

Biyofilm ve Endodonti: Bölüm 1

Biofilm and Endodontics: Part 1

Neslihan ŞİMŞEK¹, Elçin Tekin BULUT¹

¹Inönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti AD, Malatya

Özet

Mikroorganizmaların oluşturdukları biyofilm yapısı, planktonik hücrelerle kıyaslandığında, bu organizmalara daha üstün hayatta kalma becerileri kazandırmaktadır. Kompleks biyofilm yapısı mikroorganizmaların iletişim kurmalarını, değişen yaşam şartlarında hayatta kalabilmelerini ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli olmalarını sağlamaktadır. Kök kanallarında ve çevre dokularında oluşan biyofilm tabakası kök kanal tedavisinin başarısını direk olarak etkilemektedir. Bu makale; biyofilm tabakasının oluşumunun, içerdiği mikroorganizmaların birbirleri ile iletişimlerinin, antimikrobiyallere karşı direnç mekanizmalarının ve endodontide öneminin derlenmesini amaçlamaktadır.

Anahtar Kelimeler: Biyofilm, Dental plak, Antimikrobiyal, Endodontik biyofilmler.

Abstract

Biofilm structure that formed by microorganisms, when compared to planctonic cells, provides these organisms superior survival ability. Complex biofilm structure allows microorganism to communicate, survive in changing living conditions and resistance to antimicrobial agents. Biofilm layers that formed around root canals and surrounding tissues directly effect the success of endodontic treatments. This article reviews the formation of biofilm layers, communication of comprising microorganisms to each other, resistance mechanisms to antimicrobials and importance in endodontics.

Key Words: Biofilm, Dental plaque, Antimicrobial, Endodontic biofilms.

Giriş

Costerton ve arkadaşları 1977 yılında biyofilmi “bakterilerin, polisakkarit fiberlerin birbirine geçmesiyle veya şeker moleküllerinin dallanmasıyla bakteri yüzeyinden uzanarak tek bir hücrenin veya hücre kolonilerinin adezyonun iletimini sağlayan glikokaliks yapısının çevrelenmesiyle yapıştıkları görülmüştür” diyerek tanımlamışlardır (1). Elder ve arkadaşları ise mikroorganizmaların ekzopolimer matriks aracılığı ile oluşturdukları yapısal birlik olarak tanımlamışlardır (2). Biyofilmin en yeni tanımı ise; mikroorganizmalar tarafından oluşturulan, mikroorganizmaların herhangi bir yüzeye, ara yüzeye veya birbirlerine yapışmalarını sağlayan ve büyüme oranları ile gen transkripsiyonuna bağlı olarak farklı fenotip gösterebilen ve oluşturan, mikroorganizmaların içinde gömülü olarak bulunduğu ekstraselüler polimerik maddeden oluşmuş matriks şeklindedir (3).

Bir mikrobik biyofilm, şu dört temel kriteri sağlayan bir topluluk olarak düşünülür: 1-Çoğunluğu kendi kendilerini organize edebilme özelliğine sahiptirler (autopoiesis); 2-Çevresel düzensizliklere dirençlidirler (homeostasis); 3-Birlikte olduklarında izole olduklarından daha etkilidirler (sinerji); 4-Çevresel değişikliklere karşı tek tek bir bireyden ziyade birlikte karşılık verirler (communality) (4).

Ekstraselüler Polimerik Matriks

Biyofilmlerin çoğunda mikroorganizmalar kuru yapının % 10’undan daha azını oluştururken, matrix % 90’dan daha fazlasını oluşturmaktadır.

Matrix çoğunlukla mikroorganizmaların kendileri tarafından üretilen ve biyofilm hücrelerinin yerleştiği ekstraselüler materyaldir. Farklı tipteki polimerlerin kümeleri ile oluşmaktadır ve bu da ekstraselüler polimerik matriks olarak bilinmektedir. EPM üç boyutlu biyofilm yapısının iskeletini oluşturur ve biyofilmin yüzeylere adezyonu ve kohezyonundan sorumludur (5). Bu EPM’ler hücreleri yüzeye bağlayarak adezin gibi davranmalarını dışında hücreleri birbirlerine de bağlayarak antimikrobiyallerin biyofilmler içerisinde mikrokolonilere difüzyonunu önlemekte ve geciktirmekte, ve konağın savunma mekanizmalarından biyofilm organizmalarını korumaktadır (6).

Biyofilm durumundaki bakteri zorlu büyüme ve çevre şartlarında farklı bir hayatta kalma kapasitesi göstermektedir. Biyofilm durumundaki bakterinin bu eşsiz kapasitesi şu özelliklerinden kaynaklanır: 1-Biyofilm yapısı içerisindeki bakterileri çevresel tehditlerden korumaktadır. 2-Biyofilmin yapısı besinlerin yakalanmasına ve içerisindeki aynı veya farklı türden hücrelerin metabolik birlikteliğine imkân sağlamaktadır. 3-Biyofilm yapısı organize iç bölümlendirme özelliği göstermektedir, bu da farklı büyüme gereksinimi olan bakteri türlerinin farklı bölmelerde yaşayabilmesine imkân sağlamaktadır. 4-Biyofilm topluluğu içerisindeki bakteriyel hücreler yeni özellikler alabilmek için haberleşebilir ve genetik materyal değiş tokuşu yapabilirler (7).

Quorum Sensing

Bakteriler otoindüktör denilen, yayılabilen sinyal moleküllerinin üretimi yoluyla iletişim kurarlar. Bu moleküller bazal seviyede üretilerek büyüme sırasında birikirler. Kritik konsantrasyona ulaşıldığında otoindüktörler hedef genlerin bir kısmını aktive edebilir veya baskılayabilirler. Otoindüktörlerle gen ekspresyon kontrolü hücre yoğunluğuna bağlı olduğundan bu olay quorum sensing olarak adlandırılır. Quorum sensing birçok organizmada virulans gen ekspresyonu ile kontrol edilmektedir (8).

Quorum sensing bakterilere; başka bir bakteri ile karşılaşıldığında iletişim kurabilme ve davranışını değiştirebilme yeteneği kazandırır. Quorum sensing bireylerden oluşan topluluğun birlikte hareket etmelerine ve çok hücreli birim olarak davranmalarına izin vermektedir (9).

Biyofilmin Antimikrobiyal Dirençteki Rolü

Biyofilm içerisinde bulunan bakterilere ve kullanılan ilaç veya biyosite bağlı olarak biyofilm direncinin etkili olduğu birkaç mekanizma bulunmaktadır. Bu mekanizmalar, biyofilm içerisine antimikrobiyallerin penetrasyonunun fiziksel veya kimyasal bariyeri, besin sınırlamalarına bağlı olarak biyofilm büyümesinin yavaşlaması, genel stress cevabının aktive edilmesi ve biyofilme bağlı fenotipin ortaya çıkmasını içermektedir (10). Antimikrobiyal ajanların biyofilm içerisine tamamen girememesi biyofilm matrisini oluşturan polimerik maddenin antibiyotiklerin diffüzyonunu engellediği bilinmektedir (11). Biyofilm içerisindeki en azından bir kısım organizmaların besin sınırlamasından dolayı yavaş büyüme evresine geçtiği ve bu yüzden de antibiyotiklere karşı direnç gösterdiği düşünülmektedir (10,11). Besin sınırlamasına bağlı olmayan genel strese karşılık olarak da büyümenin yavaşladığı gözlenmiştir (11). Biyofilm duyarlılığını azaltan diğer bir husus da biyofilm içerisindeki bir kısım organizmaların koruyucu bir fenotip kazanması olarak açıklanmıştır (11).

Biyofilm Oluşumu

Biyofilm oluşumu mikroorganizmaların geri dönülemez bir şekilde bir yüzeye bağlandığı ve büyüdüğü tutunmayı ve matriks oluşumunu sağlayan ekstrasellüler polimerler ürettiği, büyüme hızı ve gen transkripsiyonuna oranla organizmaların fenotipinde başkalaşmayla sonuçlanan bir işlemdir (12). Biofilm oluşumunun en erken safhası planktonik safhadaki makromoleküllerin yüzeye absorpsiyonu ve bunun sonucunda da koşullandırıcı tabakanın oluşumunu içermektedir (13). İkinci aşama mikroorganizmaların adezyon ve kohezyonu ve polimer üretimi yoluyla güçlendirilen tutunma ve yüzey hücre yapılarının yayılmasını içerir. Üçüncü aşama ise yapısal olarak organize olmuş karışık mikrobiyal toplulukla sonuçlanan, tutunan mikroorganizmaların çoğalmasını ve metabolizmasını içermektedir. Bu aşama sırasında mikroorganizmaların doğal karakteristikleri ve mikro

çevrenin doğası biyofilm içerisinde mikroorganizmaların çoğalmasını ve devamını etkiler (13). Yüzeye geri dönülemeyecek şekilde tutunan hücreler hücre bölünmesini başlatacak ve biyofilmi tanımlayan ekstrasellüler polimerleri üretecektir. Bu ekstrasellüler polimerik matriksler esas olarak polisakkaritlerden oluşmaktadır ve mikroskopla veya kimyasal analizle tespit edilebilmektedir (12).

Biyofilm Olarak Dental Plak

Dental plak; diş yüzeyinde biyofilm olarak bulunan, konağın polimerlerinin matriksinin içine yerleşmiş, mikrobiyal orijinli çeşitli mikroorganizma toplulukları olarak tanımlanabilir. Dental plak birikimi ağız içerisinde güçlü uzaklaştırma etkilerinden koruma sağlayan durgun bölgelerde gerçekleşmektedir. Dental plak gelişiminin belirli aşamaları şu şekilde tanımlanabilmektedir. A-Bakteriyel ve konak moleküllerinin diş yüzeyine tutunması: bu koşullandırıcı film (pelikül) dişin erüpsiyonu ya da temizlenmesini takiben oluşmaktadır ve başlangıçtaki mikrobiyal kolonizasyonun şeklini direk olarak etkilemektedir. B-Oral bakterinin diş yüzeyine pasif taşınımı: mikrobiyal hücre yüzeyi ve pelikül kaplı diş arasındaki zayıf, uzun vadeli fizikokimyasal etkileşimler geri dönüşümlü adezyona olanak sağlayan net çekimin zayıf olduğu bir bölge oluşturmaktadır. Sonrasında bakteriyel hücre yüzeylerindeki belirli moleküller (adezinler) ile peliküldaki tamamlayıcı reseptörler arasındaki güçlü, kısa vadeli etkileşimler geri dönüştürülemez tutunmayla sonuçlanabilir. C-Sonraki kolonilerin, tutunmuş olan önceki kolonilere ko-adezyonu: ko-adezyon dental plağın fonksiyonel organizasyonunu gerçekleştirmesine imkân sağlayabilir. Bakteriler çeşitli antagonistik ve sinerjistik biyokimyasal etkileşimler içerisinde bulunurlar. D-Tutunan mikroorganizmaların çoğalmasında hücre bölünmesi birleşik büyümeye neden olduğundan üç boyutlu, uzaysal, fonksiyonel olarak organize, karışık kültürlü biyofilm oluşumuna sebep olacaktır. Polimer üretimi suda çözünebilir ve çözünemeyen glukanlar, flukanlar ve heteropolimerlerde oluşan kompleks ekstrasellüler matriks oluşumuyla sonuçlanacaktır. E-Aktif kopma: bakteriler çevresel belirtilere cevap verebilir ve yüzeyden koparak hücrelerin başka bir yerde koloni oluşturmalarına imkan sağlarlar (14).

EndodontikBiyofilm

Sağlıklı bir insanın ağızında 300'den fazla mikroorganizma türünün kolonize olduğu bilinmektedir. Dental sert dokunun bütünlüğü bozulduğunda mikrobiyotadan bir kısmı pulpa odasını enfekte edebilir. Bununla birlikte, endodontik floranın öne çıkan özelliği az sayıda türün periapikal olarak enfekte olmuş dişlerin kök kanallarından sürekli olarak izole edilmesidir (15).

Birçok vakada, endodontik tedavinin başarısız olması, iyi tedavi edilmiş dişlerde bile, kök kanal sisteminin

apikal kısmındaki inatçı mikroorganizmalardan kaynaklanmaktadır. İstmus, dallanmalar, deltalar, düzensizlikler ve dentintübülleri gibi bölgelerde bulunan bakteriler, bazı durumlarda endodontik tedavi prosedürlerinden etkilenmeyebilirler. Tedavi sonrasında dallanmalarda ve deltalarda bulunan bakterilerin besin kaynağı kesilmezken, dentinal tübüllerde ve isthmuslarda bulunan bakterilerin besine ulaşma yolları kapatılmıştır. Bu bölgelerde kanal dolgusu ile üzeri kapatılan bakteri ya ölür ya da periradiküler dokulara geçişi engellenir. Fakat bazı bakteri türleri doku kalıntıları ve ölü hücrelerden beslenerek görel olarak daha uzun süreler yaşayabilirler (16).

Endodontik enfeksiyonlar anatomik olarak buldukları yere göre intraradiküler veya ekstraradiküler olarak sınıflandırılabilirler. Intraradiküler enfeksiyona kök kanal sisteminde kolonize olan mikroorganizmalar sebep olmaktadır ve kök kanal sistemine mikroorganizmaların girme zamanlarına göre üç alt kategoriye ayrılabilirler. 1- Primer enfeksiyonlar, nekrotik pulpa dokusunu kolonize eden ve ilk olarak işgal eden mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır. 2- Sekonder enfeksiyonlar, primer enfeksiyonlarda görülmeyen fakat kök kanalına profesyonel müdahaleden sonra girmiş olan mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlardır. İnataç enfeksiyonlar, primer ve sekonder enfeksiyonların üyesi bulunduğu mikroorganizmalar tarafından sebep olunan ve bir şekilde intrakanal antimikrobiyal prosedürlere direniş göstermiş ve tedavi edilen kanallarda besin yoksunluğuna dayanabilmiş enfeksiyonlardır. Ekstraradiküler enfeksiyon enfekte olmuş periradiküler dokuları mikropların işgal etmesiyle karakterize edilen ve intraradiküler enfeksiyonların devamı olan enfeksiyonlardır. Ekstraradiküler enfeksiyonlar intraradiküler enfeksiyonlara bağımlı ya da bağımsız olabilir (17).

Wang ve arkadaşları, kök ucu cerrahisi yapılmış, kök kanal dolgusu tamamlanmış, apikal periodontitisi bulunan 23 dişten apikal kök örnekleri olarak yaptıkları çalışmalarında; 5 örneği SEM aracılığı ile, 5 örneği ise Brown ve Brenn modifiye gram boyama aracılığı ile biyofilm varlığını araştırmak için kullanmışlar. Tedavi edilmiş dişlerin dış kök yüzeylerinde görülen ekstraradiküler biyofilmin, bol miktarda şekilsiz ekstrasellüler materyalin ve birçok bakteriyel türün varlığını görmüşlerdir (18). Bir başka çalışmada; pulpa nekrozu bulunan, periapikal lezyonları radyografik olarak görülen veya görülemeyen ve canlı pulpası bulunan dişlerin kök apekslerinin eksternal yüzeylerinde bakteriyel biyofilmin varlığının değerlendirildiği çalışmada sağlıklı dişlerin ve pulpa nekrozu olan radyografik olarak periapikal lezyon görülmeyen dişlerin apikal eksternal kök yüzeylerinde mikroorganizma bulunmamıştır. Pulpa nekrozu ve kronik periapikal lezyonu olan dişlerde ise sementte

rezorbsiyon ve apikal foramen çevresinde çok miktarda mikroorganizmaya rastlanmışlardır (19). Dirençli periapikal periodontitisi bulunan insan dişlerinin ekstraradiküler biyofilmleri, biyofilm oluşturan bakterileri ayırt etmek için ve belirlenen bakterilerin immünohistokimyasal yerleşiminin araştırıldığı çalışmada; 20 ekstraradiküler biyofilm örneğinin 14'ünden 1207 klon analiz edilmiş ve 113 bakteri cinsi ve türü belirlenmiştir (20). Noiri ve arkadaşlarının elektron mikroskop çalışmalarında; cerrahi olarak çekilen dişlerin; yüzeyi, kök uçları ve ameliyat sırasında veya endodontik olarak yeniden yapılan tedavi sırasında çıkarılan gutta perka uçlarında periapikal lezyonlarda biyofilmin oluşumunun varlığı incelenmiştir ve incelenen 11 örneğin 9'unda ekstraradiküler biyofilme rastlanmıştır (21). Dirençli periapikal endodontik lezyonların florasının toplanması ve belirlenmesinin amaçlandığı çalışmada; 36 periapikal lezyondan 35'inde mikrobiyal büyüme gözlenmiştir ve 33 örnekte polimikrobiyal türe rastlanırken 2 örnekte tek bakteriyel türe rastlanmıştır (22).

Biyomateryal Merkezli Enfeksiyon

Bakteriler; yapay biyomateryal yüzeye yapıştığında ve biyofilm yapısı oluşturduklarında biyomateryal merkezli enfeksiyon oluştururlar. Biyomateryalin konağın bağışıklık sistemine yakın olması biyomateryal merkezli enfeksiyonlara duyarlılığı arttırmaktadır. Endodontide biyomateryal merkezli enfeksiyonlar kök kanal dolgu materyalleri üzerinde oluşabilirler (23). Kök kanallarından izole edilen bakterilerin gutta perka uçlarında ilk biyofilm oluşturma yeteneklerinin araştırıldığı in vitro çalışmada *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, *S. intermedius*, *S. pyogenes* ve *Staphylococcus aureus* türlerinin yüksek konsantrasyonlu serum içerisinde bulunan gutta perka uçlarının yüzeylerinde tek türlü biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (24). *E. faecalis*'in; farklı kök kanal patları ile kaplanmış ve kaplanmamış gutta perka uçları üzerinde biyofilm oluşturma kapasitesinin, farklı besin durumlarında, tükürük ve serum içerisinde incelendiği in vitro çalışmada *E. faecalis*'in gutta perka uçları üzerinde (pat ile kaplanmış olsun ya da olmasın) besinden zengin veya yoksun ortamda tükürük veya serum içerisinde bekletildikten sonra biyofilm oluşturduğu gözlenmiştir (25).

Endodontik Biyofilmin Yok Edilmesi

Endodontik biyofilmin yok edilmesi ile ilgili yapılan çalışmalarda; Araki ve arkadaşlarının (26) çalışma bulguları, mikroplu apikal bölgelerin lazer ile ışınlanması diğer klinik testlerde olduğu gibi bağlanmış mikroorganizmaların yüzeysel buharlaşmasına imkân sağladığını göstermiştir. Işınlamada, hem mikrobiyolojik apikal biyofilm hem de enfekte olmuş sement buharlaşmış, açık dentin tübüllerinin olmadığı morfolojik olarak şekillendirilmiş bir yüzey oluşturulmuştur. Noiri ve arkadaşları (26) değişik

biyofilm (*Actinomyces naeslundii*, *E. faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Propionibacterium acnes*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*) üzerinde Er:YAG lazerin etkilerini incelemişlerdir. Er:YAG lazer biyofilmler üzerinde, *L. casei* dışındaki diğer bakteriyel türlerde etkili olmuştur. Işınlamadan sonra, biyofilm içerisindeki yaşayan hücrelerin sayısı önemli derecede azalmıştır ve bakteri hücrelerinde atropik değişiklikler ve biyofilm hücre yoğunluğunun azalması morfolojik olarak gözlemlenebilmiştir (27).

Chavez de Paz LE ve arkadaşları (27) klorheksidin, pH12 (alkali pH), EDTA ve NaOCl 'nin biyofilmin yok edilmesindeki etkisini test etmişlerdir. En etkin yok etme sodyum hipoklorit ile sağlanmıştır. Biyofilmlerden *E. faecalis*'in %91±1'ini, *L. paracasei*'nin %84 ±2'sini, *S. anginosus*'un %76 ±3'ünü ve *S. gordonii*'nin %71±1'ini yok etmiştir. Klorheksidin büyük miktarda *S. anginosus* (% 79±3) ve *E. faecalis* (%49±4) biyofilm hücrelerini yok edebilmiştir. Bunun yanında pH=12 sadece *S. anginosus* üzerinde belirgin bir yok etme etkisi (%63±6) göstermiştir. Benzer şekilde EDTA *S. gordonii* (% 83±3) ve *S. anginosus* (% 33±1) biyofilm hücreleri üzerinde etkili olmuştur. Shen ve arkadaşları in vitro çalışmalarında mekanik ajitasyonun (ultasonik veya sonik) biyofilm bakterilerine karşı klorheksidinin etkisini artırıp artırmadığını incelemişlerdir. Biyofilmi saran solüsyon ultrasonik veya sonik ajitasyona maruz kaldığında biyofilm yapısı belirgin bir değişiklik göstermemiştir. Mekanik ajitasyon ve klorheksidinin beraber kullanılması her ikisinin ayrı ayrı kullanılmasından daha fazla etkili olmuştur. Düşük şiddetteki ultrasonik veya sonik ajitasyon biyofilmi etkilememiş veya biyofilm bakterilerini dağıtmamıştır (28).

Kaynaklar

1. Costerton W, Geesey GG, Cheng KJ. How bacteria stick. *Sci Am* 1978; 238: 86–95.
2. Elder MJ, Stapleton F, Evans E, Dart JK. Biofilm-related infections in ophthalmology. *Eye* 1995; 9: 102-9.
3. Donlan MR, Costerton W. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 167-93.
4. Caldwell DE, Atuku E, Wilkie DC, et al. Germ theory vs. community theory in understanding and controlling the proliferation of biofilms. *Adv Dent Res* 1997; 11: 4-13.
5. Flemming HC, Wingender J. Biofilm the matrix. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 623-33.
6. Donlan RM. Role of biofilms in antimicrobial resistance. *ASAIO J* 2000; 46: 47-52.
7. Ingle JI, Bakland L, Baumgartner JC. Ingle's Endodontics 6. In: Baumgartner JC, Siquera JF Jr, Sedgley CM, Kishen A. *Microbiology of Endodontic Disease*. 6th ed. BC Decker 2008: 270-85.
8. Antunes LCM, Ferreira RBR, Buckner MMC, Finlay BB. Quorum sensing in bacterial virulence. *Microbiol* 2011; 156: 2271–82.
9. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2001; 55: 165–99.
10. Mah TFC, O'Toole GA. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trends Microbiol* 2001; 9: 34-9.
11. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 1999; 284: 1318-22.
12. Donlan RM. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clin Infect Dis* 2001; 33: 1387-92.
13. Svensater G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics* 2004; 9: 27–36.
14. Marsh PD. Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res* 2004; 38: 204-11.
15. Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000 1997; 13: 121–4.
16. Siqueira JF Jr. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *Int Endod J* 2001; 34: 1-10.
17. Hargreaves KM, Cohen S. Cohen's Pathways of the Pulp. In: Siqueira FJ Jr, Roças IN. *Microbiology and Treatment of Endodontic Infections*. 10th Ed. Elsevier-Health Sciences Division 2010: 569-71.
18. Wang J, Jiang Y, Chen W, Zhu C, Liang J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod* 2012; 38: 954-9.
19. Leonardo MR, Rossi MA, Silva AB, Ito IY, Bonifa'cio KC. EM evaluation of bacterial biofilm and microorganisms on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002; 28: 815-8.
20. Noguchi N, Noiri Y, Narimatsu M, Ebisu S. Identification and localization of extraradicular biofilm-forming bacteria associated with refractory endodontic pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8738–43.
21. Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Takemura N, Ebisu S. Participation of bacterial biofilms in refractory and chronic periapical periodontitis. *J Endod* 2002; 28: 679-83.
22. Sunde PT, Olsen I, Debelian GJ, Tronstad L. Microbiota of periapical lesions refractory to endodontic therapy. *J Endod* 2002; 28: 304-10.
23. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S. Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 523–9.
24. George S, Basrani B, Kishen A. Possibilities of gutta-percha-centered infection in endodontically treated teeth: an in vitro study. *J Endod* 2010; 36: 1241–4.

25. Araki AT, Ibraki Y, Kawakami T, Lage-Marques JL. Er:Yag laser irradiation of the microbiological apical biofilm. *Braz Dent J* 2006; 17: 296-9.
26. Noiri Y, Katsumoto T, Azakami H, Ebisu S. Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens in vitro. *J Endod* 2008; 34: 826-9.
27. Chavez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensater G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010; 36: 70-7.
28. Shen Y, Stojicic S, Qian W, Olsen I, Haapasalo M. The synergistic antimicrobial effect by mechanical agitation and two chlorhexidine preparations on bofilm bacteria. *J Endod* 2010; 36: 100-4.

İletişim Yazarı

Yrd. Doç. Dr. Neslihan ŞİMŞEK
İnönü Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti AD, MALATYA
e-posta:neslihan.akdemir@inonu.edu.tr