

Biyoagregat ve Mineral Trioksit Agregatın Antimikrobiyal Etkilerinin İn Vitro Olarak Karşılaştırılması

Comparison of In Vitro Antimicrobial Activities of Bioaggregate and Mineral Trioxide Aggregate

Esmâ Asuman ÇAVDAR TETİK¹, Meltem DARTAR ÖZTAN¹, Mehmet KIYAN²

¹ Ankara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi, Endodonti Anabilim Dalı, Ankara.

¹ Ankara University Faculty of Dentistry, Department of Endodontics, Ankara, Turkey.

² Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara.

² Ankara University Faculty of Medicine, Department of Medical Microbiology, Ankara, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 11.02.2013 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 06.03.2013

ÖZET

Endodontik perforasyonların başarılı bir şekilde tamir edilmesi, perforasyon alanının bakteriyel enfeksiyondan korunması veya bakterilerin o bölgeden eliminasyonu ile gerçekleşmektedir. İdeal bir perforasyon tamir materyali, iyi örtücülük özelliği ve biyo-uyumluluk kadar perforasyon bölgesinde mikroorganizmaların üremesini engelleyebilmek için bakteriyostatik veya bakterisidal olmalıdır. Bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle BioAggregat (BA) ve Mineral Trioksit Agregat (MTA)'nın standart *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* ve *Pseudomonas aeruginosa* suşları üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin incelenmesi amaçlanmıştır. Her suş için farklı tüpler içinde 10^8 cfu/ml olacak şekilde mikroorganizma süspansiyonları hazırlanmış, bu süspansiyonlardan Sabouraud dekstrozu agar (*C.albicans* için) ve %5 koyun kanlı agar besiyerlerine yayma ekimleri yapıp üzerine çapı 6 mm, kalınlığı 2 mm olan BA ve MTA diskleri yerleştirilmiş, 24 ve 48 saatlik inkübasyondan sonra örneklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları ölçülmüştür. Disk difüzyon testi sonuçlarına göre 24 ve 48 saatlik inkübasyon periyodu sonunda BA ve MTA materyallerinin tüm mikroorganizmalar üzerinde çeşitli düzeylerde inhibisyona neden olduğu tespit edilmiştir. BA; *S.mutans*, *E.faecalis* ve *P.aeruginosa* üzerinde MTA'dan daha etkili olmakla birlikte MTA'nın 48. saatte *S.sanguinis* üzerinde BA'dan daha etkin olduğu bulunmuştur. Bununla birlikte, materyallerin etkinlik zamanları karşılaştırıldığında *E.faecalis*, *E.coli*, *S.mutans*, *S.sanguinis* üzerinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p > 0.05$). *C.albicans* üzerinde BA ve MTA'nın ve *P.aeruginosa* üzerinde BA'nın etkinliğinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p < 0.05$). Bu çalışmanın sonuçları perforasyon tamir materyalleri olan BA ve

İletişim (Correspondence): Prof. Dr. Mehmet Kıyan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, 06100 Sıhhiye, Ankara, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 312 595 8116, **E-posta (E-mail):** kıyan@medicine.ankara.edu.tr

MTA'nın her ikisinin de test edilen mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu ancak daha yeni bir materyal olan BA'nın daha geniş bir spektrumda antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

Anahtar sözcükler: Antimikrobiyal etki; biyoagregat; mineral trioksit agregat.

ABSTRACT

Treatment outcome of endodontic perforations depends on successful elimination of the associated microorganisms and infected tissues as well as the effective seal of the root-end or perforation site to prevent future contamination. Ideally, perforation repair material has to be bacteriostatic or bactericidal in order to prevent bacterial contamination as well as good sealing properties and biocompatibility. The aim of this study was to evaluate the antimicrobial effects of BioAggregate (BA) and Mineral Trioxide Aggregate (MTA) on the standard strains of *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis* and *Pseudomonas aeruginosa* using the agar disc diffusion test. Colonies of each strains were harvested from the medium and microorganisms were diluted to obtain a suspension of approximately 10^8 cfu/ml. Petri plates with blood agar base with 5% sheep blood or Sabouraud dextrose agar (for *C. albicans*) were inoculated with experimental suspensions and BA and MTA discs prepared as 2 mm length and 6 mm diameter were placed. After 24 and 48 hours incubation, the diameters of the zones of inhibition were measured. The results of the disc diffusion tests showed that BA and MTA were effective on the tested microorganisms at 24 and 48 hours incubation periods. BA and MTA showed similar antimicrobial effects on *C. albicans* and *E. coli*. BA was more effective than MTA on *S. mutans*, *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, however MTA was more effective than BA on *S. sanguinis* at 48 hours. When the time efficiency of the materials were compared, there was no statistically difference between 24 to 48 hours on *E. coli*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* in both two groups ($p > 0.05$). There was statistically significant decrease 24 to 48 hours on *C. albicans* in BA and MTA groups and *P. aeruginosa* in BA group ($p < 0.05$). It can be concluded that although BA and MTA displayed similar antimicrobial efficacy on the tested microorganisms newly improved material BA demonstrated superior antimicrobial activity than other.

Key words: Antimicrobial effect; bioaggregate; mineral trioxide aggregate.

GİRİŞ

Kök perforasyonları; çürük ve rezorbsiyon gibi patolojik durumların neden olduğu veya iyatrojenik olarak ortaya çıkan, pulpa boşluğu ve periodonsiyum arasında devamlı bir ilişkiye neden olan yapay bir açıklığın oluşturulması işlemidir¹. Son yıllarda üstün fiziksel, kimyasal özellikleri ve biyo-uyumluluğu nedeniyle Mineral Trioksit Agregat (MTA) perforasyon tamirinde en fazla tercih edilen materyal olmuştur. Uygulandığı alanda nem ve hatta kan varlığında dahi sertleşebilme özelliği kök perforasyonlarının tedavisinde kullanıldığında başarı oranını artıran en önemli karakteristik özelliğidir. MTA ve BioAgregat (BA) arasındaki en önemli fark tantalum oksit içeriğidir. Tantalum oksit antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğundan, bu maddenin varlığı BA'nın mikroorganizmalara karşı daha etkili olmasını sağlamaktadır²⁻⁴.

MTA ve BA, retrograd dolgu, perforasyon tamiri, vital pulpa tedavisi ve kök gelişimini tamamlamamış dişlerin apikal kapanmasını indüklemek için kullanılan materyallerdir. Kök perforasyonlarında prognoz, perforasyon alanında bakteriyel enfeksiyonun önlenmesi veya ortadan kaldırılmasına bağlıdır. Teorik olarak, destek dokulara ulaşan perforas-

yon tek başına geri dönüşümsüz inflamasyona neden olmaz. Ancak perforasyon alanında bakteriyel enfeksiyon varlığında veya tedavi amacıyla kullanılan tamir materyalinin biyo-uyumlu olmaması durumunda iyileşme gerçekleşmeyecektir. MTA'nın antimikrobiyal aktivitesi birçok çalışmada incelenmiştir⁵⁻¹⁰. Buna karşılık, BA hakkında çok sınırlı bilgi mevcuttur^{11,12}. Bu çalışmada disk difüzyon yöntemiyle BA ve MTA'nın bazı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma, standart *Candida albicans* (ATCC 10231), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 29667) ve *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) suşları kullanılarak gerçekleştirildi. Standart suşlar Ankara Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü Kültür Koleksiyonundan temin edildi. *C.albicans* için Sabouraud dekstroza agar (SDA) (Lab M Ltd, İngiltere), diğer türler için %5 koyun kanlı agar (HiMedia Lab., Pvt. Ltd, Hindistan) besiyerleri kullanıldı.

Antimikrobiyal etkileri araştırılacak olan BA (Innovative BioCeramix Inc, Kanada) ve MTA (White MTA Angelus, Prod. Odont. Ltd, Brazil), üretici firmaların talimatları doğrultusunda güvenlik kabini içinde steril şartlarda karıştırıldıktan sonra iç çapı 6 mm, kalınlığı 2 mm olan yuvarlak steril polietilen kalıplara yerleştirildi; materyallerin sertleşmesi beklenildi ve örnekler kalıplarından çıkarılarak deneyde kullanılacak diskler elde edildi. Her mikroorganizma için ayrı ayrı olmak üzere 10^8 koloni oluşturan ünite (cfu)/ml değerindeki süspansiyonlar hazırlandı. Tüplerden alınan 20 µl'lik örnekler, uygun besiyerlerine aktarıldıktan sonra besiyerlerinin tüm yüzeyini kaplayacak şekilde yayıldı; plaklar oda sıcaklığında 15 dakika bekletildikten sonra besiyerlerinin üzerine birbirlerinden eşit uzaklıkta olacak şekilde test edilen perforasyon tamir diskleri yerleştirilerek plaklar 37°C'de inkübe edildi. Inkübasyonun 24. ve 48. saatlerinde disklerin çevresindeki inhibisyon zonları milimetrik olarak ölçülerek not edildi. Çalışma, her bir mikroorganizma için her periyotta 10 besiyeri kullanılmak üzere üç kez tekrarlandı. Deney sürecinde kontaminasyon olup olmadığı, besiyerlerinden hazırlanıp Gram yöntemi ile boyanan preparatlardaki mikroorganizmaların morfoloji ve boyanma özellikleri incelenerek kontrol edildi.

Verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde faktöriyel tasarımlarda uzunlamasına veriler için parametrik olmayan analiz yöntemlerinden F1_LD_F1 tasarımı kullanıldı¹³. $p < 0.05$ değeri anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Çalışmamızda, BA ve MTA diskleri çevresinde 24. ve 48. saatlerde ölçülen inhibisyon zonu ve medyan değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Test sonuçları BA ve MTA'nın *C.albicans* ($p = 0.069$) ve *E.coli* ($p = 0.113$) üzerinde benzer antimikrobiyal etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. BA; *S.mutans*, *E.faecalis* ve *P.aeruginosa* üzerinde MTA'dan daha etkili olmakla birlikte MTA'nın 48. saatte *S.sanguinis* üzerinde BA'dan daha etkin olduğu bulunmuştur ($p < 0.001$).

Tablo 1. Test Materyallerinin Oluşturduğu İnhibisyon Zonu Ölçümlerinin Medyan (Minimum-Maksimum) Değerleri

Grup (Zaman)	İnhibisyon zonu (mm)					
	<i>C.albicans</i>	<i>E.faecalis</i>	<i>E.coli</i>	<i>S.mutans</i>	<i>S.sanguinis</i>	<i>P.aeruginosa</i>
BA (24 saat)	11 (9-16)	9 (8.5-10)	7.75 (7-9)	12 (11-13)	9 (8-10)	8 (7-8)
BA (48 saat)	8.25 (8-15)	9 (8.5-10)	7.5 (6.5-9)	12 (10-13)	8.75 (7-9)	7.75 (7-8)
MTA (24 saat)	12.5 (10-15)	8 (6.5-9)	7 (7-8)	11 (9-12)	9 (8-10)	7 (7-8)
MTA (48 saat)	9.5 (8-14)	8 (6.5-9)	7 (6.5-8)	11 (9-12)	9 (8-10)	7 (7-8)

BA: Biyoagregat; MTA: Mineral trioksit agregat.

Materyallerin etkinliklerinin zamanla değişimi karşılaştırıldığında *E.faecalis*, *E.coli*, *S.mutans*, *S.sanguinis* üzerinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir fark oluşmamıştır ($p > 0.05$). *C.albicans* üzerinde BA ($p = 0.005$) ve MTA'nın ($p = 0.004$), *P.aeruginosa* üzerinde BA'nın etkinliğinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir azalma meydana gelmiştir ($p = 0.025$).

TARTIŞMA

Mikroorganizmalar pulpa ve periapikal doku hastalıklarının ortaya çıkmasında ve endodontik tedavilerin başarısızlığında anahtar rol oynamaktadır. Endodontik perforasyonların başarılı bir şekilde tamir edilmesi, perforasyon alanının bakteriyel enfeksiyondan korunması veya bakterilerin o bölgeden eliminasyonu ile gerçekleşmektedir¹⁰. İdeal bir perforasyon tamir materyali, iyi örtücülük özelliği ve biyo-uyumluluk kadar perforasyon bölgesinde mikroorganizmaların üremesini engelleyebilmek için bakteriyostatik veya bakterisidal olmalıdır⁵.

Bu çalışmada BA ve MTA'nın bazı mikroorganizmalar üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri disk difüzyon testi ile incelenmiştir. Bu yöntem birçok araştırmacı tarafından mikrobiyolojik çalışmalarda kullanılmıştır^{5,7-10}. Bu yöntemle test edilen mikroorganizmalar üzerinde materyallerin etkilerinin birbiriyle direkt olarak karşılaştırılabilmesi mümkündür. Ancak disk difüzyon testinde materyallerin antimikrobiyal özelliklerinin belirlenmesi materyal ve agar jelin iyi bir temas sağlaması, inhibitör ajanların jel içine difüze olabilme kapasitesi, bakteri türleri ve hücresel yoğunluk gibi faktörlere bağlıdır^{5,8,9}.

Bu çalışmada disk difüzyon testi sonuçları 24 ve 48 saatlik periyotlarda BA ve MTA'nın test edilen mikroorganizmalar üzerinde inhibisyon etkilerinin olduğunu ortaya koymuştur. Materyallerin etkinliklerinin zamanla değişimleri karşılaştırıldığında *E.faecalis*, *E.coli*, *S.mutans*, *S.sanguinis* üzerinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir fark oluşmamışken, *C.albicans* üzerinde BA ve MTA'nın, *P.aeruginosa* üzerinde ise BA'nın etkinliğinde 24. saatten 48. saate anlamlı bir azalma meydana gelmiştir.

Torabinejad ve arkadaşları⁵, MTA'nın *S.mutans* üzerinde antimikrobiyal etkisi olduğunu ancak *E.faecalis* ve *E.coli* üzerinde etkin olmadığını bildirmişlerdir. Bu çalışmanın so-

nuçlarından farklı olarak bizim çalışmamızda *E.faecalis* ve *E.coli* üzerinde MTA etkin bulunmuştur. Bizim çalışmamızla bu çalışmanın sonuçları arasındaki fark kullanılan MTA si-manlarının formülasyonundaki farklılığa bağlı olabilir. Çalışmamızın sonuçları Stowe ve arkadaşları⁸ ile Tanomaru-Filho ve arkadaşlarının⁹ sonuçları ile paralellik göstermektedir. Bununla birlikte sonuçlarımız *E.faecalis*, *P.aeruginosa* ve *C.albicans* üzerinde MTA'nın hiçbir antimikrobiyal etkinliği olmadığı sonucuna varan Estrela ve arkadaşlarının⁶ sonuçları ile farklılık göstermektedir.

Dohaithem ve arkadaşları¹², BA'nın *C.albicans* üzerindeki etkinliğini 1 saat, 24 saat, 3 gün ve 5 günlük periyotlarda direkt kontakt testiyle incelemişlerdir. Bu çalışmanın sonuçlarına göre BA örnekleri, 1 ve 24 saat sonunda antifungal etki göstermemiş, 3 ve 5. günlerdeki örnekler *C.albicans* üzerinde inhibisyon göstermiştir. Bizim çalışmamızda ise 24 saat sonunda BA'nın *C.albicans* üzerine etkin olduğu ve bu etkinin 48. saatte azaldığı görülmüştür. MTA'nın test organizmaları üzerindeki antimikrobiyal etkisinin yüksek pH'sına ve difüze olabilir maddelerin salınımına bağlı olduğu bildirilmiştir¹³. BA ve MTA hidrasyon reaksiyonu ile kalsiyum hidroksit üretirler¹². Antimikrobiyal etkilerinin, kalsiyum hidroksitin kalsiyum ve hidroksil iyonlarına ayrışmasıyla pH'yı yükseltme etkisine bağlı olduğu düşünülebilir.

Zhang ve arkadaşları¹¹, BA ve MTA'nın antimikrobiyal etkinliklerini *E.faecalis* üzerinde farklı konsantrasyonlarda 1, 6, 15, 60 ve 240 dakika süreyle direkt kontakt testi kullanarak değerlendirmişler, her iki maddenin de *E.faecalis* üzerinde etkin olduğunu bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızda BA, *S.mutans*, *E.faecalis* ve *P.aeruginosa* üzerinde MTA'dan daha fazla antimikrobiyal etki göstermiştir.

Sonuç olarak verilerimiz, perforasyon tamir materyallerinden BA ve MTA'nın test edilen mikroorganizmalar üzerinde etkili olduğunu, ancak daha yeni bir materyal olan BA'nın daha geniş spektrumda antimikrobiyal etki gösterdiğini ortaya koymuştur.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın istatistiksel analizlerindeki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Atilla H. Elhan ve Dr. Can Ateş'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Al-Daafas A, Al-Nazhan S. Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2007; 103(3): e92-9.
2. Pistorius A, Willershausen B, Briseño Marroquin B. Effect of apical root-end filling materials on gingival fibroblasts. Int Endod J 2003; 36(9): 610-5.
3. Hashem AA, Hassanien EE. ProRoot MTA, MTA-Angelus and IRM used to repair large furcation perforations: sealability study. J Endod 2008; 34(1): 59-61.
4. Mente J, Hage N, Pfefferle T, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate: repair of root perforations. J Endod 2010; 36(2): 208-13.
5. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR, Kettering JD. Antibacterial effects of some root end filling materials. J Endod 1995; 21(8): 403-6.

6. Estrela C, Bammann LL, Estrela CR, Silva RS, Pecora JD. Antimicrobial and chemical study of MTA, portland cement, calcium hydroxide paste, Sealapex and Dycal. *Braz Dent J* 2000; 11(1): 3-9.
7. Al-Nazhan S, Al-Judai A. Evaluation of antifungal activity of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2003; 29(12): 826-7.
8. Stowe TJ, Sedgley CM, Stowe B, Fenno JC. The effects of chlorhexidine gluconate (0.12%) on the antimicrobial properties of tooth-colored ProRoot MTA. *J Endod* 2004; 30(6): 429-31.
9. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 2007; 49(1): 41-5.
10. Al-Hezaimi K, Al-Shalan TA, Naghshbandi J, Simon JH, Rotstein I. MTA preparations from different origins may vary in their antimicrobial activity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107(5): e85-8.
11. Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M. Dentin enhances the antibacterial effect of mineral trioxide aggregate and bioaggregate. *J Endod* 2009; 35(2): 221-4.
12. Dohaithem A, Al-Nasser A, Al-Badah A, Al-Nazhan S, Al-Maflehi N. An in vitro evaluation of antifungal activity of bioaggregate. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011; 112(4): e27-30.
13. Duarte MA, Demarchi AC, Yamashita JC, Kuga MC, Fraga Sde C. pH and calcium ion release of 2 root-end filling materials. *Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95(3): 345-7.