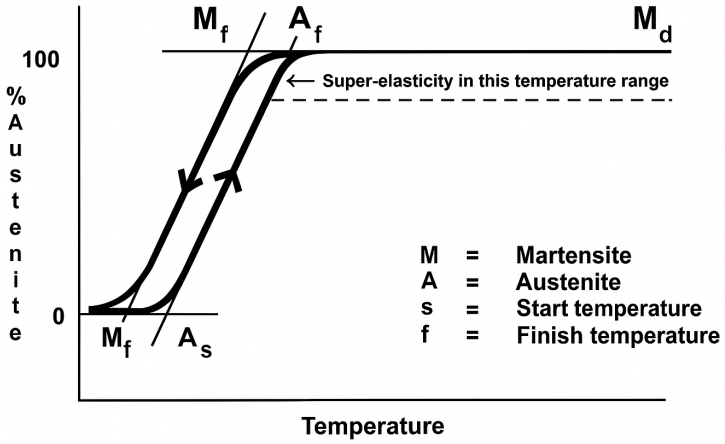
NiTi alaşımlarının endodontiye kazandırılması, kök kanal şekillendirme protokollerinde önemli bir dönüm noktası olmuştur. Paslanmaz çelik eğelere kıyasla çok daha esnek olan bu alaşımlar, özellikle eğri kök kanallarında daha güvenli ve etkili şekillendirme olanağı sunmuştur. NiTi esaslı eğelerin süperelastik özellikleri, kök kanal eğimlerine uyum sağlamalarını kolaylaştırırken, kanal duvarlarında zipping, basamak oluşumu ve perforasyon gibi istenmeyen komplikasyonların önüne geçilmesine yardımcı olmaktadır (63,159).

NiTi alaşımın bu üstün mekanik özellikleri, rotasyonel hareket prensibine dayalı şekillendirme sistemlerinin gelişimini de beraberinde getirmiştir. İlk döner sistemlerin temelini, 1892 yılında Oltramare'nin tanımladığı manuel döndürme yöntemi oluşturmuştur (29,160). Bu yöntemi takiben 1889'da Rollins tarafından geliştirilen endodontik angldruva, motor destekli şekillendirme sistemlerinin öncüsü olmuştur (161). Zamanla bu sistemler *"Endo-Cursor"*, *"Giromatic"* ve *"Endolift"* gibi cihazlarla evrilmiş, modifiye başlık ve özel hareket paternleriyle donatılmış pek çok sistem geliştirilmiştir (161–163).

NiTi döner sistemler ilk kez 1988 yılında Walia ve Brantley (164) tarafından tanıtılmış ve bunu takiben Wildey ve Senia'nın 1989'da geliştirdiği *"Canal Master"*

sistemiyle klinik uygulamaları yaygınlık kazanmıştır (155). Bu sistemler, kanal duvarlarını daha düzgün ve merkezde tutarak minimal doku kaybı ile etkin şekillendirme sağlamaktadır (165–167).

NiTi döner sistemlerin başlıca avantajları; yüksek torsiyonel dirençleri, apikalden koronale artan koniklikleri ve farklı kesit geometrileri ile çeşitli kanal anatomilerine adaptasyon yetenekleridir (63). Bu sistemlerde, geleneksel .02 koniklik yerine %4, %6 ve hatta %19'a varan koniklik açılarına sahip eğeler üretilmiş; bu sayede istenilen taper daha etkin sağlanabilmiştir (30,168,169).



Şekil 2. NiTi transformasyon grafiği. (Mf: son martensite, Ms: başlangıç martensite, Af: son austenite, As: başlangıç austenite) (170)

Klinik uygulamalarda NiTi döner eğelerle çalışırken bazı teknik detaylara dikkat edilmesi önerilir: Crown-down tekniği uygulanmalı, sık irigasyon yapılmalı, eğelerin yivleri düzenli olarak kontrol edilmeli ve özellikle eğri kanallarda fazla kuvvet uygulanmaktan kaçınılmalıdır. Ayrıca, her eğe kullanımı sonrası EDTA ile yıkama önerilerek smear tabakasının uzaklaştırılması tavsiye edilir (3,29,33,161).

NiTi döner sistemlerin önerilen çalışma hızı üretici firmaların talimatlarına göre genellikle 150–600 rpm aralığında olmalı ve tork değerleri eğe tipine göre ayarlanmalıdır (171,172). Klinik pratikte, özellikle çok eğimli ve dar kanallarda bu

sistemler hem şekillendirme süresini kısaltmakta hem de başarılı bir 3B obturasyon için gerekli kanal formunu daha güvenli şekilde elde etmeye imkân tanımaktadır.

Kök kanal şekillendirmesi, geleneksel olarak ISO standartlarına uygun, .02 koniklik açısına sahip paslanmaz çelik el eğeleriyle gerçekleştirilmiştir. Bu eğelerin 16 mm'lik kesici alanı bulunmakta ve her bir milimetrede çap artışı 0.02 mm olacak şekilde tasarlanmıştır. En sık tercih edilen modeller K-tipi ve Hedström eğeleri olup, K-tipi eğeler rotasyonel ve piston benzeri hareketlerle, Hedström eğeler ise yalnızca ileri-geri hareketle kullanılmaktadır (173).

Paslanmaz çelik eğelerin esnek olmaması, özellikle eğimli kanallarda apikal sapmalar, basamak oluşumu ve perforasyon gibi iatrojenik komplikasyonlara yol açmaktadır. Ayrıca, düşük koniklik, irigantların kanalda yeterli temas süresi elde edememesine ve apikal ekstrüzyon riskinin artmasına neden olmaktadır (173). Bu sınırlamaların aşılması amacıyla, 1960'lı yıllarda süperelastik özelliklere sahip NiTi alaşımlar endodontide kullanılmaya başlanmıştır.

NiTi alaşımı, ilk kez ABD Donanması'nın araştırma projeleri kapsamında W. F. Buehler tarafından geliştirilmiş ve *"Nitinol"* olarak adlandırılmıştır (174). %55 nikel ve %45 titanyum içeren bu alaşım, ısıya bağlı şekil hafızası ve süperelastikiyet özellikleriyle öne çıkmaktadır. Bu özellikler sayesinde, deformasyona uğrayan eğeler ısı uygulanmasıyla eski formuna dönebilmekte, bu da onları klinik kullanıma son derece uygun hale getirmektedir (175).

Sonuç olarak, NiTi alaşımlı döner sistemler, kök kanal şekillendirme sürecinde güvenliği artırmış, işlem süresini kısaltmış ve klinik başarıyı önemli ölçüde desteklemiştir. Sürekli gelişen tasarım ve üretim teknolojileri sayesinde, NiTi sistemler modern endodontinin vazgeçilmez araçları haline gelmiştir.

2.7.2. Çalışmamızda Kullanılan NiTi Kök Kanal Eğelerinin Genel Özellikleri

Perfect Super System Advanced Kit



Resim 1. Perfect Super System Advanced Kit eğe seti

Perfect Super System Advanced Kit (Shenzhen Perfect Medical Instruments, Shenzhen, Çin) , termal işlem görmüş NiTi alaşımı sayesinde yüksek esneklik ve kırılma direnci sunan döner kanal eğeleri içerir. ISO 10/07'den 25/04'e kadar değişen koniklikler, farklı kanal anatomilerine uyum sağlayarak özellikle dar ve eğimli kök kanallarında güvenli ve etkin şekillendirme sağlar. Üreticiye göre sistem, 250–400 rpm hız aralığında *"brushing"* tekniğiyle kullanılmalıdır.

2.8. Kök Kanal Preparasyonunun Periapikal Dokulara Etkisi

Kök kanal şekillendirmesi veya irigasyonu sırasında ortaya çıkan vital veya nekrotik pulpa artıkları, dentin talaşları, kök kanal dolgu materyalleri ve MO'ları içeren artık maddeler için genel olarak debris terimi kullanılmaktadır. Oluşan bu artıkların apikal foramen aracılığıyla periapikal dokulara çıkması *"apikalden debris taşması"* veya *"apikal ekstrüzyon"* olarak tanımlanır.

Kullanılan tüm kanal şekillendirme teknikleri ve aletleri ile yapılan şekillendirme işleminde apikalden bir miktar debris taşabilmektedir (176). Kök kanal şekillendirmesi sırasında apikalden taşan debris, ilk olarak 1968 yılında Chapman ve ark. (177) tarafından doğrulanmıştır. Apikalden taşan debris miktarı ise ilk olarak 1975 yılında Vande Visse ve Brillant tarafından ölçülmüştür (178). Kök kanal tedavisi sırasında apikalden debrisin taşması sonucu postoperatif ağrı, rahatsızlık, apse, doku hasarı ve tedavi seansları arasında akut alevlenmeler gelişebilmektedir

(178). Araştırmacılar akut alevlenme görülme sıklığının %1,4 ile %16 arasında değiştiği bildirilmiştir (179). Siqueira, asemptomatik kronik periradiküler lezyonlarda MO ile konak savunması arasında bir dengenin olduğuna dikkat çekmiştir (22). Siqueira (179) ayrıca mikrobiyota ve ürünlerinin periradiküler dokulara itilmesinin, yoğunluğu bakteri sayısına ve/veya virülansına bağlı olacak akut bir inflamatuar yanıt başlatabileceğini belirtmiştir. Kemomekanik şekillendirme sırasında MO'ların periradiküler alana taşması, bu dengenin bozulmasına neden olarak akut reaksiyonun başlamasına neden olmaktadır.

Apikal debris taşmasının immünolojik etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada Naidorf (180), periapikal bölgede immünoglobulinlerin varlığını saptamış ve kanal içeriğinin taşması durumunda, hücre zarında hasara neden olacak bir antijen-antikor kompleksi oluşacağını, sonuçta hasta için ağrıya neden olan bir dizi immünolojik sürecin başlayacağını öne sürmüştür. Seltzer ve ark. (181) debris taşmasının histolojik sonuçlarını inceleyen çalışmalarında kontamine olmayan dentin talaşlarının taşkın şekillendirme nedeniyle apikal foramenin ilerisine itildiği 2 vaka bildirmiş ve her 2 vakada da periodontal ligamentin apikal kollajen liflerinde ödem gözlemlemişlerdir. Ayrıca, vakaların birinde şekillendirmeden 1 yıl sonra dentin talaşları etrafında epitel proliferasyonu saptamışlardır. Yazarlar periapikal dokulara itilen dentin talaşlarının dirençli enflamasyona neden olabileceğini de belirtmişlerdir. Gutierrez ve ark. (182), insan dişlerinde enfekte olmuş kök kanallarında çalışma boyundan daha uzun kullanılan eğelerin oluklarında biriken yüksek bakteri oranının, postoperatif ağrı, klinik rahatsızlık ve alevlenmeler için potansiyel risk taşıdığını belirtmiştir. Litaretürde (183) periapikal dokularda granülasyon dokusu ve kollajen lifleri ile çevrili küçük miktarlarda nekrotik dentin tanımlanmıştır. Bu komplikasyonun kısa dönemde akut alevlenmeye, uzun dönemde ise periapikal iyileşmede gecikmeye neden olabileceği belirtilmektedir (184).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı ve Araştırma Merkezi

Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun TBAEK - 497 sayılı kararı doğrultusunda etik kurul onayı alınmıştır. (Ek 1)

Çalışmada kullanılan diş örneklerine bakteri ekim ve inokülasyon işlemleri Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapılmıştır. Örneklerin görüntülenmesi Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı Ar-Ge laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

3.2. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması

Örnek büyüklüğü, G*Power yazılımı (sürüm 3:1; Heinrich Heine Universitat Düsseldorf, Düsseldorf, Almanya) ile etki büyüklüğü (f)= 0.45 %95 güven düzeyi (α=0.05) ve %82 güç (β=0.18) ile hesaplandı. Her bir grup için hedeflenen örneklem sayısı, çalışmanın istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmasını sağlamak amacıyla belirlenmiş olup, elde edilen örnek sayısı analizler için yeterli bulunmuştur.

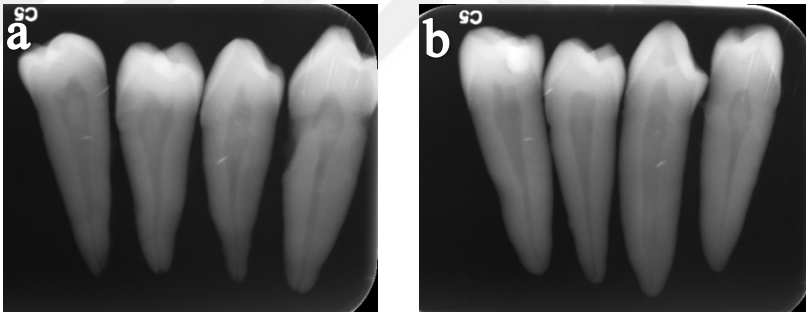
3.3. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Seçimi ve Hazırlanması

Bu çalışmada, ortodontik veya periodontal nedenlerle çekilmiş, herhangi bir çatlak, kırık, iç/dış rezorpsiyon ya da kalsifikasyon bulunmayan toplam 54 adet insan alt küçük azı dişi kullanıldı. Dişlerin daha önce KKT görmemiş olmasına ve kök ucu kapanmış olmasına dikkat edildi (Resim 2). Bu kriterlere uymayan dişler çalışmaya dahil edilmedi. Tüm dişlerin öncelikle mezyo-distal yönden periapikal radyografileri çekildi (Resim 3) ve elde edilen radyograflar Cliniview 10.2 (Dexis, Sidney, Avustralya) yazılımı kullanılarak görüntülendi. Görüntüleme sonuçlarına dayanarak, birden fazla kanalı bulunan ya da kanal kalsifikasyonu veya rezorpsiyonu saptanan dişler çalışma dışında bırakıldı. Vertucci sınıf 1 kanal konfigürasyonuna sahip oldukları doğrulandı.



Resim 2. Çalışmada kullanılacak dişlerin seçimi

Seçilen dişlerin üzerindeki sert ve yumuşak doku kalıntıları bir kretuar yardımıyla temizlendi ve kurumalarını önlemek amacı ile çalışma süresi boyunca dişler serum fizyolojik solüsyonu içerisinde muhafaza edildi.



Resim 3. Dişlerin mezyo-distal radyografisi

Örneklerin standardizasyonunu sağlamak amacıyla, tüm dişlerin uzunluğu 18 ± 1 mm olacak şekilde örnek dişlerin koronal kısımları, aeretöre (KAVO Gentle Silence Lux 8000 B, Biberach, Almanya) takılan 8 nolu elmas fissur frez (Shenzhen Dian Fong Abrasives, Guangdong, Çin) kullanılarak uzaklaştırıldı. Giriş kaviteleri ise 1.4 nolu elmas rond frez (Shenzhen Dian Fong Abrasives) ile açıldı. Kök kanalı içerisine yerleştirilen #10 K-tipi eğenin (Shenzhen Perfect Medical Instruments), apikal uçta gözlendiği ilk uzunluğundan 1 mm çıkarılarak çalışma boyutu belirlendi.



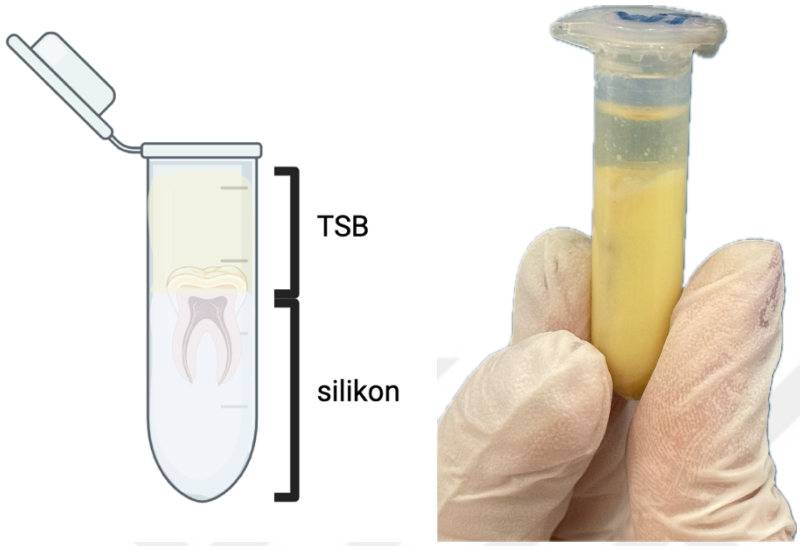
Resim 4. Kavite düzenlemesi yapılmış diş örnekleri



Resim 5. Dijital kumpas ile boy belirlenmesi

MO inokülasyonundan önce her bir diş örneğinde 02/15 nolu konik açılı elle kullanılan paslanmaz çelik K-tipi kanal eğesi (Shenzhen Perfect Medical Instruments) apikal foramenden 1 mm çıkana kadar ilerletildi, smear tabakasını uzaklaştırmak için her örnek 27 G ucu açık iğne ile 2.5 mL'lik şırınga (Genject, Sincan, Ankara) kullanılarak sırasıyla 2,5 mL %2,5 SH (Cerkamed, Pawloski, Polonya), 2.5 mL distile su ve 2,5 mL %17 EDTA ile irigasyona tabi tutuldu. Dişlerin kök yüzeyleri apikal foramen dışına sıvı çıkısını önlemek amacıyla mine-sement hattından kök ucuna kadar iki kat tırnak cilası (L'Oreal, Paris, Fransa) ile kaplandı. Daha sonra tekrar, 02/15 nolu konik açılı elle kullanılan paslanmaz çelik K-tipi kanal eğesi (Shenzhen Perfect Medical Instruments) apikal foramenden 1 mm çıkana kadar ilerletildi ve yaklaşık 0,17 mm çapında standart apeks açıklığı elde edildi.

Numuneler, silikon ölçü materyali ile sabitlenmiş halde eppendorf tüplerine yerleştirildi (Şekil 3 ve Resim 6). Her bir tüpe 600 µL TSB eklendikten sonra tüm örnekler, sterilizasyon amacıyla 121 °C sıcaklık 1 atm basınç altında 45 dk boyunca otoklavda steril edildi.

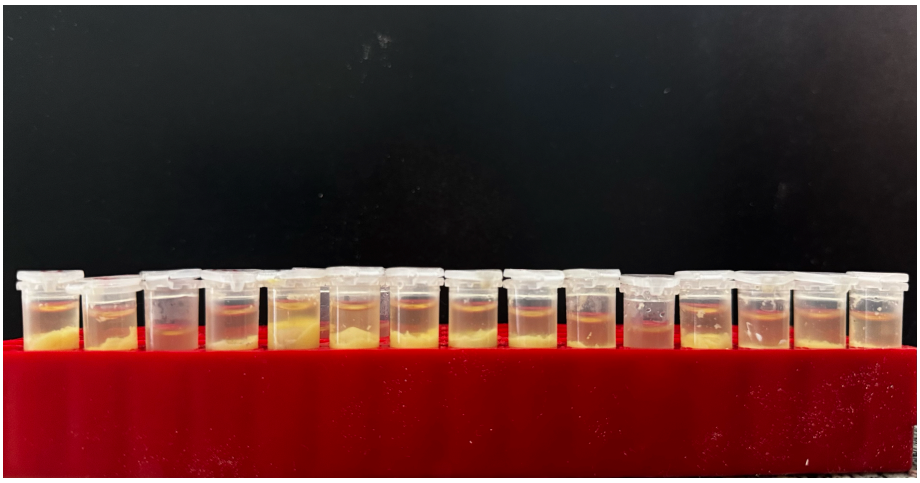


Şekil 3 -Resim 6. Silikon ölçü materyali ile sabitlenmiş Eppendorf tüpleri içindeki diş örnekleri

3.4. Bakteri Ekimi ve Biyofilm Oluşumu

Sterilizasyonun doğrulanması amacıyla, otoklav ile sterilizasyon işleminden sonra her bir tüpten örnek alınarak kanlı agar yüzeyine ekim yapıldı ve kapakları kapalı halde gece boyunca inkübasyona bırakıldı. Herhangi bir üreme gözlenmeyen agarlar ve eş zamanlı olarak bulanıklık gözlenen TSB ortamları, numunelerin steril olduğunu doğrulamak amacıyla değerlendirildi (Resim 7).

Tüm inokülasyon ve mikrobiyal işlemler, kontaminasyon riskini en aza indirmek amacıyla biyogüvenlik kabini (Class 1 laminar akış kabini) (Nüve LN serisi, Ankara, Türkiye) içerisinde gerçekleştirildi.



Resim 7. Sterilizasyon sonrası etüve alınan diş numuneleri

Kök kanalında biyofilm üretimi için gerekli olan *E. faecalis* (ATCC 29212) ve *C. albicans* (ATCC 10231) suşları Akdeniz Üniversitesi Verem Çalışmaları Uygulama ve Araştırma Merkezi laboratuvarından temin edildi.

Suşlar -80 °C'den çıkarıldıktan sonra *E. faecalis*, kanlı agara seyreltme yöntemi ile, *C. albicans* ise Sabouraud Dekstroz Agar (SDA) ya da kanlı agara ekildi. Tüm kültürler 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonunda, izolatların saflığını sağlamak amacıyla plaklardan tek koloni alınıp 10 mL TSB besiyeri bulunan şişelere ekim yapıldı. Hazırlanan örnekler her iki bakteri için 24 saatlik inkübasyona bırakıldı (185).

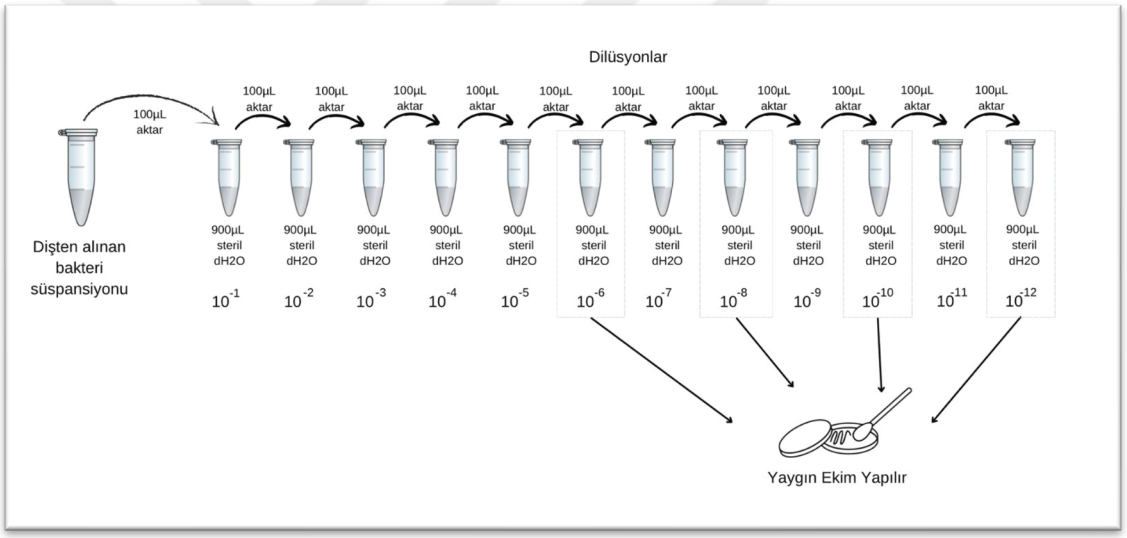
24 saatlik inkübasyondan sonra her şişede bulunan bakteri kültürü OD_{600} değeri mikrotitre plaka spektrofotometre cihazı (Allsheng AMR- 100 , Hangzhou, Çin) ile ölçüldü.

İstenen OD değeri, McFarland 0.6 olarak ayarlandı. Bu değer, yaklaşık 1.8 x 10^8 CFU/mL bakteri yoğunluğuna karşılık gelmekteydi. Her bir Eppendorf tüpündeki TSB ortamı uzaklaştırıldıktan sonra, steril koşullarda her dişin üzerine 600 µL'lik bakteri süspansiyonu eklendi. Miks biyofilm oluşturulmak istenen grupta her iki bakteriden de 300'er µL bakteri süspansiyonu kök kanalı içine eklendi. Kontaminasyon işlemi steril pipetler kullanılarak yapıldı. Kontaminasyon sırasında 15 nolu K tipi paslanmaz çelik kanal eğesi (Shenzhen Perfect Medical Instruments) ile bakteri süspansiyonu dişlerin apikaline doğru, kökün koronal 2/3 mesafesine

kadar itildi. Daha sonra tüm numuneler 37°C sıcaklıktaki etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı.

3.4.1. Biyofilm Gelişiminin Takibi ve Koloni Sayımı

İnkübasyon tamamlandıktan sonra, kanal içinde üreme olup olmadığının kontrolünü yapmak amacıyla rastgele seçilen bir dişten 100 µL süspansiyon alınarak, 10^{-6}, 10^{-8}, 10^{-10} ve 10^{-12} dilüsyonlar hazırlandı (her birinde 100 µL bakteri süspansiyonu + 900 µL steril distile su). Hazırlanan dilüsyonlardan 100 µL alınarak; *E. faecalis* için Bile Eskulin Agar (BEA), *C. albicans* için antibiyotik içeren SDA'a yayma ekimi gerçekleştirildi. Drigalski spatülü alevde sterilize edilerek yayma işlemi yapıldı ve plaklar 37 °C sıcaklıktaki etüvde 24 saat inkübe edildi.



Şekil 4. Dilüsyonların hazırlanması ve yaygın ekimi

İnkübasyon sonrasında koloniler sayılarak CFU/mL cinsinden bakteri yoğunluğu hesaplandı. Örneğin, 10^{-4} dilüsyondan 100 µL inokule edilen bir plakta 50 koloni sayılmışsa, bakteri yoğunluğu şu formüle göre hesaplandı.

$$\text{CFU/mL} = \frac{\text{Koloni Sayısı} \times \text{Dilüsyon Faktörü}}{\text{Ekilen Hacim (mL)}} = \frac{50 \times 10^4}{0.1} = 5 \times 10^6 \text{ CFU/mL}$$

Şekil 5. Bakteri yoğunluğu hesaplama formülü

Biyofilm süspansiyonlarının her biri 7 gün boyunca her gün aynı saatte taze TSB ortamı ile beslendi. Bu işlem sırasında, Eppendorf tüp içindeki eski TSB ortamı uzaklaştırıldı ve yerine 500 µL taze TSB eklendi (Resim 8). Böylece 7 gün sonunda olgun bir biyofilm tabakası oluşturulmuş oldu. Bu sürecin sonunda, numuneler kök kanal şekillendirme aşamasına geçmek üzere hazır hale getirildi.



Resim 8. TSB ortamının değiştirilmesi

Gruplar;

Dişler üç ana gruba ayrıldı **(***n* = 18): Grup 1: *E. faecalis* biyofilmi ile muamele edilen grup, Grup 2: *C. albicans* biyofilmi ile muamele edilen grup, Grup 3: Miks biyofilm (*E. faecalis* + *C. albicans*) ile muamele edilen grup

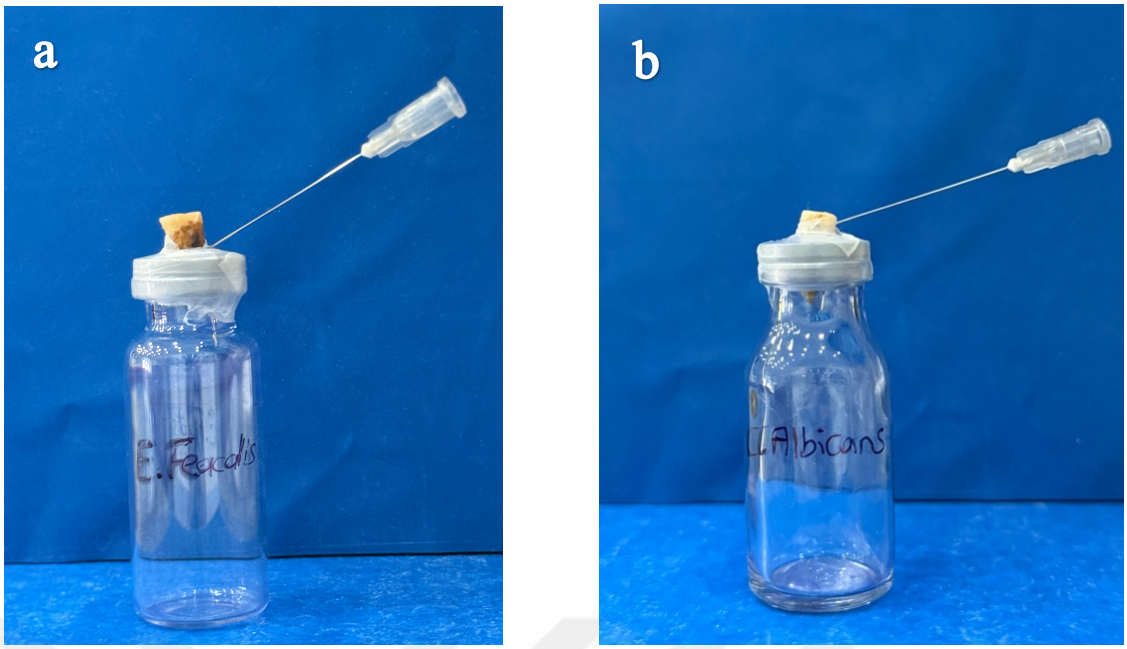
Her gruptaki 18 dişin 14'ü, 7 günlük inkübasyon sürecinin ardından kanal eğeleme işlemine tabi tutuldu. Geriye kalan 4 diş, kontrol grubu olarak değerlendirildi. Bu kontrol örneklerine de biyofilm inokülasyonu uygulandı ve 7 gün boyunca inkübe edildi; ancak şekillendirme işlemi gerçekleştirilmedi. Böylece biyofilm varlığının şekillendirme olmaksızın oluşturduğu potansiyel kontaminasyon seviyesi değerlendirilmiş oldu. Eğeleme hariç tüm aşamalar (irigasyon, boyama, kurutma vb.) kontrol grubundaki dişlere de uygulandı.



Resim 9. Örnek dişlerin 37 °C'de 7 gün inkübe edilmesi

3.5. Kök Kanal Şekillendirme ve Apikal Ekstrüzyonun Değerlendirilmesi

Yedi günlük inkübasyon süreci tamamlandıktan sonra her bir diş Eppendorf tüpten dikkatlice çıkarılarak silikon materyalinden ayrıldı. Steril spanç kullanılarak diş dış yüzeyindeki TSB materyali uzaklaştırıldı. Dişler, daha önce kapaklarında delik açılmış steril cam tüplere, kron kısmı dışarıda ve kök kısmı tüp içinde kalacak şekilde yerleştirildi. Şişe içi basınç ve atmosferik basıncı dengelemek amacıyla 27G ucu açık iğne ucu (Genject) parabol şeklinde kıvrılarak kapağa sabitlendikten sonra şişelerin kapakları parafilm ile kaplandı (Resim 10). Bu düzenek sayesinde, şekillendirme işlemi sırasında apikalden taşan materyalin toplanması sağlandı.



Resim 10. (*a*), (*b*): Deney düzeneği için hazırlanan steril cam tüpler

3.5.1. Kök Kanal Preparasyon Yönteminin Uygulanışı

Üretici firmanın önerisi doğrultusunda Perfect Super System Advanced Kit (Shenzhen Perfect Medical Instruments) döner eğe sisteminde, tüm kanal eğeleri belirlenen çalışma boyunda olacak şekilde sırasıyla 07/10, 04/10, 05/17 ve 04/25 açılı ve numaralı kanal eğeleri kullanıldı.

Eğe işlemleri**,** EndoRadar Pro (Woodpecker DTE, Guilin, Çin) cihazı ile gerçekleştirilerek 250–400 rpm hız aralığında ve 2.5 Ncm torkla uygulandı. Son kullanılan eğe ile ayrıca kanal duvarlarına çevresel eğeleme uygulandı.



Resim 11. Çalışmada kullanılan EndoRadar Pro Endo-Motor cihazı

Eğeleme sonrası 30 G ucu kapalı yandan açık iğne (Medic, Şangay, Çin) ile 2.5 mL'lik şırınga (Genject) (Resim 12) kullanılarak, her kanalda 2,5 mL, kök ucunda 0.5 mL steril distile su ile irigasyon yapıldı. Kontrol grubundaki tüm dişler de aynı irigasyon işlemine tabi tutuldu. Apikalden taşan materyalin değerlendirilmesi amacıyla, her bir diş için (n=18) iriganttan örnek alındı. Bu örneklerden doğrudan ekim ve 10^{-1}–10^{-5} arası seri dilüsyonlar hazırlanarak uygun besiyerlerine yayma ekimi yapıldı.

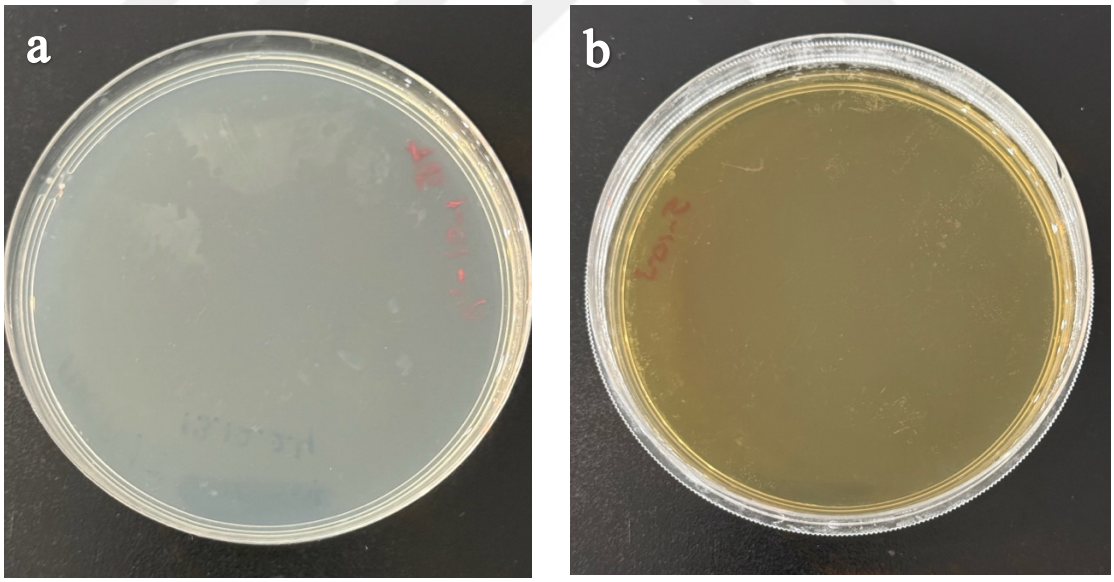


Resim 12. Çalışmada kullanılan şırınga ve 30 G ucu kapalı yandan açık iğne ucu

E. faecalis grubu örnekleri BEA, *C.albicans* grubu örnekleri antibiyotik (gentamisin ve kloramfenikol) içeren SDA, miks biyofilm grubu örnekleri ise her iki agara (BEA ve SDA) ekildi.



Resim 13. Steril distile su ile irigasyon sonrası taşan sıvı



Resim 14. (*a*) Antibiyotik içeren SDA (*b*) BEA

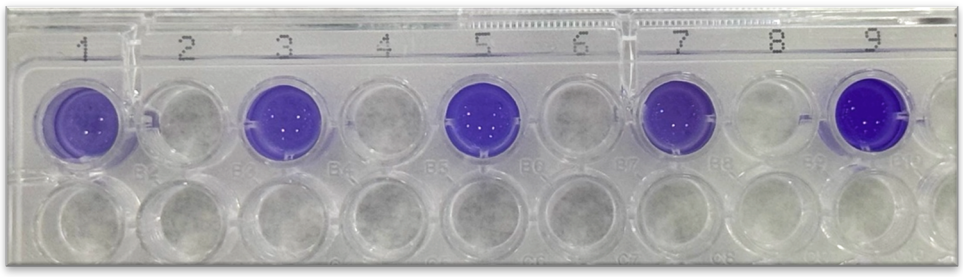
Tüm plaklar 37 °C'de 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonunda uygun dilüsyon seviyesindeki petriler seçilerek koloni sayımı yapıldı. Her örnek için apikalden taşan mikrobiyal yük CFU/mL olarak belirlendi ve kayıt altına alındı.

3.6. KV ile Biyofilm Miktarı Tayini

Eğelenen diş örneklerinin yarısı (*n = 7*), biyofilm miktarının kalitatif ve morfolojik olarak değerlendirilmesi amacıyla KV boyama yöntemi ile analiz edilmiştir. Dişler biyofilm boyaması amacıyla %0.1 KV solüsyonu ile 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Bu boyama işlemi ile kanal duvarlarına tutunmuş biyofilmin belirginleşmesini sağlandı. Daha sonra dişler, steril PBS ile nazikçe yıkanarak yüzeydeki artıklar ve gevşek tutunmuş MO'lar uzaklaştırıldı. Ardından örnekler etüvde kurutuldu ve bu gruptaki (*n* = 7) her bir diş longitudinal olarak ikiye kesildi. Kesit alınan örneklerde KV ile boyanmış biyofilm varlığı ve dağılımı, ışık mikroskobu (Zeiss Axiocam 105 Color, Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi.

3.7. OD Ölçümü ile Biyofilm Miktarı Tayini

Eğelenen diş örneklerinin diğer yarısı (*n* = 7), biyofilmdeki mikrobiyal yükün kantitatif (nicel) ölçümü için değerlendirilmiştir. Bu gruptaki dişler de biyofilm boyaması amacıyla %0.1 KV solüsyonu ile 37 °C'de 15 dk inkübe edildi. Daha sonra dişler, steril PBS ile yıkandı. Ardından örnekler etüvde kurutuldu; her bir dişe, 200 µL, %95 etanol ve %5 asetik asit içeren çözelti 1 dk boyunca uygulandı, örnekler biyofilmin çözülmesi için vortekslendi. Her bir örnek için biyofilm çözeltisinden 200 µL alınarak 96 kuyucuklu mikrotitre plakasına aktarıldı ve 595 nm dalga boyunda OD ölçümü yapıldı (µQuant ELISA Reader, Bio-Tek Instruments, Winooski, VT, ABD).



Resim 15. 96 kuyucuklu mikrotitre plakasına alınmış biyofilm çözeltisi (1-3-5-7 numaralı kuyucuklar eğeleme işlemi uygulanan dişlere ait, 9 numaralı kuyucuk kontrol dişe aittir.)

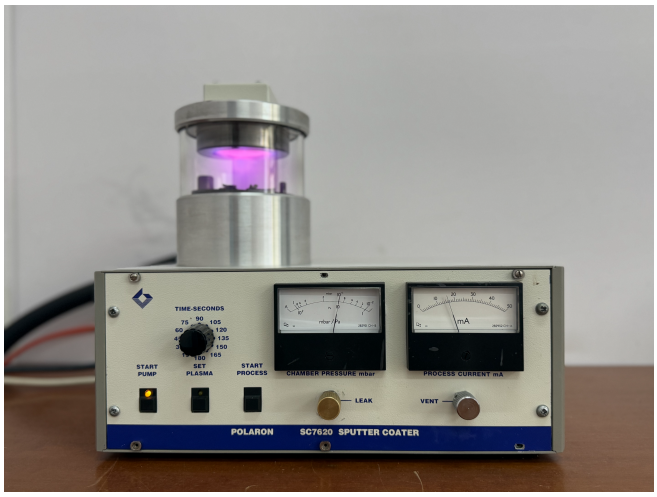
3.8. TEM ile Biyofilm Morfolojisinin Değerlendirilmesi

Her gruptan, eğeleme yapılan ve yapılmayan birer diş doğrudan kesildi ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Elektron Mikroskobu ve Görüntüleme Merkezi'nde bünyesinde bulunan TEM laboratuvarındaki cihaz (Zeiss, LEO-1430, Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi.



Resim 16. Örneklerin TEM incelenmesi için hazırlanması

Bu analiz ile biyofilm yapılarının yüzey morfolojisi ve yapışma özellikleri mikroskobik düzeyde değerlendirildi. Fiksasyon işlemi için %2.5'luk glutaraldehit ve %1'lik osmiyum tetroksit kullanıldı. Glutaraldehit ile 30 dk, osmiyum tetroksit ile 1 saat süreyle fiksasyon uygulandı. Örnekler etanol ile dehidrate edildikten sonra vakum evaporatörde altın-paladyum ile kaplandı (Polaron SC7620, Quorum Technologies Ltd., İngiltere).



Resim 17. Örneklerin iletken hale gelmesi için, Polaron SC7620 Sputter Coater cihazı ile altın paladyum ile kaplanması.

E. faecalis ve *C. albicans*'ın dentin tübüllerine penetrasyonu, TEM ile gözlemlendi ve görüntüler 15,00 kV hızında, 8000-10000X büyütme ile elde edildi.



Resim 18. Kullanılan TEM cihazı

3.9. İstatiksel Analiz

Çalışmamızda apikal bölgeden taşan bakteri miktarlarının karşılaştırılması amacıyla yapılan analizler IBM SPSS Statistics for Windows, Version 26.0 (IBM Corp., Armonk, New York, ABD) yazılımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Verilerin

normal dağılım göstermemesi nedeniyle analizlerde nonparametrik test yöntemleri tercih edilmiştir. Tanımlayıcı istatistikler ortalama, standart sapma, medyan ve minimum-maksimum değerleri ile sunulmuştur. İki bağımsız grup karşılaştırmalarında Mann-Whitney U testi**,** üç veya daha fazla grup arasındaki karşılaştırmalarda ise Kruskal-Wallis H testi kullanılmıştır. Kruskal-Wallis testi sonucunda anlamlı fark saptanan değişkenlerde, gruplar arası farkın hangi gruplardan kaynaklandığını belirlemek amacıyla Bonferroni düzeltmeli post-hoc analiz uygulanmıştır. Çalışmada istatiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

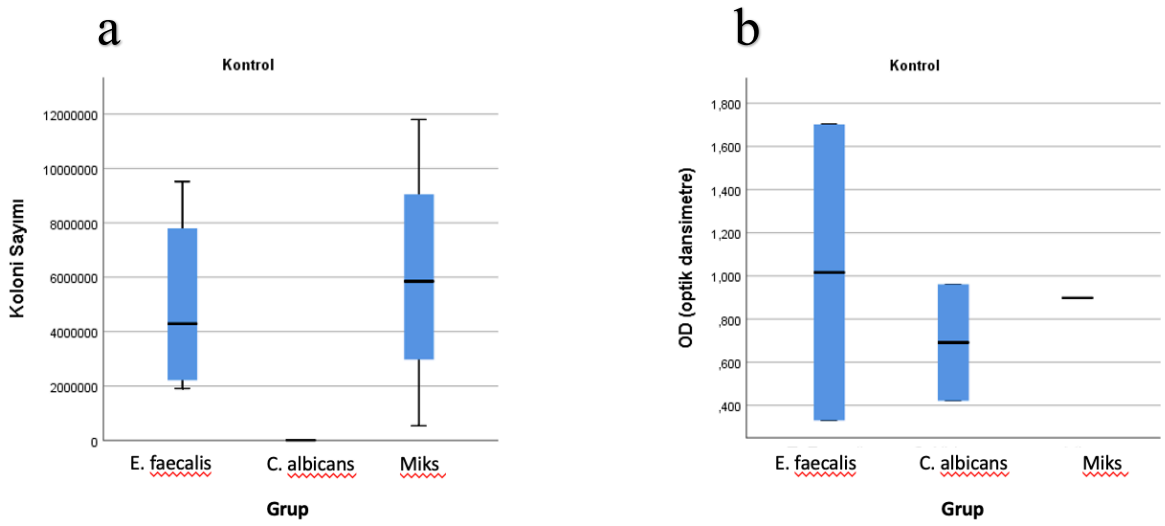
Bu çalışmada farklı biyofilmler ile enfekte edilmiş kök kanallarında yapılan şekillendirme işlemleri sırasında apikalden taşan bakteri miktarları, hem koloni sayımı hem de OD ölçümleriyle değerlendirilmiştir. Bulgular, kontrol ve deney grupları düzeyinde ayrı ayrı ve birleşik olarak analiz edilmiştir. Analizlerde nonparametrik testler tercih edilmiş olup anlamlılık düzeyi $p<0,05$ olarak kabul edilmiştir.

Tablo 1. Kontrol grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	***E. faecalis***	*4*	5002500.000 [a]	3527202.622	4290000.000	7610000.000	***.024***
	C. albicans	*4*	2595.000 [b]	1322.258	2380.000	3020.000	
	Miks	*4*	6019285.00 [a]	4608446.55	5850000.000	11260000.000	
OD	***E. faecalis***	*4*	1.016	.970	1.016	1.372	*.995*
	C. albicans	*4*	.691	.382	.691	.540	
	Miks	*4*	.898	.	.898	.000	

** Kruskal-Wallis H testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyi; a,b: Bonferroni Post-Hoc testine göre farklı grupları gösterir.*

Kontrol grubundaki örneklerde farklı mikrobiyal işlem gruplarına göre elde edilen koloni sayımı ve OD değerleri Tablo 1'de sunulmuştur. Elde edilen verilere göre, koloni sayımı açısından işlem grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur ($p = 0.024$). *E. faecalis* ve miks gruplarındaki koloni sayıları, *C. albicans* grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksektir. OD ölçümleri gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir ($p = 0.995$).



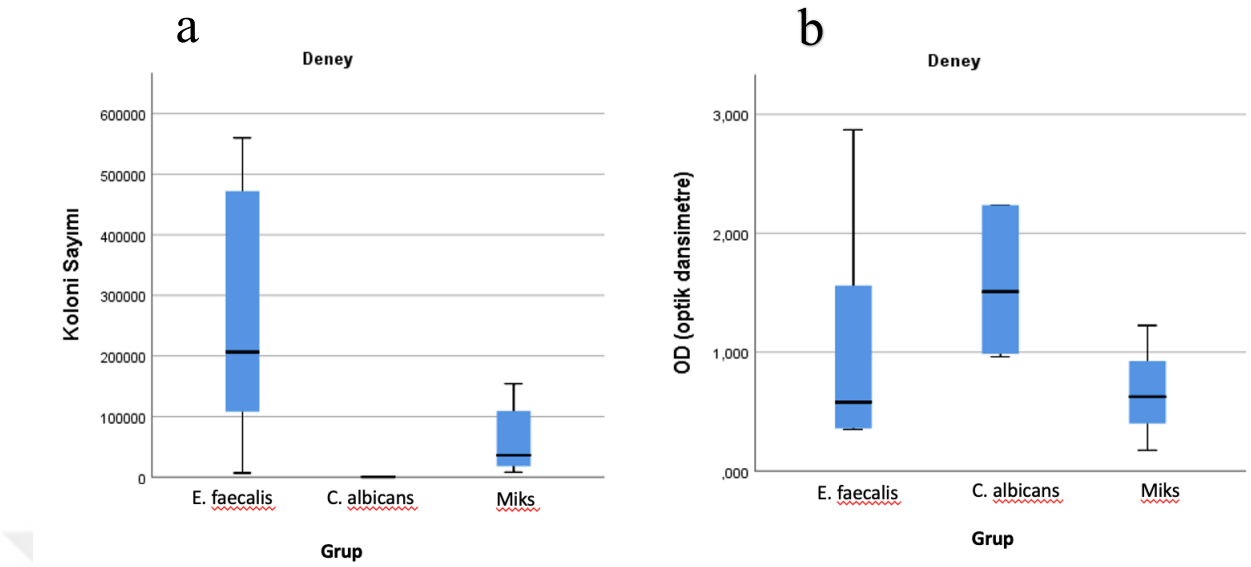
Şekil 6. Kontrol grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

Tablo 2. Deney grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	***E. faecalis***	*14*	328784.286 [a]	387210.390	206500.000	1513300.000	***.001***
	C. albicans	*14*	3647.143 [b]	12768.345	180.000	47980.000	
	Miks	*15*	146365.33[a]	232577.62	36000.000	776000.000	
OD	***E. faecalis***	*14*	1.027	.910	.579	2.520	*.141*
	C. albicans	*14*	289.367	705.273	1.510	1728.039	
	Miks	*15*	.675	.527	.625	1.051	

** Kruskal-Wallis H testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyi; a,b: Bonferroni Post-Hoc testine göre farklı grupları gösterir.*

Tablo 2'de verilen verilere göre ; deney grubunda MO grupları arasında koloni sayımı açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.001). *E. faecalis* ve miks gruplarındaki koloni sayıları, *C. albicans* grubuna göre anlamlı derecede yüksektir. OD ölçümleri gruplar arasında anlamlı fark göstermemiştir (p = 0.141), özellikle *C. albicans* grubunda yüksek varyasyon gözlenmiştir.



Şekil 7. Deney grubunda ölçümlerin farklı MO gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

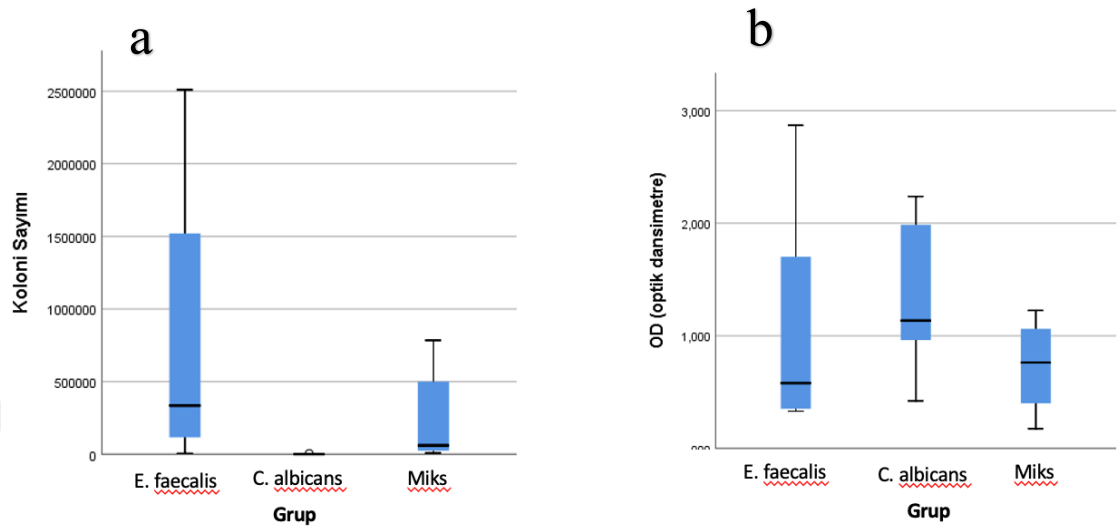
Tablo 3. Genel (deney+kontrol) düzeyde ölçümlerin bakteri gruplarına göre karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	***E. faecalis***	*18*	1367387.778 [a]	2511508.967	334500.000	9513300.000	***.001***
	C. albicans	*18*	3413.333 [b]	11188.458	300.000	47980.000	
	Miks	*19*	1378947.368 [a]	3102814.304	60000.000	11792000.000	
OD	***E. faecalis***	*18*	1.025	.865	.579	2.541	*.211*
	C. albicans	*18*	217.198	610.860	1.136	1728.579	
	Miks	*19*	.731	.445	.762	1.051	

** Kruskal-Wallis H testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyi; a,b: Bonferroni Post-Hoc testine göre farklı grupları gösterir.*

Genel düzeyde elde edilen ölçümlerin karşılaştırmalı dağılımı Tablo 3'te sunulmuştur. Koloni sayımı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (p = 0.001). *E. faecalis* ve Miks gruplarındaki koloni sayıları, *C.*

albicans grubuna kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksektir. OD değerleri açısından ise gruplar arasında anlamlı bir fark saptanmamıştır (p = 0.211).



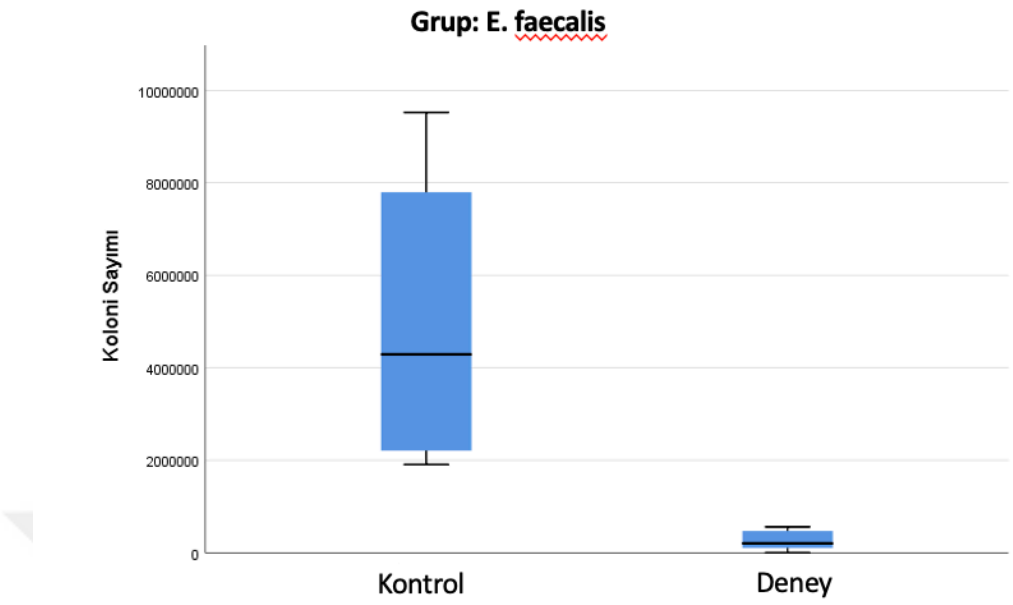
Şekil 8. Genel düzeyde ölçümlerin farklı bakteri gruplarına göre karşılaştırılması, çizgi grafiği *(a)* koloni sayımı, *(b)* OD ölçümü

Tablo 4. *E. faecalis* grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	**Kontrol**	*4*	5002500.000	3527202.622	4290000.000	7610000.000	***.003***
	Deney	*14*	328784.286	387210.390	206500.000	1513300.000	
OD	**Kontrol**	*4*	1.016	.970	1.016	1.372	*.600*
	Deney	*14*	1.027	.910	.579	2.520	

** Mann-Whitney-U testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyleri*

E. faecalis ile inoküle edilen örneklerde deney ve kontrol gruplarına ait verilerin karşılaştırmalı dağılımı Tablo 4'te detaylı şekilde gösterilmiştir. Kontrol grubunda, koloni sayısı deney grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur (p = 0.003). OD değerleri değerlendirildiğinde ise gruplar arasında anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir (p = 0.600).



Şekil 9. *E. faecalis* grubunda ölçümlerin deney kontrol arası karşılaştırılması, çizgi grafiği

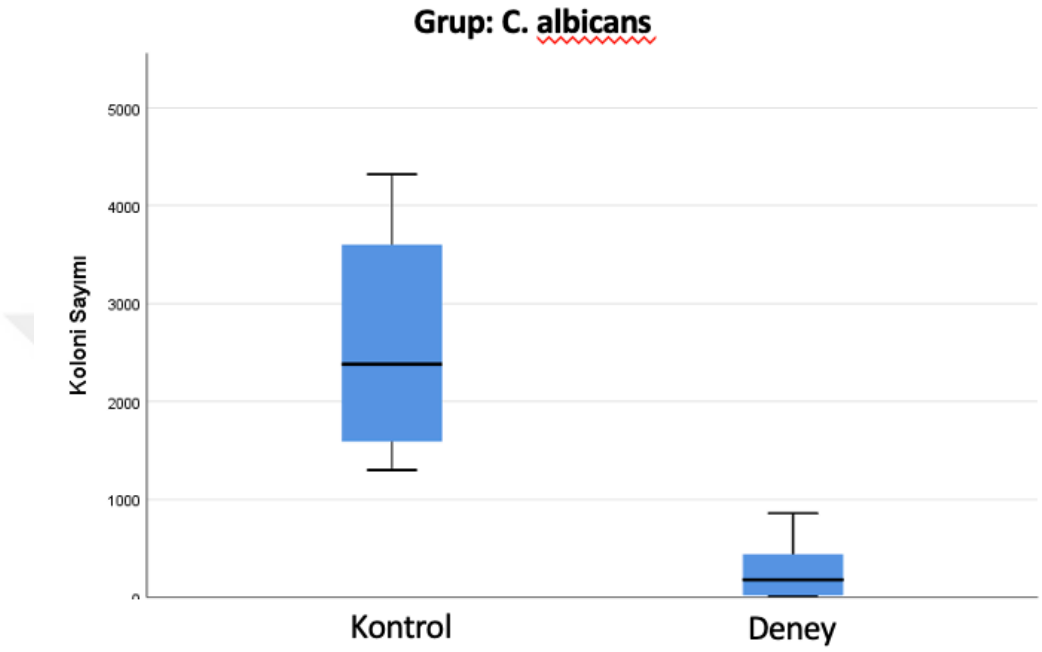
Tablo 5. *C.albicans* grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart Sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	**Kontrol**	*4*	2595.000	1322.258	2380.000	3020.000	***.010***
	Deney	*14*	3647.143	12768.345	180.000	47980.000	
OD	**Kontrol**	*4*	.691	.382	.691	.540	*.065*
	Deney	*14*	289.367	705.273	1.510	1728.039	

** Mann-Whitney-U testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyleri*

C. albicans grubuna ait ölçümlerin deney ve kontrol gruplarına göre karşılaştırmalı dağılımı Tablo 5'te detaylı şekilde sunulmuştur. Koloni sayımı açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p = 0.010). Deney grubunun medyan değerinin, kontrol grubuna kıyasla anlamlı ölçüde daha düşük olduğu saptanmıştır. OD ölçümleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak

anlamlı bir fark bulunmamakla birlikte (p = 0.065), deney grubunda yüksek varyasyon gözlenmiştir.



Şekil 10. *C. .albicans* grubunda ölçümlerin deney kontrol arası karşılaştırılması, çizgi grafiği

Tablo 6. Miks grubunda ölçümlerin "deney-kontrole göre" karşılaştırma sonuçları

		n	Ortalama	Standart sapma	Medyan	Ranj	**p.*
CFU/mL	**Kontrol**	*4*	6010000.000	4615235.639	5850000.000	11260000.000	***.004***
E. faecalis	**Deney**	*15*	144000.000	228348.105	36000.000	776000.000	
OD	**Kontrol**	*4*	.898	.	.898	.000	*.655*
	Deney	*15*	.675	.527	.625	1.051	
CFU/mL	**Kontrol**	*4*	9285.000	7155.201	8000.000	16460.000	***.016***
C. albicans	**Deney**	*15*	2365.333	7071.854	40.000	27000.000	

** Mann-Whitney-U testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyleri*

Miks grubunda elde edilen bulgular Tablo 6'da sunulmuştur. *E. faecalis* koloni sayısı açısından, kontrol grubunda (Medyan = 5.850.000) deney grubuna (Medyan = 36.000) göre istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek değerler elde edilmiştir (P = 0,004). Benzer şekilde, *C. albicans* koloni sayısı da kontrol grubunda (Medyan = 8.000) deney grubuna (Medyan = 40) kıyasla anlamlı olarak daha yüksektir (P = 0,016). Buna karşın, OD ölçümleri arasında gruplar arası anlamlı bir fark saptanmamıştır (P = 0,655).

Tablo 7. Tekli ve miks gruplarda *E. faecalis* koloni oluşumunun karşılaştırılması

		n	**Ortalama**	**Standart sapma**	**Medyan**	**Ranj**	****p***
CFU/mL	**Tekli**	*14*	328,784.29	387.210.39	206.500	6,700 – 1,520,000	***0.0576***
	Miks	*15*	144,000.00	228,348.11	36.000	8,000 – 784,000	

** Mann-Whitney-U testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyleri*

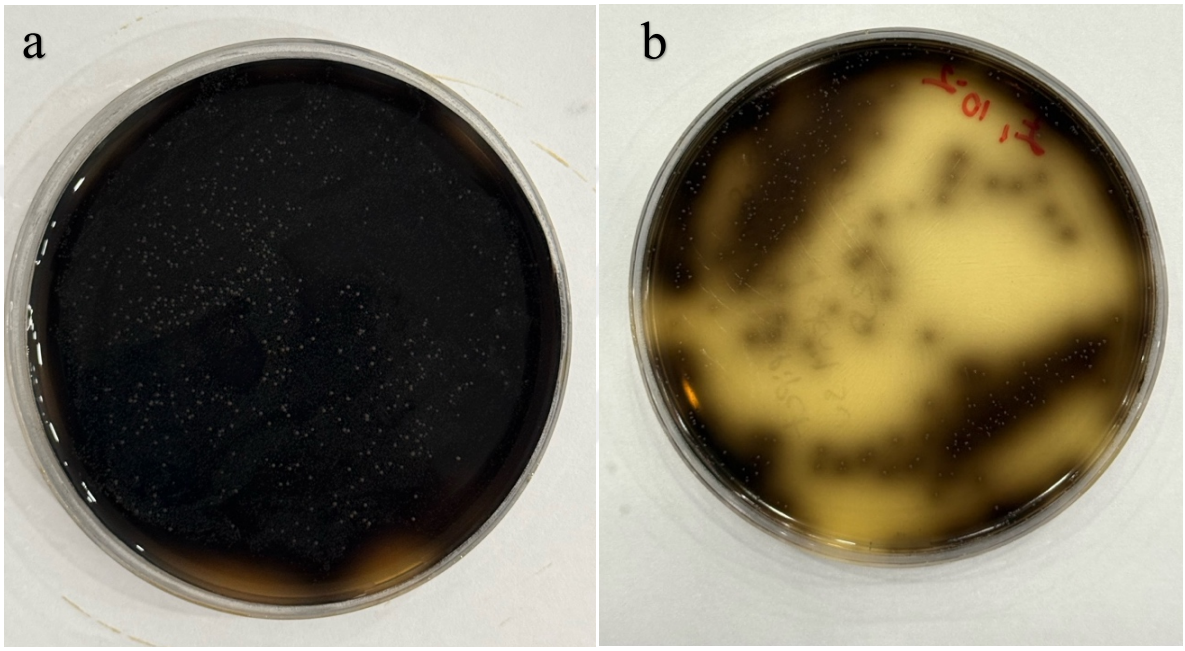
*E. faecalis'*in tekli ve miks biyofilm gruplarındaki koloni oluşumu Tablo 7'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. Kontrol grubu verileri incelendiğinde; miks biyofilm koşullarında koloni sayılarında, tekli biyofilme kıyasla ortalama ve medyan düzeylerinde artış gözlenmiş olsa da, bu fark istatistiksel olarak anlamlı değildir. Deney grubu örnekleri karşılaştırıldığında, *E. faecalis*'in tekli ve miks biyofilm ortamlarında oluşturduğu koloni sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p = 1.000).

Tablo 8. Tekli ve miks gruplarda *C. albicans* koloni oluşumunun karşılaştırılması

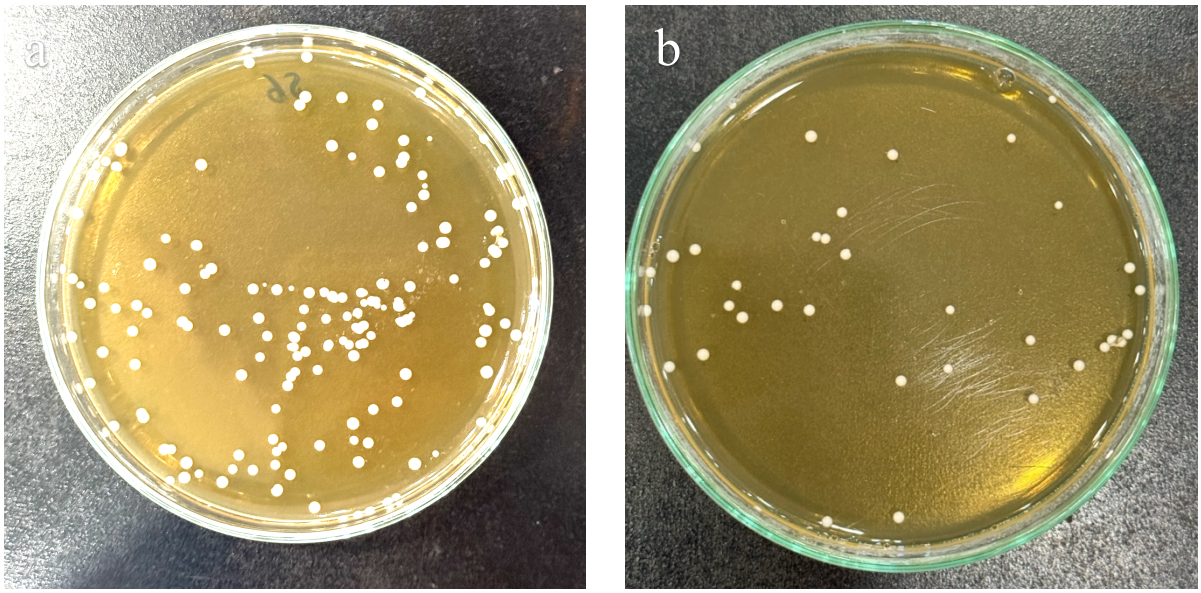
		n	**Ortalama**	**Standart sapma**	**Medyan**	**Ranj**	****p***
CFU/mL	**Tekli**	*14*	3.647.14	12.768.34	180	20 – 48,000	***0.1997***
	Miks	*15*	2.365.33	7.071.85	40	0 – 27,000	

** Mann-Whitney-U testine göre gruplar arası anlamlılık düzeyleri*

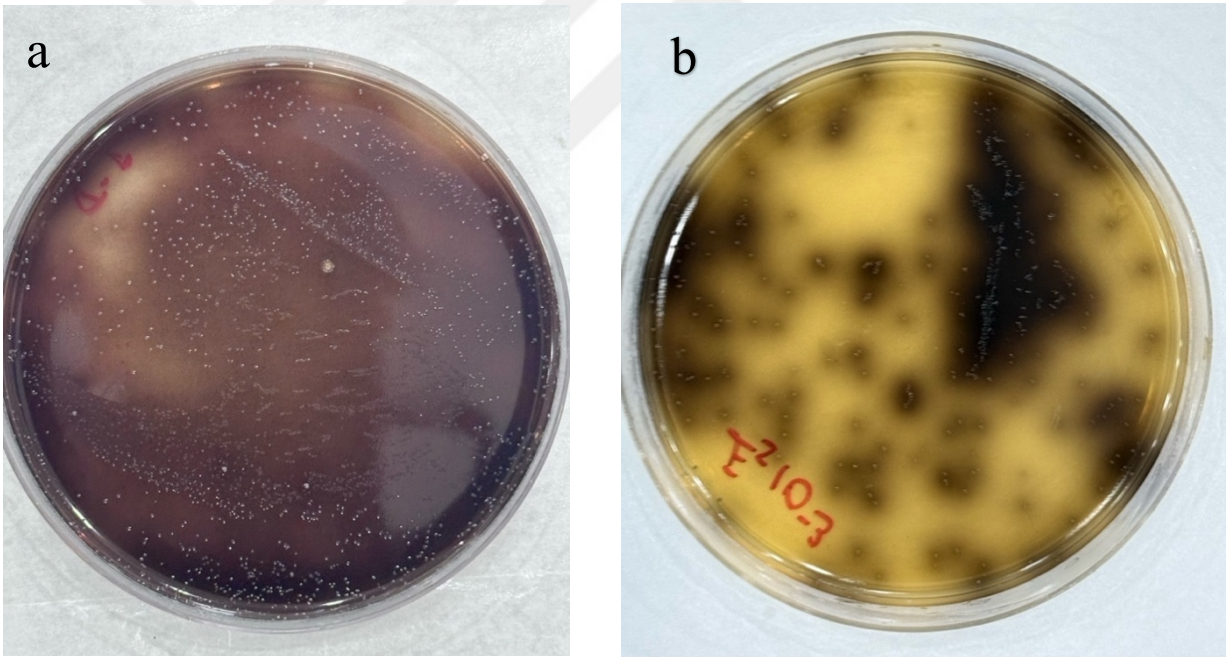
C. albicans' a ait tekli ve miks biyofilm gruplarındaki koloni oluşumu Tablo 8'de karşılaştırmalı olarak sunulmuştur. *C. albicans'*a ait koloni sayıları hem tekli hem de *E. faecalis* ile birlikte bulunduğu miks grupta, deney koşullarında anlamlı şekilde azalmıştır. Kontrol gruplarındaki medyan değerler karşılaştırıldığında; miks grubundaki C. *albicans* koloni sayısı, tekli biyofilmdeki *C. albicans* koloni sayısına göre daha yüksektir.



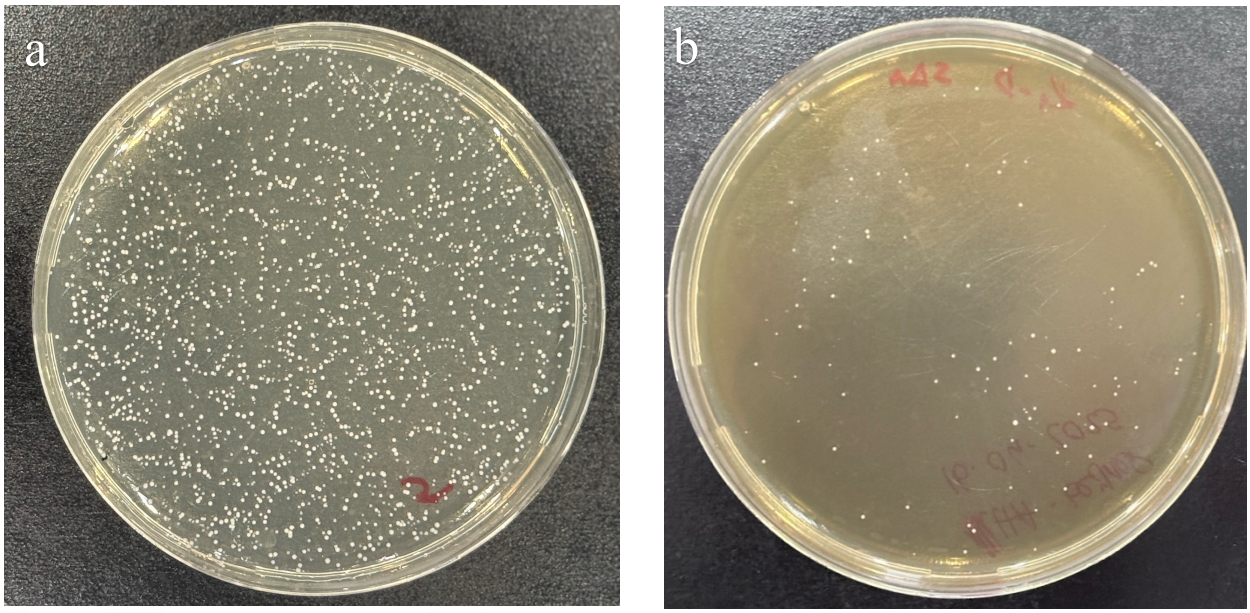
Resim 19. *E. faecalis* ile enfekte edilen dişlerin bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu



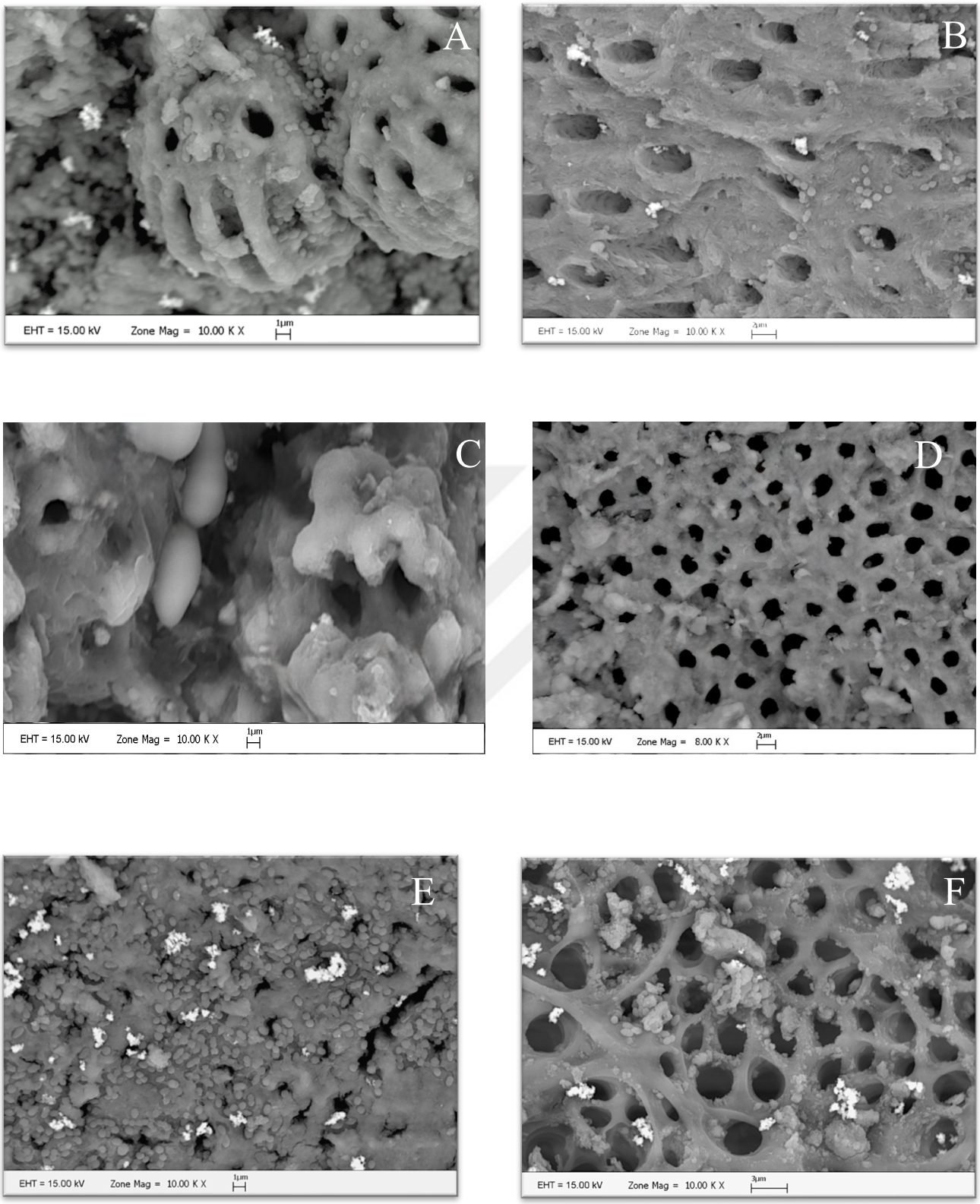
Resim 20. *C. albicans* ile enfekte edilen dişlerin bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu



Resim 21. Miks grup - *E. faecalis* bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu



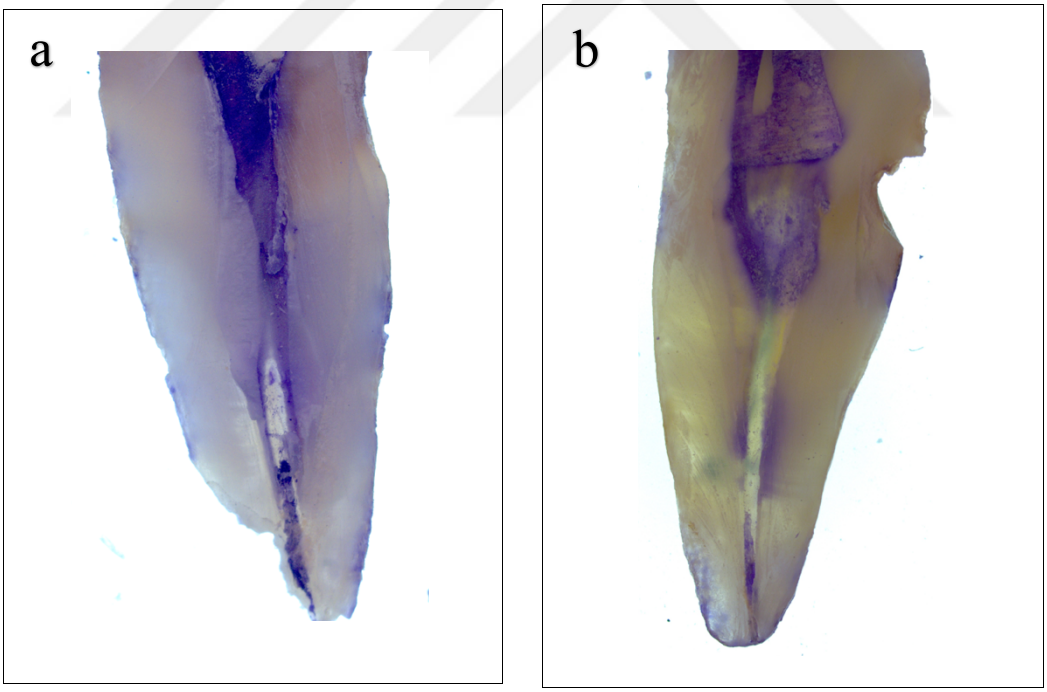
Resim 22. Miks grup- *C. albicans* bakteriyel örneklemesi *(a)* kontrol *(b)* deney grubu



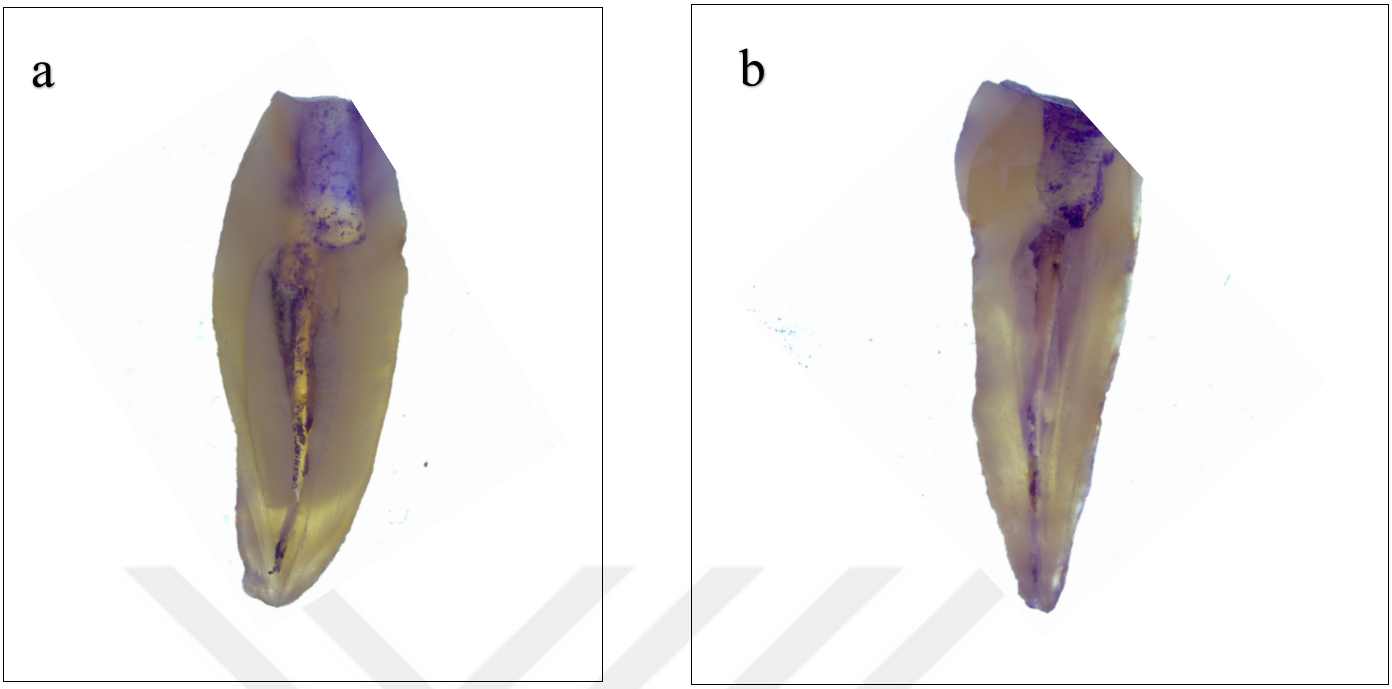
Resim 23. 8000-10000X büyütmede kök kanal dentini üzerinde oluşan 7 günlük biyofilm TEM görüntüleri : **A-B**: *E. faecalis (A)* kontrol *(B)* deney grubu **C-D:** *C. albicans. (C)* kontrol *(D)* deney grubu **E-F:** Miks *(E)* kontrol *(F)* deney grubu



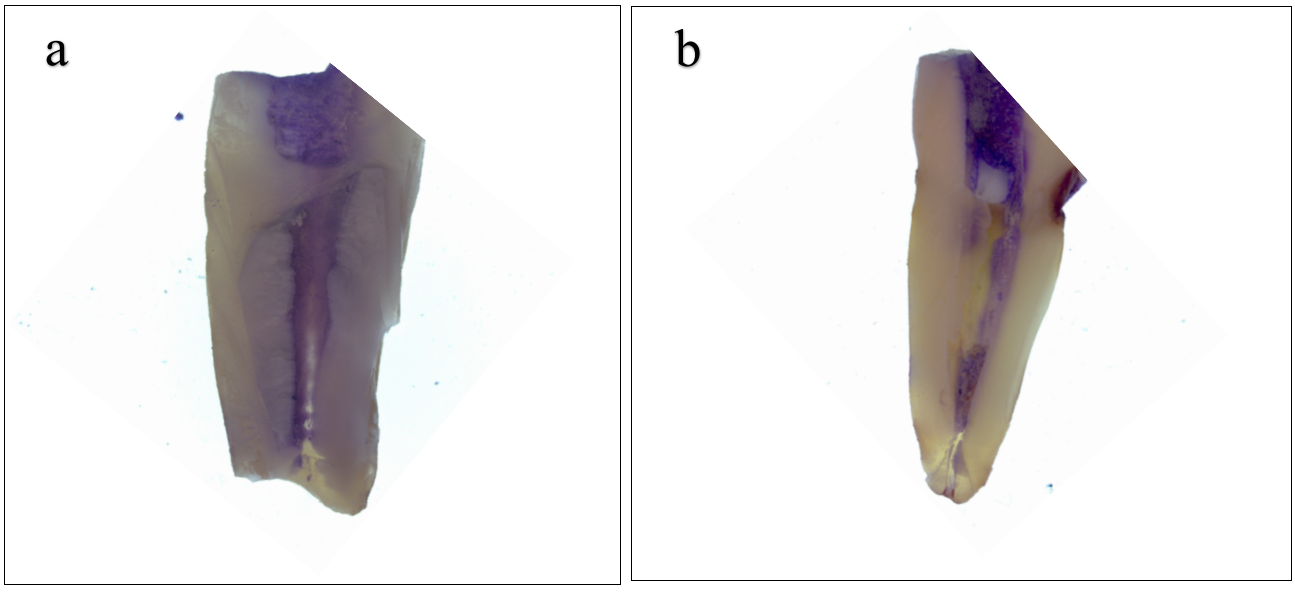
Resim 24. OD ölçümü için kullanılan bir diş örneği- ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü (KV ile boyama sonrası %95 etanol ve %5 asetik asit içeren çözelti 1 dk boyunca uygulandı ve biyofilm çözdürüldü.)



Resim 25. *E. faecalis* grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu



Resim 26. *C. albicans* grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu



Resim 27. Miks grubu: KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında inceleme görüntüsü *(a)* kontrol, *(b)* deney grubu

Kontrol grubuna ait örneklerde, KV boyasıyla belirgin şekilde boyanmış dentin yüzeylerinde yoğun biyofilm varlığı gözlenmektedir. Deney grubuna ait örneklerde, kök kanal duvarlarında KV boyası ile daha sınırlı alanlarda boyanma gözlenmiş, biyofilm birikiminin azaldığı izlenmiştir.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada dentin tübüllerinde bulunan *E. faecalis*, *C. albicans* ve bu iki MO'nın bir arada bulunduğu miks biyofilmlerin kök kanal şekillendirme işlemi sırasında apikal bölgeden taşma miktarları; CFU/mL tayini, OD ölçümü ve KV ile boyama sonrası ışık mikroskobu altında yapılan morfolojik inceleme yöntemleriyle değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre üç grupta da kontrol grubunda, koloni sayısı deney grubuna kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. *E. faecalis* ve miks gruplarındaki koloni sayıları, *C. albicans* grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yine her grupta *E. faecalis'* e ait koloni sayıları, *C. albicans'*a ait koloni sayılarına göre anlamlı derecede yüksektir. Tüm gruplarda OD ölçümü açısından anlamlı bir fark saptanmamıştır.

KKT'nin başarısı, kanal sisteminde bulunan MO'ların, pulpa artıklarının ve dentin artıklarının uzaklaştırılmasının ardından kanalın sızdırmaz şekilde doldurulmasına bağlıdır (186). Mekanik şekillendirme işleminin temel amacı, etkili bir kanal dolgusu yapılabilmesi için ideal dezenfeksiyon koşullarını sağlamaktır (186). Bu süreçte dentin duvarlarına tutunmuş biyofilmin uzaklaştırılması, mikrobiyal yükün azaltılmasına katkı sağlar. Ancak, kök kanal sisteminde yer alan lateral kanallar, aksesuar kanallar, isthmuslar, apikal delta ve finler gibi anatomik kompleks yapılar, dezenfeksiyonu zorlaştıran bölgeler olarak karşımıza çıkar (187). Nitekim bazı araştırmalarda (188) mekanik şekillendirme sonrasında kök kanal yüzeyinin yaklaşık %30-50'lik kısmının eğeler tarafından yeterince şekillendirilemediği bildirilmiştir. Bu nedenle irigasyon, yalnızca şekillendirme işlemini desteklemekle kalmaz; aynı zamanda dezenfeksiyonun tamamlanması ve tedavi başarısının artırılması açısından hayati bir basamaktır.

KKT sürecinde uygulanan çeşitli şekillendirme teknikleri ve kullanılan irigantlar, işlem sırasında periapikal bölgeye irigasyon sıvısı, mikrobiyal içerik veya kanal içi kalıntıların taşmasına yol açabilmektedir. Bu taşma; periapikal dokularda inflamasyon ve hassasiyet gibi olumsuz klinik tablolara neden olabileceği gibi, bölgedeki mikrobiyal dengeyi ve konak yanıtını bozarak kısa vadede akut alevlenmelere, uzun vadede ise iyileşme sürecinde gecikmelere sebebiyet verebilmektedir (22,180). Bugüne kadar, preparasyon sırasında periapikal alana

ulaşan irigant, debris ve bakteriyel yükün nicel olarak değerlendirilmesine yönelik; farklı preparasyon yöntemleri, uygulama teknikleri ve irigasyon çözeltilerini karşılaştıran çalışmalar literatürde mevcuttur (20,189,190).

Bu *in vitro* çalışmada, farklı biyofilm tipleri ile kontamine edilmiş kök kanallarında, tek tip bir döner NiTi eğe sistemi kullanılarak gerçekleştirilen preparasyonun apikal bölgeye taşan bakteri miktarı üzerindeki etkisi değerlendirilmiştir. Aynı zamanda, uygulanan kök kanal preparasyonunun, kök kanalı içerisindeki *E. faecalis* ve *C. albicans* MO'larının eliminasyonu üzerindeki etkinliği araştırılmıştır.

Tüm deneysel işlemler, metodolojik standardizasyonu sağlamak ve değişkenliği en aza indirmek amacıyla tek bir araştırmacı tarafından uygulanmıştır.

Endodontide biyofilm modeli oluşturmak amacıyla yapılan çalışmalarda; çekilmiş insan dişleri, sığır dişleri ve polimetilmetakrilat gibi biyolojik olmayan materyaller sıklıkla tercih edilmektedir (129). İnsan dişlerinin farklı yaş gruplarından ve bireylerden elde edilmesi, dentin yapısında ve bileşiminde belirli bir heterojenlik yaratmaktadır. Özdemir ve ark. (191) *E. faecalis*'in genç ve yaşlı bireylere ait dentin dokusuna tutunma eğilimini karşılaştırdıkları çalışmalarında, yaşlı dentinde daha yoğun ve hacimli biyofilm gelişimini gözlemlemişlerdir. Biyolojik olmayan materyallerin kullanımı örnekler arasında daha yüksek düzeyde standardizasyon sağlama avantajı sunsa da bu materyallerin idealize edilmiş yuvarlak yapısı, düzgün yüzey özellikleri ve düz kanal seyri nedeniyle gerçek klinik koşulları tam olarak yansıtmadığı belirtilmektedir (129). Ayrıca, MO'ların sentetik yüzeylere tutunma biçimi doğal dentinden farklılık gösterebileceğinden, biyofilm oluşumunun yapısal karakteristiği de değişebilir. Nitekim literatürde, doğal insan dişlerinin morfolojik özelliklerinin bakteriyel adezyon ve biyofilm gelişimi üzerinde belirleyici bir etkisi olduğu vurgulanmaktadır (81). Bu çalışmada, Haapasalo ve Ørstavik'in (142) tanımladığı enfekte dentin modeline benzer şekilde belirli bakteriler ile kontamine edilmiş çekilmiş insan dişleri kullanılmıştır. Ancak, çalışmamızda dişlerin şekillendirilmeden bakteri inokülasyonuna tabi tutulması ve bütün diş yapısının korunması, klinik durumu daha yakından yansıtan bir model oluşturmayı amaçlamıştır.

Kök kanal içeriğinin periapikal bölgeye taşma miktarının değerlendirilmesinde; kullanılan dişin tipi, kök kanalının anatomik yapısı ve genişliği, tercih edilen preparasyon yöntemi, kullanılan kanal aletlerinin türü ve boyutu, şekillendirme işleminin sonlandırıldığı seviye ile irigant ve irigasyon tekniği gibi birçok etken rol oynamaktadır. Bu konuda literatürde yapılan çeşitli çalışmalarda farklı diş tipleri tercih edilmiştir. Örneğin; Ghogre ve ark (192) çalışmalarında tek kök ve tek kanallı alt çene küçük azı dişleri kullanırken; Patel ve ark. (193) tek köklü üst çene keserler, Tinoco ve ark. (194) tek köklü ve tek kanallı alt çene keser dişleri tercih etmişlerdir. Low ve Jie (195) çalışmalarında alt çene büyük azı dişleri kullanmışlardır. Aydın ve ark. (196) farklı kanal morfolojisine sahip dişlerde uygulanan döner sistemlerin apikal bakteriyel ekstrüzyon düzeylerini karşılaştırmış; kanal eğimi ya da diş tipi gibi morfolojik değişkenlerin ekstrüzyon miktarını anlamlı şekilde etkilemediğini raporlamışlardır.

Çalışmamızda, toplam 54 adet çekilmiş insan alt çene küçük azı dişi kullanılmıştır. Alt küçük azı dişlerinin sıklıkla tip 1 kanal morfolojisine sahip olması, kanal seyrinin genellikle düz ve erişilebilir yapıda bulunması, deneysel çalışmalarda uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Ayrıca, literatürde benzer çalışmalarda bu diş grubunun tercih edilmiş olması, elde edilen verilerin karşılaştırılabilirliğini artıran önemli bir unsurdur (194,196). Bu nedenlerle, çalışmamızda standart bir örnek yapısı sağlamak amacıyla alt çene küçük azı dişleri tercih edilmiştir.

Farklı diş boyutlarının çalışma sonuçları üzerinde yaratabileceği etkileri en aza indirmek amacıyla, tüm örneklerin uzunluğu 18 mm olacak şekilde standardizasyon sağlanmıştır. Kron kısmı tamamen uzaklaştırılmamış, bakterilerin daha etkin tutulması ve besin rezervuarı işlevi görmesi amacıyla bir miktar bırakılmıştır. Çekilmiş insan dişleriyle gerçekleştirilen çalışmalarda boyutun standart hale getirilmesi hem bakteriyel inokülasyon sürecini hem de kök kanal şekillendirme işlemini daha kontrollü ve karşılaştırılabilir hale getirmeyi amaçlamaktadır (142,197).

Biyofilm modellemelerinde kök kanallarının inokülasyon öncesinde şekillendirilmesi, bakterilerin dentin tübüllerine daha etkin penetrasyonunu sağlamak ve mikrobiyolojik değerlendirmelerde örneklemeyi kolaylaştırmak amacıyla yaygın olarak tercih edilmektedir. Bununla birlikte, bu yaklaşım klinik enfeksiyon sürecini

doğrudan yansıtmayabilir (117). Doğal enfekte dişlerde MO'lar genellikle şekillendirme öncesinde yerleşmiş ve organize biyofilm yapıları oluşturmuştur. Bu nedenle, çalışmamızda tercih edilen şekillendirme öncesi inokülasyon modeli, biyofilmlerin klinikteki doğal oluşum sürecini daha doğru temsil etme avantajı taşımaktadır. Her ne kadar tam kanal şekillendirmesi yapılmamış olsa da bakteriyel inokülasyondan önce her bir dişte 15 nolu K-tipi eğe ile giriş yolu oluşturulmuş ve SH, salin ve EDTA ile irigasyon uygulanarak kanallar inokülasyona hazırlanmıştır. Bu işlem, hem enfeksiyonun daha homojen dağılmasını sağlamış hem de biyofilm oluşumu için daha uygun bir mikro ortam yaratmıştır. Öte yandan, tam şekillendirme yapılmadan gerçekleştirilen modelin bir sınırlılığı olarak, bakterilerin kanalın daha derin bölgelerine ulaşımında kısıtlılık oluşabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (117). Dolayısıyla, bu yöntemle klinik gerçekliğe daha yakın bir model elde edilmiş olsa da mikrobiyolojik analiz açısından bazı teknik zorluklar içerebileceği de dikkate alınmalıdır.

Çalışmamızda, dişler *E. faecalis*, *C.albicans* ve ikisinin bir arada olduğu miks bakteri ile kontamine edilmeden önce, dentin tübüllerinin tıkanması ve olası sızıntıların önlenmesi amacıyla köklerin dış yüzeyi tırnak cilası ile kaplanmıştır. Haapasalo ve Ørstavik (142) yürüttükleri *in vitro* çalışmada, tırnak cilası içerisinde yer alan çözücülerin hafif antibakteriyel özellik gösterebileceğini ifade etmiş; ancak bu etkinin kontrol gruplarında anlamlı bir sonuç doğurmadığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda sızıntıyı önlemek amacıyla tüm kök yüzeyi iki kat tırnak cilası ile kaplanmıştır. Tüm dişlerde standart bir apikal açıklık elde edilebilmesi amacıyla bakteri inokülasyonundan önce 15 numaralı K tipi kök kanal eğesi ile apikal foramenden 1mm çıkılarak 0.17 mm'lik apikal açıklık elde edilmiştir.

Kök kanal preparasyonunun sonlandırıldığı seviye, apikal bölgeden dışarı taşan kanal içeriği miktarını doğrudan etkileyen önemli bir parametredir. Çalışma boyu doğru şekilde belirlenmiş olsa dahi, preparasyon sürecinde dentin debrisleri, pulpa dokusuna ait kalıntılar, nekrotik materyaller, MO'lar ve kullanılan irigantları, apikal foramen yoluyla periapikal dokulara ulaşabilmektedir. Bu apikal ekstrüzyon, tedavi sonrası ağrıya ya da akut alevlenmelere zemin hazırlayabilir (20).

Çalışmamızda; apikalden taşan bakteri miktarı üzerine çalışma boyutunun etkisi olduğu göz önüne alınarak, kök kanal aleti apikal foramenden göründüğü noktadan 1 mm geri çekilerek çalışma boyutu belirlenmiştir.

Çalışmamızda kök kanal şekillendirmesi için döner sistemlerden Perfect Super System Advanced Kit tercih edilmiştir. Bu sistem, termal işlem görmüş NiTi alaşımı sayesinde yüksek esneklik ve kırılma direncine sahip olup, apikal bölgeye kadar etkin şekillendirme sağlarken dentin yapısına minimum düzeyde zarar vermesiyle öne çıkmaktadır. Apikal şekillendirme işlemi, apikal daralım (minör apikal foramen) hizasında apikal çap 25 0.4 olacak şekilde standardize edilmiştir.

Literatürde, apikal preparasyonun foramen ötesine taşmasının apikal ekstrüzyon miktarını artırabileceği belirtilmektedir. Tınaz ve ark. (198) apikal daralımın bozulmasının, *E. faecalis* gibi MO'ların apikalden periapikal dokulara taşma miktarını anlamlı düzeyde artırdığını ortaya koymuşlardır. Teixeira ve ark. (199) çalışmalarında farklı çalışma uzunluklarının apikal bakteri ekstrüzyonu üzerindeki etkilerini karşılaştırmış; apikal daralım noktasının 1 mm ötesine kadar yapılan şekillendirmelerde anlamlı düzeyde daha fazla bakteri ekstrüzyonu meydana geldiğini bildirmişlerdir.

Aksel ve ark. (200) tarafından yapılan çalışmada, farklı taper değerlerine sahip eğe sistemlerinin (0.02, 0.04 ve 0.06) bakteriyel ekstrüzyon üzerindeki etkileri değerlendirilmiş; özellikle 0.02 taper ile uygulanan crown-down tekniğinin, bakteriyel ekstrüzyon miktarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde azalttığı bildirilmiştir. Öte yandan, 0.04 ve 0.06 taper gruplarında kullanılan şekillendirme teknikleri arasında anlamlı bir fark tespit edilememiştir.

Çalışmamızda kullandığımız Perfect Super System Advanced Kit döner eğe sistemi de crown-down prensibine uygun olarak tasarlanmıştır ve eğe dizilimi sayesinde kanalın koronal kısmından apikale doğru ilerleyen bir preparasyon protokolü uygulanmıştır.

Endodontik biyofilm modellemelerinde kullanılacak dentin yüzeylerinde anlamlı bir mikrobiyal kontaminasyon riski bulunduğundan, biyofilm inokülasyonundan önce bu yüzeylerin MO'lardan arındırılması ve uygun şekilde sterilize edilmesi

gerekmektedir. Doğal kaynaklı insan ve sığır dişlerinin, içerdikleri endojen MO çeşitliliği ve kompleks morfolojik yapıları nedeniyle tam anlamıyla sterilize edilmesi güç olabilir. CDC, bu tür araştırmalarda kullanılacak çekilmiş dişlerin buharla sterilizasyonuna dair spesifik protokoller önermektedir (201). Literatürde, MO'ların eliminasyonu açısından otoklavlama yönteminin daha etkili olduğu da bildirilmiştir (202). Bu doğrultuda, CDC kılavuzlarında dişlerin 121 °C'de 40 dk süreyle otoklavlanması önerilmektedir. Sunulan çalışmada ise, kontaminasyonun önüne geçmek amacıyla tüm örnek dişler 121 °C, 1 atm basınç altında toplam 45 dk süreyle otoklavda sterilize edilmiştir.

Biyofilm modellemesinin laboratuvar ortamında başarıyla gerçekleştirilebilmesi için, uygun bir kontaminasyon protokolü, biyofilme elverişli bir mikroyapı yeterli süre ve çevresel koşullar gereklidir. Ayrıca enfeksiyöz ajanın (örneğin *E. faecalis* veya *C. albicans*) klinikteki patojeniteyi yansıtacak şekilde seçilmesi, mikrobiyal tutunmayı ve biyofilm gelişimini doğrudan etkilemektedir (130). Dentin tübüllerinin açık olması, yüzeyin mikropürüzlülüğü, besiyerinin bileşimi ve inkübasyon süresi gibi faktörler de biyofilm oluşum dinamiklerini belirleyen kritik unsurlardır (117). Bu nedenle, *in vitro* çalışmaların gerçek klinik koşulları mümkün olduğunca taklit etmesi, elde edilen verilerin translasyonel değerini artırmaktadır (142).

Çalışmamızda, biyofilm oluşumu süresince sterilizasyonu tamamlanmış olan silikon bazlı bir ölçü materyali ile birlikte doğrudan Eppendorf tüpü içerisine yerleştirilmiş dişler 7 gün süreyle inkübasyona bırakılmıştır; bu yönüyle modelimiz, Goulart ve ark. (203) tarafından kullanılan ve köklerin mikro santrifüj tüpü kapağına sabitlendiği düzeneğe benzer şekilde kontrollü bir ortam sağlamış, ancak dişi doğrudan tüp içine gömerek mikrobiyal kolonizasyonun daha stabil bir mikro çevrede gelişmesine imkân tanımıştır. Kök ucunun sızdırmaz bir materyal ile kapatılarak enfekte rezervuar oluşturulmasının, biyofilm modellemelerinde kontaminasyon kontrolü ve standardizasyon sağlama açısından etkili olduğunu bildiren çalışmalar mevcuttur (203,204).

Apikal ekstrüzyonun *in vitro* olarak değerlendirilmesinde, kök kanal preparasyonu sırasında kanaldaki MO veya debrisin yalnızca apikal foramenden yayılımını sağlayacak ve nicel olarak değerlendirmek için tasarlanmış deney düzeneği modelleri yaygın olarak kullanılmaktadır (205–207). Bu tür modellerde, kontaminasyonun

önlenmesi ve deneysel verilerin güvenilirliğinin sağlanması için sızdırmazlık ve basınç dengeleme sistemleri önemli rol oynamaktadır (194,208).

Çalışmamızda biyofilm oluşturma süreci ile kök kanal şekillendirme aşamasına ilişkin deneysel düzenekler birbirinden ayrılmıştır. Yedi günlük inkübasyon sürecinin ardından, dişler steril koşullarda Eppendorf tüplerinden dikkatlice çıkarılarak, kök kanal şekillendirmesi için hazırlanmış steril cam şişelere aktarılmıştır. Dişler, kron kısmı şişe dışında, kök kısmı ise şişe içerisinde kalacak şekilde lastik kapaklara yerleştirilmiş; kapak-diş birleşim yüzeyinde sızdırmazlık sağlamak amacıyla parafilm ile sarılmış ve iç-dış basınç dengesini korumak için kapak üzerine 27 G'lik bir iğne ucu yerleştirilmiştir. Bu deney düzeneği, Tinoco ve ark. (194) tarafından tanımlanan sistemle benzer özellikler taşımakta olup, apikal ekstrüzyonun kontrollü ve standart bir ortamda değerlendirilmesine olanak sağlamaktadır. Özellikle parafilm ile sağlanan sızdırmazlık ve basınç dengelemesi amacıyla kapağa açılan hava kanalı, deneysel ortamdaki kontaminasyonu minimize ederken, enstrümantasyon sırasında kanal içi basınç farklılıklarının ekstrüzyon üzerindeki etkisini kontrol etmeye yardımcı olmaktadır.

Kök kanal preparasyonu sırasında apikalden dış ortama taşabilecek bakteri ve debris miktarının değerlendirilmesi amacıyla, *in vitro* çalışmalarda apikal bölgeye benzer dirence sahip bariyer sistemlerinin oluşturulması önerilmektedir. Bu doğrultuda, Alves ve ark. (190) çalışmalarında dişleri 2 mL'lik eppendorf tüplerine yerleştirerek, tüp ve diş arasındaki boşlukları epoksi bazlı yapıştırıcı ile sızdırmaz şekilde kapatmış ve apikalden ekstrüde olan materyali doğrudan tüp içinde toplama yöntemini tercih etmişlerdir. Bu yöntem, sistemin basitliği ve kontaminasyona karşı etkinliği bakımından dikkat çekmektedir.

Benzer şekilde, Cabreira ve ark**.** (209) ise periapikal dokuların direncini taklit edebilmek için %1.5 agaroz jel kullanarak apikal kök ucunu tamamen bu jel ile kaplamışlardır. Bu sayede hem apikal sızıntı önlenmiş hem de ekstrüde olan bakteriler kontrollü bir şekilde jel içinde toplanmıştır. Araştırmacılar, bu modelin apikal direnç benzeşimi açısından etkili bir çözüm sunduğunu ve önceki modellerdeki sınırlılıkların bu şekilde giderildiğini ifade etmişlerdir.

Kök kanal preparasyonu ve irrigasyonu sırasında MO'ların, debrisin veya irigantların apikal foramen aracılığıyla periapikal dokulara ekstrüzyonu, endodontik tedavide önemli bir endişe kaynağıdır. Özellikle Salzgeber ve Brillant'ın (210) klasik çalışmaları, periapikal lezyonlu nekrotik vakalarda irigantların vital vakalara kıyasla periapikal alana daha kolay ve fazla miktarda taşabileceğini öne sürmüştür. Ancak, laboratuvar ortamında elde edilen bulgular ile klinik gözlemler arasında her zaman birebir uyum bulunmayabilir (211,212).

Laboratuvar tabanlı deney düzeneklerinde, genellikle iç ve dış basınçların eşitlendiği kontrollü koşullar sağlanır. Oysa *in vivo* periapikal bölgede, vasküler yapı ve doku reaksiyonları nedeniyle pozitif veya negatif basınç farklılıkları dinamik olarak oluşabilir (117,213). Bu nedenle, deney ortamında gözlemlenen ekstrüzyon miktarı ve mekanizması, canlı dokunun karmaşık fizyolojik yanıtlarını tam olarak yansıtamayabilir. Eğer laboratuvar bulguları klinik duruma doğrudan tercüme edilseydi, KKT sonrası ortaya çıkabilecek flare-up insidansında ve postoperatif ağrı şikayetlerinde belirgin bir artış beklenebilirdi.

Klinik ve laboratuvar ortamları arasındaki bu niceliksel farklılıklara rağmen, çalışma boyutu, kullanılan irrigasyon yöntemleri, kök kanal aletleri ve preparasyon teknikleri gibi parametrelerin apikalden taşan sıvı, debris ve bakteri miktarları üzerindeki etkisi genellikle paralellik göstermektedir (183,205–207,214). Dolayısıyla, *in vitro* çalışmalar, belirli parametrelerin ekstrüzyon üzerindeki göreceli etkilerini anlamak ve farklı tekniklerin potansiyel risklerini değerlendirmek için değerli bilgiler sunmaya devam etmektedir.

KKT sürecinde meydana gelen bakteriyel ekstrüzyonu inceleyen çalışmalarda, genellikle *E. faecalis* içeren monomikrobiyal biyofilm modelleri tercih edilmektedir (117). Ancak, iki ya da daha fazla MO'yı içeren polimikrobiyal biyofilm modellerine sahip araştırmalar oldukça sınırlıdır (125,215). Oysaki, endodontik enfeksiyonlar çoğunlukla çok sayıda farklı MO'nın bir arada bulunduğu kompleks yapılarla karakterizedir.

Monomikrobiyal biyofilm modelleri; yapısal basitlikleri, standartlaştırma kolaylıkları ve yüksek kontrol imkanı sayesinde araştırmalarda sıkça kullanılmakta ve deneysel tekrar edilebilirlik açısından avantaj sunmaktadır. Bununla birlikte, polimikrobiyal

biyofilm modelleri, daha gerçekçi bir mikrobiyal ortamı temsil etmesi bakımından önemli avantajlar taşır. Doğal biyolojik sistemler çoğunlukla birden fazla MO türünün birlikte bulunduğu topluluklardan oluşur ve enfekte kök kanalları da bu yapıya benzer özellikler taşımaktadır (117). Yapılan çalışmalar, polimikrobiyal biyofilmlerin, tek türden oluşan biyofilmlere kıyasla daha fazla biyokütle oluşturduğunu ve daha kalın biyofilm yapıları geliştirdiğini ortaya koymuştur (118). Bu nedenle, polimikrobiyal modellerin endodontik enfeksiyonları daha doğru temsil ettiği düşünülmektedir.

Polimikrobiyal biyofilm modelleri, klinik gerçekliğe daha yakın olmalarının yanı sıra, artmış metabolik aktiviteleri ve çevresel stres faktörlerine karşı gösterdikleri direnç sayesinde biyofilm eliminasyonuna karşı daha dayanıklı bir yapı sergiler. Ancak bu avantajlar, deneysel uygulamalarda bazı güçlükleri de beraberinde getirir. Örneğin, birden fazla MO içeren biyofilmlerin oluşturulabilmesi için farklı türlerde besiyerleri, daha fazla sayıda başlangıç kültürü ve ilave hazırlık aşamaları gerekmektedir. Bu durum, polimikrobiyal model sistemlerinin uygulanmasını hem zaman açısından hem de maliyet bakımından daha zahmetli hâle getirmektedir (127). Bütün bu özellikler dikkate alınarak, iki ayrı monomikrobiyal biyofilm modelinin yanı sıra bir polimikrobiyal biyofilm modeli de çalışmamızın kapsamına dahil edilerek, elde edilecek verilerin hem kontrollü analizlere olanak tanıması hem de klinik gerçeklikle daha yüksek düzeyde örtüşmesi hedeflenmiştir.

Swimberghe ve ark. (117) tarafından son yıllarda yapılan biyofilm modellemelerine ilişkin 77 çalışmanın değerlendirildiği literatür taramasında, araştırmaların %86'sında monomikrobiyal model sistemlerinin tercih edildiği bildirilmiştir. Bu çalışmaların büyük bir kısmında ise MO olarak *E. faecalis* kullanılmıştır (%92). Kök kanal enfeksiyonlarında yer alan bakterilerin yaklaşık %85'inin *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Enterococcus* gibi fakültatif anaerob türlere ait olduğu belirtilirken; zorunlu anaerob bakterilere yalnızca %14 oranında yer verildiği ifade edilmiştir. Kullanılan MO'ların çoğunluğunu gram pozitif bakteriler oluşturmaktadır. Ayrıca, çalışmada incelenen 77 biyofilm çalışması arasında, 3 çalışmada endodontik biyofilm modellerinde fakültatif anaerob bir mantar olan *C. albicans*'ın kullanıldığı belirtilmiştir.

Bu nedenle, deneysel biyofilm modellerinde, klinik olarak kök kanalı sisteminde sık rastlanan MO'ların seçilmesi, modelin biyolojik geçerliliği açısından büyük önem taşımaktadır.

E. faecalis, insan ağız florası ve gastrointestinal sistemin doğal bileşenlerinden biri olan fakültatif anaerob gram pozitif bir koktur. Her ne kadar tedavi edilmemiş kök kanallarında sınırlı düzeyde bulunsa da özellikle başarısız KKT'lerden sonra ortaya çıkan kalıcı periradiküler lezyonların etiyopatogenezinde önemli bir role sahiptir. Yapılan çalışmalarda (80,216), primer endodontik enfeksiyonlarda *E. faecalis*'in izolasyon oranı %18 civarındayken, daha önce KKT uygulanmış dişlerde bu oran %67'ye kadar yükselmektedir. Bu MO; aksesuar kanallar, apikal deltalar ve isthmus gibi dezenfeksiyonu zor alanlarda biyofilm oluşturabilme ve bu bölgeleri kolonize edebilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, antimikrobiyal maddelere karşı çeşitli direnç mekanizmaları geliştirebilmesi nedeniyle, standart kemomekanik preparasyonla tamamen elimine edilmesi güçleşmektedir (217). Molander ve ark. (218) ile Rôças ve ark. (219), *E. faecalis*'in uzun süreli besin kıtlığı ve yüksek pH gibi olumsuz çevre koşullarına karşı dikkat çekici düzeyde direnç gösterdiğini bildirmiştir. Yapılan çalışmalar *E. faecalis*'in dentin tübüllerini istila etme ve endodontik tedaviden sonra canlı kalma kapasitesine sahip olduğunu ve en az 12 ay boyunca *ex vivo* koşullarda kök kanallarında hayatta kalabildiğini göstermektedir (220). Tüm bu nedenler göz önünde bulundurularak, çalışmamızda kök kanal kontaminasyon modeli olarak *E. faecalis* tercih edilmiştir.

Endodontik enfeksiyonlarda yalnızca bakteriler değil, mantarların da varlığına dair birçok çalışma mevcuttur. Bu nedenle, mantarlar da periradiküler enfeksiyonların gelişiminde önem arz eder çünkü hem tek başlarına hem de diğer bakteriyel türlerle birlikte biyofilm oluşturabilirler (221).

Kök kanal enfeksiyonlarına neden olan en yaygın mantar, dentin tübüllerine penetre olabilen *C. albicans*'tır (222). *C. albicans*, dimorfik özellik gösteren hem maya hem de filamentöz formda büyüyebilen bir fakültatif anaerob fungal MO'dır. Normal şartlarda ağız mukozası, gastrointestinal ve genitoüriner sistemde kommensal olarak bulunmakta olup, konak bağışıklık sisteminin zayıflamasıyla birlikte fırsatçı patojen hâline gelebilmektedir (83). *C. albicans* düşük redoks potansiyeline sahip ortamlarda

yaşamını sürdürebilmekte ve dentin tübüllerine penetre olabilen, antimikrobiyal ajanlara dirençli ve endodontik işlemlere karşı hayatta kalma kapasitesi yüksek bir mantardır (220). Şen ve ark. (223), smear tabakasının varlığının *C. albicans*'in dentine tutunmasını artırdığını göstermiştir. Bunun, dentinin bozulmuş organik yapısı ve büyüme ile tutunma için kalsiyum iyonlarının mevcudiyeti nedeniyle gerçekleştiği hipotezini ileri sürmüşlerdir. Bu MO'lar biyofilm oluşturmakta ve bu durum, kök kanallarındaki MO'ların elimine edilmesini zorlaştırmaktadır.

Yapılan çalışmalarda (224,225) *S. aureus*'un *Candida* hiflerine karşı yüksek afinitesi olduğu gözlenmiştir. *Stafilokok* ve *Candida* ko-enfeksiyonu, monomikrobiyal biyofilmlere kıyasla daha büyük biyokütleye ve ilaç direncine sahip polimikrobiyal biyofilm oluşturabilir.

Tüm bu sebepler göz önünde bulundurularak çalışmamızda ikinci patojen olarak *C. albicans* tercih edilmiştir.

Swimberghe ve ark. (117) endodontik literatürde biyofilm model sistemleri üzerine yaptıkları incelemede, *E. faecalis* ile yapılan çalışmaların çoğunluğunda ATCC 29212 suşunun kullanıldığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da literatürde sıklıkla kullanılan *E. faecalis* (ATCC 29212), *C. albicans* (ATCC 10231) suşları kullanılmıştır.

E. faecalis'in kök kanalları içerisinde biyofilm oluşturma süreciyle ilgili yapılan çeşitli çalışmalarda, inkübasyon sürelerinin önemli ölçüde farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Literatürde bu sürelerin 24 saat, 48 saat, 72 saat, 14 gün ve 21 güne kadar uzanabildiği belirtilmektedir (129, 226-229). Ancak, endodontik araştırmalarda kullanılacak standart bir kanal içi biyofilm modeli geliştirilmesine yönelik olarak inkübasyon süresi konusunda halen bir fikir birliği bulunmamaktadır (230). Bu durum, farklı deneysel koşullar ve hedeflenen biyofilm olgunluk düzeyleri nedeniyle protokollerde çeşitliliğe neden olmaktadır.

Stojicic ve ark. (134) polimikrobiyal biyofilmler üzerinde farklı dezenfektanların etkinliğini değerlendirdikleri çalışmada, üç haftalık inkübasyon süresi sonrasında biyofilmdeki bakterilerin dezenfektanlara karşı direnç düzeyinin arttığı

gözlemlenmiştir. Méndez-González ve ark. (231), *E. faecalis* ve *C. albicans*'tan oluşan olgunlaşmış miks biyofilm modeli elde edebilmek amacıyla 31 günlük inkübasyona tabi tutmuş; ardından farklı şekillendirme sistemleri ve SH solüsyonlarının farklı konsantrasyonlarını karşılaştırarak dezenfeksiyon etkinliğini değerlendirmiştir. Bu çalışmada uzun inkübasyon süresi, biyofilmin matür yapısının korunması açısından önemli bir parametre olarak öne çıkarken, şekillendirme sistemi ve irrigant konsantrasyonunun mikrobiyal yük üzerindeki etkisinin anlamlı olduğu vurgulanmıştır. Seneviratne ve ark. (130) mikrotitre plaka sisteminde oluşturdukları *E. faecalis* biyofilminde, 72. saatte en yüksek hücre geri kazanımını elde ettiklerini, ancak 7. gün itibariyle bu değerde azalma gözlemlediklerini rapor etmişlerdir. Benzer şekilde, Swimberghe ve ark. (117) tarafından yürütülen mikrobiyolojik temelli *in vitro* çalışmalarda, bakteriyel inkübasyon sürelerinin 1 ile 70 gün arasında geniş bir aralıkta değişkenlik gösterebildiği belirtilmiştir. Bu bulgular doğrultusunda, çalışmamızda literatürde önerilen süreler dikkate alınarak inkübasyon süresi 7 gün olarak seçilmiştir.

E. faecalis ve *C. albicans* biyofilm oluşumunu desteklemek amacıyla çeşitli sıvı besiyerleri kullanılabilmektedir; literatürde TSB, BHI, Pg broth ve glukoz ile zenginleştirilmiş modifiye ortamların biyofilm gelişimi üzerindeki etkileri karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiş, özellikle karbon kaynağı içeriği zenginleştirilen ortamların biyofilm hacmini ve hücre canlılığını anlamlı şekilde artırdığı bildirilmiştir (130). Bu doğrultuda, çalışmamızda standardizasyonu yüksek ve uygun bir üreme ortamı olan TSB tercih edilmiştir.

Kök kanal sistemi içerisinde etkin bir irigasyon sağlayabilmek için, kullanılan iğne ucunun apikal bölgeye yakın konumlandırılması ve kanalın şekillendirilme boyutuna uygun çapta bir iğne seçilmesi büyük önem taşımaktadır (232). Literatürde, açık uçlu iğnelerin çalışma boyundan 2–3 mm, kapalı uçlu iğnelerin ise 1–2 mm daha kısa yerleştirilmesi gerektiği belirtilmektedir (233). Ayrıca, küçük çaplı iğnelerin apikal bölgeye ulaşımının daha kolay olduğu ve bu sayede irigantın kanal içerisinde daha etkili şekilde değiştirilebildiği bildirilmektedir (234). Bu bilgiler doğrultusunda, çalışmamızda 30 G kapalı uçlu irigasyon iğnesi, çalışma boyunun 2 mm gerisine yerleştirilerek kullanılmıştır.

Klinik uygulamalarda, geleneksel şırınga ile irigasyon yöntemi hem ekonomik oluşu hem de kolay uygulanabilirliği nedeniyle yaygın biçimde tercih edilmektedir. Ancak bu teknikte irigantın kanal içerisinde yalnızca 1 mm ilerleyebildiği gösterilmiştir (234). Kanalların finler, istmuslar, lateral kanallar ve anastomozlar gibi bölgeleri, geleneksel irigasyon ile tam olarak dezenfekte edilemeyebilir ve bu durum, enfeksiyonun kalıcılığına yol açabilir (235). Günümüzde, bu dezavantajları aşmak ve irigantların etkinliğini artırmak amacıyla farklı irigasyon aktivasyon teknikleri kullanılmakta ve klinik başarıyı artırmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir (236).

Ek olarak çalışmamızda, irigasyon protokolünde tek tip irigant olarak steril distile su kullanılmıştır. Bu tercihin temel nedeni, çalışmada değerlendirilen asıl değişkenin biyofilm tipi olmasıdır; bu sayede herhangi bir kimyasal dezenfektanın etkisi dışlanarak yalnızca mekanik şekillendirmenin apikal mikrobiyal taşma üzerindeki etkisi analiz edilebilmiştir.

Endodontik biyofilm modelleme sistemlerini inceleyen derleme çalışmaları, inokulum konsantrasyonlarının genellikle CFU/mL cinsinden ifade edildiğini göstermektedir. Bu çalışmalarda, inokulum konsantrasyonunun 10^4 ile 10^8 CFU/mL arasında değiştiği ve en sık kullanılan konsantrasyonun 10^8 CFU/mL olduğu belirtilmiştir (117). Çalışmamızda, kök kanallarında enfeksiyon oluşturmak amacıyla standart mikrobiyolojik protokollere uygun olarak 0.6 McFarland (yaklaşık 1.8×10^8 CFU/mL) yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlanarak inokülasyon işlemi gerçekleştirilmiştir.

Kök kanal preparasyonu sırasında kullanılan antibakteriyel ajanların veya tekniklerin etkinliğini belirlemeye yönelik çalışmalarda, genellikle çeşitli mikrobiyolojik analiz yöntemlerine başvurulmaktadır. Bu analizlerde, kök kanallarından elde edilen örneklerdeki canlı MO'ların saptanması temel alınmaktadır. Yaygın olarak kullanılan iki ana yöntemden biri; kök kanal dentininden elde edilen talaş örneklerinin mikrobiyolojik değerlendirmeye tabi tutulmasıdır. Diğeri ise steril kağıt konların kök kanalına yerleştirilip belirli bir süre burada bekletilmesinin ardından, bu konların aseptik koşullar altında uygun besiyerine aktarılmasıyla gerçekleştirilen örnekleme yöntemidir (237,238).

Son dönemde literatürde, kök kanal preparasyonu sırasında apikalden ekstrüde olan bakterilerin kantitatif olarak değerlendirilmesinde, CFU sayımı yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir (194,199,203). Bu yöntemde, apikalden taşan sıvı örnekleri uygun oranlarda seyreltilmekte ve elde edilen süspansiyonlar uygun besiyerine yayma ekimi tekniğiyle inoküle edilerek, inkübasyon süresi sonunda oluşan koloni sayıları değerlendirilmek suretiyle sonuçlar elde edilmektedir. Bu yaklaşım, ekstrüde olan bakterilerin canlılık durumunu ve sayısal yoğunluğunu doğrudan belirleyebilmesi açısından güvenilir bir yöntem olarak kabul görmektedir. Çalışmamızda bu yöntem tercih edilmiştir, ekstrüden olan sıvı örnekleri *E. faecalis* için selektif olan BEA, *C.albicans* için antibiyotik içeren SDA besiyerlerine aseptik koşullarda ekilmiş, ardından örnekler 24 saat süreyle uygun inkübasyon koşullarında bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası oluşan koloni sayıları değerlendirilerek, ilgili MO'ların canlılık düzeyleri ve miktarları klasik CFU/ml sayım yöntemiyle belirlenmiştir.

Çalışmamızda, tüm gruplarda gerçekleştirilen eğeleme ve irigasyon işlemlerinin ardından apikal bölgeden ekstrüde olan bakteri sayısının, başlangıçta inoküle edilen bakteri yüküne kıyasla anlamlı düzeyde azaldığı gözlemlenmiştir.

Bu çalışmada her deney grubuna ait kontrol alt grupları oluşturulmuş, bu gruplarda herhangi bir eğeleme işlemi uygulanmamıştır. Sadece kontaminasyon protokolü ve ardından irigasyon uygulanan bu örneklerde gözlemlenen yüksek CFU sayımı, bakteri inokülasyonunun başarılı olduğunu ve oluşturulan enfeksiyon modelinin geçerliliğini ortaya koymuştur. Ayrıca, kontrol gruplarında *E. faecalis* ve *C. albicans*'ın kök kanalı sisteminde yoğun şekilde kolonize olduğu, sadece kültürel yöntemlerle değil, aynı zamanda OD ölçümleri ve KV boyama sonuçlarıyla da doğrulanmıştır. KV boyama tekniği ile biyofilm oluşumunun kanal duvarlarındaki dağılımı tespit edilirken, OD ölçümleri biyokütlenin kantitatif değerlendirilmesine olanak sağlamıştır. Bu yöntemlerin birlikte kullanılması, biyofilmin hem kantitatif hem de morfolojik özellikleri hakkında daha kapsamlı bilgi edinilmesini sağlamış ve kontrol gruplarındaki yüksek biyofilm varlığı ile karşılaştırmalı analizler için sağlam bir referans oluşturmuştur.

Duggan ve Sedgley (239) tarafından yapılan bir çalışmada, *E. faecalis*'in biyofilm oluşturma kapasitesini değerlendirmek amacıyla mikrotiter plaklarda geliştirilen

biyofilmler %1 oranında KV ile boyanmış, ardından OD_{570} ölçümü yapılarak biyofilm miktarı kantitatif olarak analiz edilmiştir. Seneviratne ve ark.'nın (130) laboratuvar ve klinik kökenli *E. faecalis* suşları üzerinde gerçekleştirdiği kapsamlı çalışmada, biyofilm oluşum kinetiği; OD ölçümü, CFU sayımı ve KV ile boyama yöntemi ile değerlendirilmiştir. Çalışmamız, biyofilm oluşumunun doğal insan dentini üzerinde gerçekleştirilmiş olmasıyla bu çalışmalardan ayrılmaktadır.

Alves ve ark. (240) yaptıkları *in vitro* çalışmada bakteri eliminasyonunu hem klasik kültür yöntemleri hem de gerçek zamanlı PCR (qPCR) gibi moleküler tekniklerle birlikte değerlendirmişlerdir. Bu yaklaşım, özellikle düşük düzeydeki bakteri varlığını saptamada daha hassas sonuçlar sağlayabilmektedir.

Çalışmamızda, kontrol ve deney gruplarının CFU ve OD verileri birlikte değerlendirildiğinde, biyofilm varlığı ve eliminasyonuna dair önemli bulgular elde edilmiştir. Koloni sayımı sonuçları, tüm gruplarda anlamlı farklılıklar göstermiştir. Özellikle *E. faecalis* ve miks biyofilm (*E. faecalis* + *C. albicans*) gruplarında, tek başına *C. albicans* içeren gruba kıyasla anlamlı derecede daha yüksek CFU değerleri elde edilmiştir. Bu bulgu, *E. faecalis*'in dentin yüzeylerine daha güçlü tutunabilen, invaziv ve dirençli bir MO olduğunu; miks biyofilm grubunda ise bu bakterinin maya hücrelerine baskın geldiğini göstermektedir. Bu yönüyle, *E. faecalis*'in endodontik başarısızlıklarla sık ilişkilendirilmesinin mikrobiyolojik temeli bir kez daha desteklenmiştir.

Kontrol gruplarında hem *E. faecalis* hem de *C. albicans* için koloni sayılarının deney gruplarına göre belirgin şekilde yüksek olması, kanal içi mekanik preparasyonun biyofilm uzaklaştırmadaki etkinliğini açıkça ortaya koymaktadır. Eğeleme işlemi uygulanan deney gruplarında, bakteriyel yük anlamlı ölçüde azalmıştır. Bu durum, kanal şekillendirmesinin sadece mekanik bir genişletme değil, aynı zamanda mikrobiyal yükün fiziksel olarak ortadan kaldırılmasında da önemli bir adım olduğunu göstermektedir.

Çalışmamızda biyofilm oluşumu TEM görüntüleriyle doğrulanmıştır. TEM bulgularında kontrol grubunda daha yoğun bakteri ve maya formlarının bulunduğu, deney grubunda ise mikrobiyal varlığın azaldığı ancak dentin yüzeyinde debris birikiminin arttığı gözlenmiştir. Bu bulgular, kök kanal şekillendirme işlemlerinin bir

yandan biyofilm miktarını azaltırken diğer yandan dentin yüzeyinde artan debris nedeniyle dentin tübüllerinin girişlerini kısmen kapatabileceğini düşündürmektedir. Benzer şekilde Al-Nazhan ve ark. (241) tekli inokülasyonlarla *E. faecalis* ve *C. albicans*'ın dentin tübüllerine penetrasyonunu ayrı ayrı değerlendirmiş, ayrıca her iki MO'nın birlikte bulunduğu miks biyofilm koşullarında da penetrasyonun gerçekleştiğini göstermiştir. Bulguları TEM görüntüleriyle doğrulayan araştırmacılar, *E. faecalis*'in hücre bölünmesi ile tübüllerde daha derine, 244 µm'ye kadar, *C. albicans*'ın ise hif formu ile 183 µm'ye kadar penetre olduğunu bildirmiştir.

OD ölçümleri değerlendirildiğinde ise, kontrol gruplarında daha yüksek ortalama değerlere ulaşılmasına rağmen, bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Özellikle *C. albicans* grubunda yüksek ortalama ve standart sapma değerleri gözlenmiştir. Bu durum hem biyofilm dağılımındaki heterojenlik hem de maya hücrelerinin KV tutulum kapasitesinin farklılığı ile ilişkili olabilir. Ayrıca, OD ölçümünün, biyofilm yapısındaki canlı hücre sayısından çok toplam biyokütleyi yansıtması nedeniyle, CFU kadar hassas bir ayraç olmadığı düşünülmektedir.

Tinoco ve ark. (194) ile Teixeira ve ark.'nın (199) çalışmalarında, enfekte edilip eğelenmeyen dişler kontrol grubu olarak kullanılmış ve deney gruplarıyla karşılaştırılmıştır. Her iki çalışmada da kontrol gruplarında CFU sayılarının eğeleme yapılan gruplara göre anlamlı derecede yüksek olduğu bildirilmiştir. Hamed ve ark. (242) her dişten, eğeleme öncesi ve sonrası olmak üzere iki ayrı zamanda örnekleme yaparak bakteriyel yükü karşılaştırmıştır. Gonzalez ve ark. (231) eğelemenin biyofilm üzerine etkisini değerlendirmek amacıyla, enfekte edilmiş ancak şekillendirme uygulanmamış kök kanallarından oluşan pozitif kontrol grubu ve enfekte edilmemiş biyofilm oluşturulmamış negatif kontrol grubu kullanmışlardır. Bu bulgular, çalışmamızda da gözlemlendiği üzere, eğeleme işleminin biyofilm yükünü azaltmada etkili olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda bakterilerin tekli ve miks haldeki varlıkları karşılaştırıldığında, hem *E. faecalis* hem de *C. albicans* için biyofilm oluşumu ve koloni gelişimi açısından anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. *E. faecalis*'in tekli ve miks biyofilm ortamlarında oluşturduğu koloni sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark

saptanmamıştır (p = 0.0576). Bu durum, *C. albicans* varlığının *E. faecalis*'in üreme kapasitesi üzerinde belirgin bir etkisi olmadığını düşündürmektedir. Her iki durumda da *E. faecalis* güçlü biyofilm oluşturma yeteneğini korumuştur. Buna karşılık, *C. albicans* için yapılan değerlendirmede, miks biyofilm ortamındaki kontrol grubunda koloni sayısının tekli biyofilme kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür; bu durum, *E. faecalis*'in *C. albicans*'ın biyofilm gelişimini destekleyebileceği yönünde yorumlanabilir. Literatürde, endodontik enfeksiyon modellerinde tekli ve miks biyofilm yapılarını doğrudan karşılaştıran bir çalışmaya rastlanmamıştır**.** Bu bağlamda, çalışmamız bu iki farklı biyofilm formunun davranışlarını aynı deneysel koşullar altında incelemesi açısından dikkat çekmektedir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular değerli bilgiler sunmakla birlikte, bazı sınırlamalar göz önünde bulundurulmalıdır. Öncelikle, araştırmanın *in vitro* koşullarda gerçekleştirilmiş olması, elde edilen sonuçların doğrudan klinik uygulamalara genellenmesini zorlaştırmaktadır. Canlı dokular, bağışıklık yanıtı ve periapikal çevre koşulları gibi faktörler laboratuvar ortamında taklit edilememektedir (117).

Kullanılan dişler benzer anatomik özellikte seçilse de her dişin kök kanal yapısında görülen doğal farklılıklar dezenfeksiyon etkinliğini etkileyebilir ve bu da apikalden taşan bakteri miktarını değiştirebilir.

Çalışmada bakteriyel yükün değerlendirilmesinde kültür yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem sadece canlı ve kültürlenebilir bakterileri tespit edebilir; ölü bakteriler veya VBNC MO'lar değerlendirilemez. Bu durum, gerçek bakteri yükünün olduğundan az tahmin edilmesine yol açabilir. Öte yandan, literatürde kullanılan qPCR gibi yöntemler ise canlı-ölü ayrımı yapamaması nedeniyle bakteriyel yükü fazla gösterebilir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, farklı biyofilm modelleri ile kontamine edilmiş kök kanallarında şekillendirme işlemleri sırasında apikalden taşan bakteri miktarları değerlendirilmiştir. Elde edilen bulgulara göre;

1. Tüm deney gruplarında, kontrol gruplarına kıyasla anlamlı derecede daha düşük koloni sayıları saptanmıştır. Bu bulgu, mekanik şekillendirmenin biyofilm uzaklaştırmada etkili olduğunu ortaya koymuştur.
2. *C. albicans, E. faecalis*'e kıyasla daha düşük düzeyde üreme göstermiştir. Bu durum, farklı MO'ların biyofilm yapılarının direnç düzeyleri bakımından farklılık gösterebildiğini düşündürmektedir.
3. *E. faecalis'*in tekli ve miks biyofilm ortamlarında oluşturduğu koloni sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır. Bu sonuç, bakterinin maya hücreleri varlığında da baskınlığını koruyabildiğini göstermektedir.
4. *C. albicans* için yapılan değerlendirmede, miks biyofilm ortamındaki kontrol grubunda koloni sayısının tekli biyofilme kıyasla daha yüksek olduğu görülmüştür; bu durum, *E. faecalis*'in *C. albicans*'ın biyofilm gelişimini destekleyebileceği yönünde yorumlanabilir
5. Çalışmada biyofilm varlığı; OD ölçümleri, KV boyaması ve TEM görüntüleriyle desteklenerek doğrulanmıştır. Gruplar arasında yapılan karşılaştırmalarda OD verileri bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık gözlenmemiştir. Bu durum, OD yönteminin kanal içi biyofilm değerlendirilmesinde yeterince hassas olmadığını düşündürmektedir.
6. Farklı MO'ların birlikte oluşturduğu biyofilmlerin endodontik tedaviye direnç mekanizmalarını aydınlatmak için daha fazla çoklu biyofilm modeliyle çalışma yapılması gereklidir.
7. Elde edilen sonuçların klinik koşullara yansıtırken dikkatli olunması ve daha fazla *in vitro* çalışma ile desteklenmesi önerilir.

KAYNAKLAR

1. Alaçam, T., Endodonti. . 2012.
2. Deplazes P, Peters O, Barbakow F. Comparing apical preparations of root canals shaped by nickel-titanium rotary instruments and nickel-titanium hand instruments. J Endod 2001 27(3):196–202.
3. Weine FS, Kelly RF, Lio PJ. The effect of preparation procedures on original canal shape and on apical foramen shape. J Endod 1975 1(8):255–62.
4. Southard DW, Oswald RJ, Natkin E. Instrumentation of curved molar root canals with the roane technique. J Endod 1987;13(10):479–89.
5. SJöGREN U, FIGDOR D, SPÅNGBERG L, SUNDQVIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Int Endod J 1991 24(3):119–25
6. ENDODONTİK TEDAVİ 2 - PROF. DR. GÜNDÜZ BAYIRLI | Nadir Kitap
7. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effect of endodontic procedures on enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. Int Endod J. 2005 Jun;38(6):372–80.
8. Nair PNR, 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
9. Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod []. 1992 [cited 2025 May 21];18(9):427–30.
10. Siqueira JF, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 97(1):85–94.
11. Pataky L, Iványi I, Grigár Á, Fazekas Á. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: An in vitro comparative study. J Endod 2002;28(8):603–5.
12. Menezes MM, Valera MC, Jorge AOC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. Int Endod J 2004 May;37(5):311–9.

13. Graphics P. The Effectiveness of Three Instrumentation Techniques on the Elimination of Entererococcus Faecalis from a Root Canal: An In Vitro Study.
14. Ferraz CCR, Gomes N V., Gomes BPFA, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Apical extrusion of debris and irrigants using two hand and three engine-driven instrumentation techniques. Int Endod J 2001 Jul ;34(5):354–8.
15. Samaranayake LP, Lamey PJ. Oral candidosis: 1. Clinicopathological aspects. Dent Update. 1988 Jul;15(6):227–8, 230.
16. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011;3(2011):10.3402/jom.v3i0.5771.
17. Mayer FL, Wilson D, Hube B. Candida albicans pathogenicity mechanisms. Virulence 2013 Feb 15 [cited 2025 May 22];4(2):119.
18. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ, et al. Antifungal resistance of Candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. J Dent Res. 2001;80(3):903–8.
19. Siqueira JF, Rôçac IN. Critical review in oral biology and Medicine: Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res . 2009 Nov ;88(11):969–81.
20. Fairbourn DR, McWalter GM, Montgomery S. The effect of four preparation techniques on the amount of apically extruded debris. J Endod. 1987 ;13(3):102–8.
21. McKendry DJ. Comparison of balanced forces, endosonic, and step-back filing instrumentation techniques: Quantification of extruded apical debris. J Endod 1990 16(1):24–7.
22. Siqueira JF. Microbial causes of endodontic flare-ups. Int Endod J. 2003 Jul 1 36(7):453–63.
23. Martin H, Cunningham WT. The effect of endosonic and hand manipulation on the amount of root canal material extruded. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1982 53(6):611–3.
24. Ruiz-Hubard EE, Gutmann JL, Wagner MJ. A quantitative assessment of canal debris forced periapically during root canal instrumentation using two different techniques. J Endod 1987;13(12):554–8.
25. Prati C, Foschi F, Nucci C, Montebugnoli L, Marchionni S. Appearance of the root canal walls after preparation with NiTi rotary instruments: a comparative SEM investigation. Clin Oral Investig. 2004;8(2):102–10.

26. Alaçam T, Alaçam A. İleri Restorasyon Teknikleri. 1. Baskı. Ankara: Polat Basımevi; 1998, s: 47-136.
27. Reddy SA, Hicks ML. Apical extrusion of debris using two hand and two rotary instrumentation techniques. J Endod. 1998 ;24(3):180–3.
28. Hu¨lsmann M, Hu¨lsmann H, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. Endod Topics. 2005 Mar 1 10(1):30–76.
29. Hülsmann M, Stryga F. Comparison of root canal preparation using different automated devices and hand instrumentation. J Endod. 1993;19(3):141–5.
30. Ruddle CJ. The ProTaper technique: endodontics made easier. Dent Today. 2001 Nov;20(11):58–64, 66–8.
31. Yared GM, Bou Dagher FE, Machtou P, Kulkarni GK. Influence of rotational speed, torque and operator proficiency on failure of Greater Taper files. Int Endod J 2002 35(1):7–12.
32. Henderson B, Wilson M. Commensal communism and the oral cavity. J Dent Res 1998 77(9):1674–83.
33. Hargreaves KM, Berman LH, Rotstein I, Cohen S. Cohen's Pathways of the Pulp, 12th Edition. 2021 979.
34. Willoughby Dayton M. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp - Digital Collections - National Library of Medicine
35. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1965 Sep 1;20(3):340–9.
36. MÖLLER ÅJR, FABRICIUS L, DAHLÉN G, ÖHMAN AE, HEYDEN G. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. Eur J Oral Sci 1981 89(6):475–84.
37. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. Oral Microbiol Immunol. 1997 12(5):318–22.
38. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. Endod Topics 2003 Nov 6(1):3–28.
39. BERGENHOLTZ G, LINDHE J. Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. Eur J Oral Sci;83(3):153–8.

40. Warfvinge J, Bergenholtz G. Healing capacity of human and monkey dental pulps following experimentally-induced pulpitis. Dental Traumatology 1986 2(6):256–62.
41. Ingle JI, Bakland LK, Baumgartner JC. Retreatment of non-healing endodontic therapy and management of mishaps. In Ingle's Endodontics 6th edn. USA: Peoples Medical Publishing House, 2007: pp1088−1161. In.
42. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure after experimental crown fractures or grinding in adult monkeys. J Endod. 1982;8(9):391–7
43. Torabinejad M, Kiger RD. A histologic evaluation of dental pulp tissue of a patient with periodontal disease. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1985 59(2):198–200.
44. Mazur B, Massler M. Influence of periodontal disease on the dental pulp. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1964 ;17(5):592–603.
45. Czarnecki RT, Schilder H. A histological evaluation of the human pulp in teeth with varying degrees of periodontal disease. J Endod 1979 [;5(8):242–53.
46. Wong R, Hirsch RS, Clarke NG. Endodontic effects of root planing in humans. Dental Traumatology 1989 5(4):193–6.
47. KOBAYASHI T, HAYASHI A, YOSHIKAWA R, OOKUDA K, HARA K. The microbial flora from root canals and periodontal pockets of non-vital teeth associated with advanced periodontitis. Int Endod J 1990 23(2):100–6.
48. Delivanis PD, Snowden RB, Doyle RJ. Localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled root canals. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1981 52(4):430–2.
49. Grossman LI. Origin of Microorganisms in Traumatized, Pulpless, Sound Teeth. J Dent Res 1967 46(3):551–3.
50. Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infections. Oral Microbiol Immunol. 1992;7(5):257–62.
51. Sugita EI. Microbiology of endodontics. In: Ingle JI, Bakland LK eds, Endodontics 4th edn, Lea&Febiger, Philadelphia 1994; pp 608- 622. .
52. Hentges DJ. Anaerobes: General Characteristics. Medical Microbiology 1996
53. Feuille F, Ebersole JL, Kesavalu L, Steffen MJ, Holt SC. Mixed infection with Porphyromonas gingivalis and Fusobacterium nucleatum in a murine lesion

model: Potential synergistic effects on virulence. Infect Immun. 1996;64(6):2095–100.

54. Dahlén G, Fabricius L, Holm SE, Möller Å. Interactions within a collection of eight bacterial stains isolated from a monkey dental root canal. Oral Microbiol Immunol. 1987;2(4):164–70.
55. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1994 78(4):522–30.
56. FABRICIOUS L, DAHLEN G, ÖHMAN AE, MÖLLER AJR. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. Eur J Oral Sci 1982;90(2):134–44.
57. Ter Steeg PF, Van Der Hoeven JS. Development of periodontal microflora on human serum. Microb Ecol Health Dis 1989 2(1):1–10.
58. Persson S, Edlund M -B, Claesson R, Carlsson J. The formation of hydrogen sulfide and methyl mercaptan by oral bacteria. Oral Microbiol Immunol 19905(4):195–201.
59. Grenier D, Mayrand D. Nutritional relationships between oral bacteria. Infect Immun 1986 53(3):616–20.
60. West JD. The relationship between three-dimensional endodontic seal and endodontic failures []. Boston University; 1975
61. Alaçam Tayfun, Alaçam AN. Endodonti, 20 Polat Yayınları; 1998.
62. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. J Endod 1978 4(2):60–4.
63. Thompson SA. An overview of nickel-titanium alloys used in dentistry. Int Endod J 2000 33(4):297–310.
64. Lancefield RC. The antigenic complex of streptococcus haemolyticus. : I. demonstration of a type-specific substance in extracts of streptococcus haemolyticus. Journal of Experimental Medicine. 1928 Jan 1 47(1):91–103.
65. The enterococci : pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance and infection control. 2002;420.
66. Rams TE, Feik D, Young V, Hammond BF, Slots J. Enterococci in human periodontitis. Oral Microbiol Immunol. 1992;7(4):249–52.
67. Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on

biofilm formation by Enterococcus faecalis. Infect Immun. 2004 Jun;72(6):3658–63.

68. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. Enterococcus faecalis- the root canal survivor and “star” in post-treatment disease. Endod Topics 2003 Nov 6(1):135–59.
69. Hartke A, Giard JC, Laplace JM, Auffray Y. Survival of Enterococcus faecalis in an oligotrophic microcosm: Changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis. Appl Environ Microbiol. 1998 64(11):4238–45.
70. Shankar N, Lockatell C V., Baghdayan AS, Drachenberg C, Gilmore MS, Johnson DE. Role of Enterococcus faecalis surface protein Esp in the pathogenesis of ascending urinary tract infection. Infect Immun 2001 69(7):4366–72.
71. Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cucarella C, Lamata M, et al. The Enterococcal Surface Protein, Esp, Is Involved in Enterococcus faecalis Biofilm Formation. Appl Environ Microbiol []. 2001 Oct [cited 2025 Jun 7];67(10):4538–45.
72. Hancock LE, Perego M. The Enterococcus faecalis fsr two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. J Bacteriol. 2004 Sep 186(17):5629–39.
73. Oancea C, Klare I, Witte W, Werner G. Conjugative transfer of the virulence gene, esp, among isolates of Enterococcus faecium and Enterococcus faecalis. Journal of Antimicrobial Chemotherapy 2004 Jul
74. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic Enterococcus faecalis. J Endod []. 2007 Jul 33(7):815–8.
75. Huycke MM, Moore D, Joyce W, Wise P, Shepard L, Kotake Y, et al. Extracellular superoxide production by Enterococcus faecalis requires demethylmenaquinone and is attenuated by functional terminal quinol oxidases. Mol Microbiol. 2001 ;42(3):729–40.
76. Hancock LE, Gilmore MS. The capsular polysaccharide of Enterococcus faecalis and its relationship to other polysaccharides in the cell wall. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002 Feb 5 99(3):1574–9.
77. Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. Expert Rev Anti Infect Ther []. 2014 Oct 1;12(10):1221.

78. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the effect of 0.5 percent sodium hypochlorite in endodontic therapy. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology. 1983 55(3):307–12.
79. Barnett F, Trope M, Khoja M, Tronstad L. Bacteriologic status of the root canal after sonic, ultrasonic and hand instrumentation. Dental Traumatology 1985 1(6):228–31.
80. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998;85(1):86–93.
81. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. J Endod. 2012 Oct ;38(10):1376–9.
82. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. Int Endod J. 2005 Oct 38(10):735–42.
83. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of Candida albicans in infections of endodontic origin. J Endod 2000;26(12):695–8.
84. SIQUEIRA J. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 May ;97(5):632–41.
85. Waltimo TMT, Sirén EK, Ørstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral Candida species to calcium hydroxide in vitro. Int Endod J. 1999 Mar 32(2):94–8.
86. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Ghodse Hosseini MR. Presence of Candida Albicans in Root Canal System of Teeth Requiring Endodontic Retreatment with and without Periapical Lesions. Iran Endod J. 2007;2(1):24–8.
87. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004 May 1;97(5):632–41.
88. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. Candida albicans Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. Microorganisms. 2020 Sep 1 8(9):1300.
89. Fox E, Nobile C. The Role of Candida albicans Biofilms in Human Disease. Candida albicans: Symptoms, Causes and Treatment Options. 2013 2025 Jun ;(May):1–24.

90. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of Candida albicans. Trends Microbiol. 2001 Jul 1;9(7):327–35.
91. Sundstrom P. Adhesins in Candida albicans. Curr Opin Microbiol 1999 Aug 1;2(4):353–7.
92. Williams D, Lewis M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. J Oral Microbiol. 2011 Jan 28;3.
93. Hube B. From commensal to pathogen: Stage- and tissue-specific gene expression of Candida albicans. Curr Opin Microbiol. 2004 Aug Jun;7(4):336–41.
94. Soll DR. Why does Candida albicans switch? FEMS Yeast Res. 2009 Nov;9(7):973–89.
95. Siqueira JF, Rôças IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. Braz Dent J . 2007 ;18(4):267–80.
96. WALTIMO TMT, SIRÉN EK, TORKKO HLK, OLSEN I, HAAPASALO MPP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. Int Endod J 1997 Mar;30(2):96–101.
97. Costerton JW. The biofilm primer. 2007;199.
98. Textbook of Endodontics - Nisha Garg, Amit Garg
99. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of Streptococcus mutans biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. Infect Immun 1996;64(3):1035–8.
100. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in Streptococcal infections. Journal of Clinical Investigation. 2003 Dec 1 2025 112(11):1626–32.
101. Vasudevan R. Biofilms: Microbial Cities of Scientific Significance. J Microbiol Exp. 2014 Jun 18 1(3).
102. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. Clin Orthop Relat Res 2005 - 437(437):41–7.
103. Larsen T. Susceptibility of Porphyromonas gingivalis in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. Oral Microbiol Immunol. 2002 Oct;17(5):267–71.
104. Davey ME, O'toole GA. Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2000 Dec 64(4):847–67.

105. Ramachandran Nair PN. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987;13(1):29–39.
106. Ricucci D, Siqueira JF. Biofilms and apical periodontitis: Study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. J Endod 2010 2025 36(8):1277–88.
107. Nair PNR. Apical periodontitis: A dynamic encounter between root canal infection and host response. Periodontol 2000 1997 13(1):121–48.
108. Frank SA, Barbour AG. Within-host dynamics of antigenic variation. Infection, Genetics and Evolution. 2006 Mar 6(2):141–6.
109. Harn WM, Chen YHM, Yuan K, Chung CH, Huang PH. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. Endod Dent Traumatol 1998];14(5):237–40.
110. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. Nat Immunol 2002 3(11):1033–40.
111. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. J Med Microbiol 199644(2):79–87.
112. Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. Int Endod J. 2003 Jan 1 36(1):1–11.
113. Peters OA, Bardsley S, Fong J, Pandher G, Divito E. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. J Endod 2011 Jul ;37(7):1008–12.
114. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. Int Endod J. 2014;47(7):659–66.
115. Lin J, Shen Y, Haapasalo M. A comparative study of biofilm removal with hand, rotary nickel-titanium, and self-adjusting file instrumentation using a novel in vitro biofilm model. J Endod 2013 May;39(5):658–63.
116. Schaudinn C, Jaramillo D, Freire MO, Sedghizadeh PP, Nguyen A, Webster P, et al. Evaluation of a nonthermal plasma needle to eliminate ex vivo biofilms in root canals of extracted human teeth. Int Endod J. 2013 Oct;46(10):930–7.

117. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. Int Endod J . 2019 May 1 52(5):604–28.
118. Madsen JS, Røder HL, Russel J, Sørensen H, Burmølle M, Sørensen SJ. Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. Environ Microbiol 2016 Sep 1 18(8):2565–74.
119. Pastar I, Nusbaum AG, Gil J, Patel SB, Chen J, Valdes J, et al. Interactions of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus USA300 and Pseudomonas aeruginosa in Polymicrobial Wound Infection. PLoS One 2013 Feb 22 2025 8(2).
120. Peters BM, Jabra-Rizk MA, O'May GA, William Costerton J, Shirtliff ME. Polymicrobial interactions: Impact on pathogenesis and human disease. Clin Microbiol Rev 2012 Jan ; 25(1):193–213.
121. Tay WH, Chong KKL, Kline KA. Polymicrobial–Host Interactions during Infection. J Mol Biol 2016 Aug; 428(17):3355–71.
122. Burmølle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sørensen SJ, Kjelleberg S. Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. Appl Environ Microbiol. 2006 Jun 72(6):3916–23.
123. Kara D, Luppens SBI, Ten Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Veillonella parvula in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. Eur J Oral Sci 2006 Feb; 114(1):58–63.
124. Schwering M, Song J, Louie M, Turner RJ, Ceri H. Multi-species biofilms defined from drinking water microorganisms provide increased protection against chlorine disinfection. Biofouling 2013 Sep ;29(8):917–28.
125. Özok AR, Wu MK, Luppens SBI, Wesselink PR. Comparison of Growth and Susceptibility to Sodium Hypochlorite of Mono- and Dual-Species Biofilms of Fusobacterium nucleatum and Peptostreptococcus (micromonas) micros. J Endod . 2007 [33(7):819–22.
126. Bradshaw DJ, Marsh PD, Watson GK, Allison C. Oral anaerobes cannot survive oxygen stress without interacting with facultative/aerobic species as a microbial community. Lett Appl Microbiol 1997 ;25(6):385–7.

127. West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS. The Social Lives of Microbes. 2007
128. Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol. 1995;49:711–45.
129. De Meyer S, Meire MA, Coenye T, De Moor RJG. Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. Int Endod J. 2017 May 1
130. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of Enterococcus faecalis. Arch Oral Biol 2013
131. Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro: A Three-Dimensional Quantitative Analysis. J Endod. 2009 Jul;35(7):981–5.
132. Phee A, Bondy-Denomy J, Kishen A, Basrani B, Azarpazhooh A, Maxwell K. Efficacy of bacteriophage treatment on Pseudomonas aeruginosa biofilms. J Endod. 2013 Mar 39(3):364–9.
133. Sjollema J, Rustema-Abbing M, van der Mei HC, Busscher HJ. Generalized Relationship between Numbers of Bacteria and Their Viability in Biofilms. Appl Environ Microbiol. 2011 Jul. 77(14):5027.
134. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. J Endod. 2013 Apr;39(4):473–7.
135. Lim Z, Cheng JL, Lim TW, Teo EG, Wong J, George S, et al. Light activated disinfection: An alternative endodontic disinfection strategy. Aust Dent J 2009 Jun 54(2):108–14.
136. Chau NPT, Chung NH, Jeon JG. Relationships between the antibacterial activity of sodium hypochlorite and treatment time and biofilm age in early Enterococcus faecalis biofilms. Int Endod J 2015 Aug 1;48(8):782–9.
137. Ito A, Taniuchi A, May T, Kawata K, Okabe S. Increased antibiotic resistance of Escherichia coli in mature biofilms. Appl Environ Microbiol 2009 Jun;75(12):4093–100.
138. Balić M, Lucić R, Mehadžić K, Bago I, Anić I, Jakovljević S, et al. The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic-activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal E. faecalis biofilm. Lasers Med Sci 2016 Feb 1;31(2):335–42.

139. George S, Kishen A. Effect of Tissue Fluids on Hydrophobicity and Adherence of Enterococcus faecalis to Dentin. J Endod 2007 Dec;33(12):1421–5.
140. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. J Med Microbiol 2005 Aug ;54(8):777–83.
141. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. Endod Topics. 2010 Mar 1;22(1):58–78.
142. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro Infection and Disinfection of Dentinal Tubules. J Dent Res. 1987; 66(8):1375–9.
143. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MSZ, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. Int Endod J 2014 Nov 1;47(11):1058–63
144. Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. Eur J Oral Sci 2004 Apr;112(2):182–7.
145. Uzunoglu-Ozyurek E, Askerbeyli-Ors S, Türker S. Evaluation of the amount of remained sealer in the dentinal tubules following re-treatment with and without solvent. Journal of Conservative Dentistry 2020 Jul 1;23(4):407–11.
146. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. J Microbiol Methods 2010 Jul ;82(1):64–70.
147. Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. J Microbiol Methods 2000 40(2):175–9.
148. Pérez-Osorio AC, Franklin MJ. qRT-PCR of microbial biofilms. Cold Spring Harb Protoc 2008 Oct 3(10).
149. McComb D, Smith DC. A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures. J Endod 1975 May ;1(7):238–42.
150. Berg MS, Jacobsen EL, BeGole EA, Remeikis NA. A comparison of five irrigating solutions: A scanning electron microscopic study. J Endod 1986 12(5):192–7.

151. Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. Dent Clin North Am. 1974 Apr;18(2):269–96.
152. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod;85(1):86–93.
153. Gilhooly RMP, Hayes SJ, Bryant ST, Dummer PMH. Comparison of cold lateral condensation and a warm multiphase gutta-percha technique for obturating curved root canals. Int Endod J. 2000 33(5):415–20.
154. Mayo CV, Montgomery S, del Rio C. A computerized method for evaluating root canal morphology. J Endod 1986 12(1):2–7.
155. Wildey WL, Senia ES. A new root canal instrument and instrumentation technique: A preliminary report. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1989 67(2):198–207.
156. Gutie´rrez JH, Garci´a J. Microscopic and macroscopic investigation on results of mechanical preparation of root canals. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1968 25(1):108–16.
157. Liolios E, Economides N, Parissis-Messimeris S, Boutsioukis A. The effectiveness of three irrigating solutions on root canal cleaning after hand and mechanical preparation. Int Endod J 1997 ;30(1):51–7.
158. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. J Endod. 2000 26(6):331–4.
159. Coleman CL, Svec TA. Analysis of Ni-Ti versus stainless steel instrumentation in resin simulated canals. J Endod 1997;23(4):232–5.
160. Oltramare. Plötzliche Extirpation der Zahnpulpa mittels einer durch die Bohrmaschine in Rotation versetzen Nadel. Dtsch Monatsschr Zahnheilk. . 1892 32: p 407-409.
161. Hülsmann M, Herbst U, Schäfers F. Comparative study of root-canal preparation using Lightspeed and Quantec SC rotary NiTi instruments. Int Endod J []. 2003 Nov [cited 2025 Jun 13];36(11):748–56.
162. Leeb J. Canal orifice enlargement as related to biomechanical preparation. J Endod []. 1983 [cited 2025 Jun 13];9(11):463–70.
163. Tepel J, Schäfer E, Hoppe W. Properties of endodontic hand instruments used in rotary motion.Part 1. Cutting efficiency. J Endod 1995 13];21(8):418–21.

164. Walia H, Brantley WA, Gerstein H. An initial investigation of the bending and torsional properties of nitinol root canal files. J Endod 1988 14(7):346–51.
165. Glosson CR, Haller RH, Brent Dove S, del Rio CE. A comparison of root canal preparations using Ni-Ti hand, Ni-Ti engine-driven, and K-Flex endodontic instruments. J Endod 1995 21(3):146–51.
166. Bergmans L, Van Cleynenbreugel J, Wevers M, Lambrechts P. A methodology for quantitative evaluation of root canal instrumentation using microcomputed tomography. Int Endod J 2001 34(5):390–8.
167. Leseberg DA, Montgomery S. The effects of Canal Master, Flex-R, and K-Flex instrumentation on root canal configuration. J Endod 1991 17(2):59–65.
168. HERO 642 - Micro-Mega
169. Veltri M, Mollo A, Mantovani L, Pini P, Balleri P, Grandini S. A comparative study of Endoflare-Hero Shaper and Mtwo NiTi instruments in the preparation of curved root canals. Int Endod J 2005 Sep 38(9):610–6.
170. Harorlı H, Koç S, Kuştarcı A. Extrusion of debris during retreatment using various nickel-titanium files in teeth with simulated lateral root perforation. J Oral Sci 2024 66(3):189–92.
171. Kitap - Kök kanalı şekillendirme yöntemleri - E. Sedat Küçükay - kitantik - kitaLog
172. Mounce RE. The K3 rotary nickel-titanium file system. Dent Clin North Am 2004 Jan;48(1):137–57.
173. Elizabeth M. S. Hand instrumentation in root canal preparation. Endod Topics []. 2005 Mar 10(1):163–7.
174. Schäfer E, Tepel J, Hoppe W. Properties of endodontic hand instruments used in rotary motion Part 2. instrumentation of curved canals. J Endod 1995];21(10):493–7.
175. Serene TP., Adams JDavid, Saxena A. Nickel-titanium instruments : applications in endodontics. 1995;112.
176. Bürklein S, Schäfer E. Apically extruded debris with reciprocating single-file and full-sequence rotary instrumentation systems. J Endod 2012 Jun 38(6):850–2.
177. CHAPMAN CE, COLLEE JG, BEAGRIE GS. A Preliminary Report on the Correlation between Apical Infection and Instrumentation in Endodontics. Int Endod J 1968 2(1):7–11.

178. VandeVisse JE, Brilliant JD. Effect of irrigation on the production of extruded material at the root apex during instrumentation. J Endod 1975;1(7):243–6.
179. Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Machado AG, Gahyva SM, Oliveira JCM, et al. Incidence of postoperative pain after intracanal procedures based on an antimicrobial strategy. J Endod 2002;28(6):457–60.
180. Seltzer S, Naidorf IJ. Flare-ups in endodontics: I. Etiological factors. J Endod 1985 11(11):472–8.
181. Seltzer S, Soltanoff W, Sinai I, Goldenberg A, Bender IB. Biologic aspects of endodontics part III. Periapical tissue reactions to root canal instrumentation. J Endod 2004 30(7):491–9.
182. Gutiérrez JH, Brizuela C, Villota E. Human teeth with periapical pathosis after overinstrumentation and overfilling of the root canals: A scanning electron microscopic study. Int Endod J []. 1999 Jan ;32(1):40–8.
183. Tanalp J, Kaptan F, Sert S, Kayahan B, Bayirl G. Quantitative evaluation of the amount of apically extruded debris using 3 different rotary instrumentation systems. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology []. 2006 Feb [cited 2025 Aug 7];101(2):250–7.
184. Yusuf H. The significance of the presence of foreign material periapically as a cause of failure of root treatment. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology []. 1982 [cited 2025 Aug 29];54(5):566–74.
185. Ilango S, Ramachandran A, Kadandale S, Chandrasekaran C, Sakthi N, Vishwanath S. Evaluation of antimicrobial efficacy of sodium dichloroisocyanurate as an intracanal medicament against Enterococcus faecalis and Candida albicans. Journal of Conservative Dentistry and Endodontics []. 2025 May 1 [cited 2025 Aug 18];28(5):444–8.
186. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. Br Dent J []. 2014 Mar 21 [cited 2025 Aug 6];216(6):299–303.
187. Tomson RME, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system. Br Dent J []. 2014 Mar 21 ;216(6):315–22.
188. Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. Int Endod J. 2001 Apr ;34(3):221–30

189. Betül Kaya. Farklı NiTi Döner Alet Sistemleri ile Yapılan Preparasyonun Dentin Dezenfeksiyonuna, Apikalden Taşan Sıvı, Debris ve Bakteri Miktarına Etkisinin *in vitro* Olarak İncelenmesi [Sivas]; 2013.
190. Alves FRF, Paiva PL, Marceliano-Alves MF, Cabreira LJ, Lima KC, Siqueira JF, et al. Bacteria and Hard Tissue Debris Extrusion and Intracanal Bacterial Reduction Promoted by XP-endo Shaper and Reciproc Instruments. J Endod 2018 Jul 1 44(7):1173–8.
191. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of Ethylenediaminetetraacetic Acid and Sodium Hypochlorite Irrigation on Enterococcus faecalis Biofilm Colonization in Young and Old Human Root Canal Dentin: In Vitro Study. J Endod 2010 May;36(5):842–6.
192. Ghogre P, Chourasia HR, Agarwal M, Singh MP, Gurav S, Ghogre R. Quantitative evaluation of apical extrusion of intracanal bacteria using rotary ProTaper, K3XF, twisted and hand K-file system: An ex vivo study. Indian Journal of Dental Research 2015 Jul 1;26(4):406–10.
193. Surbhi Patel, Pawan Patel, Pragya Patel, Sankalp Agnani, Alok Kumar, Sachin B Mangalekar. Evaluation and comparison of apical bacterial extrusion after instrumentation of the root canals using various endodontic file systems: An in vitro study. J Pharm Negat Results. 2022 Oct 10;1576–81.
194. Tinoco JM, De-Deus G, Tinoco EMB, Saavedra F, Fidel RAS, Sassone LM. Apical extrusion of bacteria when using reciprocating single-file and rotary multifile instrumentation systems. Int Endod J. 2014 ;47(6):560–6.
195. Low Pui-Yii N, Jie SZ, Bhatia S, Davamani F, Nagendrababu V. Comparison of Apical Extrusion of Bacteria After Glide Path Preparation Between Manual K File, One G Rotary, and WaveOne Gold Glider Reciprocation Preparations. Eur Endod J 2021 6(2):221–5.
196. Aydin U, Zer Y, Zorlu Golge M, Kirkgoz Karabulut E, Culha E, Karataslioglu E. Apical extrusion of Enterococcus faecalis in different canal geometries during the use of nickel titanium systems with different motion types. J Dent Sci 2017 Mar 1 12(1):1–6.
197. Kho P, Baumgartner JC. A Comparison of the Antimicrobial Efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against Enterococcus faecalis. J Endod 2006 Jul 32(7):652–5.

198. Tinaz AC, Alacam T, Uzun O, Maden M, Kayaoglu G. The effect of disruption of apical constriction on periapical extrusion. J Endod 2005;31(7):533–5.
199. Teixeira JMS, Cunha FM, Jesus RO, Silva EJNL, Fidel SR, Sassone LM. Influence of working length and apical preparation size on apical bacterial extrusion during reciprocating instrumentation. Int Endod J 2015 Jul 1 48(7):648–53.
200. Aksel H, Küçükkaya Eren S, Çakar A, Serper A, Özkuyumcu C, Azim AA. Effect of Instrumentation Techniques and Preparation Taper on Apical Extrusion of Bacteria. J Endod 2017 Jun 1 43(6):1008–10.
201. Gerberding JL, Director Dixie Snider ME, Chu SY, Thacker SB, Ward JW, Hewitt SM, et al. Dental Health-Care Settings-2003. MMWR 2003 ;52(17).
202. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, et al. HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres. Cell2009 May ;137(3):485–97.
203. Goulart TS, Prado MM, Tieppo GC, Fischer BV, Schuldt DPV, Coelho BS, et al. Do instrument kinematics and the apical preparation limit influence canal disinfection and bacterial extrusion? Odontology 2025 Jul 1 ;113(3):1073–80.
204. Kalra P, Rao A, Suman E, Shenoy R, Suprabha BS. Evaluation of conventional, protaper hand and protaper rotary instrumentation system for apical extrusion of debris, irrigants and bacteria- An in vitro randomized trial. J Clin Exp Dent. 2017 Feb;9(2):e254–8.
205. Polineni S, Damaraju B, Bolla N, Ch S, Krishna N, Sreeha K. Comparative evaluation of apical extrusion of intracanal bacteria using ProTaper Next, Mtwo, and ProTaper rotary systems: An in vitro study. Journal of Conservative Dentistry. 2020 May 1 23(3):314–8.
206. Sahni G, Garg N, Chhabra A, Negi S, Gupta S, Chhabra V. Assessment of various endodontic instrumentation systems on the amount of apically extruded bacteria - An in vitro study. J Conserv Dent 2020 May ;23(3):270.
207. Pawar AM, Pawar BA, Bhardwaj A, Luke AM, Metzger Z, Kfir A. Apical Debris Extrusion by Adaptive Root Canal Instrumentation in Oval Canals: Full-Sequence SAF System vs. the XP-Endo Shaper Plus Sequence. Applied Sciences 2020, Vol 10, Page 5684. 2020 Aug 16;10(16):5684.

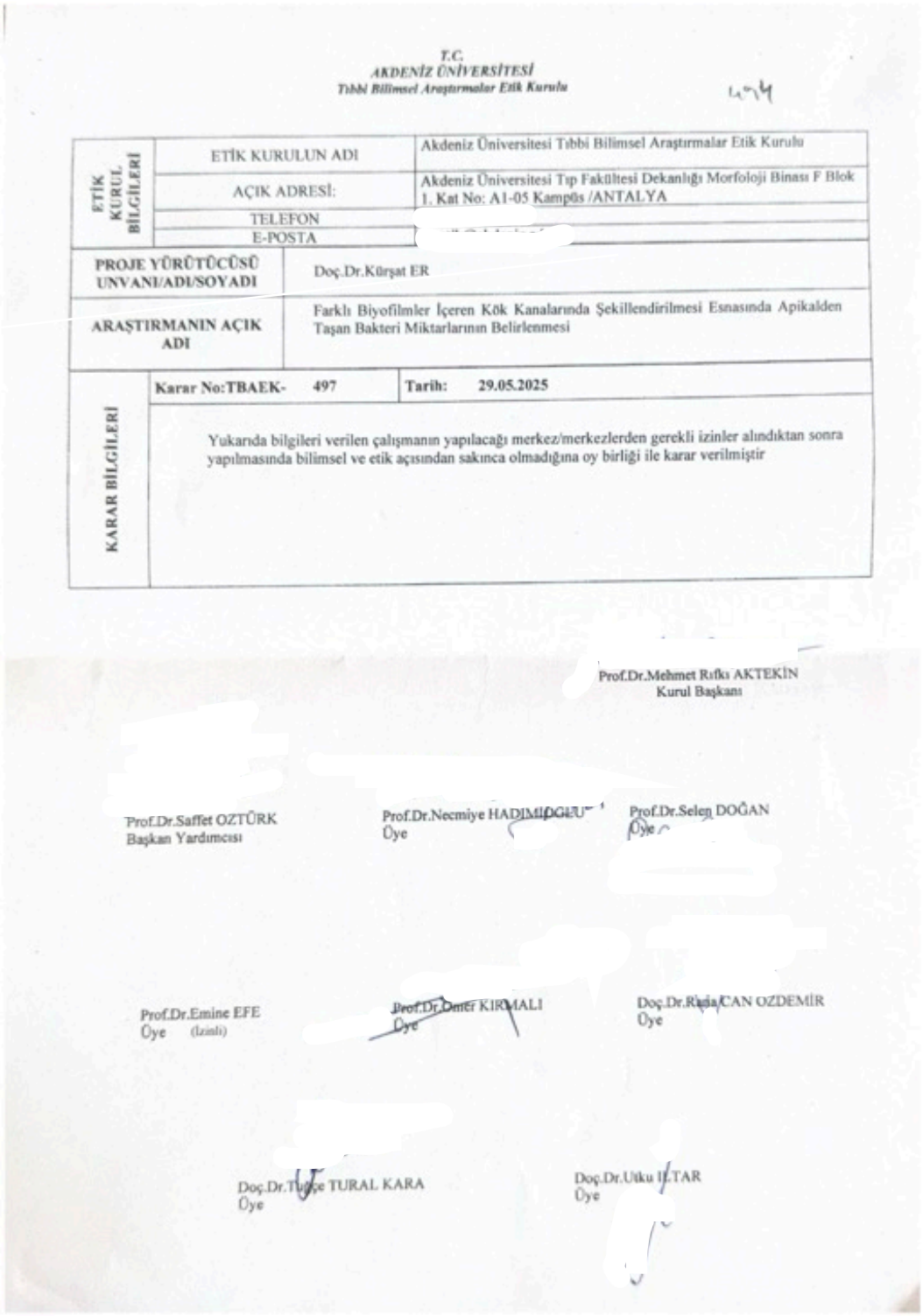
208. Kustarci A, Akdemir N, Siso SH, Altunbas D. Apical extrusion of intracanal debris using two engine driven and step-back instrumentation techniques: an in-vitro study. Eur J Dent. 2008 Oct;2(4):233–9.
209. Cabreira LJ, Gominho LF, Rôças IN, Dessaune-Neto N, Siqueira JF, Alves FR. Quantitative analysis of apically extruded bacteria following preparation of curved canals with three systems. Australian Endodontic Journal 2019 Apr 1 45(1):79–85.
210. Salzgeber RM, Brilliant JD. An in vivo evaluation of the penetration of an irrigating solution in root canals. J Endod 1977;3(10):394–8.
211. Pereira TC, Boutsioukis C, Dijkstra RJB, Petridis X, Versluis M, de Andrade FB, et al. Biofilm removal from a simulated isthmus and lateral canal during syringe irrigation at various flow rates: a combined experimental and Computational Fluid Dynamics approach. Int Endod J 2021 Mar ;54(3):427–38.
212. Soares JA, Carvalho MAR De, Soares SMCS, Pereira RD, Brito-Júnior M, Magalhães PP, et al. Pattern of Disinfection of Root Canal Dentin by Alternated Acid-Base Irrigating Regimen. Scientific World Journal 2019 2019.
213. Giovarruscio M, Argueta-Alvarado MH, Torres-Mendez F, Davila-Perez CE, Cerda-Cristema BI, Sauro S, et al. Bacterial percolation and sealer tubular penetration in a polymer-based obturation system compared with warm vertical condensation technique: An in vitro study. Iran Endod J 2020 Oct 1 15(4):246–52.
214. Mangalam S, N Rao C, Lakshminarayanan L. Evaluation of apically extruded debris and irrigant using three instrumentation techniques. Endodontology 2002 ;14(1):19.
215. Kara D, Luppens SBI, Ten Cate JM. Differences between single- and dual-species biofilms of Streptococcus mutans and Veillonella parvula in growth, acidogenicity and susceptibility to chlorhexidine. Eur J Oral Sci 2006 Feb 1 114(1):58–63.
216. Siqueira JF. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. J Endod 1996 ;22(6):308–10.

217. Siqueira JF, Rôças IN. Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. J Endod 2008 ;34(11).
218. Molander A, Reit C, Dahlén G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. Int Endod J. 1998 Jan;31(1):1–7.
219. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira JF. Microorganisms in Root Canal-treated Teeth from a German Population. J Endod 2008 Aug ;34(8):926–31.
220. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen Candida albicans: Development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001 183(18):5385–94.
221. Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. J Endod 2014 40(5):670–7.
222. Nair PNR. Endodontic biofilm, technology and pulpal regenerative therapy: Where do we go from here? Int Endod J 2014 Nov 1 ;47(11):1003–11.
223. Sen BH, Chugal NM, Liu H, Fleischmann J. A new method for studying the adhesion of Candida albicans to dentin in the presence or absence of smear layer. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2003 Aug 1 96(2):201–6.
224. Carolus H, Van Dyck K, Van Dijck P. Candida albicans and Staphylococcus Species: A Threatening Twosome. Front Microbiol 2019 Sep 18;10.
225. Eichelberger KR, Cassat JE. Metabolic Adaptations During Staphylococcus aureus and Candida albicans Co-Infection. Front Immunol 2021 Dec 8 12.
226. Souza LC, Brito PRR, Machado de Oliveira JC, Alves FRF, Moreira EJL, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic Therapy with Two Different Photosensitizers as a Supplement to Instrumentation/Irrigation Procedures in Promoting Intracanal Reduction of Enterococcus faecalis. J Endod 2010 Feb 36(2):292–6.
227. Beltes C, Sakkas H, Economides N, Papadopoulou C. Antimicrobial photodynamic therapy using Indocyanine green and near-infrared diode laser in reducing Entrerococcus faecalis. Photodiagnosis Photodyn Ther []. 2017 Mar 1 [cited 2025 Aug 7];17:5–8.

228. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against enterococcus faecalis in extracted human teeth. J Endod. 2011 Jun Aug 37(6):856–9.
229. Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. Ex vivo killing of Enterococcus faecalis and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. Int Endod J []. 2013 Jul ;46(7):649–59.
230. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on Enterococcus faecalis biofilms. Int Endod J . 2012 May 45(5):482–91.
231. Méndez-González V, Vitales-Noyola M, González-Amaro A, Muñoz-Viveros C, Ducoing-Hernández F. Elimination of an intraradicular biofilm composed of Enterococcus faecalis and Candida albicans using a negative apical pressure irrigation system. Journal of Oral Research. 2020 9(1):36–43.
232. Abou-Rass M, Piccinino M V. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1982 54(3):323–8.
233. Syringe irrigation revisited | Request PDF
234. DRUTTMAN ACS, STOCK CJR. An in vitro comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. Int Endod J []. 1989 [cited 2025 Aug 7];22(4):174–8.
235. Tiscareño A, Ortolani-Seltenerich PS, Ramírez-Muñoz A, Pérez-Ron O, Mendez S PM, Leal-Moya C, et al. Minimally Invasive Root Canal Cleaning: Evaluating Supplementary Irrigation Techniques. Dent J (Basel) . 2025 May 1 13(5).
236. Susila A, Minu J. Activated irrigation vs. Conventional non-activated irrigation in endodontics – A systematic review. Eur Endod J. 2019 ;4(3):96–110.
237. SIQUEIRA JF, MACHADO AG, SILVEIRA RM, LOPES HP, de UZEDA M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro . Int Endod J . 1997 Jul 30(4):279–82.

238. Eddy RS, Joyce AP, Roberts S, Buxton TB, Liewehr F. An in vitro evaluation of the antibacterial efficacy of chlorine dioxide on E. faecalis in bovine incisors. J Endod 2005 31(9):672–5.
239. Duggan JM, Sedgley CM. Biofilm Formation of Oral and Endodontic Enterococcus faecalis. J Endod . 2007 Jul 33(7):815–8.
240. Alves FRF, Rôças IN, Almeida BM, Neves MAS, Zoffoli J, Siqueira JF. Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. Int Endod J 2012 Sep 45(9):871–7.
241. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study. Restor Dent Endod . 2014 39(4):258.
242. Hamed SA, Shabayek S, Hassan HY. Biofilm elimination from infected root canals using four different single files. BMC Oral Health . 2022 Dec 1;22(1).

Ek 1. Etik Kurul Onayı



T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
Tıbbi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı Morfoloji Binası F Blok 1. Kat No: A1-05 Kampüs /ANTALYA
	TELEFON	
	E-POSTA	
PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI		Doç.Dr.Kürşat ER
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI		Farklı Biyofilmler İçeren Kök Kanalarında Şekillendirilmesi Esnasında Apikalden Taşan Bakteri Miktarlarının Belirlenmesi
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:TBAEK- 497	Tarih: 29.05.2025
	Yukarıda bilgileri verilen çalışmanın yapılacağı merkez/merkezlerden gerekli izinler alındıktan sonra yapılmasında bilimsel ve etik açısından sakınca olmadığına oy birliği ile karar verilmiştir	

Prof.Dr.Mehmet Rıfkı AKTEKİN
Kurul Başkanı

Prof.Dr.Saffet OZTÜRK
Başkan Yardımcısı

Prof.Dr.Necmiye HADİMİOĞLU
Üye

Prof.Dr.Selen DOĞAN
Üye

Prof.Dr.Emine EFE
Üye (İzinli)

Prof.Dr.Emel KIRMALI
Üye

Doç.Dr.Rıdvan CAN OZDEMİR
Üye

Doç.Dr.Tuğçe TURAL KARA
Üye

Doç.Dr.Utku IŞTAR
Üye