T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

FARKLI İÇERİĞE SAHİP İRRİGASYON SOLÜSYONLARI VE ÇEŞİTLİ ENZİMLERİN KOMBİNE KULLANIMININ *ENTEROCOCCUS FAECALİS* BİYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Tülin DOĞAN

ENDODONTİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

Aralık 2020
BOLU

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

FARKLI İÇERİĞE SAHİP İRRİGASYON SOLÜSYONLARI VE ÇEŞİTLİ ENZİMLERİN KOMBİNE KULLANIMININ *ENTEROCOCCUS FAECALİS* BİYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Dt. Tülin DOĞAN

ENDODONTİ ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Zeliha UĞUR AYDIN

Bu çalışma Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 2020.06.02.1461)

Aralık 2020
BOLU

ÖZET

FARKLI İÇERİĞE SAHİP İRRİGASYON SOLÜSYONLARI VE ÇEŞİTLİ ENZİMLERİN KOMBİNE KULLANIMININ *ENTEROCOCCUS FAECALİS* BİYOFİLMİ ÜZERİNDEKİ ANTİMİKROBİYAL ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bu çalışmada *Enterococcus faecalis (E. faecalis)* ile kontamine edilmiş dentin bloklarında final irrigasyon solüsyonu olarak %2,5 sodyum hipoklorit (NaOCl), %2 klorheksidin (CHX), irritrol ve gümüş kitosan nanopartikülü (AgCNP)'nün hem tek başına hem de deoksirübonükleaz 1 (DNase 1) ve tripsin ön enzim uygulamaları ile kombine kullanımının antibakteriyel etkinliğininin konfokal lazer taramalı mikroskop (KLTM) ile araştırılması amaçlandı.

Çalışmaya 76 adet tek kök ve tek kanala sahip mandibular dişten elde edilen 4 mm x 4 mm x 0,7 mm boyutlarında 152 adet yarım silindirik dentin bloğu dahil edildi. Tüm dentin blokları otovlavda steril edildi. Smear tabakasının uzaklaştırıldığı ve önceden var olan mikrobiyal kolonizasyonun sterilizasyon işlemi sonrasında elimine edildiği rastgele seçilen 4 örnekte tarama elektron mikroskobu (SEM) ile doğrulandı. 148 adet dentin bloğuna 21 gün boyunca *E. faecalis* inokülasyonu gerçekleştirildi. *E. Faecalis*'in dentin bloklarında inoküle olduğunu ve biyofilm formasyonu oluşturduğunu doğrulamak için 4 adet dentin bloğu pozitif kontrol grubu olarak ayrıldı ve SEM ile incelendi. İnokülasyonun doğrulanmasını takiben 144 dentin bloğu test edilecek final irrigasyon protokollerine göre 12 gruba ayrıldı (n= 12); NaOCl, CHX, İrritrol, AgCNP, Tripsin/ NaOCl, Tripsin/ CHX, Tripsin/ İrritrol, Tripsin/ AgCNP, DNase 1/ NaOCl, DNase 1/ CHX, DNase 1/ İrritrol ve DNase 1/ AgCNP. Final irrigasyon protokolleri uygulamalarının ardından dentin blokları üretici talimatları doğrultusunda Live/ Dead BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti kullanılarak boyandı. Boyama işleminin ardından dentin blokları KLTM ile görüntülendi. KLTM görüntüleri üzerinde ImageJ yazılımı kullanılarak ölü ve canlı bakterilerin yüzdesi

hesaplandı. Elde edilen veriler *One-Way Anova* ve *Post-Hoc Tukey* testleriyle, $p<0,05$ anlamlılık seviyesinde SPSS yazılımı ile istatistiksel olarak analiz edildi.

Ön enzim uygulaması yapılmayan ve ön enzim olarak DNase 1 uygulanan gruplarda CHX'de NaOCl'ye kıyasla daha fazla ölü bakteri yüzdesi elde edildi ($p<0,05$) ve diğer final irrigasyon solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Ön enzim olarak tripsin uygulanan gruplarda ise ölü bakteri yüzdesi açısından istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). NaOCl, CHX ve irritrol'ün yer aldığı gruplarda ön enzim uygulanıp uygulanmaması istatistiksel bir fark oluşturmazken ($p>0,05$), AgCNP ön enzim olarak tripsin uygulaması ile diğer final irrigasyon solüsyonlarına göre daha fazla ölü bakteri yüzdesi gösterdi ($p<0,05$).

Mevcut çalışmanın sınırlamaları dahilinde test edilen final irrigasyon protokollerinden hiçbiri *E. faecalis* biyofilmini %100 elimine edememiştir. Ön enzim uygulaması yapılmayan ve ön enzim olarak DNase 1 uygulanan gruplarda CHX, NaOCl'ye göre daha iyi antibakteriyel aktivite göstermiştir. Ön enzim olarak DNase 1 uygulanması hiçbir irrigasyon solüsyonunun antimikrobiyal aktivitesinde artış sağlamamıştır. Ön enzim olarak tripsinin uygulanması AgCNP'ün antimikrobiyal aktivitesini geliştirirken, diğer irrigasyon solüsyonları üzerinde herhangi bir fark oluşturmamıştır.

Anahtar kelimeler: DNase 1, *E. faecalis,* Gümüş kitosan nanopartikülü, İrritrol, Tripsin.

ABSTRACT

EVALUATİON OF THE ANTİMİCROBİAL EFFECTİVENESS OF THE COMBİNED USE OF IRRİGATİON SOLUTİONS WİTH DİFFERENT CONTENTS AND VARİOUS ENZYMES ON ENTEROCOCCUS FAECALİS BİOFİLM

In this study, it was aimed to investigate the antibacterial efficacy of 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine (CHX), irritrol and silver chitosan nanoparticles (AgCNP) alone or in combination with deoxyribonuclease 1 (DNase1) and trypsin pre-enzyme applications in dentine blocks contaminated with Enterococcus faecalis (E. faecalis) using confocal laser scanning microscopy (CLSM).

152 semi-cylindrical dentin blocks of 4 mm x 4 mm x 0.7 mm obtained from 76 single root and single canal mandibular teeth were included in the study. All dentine blocks were sterilized in autovlave. It was confirmed by scanning electron microscopy (SEM) in 4 randomly selected samples that the smear layer was removed and the preexisting microbial colonization was eliminated after the sterilization process. E. faecalis inoculation was performed on 148 dentin blocks for 21 days. To confirm that E. faecalis was inoculated in dentin blocks and formed biofilm formation, 4 dentin blocks were divided into positive control group and examined by SEM. Following verification of inoculation, 144 dentine blocks were divided into 12 groups according to the final irrigation protocols to be tested (n= 12); NaOCl, CHX, Irritrol, AgCNP, Trypsin/ NaOCl, Trypsin/ CHX, Trypsin/ Irritrol, Trypsin/ AgCNP, DNase 1/ NaOCl, DNase 1/ CHX, DNase 1/ Irritrol and DNase 1/ AgCNP. After applying the final irrigation protocols, dentin blocks were stained using the Live/ Dead BacLight Bacterial Viability Kit in accordance with the manufacturer's instructions. After staining, dentin blocks were visualized with CLSM. Percentage of dead and viable bacteria on CLSM images was calculated using ImageJ software. The data obtained were statistically analyzed with the One-Way Anova and Post-Hoc Tukey tests, at the significance level of $p<0.05$, with SPSS software.

A higher percentage of dead bacteria was obtained in CHX compared to NaOCl in the groups without pre-enzyme application and with DNase 1 as a pre-enzyme ($p<0.05$) and there was no statistically significant difference between the other final irrigation solutions ($p>0.05$). There was no statistically significant difference in the percentage of dead bacteria in the groups in which trypsin was applied as a pre-enzyme ($p>0.05$). While there is no statistical difference in the groups including NaOCl, CHX and irritrol, whether pre-enzyme is applied or not ($p>0.05$), AgCNP showed a higher percentage of dead bacteria with trypsin application as a pre-enzyme than other final irrigation solutions ($p<0.05$).

Within the limitations of the current study, none of the final irrigation protocols tested could eliminate the E. faecalis biofilm 100%. CHX showed better antibacterial activity compared to NaOCl in groups where no pre-enzyme application was applied and DNase 1 was applied as a pre-enzyme. Application of DNase 1 as a pre-enzyme did not increase the antimicrobial activity of any irrigation solution. While the application of trypsin as a pre-enzyme improves the antimicrobial activity of AgCNP, it did not make any difference on other irrigation solutions.

Keywords: DNase 1, E. faecalis, Irritrol, Silver chitosan nanoparticle, Trypsin.

ÖNSÖZ

Mevcut çalışmada final irrigasyon protokolünde sodyum hipoklorit, klorheksidin, irritrol ve gümüş kitosan nanopartikülü solüsyonlarının tek başına ve DNase 1 ve tripsin enzimleri ile kombine kullanımının *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antibakteriyel etkinliği konfokal lazer taramalı mikroskop ile değerlendirilmiştir.

Bu çalışmanın amacı başarısız endodontik tedavilerde en sık rastlanılan patojen olan *E. faecalis* ile kontamine dentin bloklarında test edilen irrigasyon protokollerinin antimikrobiyal etkinliğini araştırarak mevcut deney modelinde en etkili protokolü belirlemektir.

Bu çalışma 2020.06.02.1461 proje numarası ile Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

Bolu, 2020

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince gerek akademik gerek hayata dair her türlü bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, tezimin her aşamasında sabrını, hoşgörüsünü ve desteğini her zaman hissettiren, bilimsel çalışma disiplinini ve azmini örnek aldığım, çok sevdiğim saygıdeğer hocam, tez danışmanım Doç. Dr. Zeliha UĞUR AYDIN'a,

Lisans eğitimimi tamamladığım Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesindeki tüm hocalarıma,

Endodonti Anabilim Dalımızdaki tüm asistan arkadaşlarıma, klinik personelimize ve bana kazandırdıkları güzel şeyler için tüm öğrencilerimize,

Fakültemizdeki tüm erdemli hocalarıma ve tüm asistan arkadaşlarıma,

Fakültemizin güleryüzlü personeline,

Uzmanlık projemizi destekleyen Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tüm hayatım boyunca sonsuz fedakarlık gösteren ve bu günlere gelmemde desteklerini her zaman hissettiğim canım annem Münevver DOĞAN'a, canım babam Cemal DOĞAN'a ve tüm kardeşlerime,

Varlıklarıyla beni her zaman mutlu hissettiren sevgili yeğenlerim Nehir, Ali Emir ve Pars'a,

Eşsiz desteği ve sevgisiyle hayat arkadaşım Çağatay Çağrı ÇANKAYA'ya

Tüm kalbimle sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI .....
ÖZET ..... **iii**
ABSTRACT ..... **v**
ÖNSÖZ ..... **vii**
TEŞEKKÜR ..... **viii**
İÇİNDEKİLER ..... **ix**
TABLOLAR ..... **xii**
ŞEKİLLER ..... **xiii**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **xv**
1. GİRİŞ **1**
2. GENEL BİLGİLER **4**
2.1. Endodontik Tedavinin Amacı 4
2.2. Endodontik Enfeksiyonlarda Mikroorganizmaların Rolü 4
2.3. Endodontik Enfeksiyonlarda Biyofilm 6
2.4. *Enterococcus faecalis* 8
2.5. Kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların değerlendirilmesi 9
2.5.1. Işık mikroskobu 9
2.5.2. Mikrobiyolojik kültür yöntemi 10
2.5.3. Taramalı elektron mikroskobu 11
2.5.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop 12
2.5.5. Floresan in situ hibridizasyon 13
2.5.6. Moleküler teknikler 13
2.6. Endodontik Tedavide İrrigasyon 13
2.6.1. Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonunda Kullanılan İrrigasyon Solüsyonları 16
2.6.1.1. Alkalin solüsyonlar 18
2.6.1.1.1. Sodyum hipoklorit 18
2.6.1.1.2. Kalsiyum hidroksit 22
2.6.1.2. Katyonik bisquanidler 23
2.6.1.2.1. Klorheksidin glukonat 23

2.6.1.3. Asitler ve şelasyon ajanları 26
2.6.1.3.1. Etilendiamin tetraasetik asit 26
2.6.1.3.2. EDTA modifikasyonları 27
2.6.1.3.3. Etidronik asit 28
2.6.1.3.4. Sitrik asit 29
2.6.1.3.5. Maleik asit 29
2.6.1.3.6. Tannik asit 29
2.6.1.3.7. Poliakrilik asit 30
2.6.1.3.8. Perasetik asit 30
2.6.1.4. Tetrasiklin içerikli solüsyonlar 31
2.6.1.4.1. MTAD 31
2.6.1.4.2. Tetraclean 31
2.6.1.5. Oksitleyici ajanlar 31
2.6.1.5.1. Hidrojen peroksit 31
2.6.1.5.2. Karbamid peroksit 32
2.6.1.5.3. İyodin potasyum iyodit 32
2.6.1.6. Elektrokimyasal olarak aktive edişmiş solüsyonlar 33
2.6.1.7. Doğal ajanlar 34
2.6.1.7.1. Kitosan 34
2.6.1.7.2. Propolis 34
2.6.1.7.3. Humik asit 35
2.6.1.8. Diğer kombine solüsyonlar 35
2.6.1.8.1. QMix 35
2.6.1.8.2. İrritrol 36
2.6.1.8.3. SmearOFF 36
2.6.2. İrrigasyon Solüsyonları Etkileşimleri 36
2.6.2.1. NaOCl ile CHX arasındaki etkileşim 37
2.6.2.2. NaOCl ile EDTA arasındaki etkileşim 37
2.6.2.3. CHX ile EDTA arasındaki etkileşim 37
2.6.3. İrrigasyon Solüsyonlarının Etkinliğinin Arttırılmasında Kullanılan Yaklaşımlar 37
2.6.3.1. Antibakteriyel nanopartiküller 38

2.6.3.1.1. Gümüş nanopartikülleri 39
2.6.3.1.2. Kitosan nanopartikülleri 40
2.6.3.1.3. Gümüş kitosan nanopartikülleri 41
2.6.3.2. Enzimler 41
2.6.3.2.1. DNase 1 42
2.6.3.2.2. Tripsin 42
3. GEREÇ ve YÖNTEM 43
3.1. Güç Analizi ve Örnek Sayılarının Belirlenmesi 43
3.2. Dişlerin Seçimi ve Hazırlanması 43
3.3. Dişlerden Yarım Silindirik Dentin Bloklarının Elde Edilmesi 44
3.4. Örneklerin *E. faecalis* ile Kontaminasyonu 49
3.5. Örneklerin SEM ile İncelemesi 49
3.6. Örneklerin Çalışma Gruplarına Ayrılması ve Test Edilecek Solüsyonların Uygulanması 49
3.7. Örneklerin Boyanması ve KLTM Analizi 56
3.8. İstatistiksel Analiz 59
4. BULGULAR 60
5. TARTIŞMA 70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 83
7. KAYNAKLAR 84
8. EKLER 107
8.1. Etik Kurul Onay Formu 107
9. ÖZGEÇMİŞ 108

TABLOLAR

Tablo 2.1. Endodontik irrigasyon solüsyonları 17
Tablo 3.1. Örneklerin gruplara göre ayrılması gösterilmiştir 52
Tablo 4.1. Test gruplarına ait ölü bakteri yüzdesi ortalamaları ve standart sapma değerleri..... 68

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. NaOCl'nin dinamik denge reaksiyonu..... 18
Şekil 2.2.a. Sabunlaşma reaksiyonu, b. Amino asit nötralizasyon reaksiyonu, c. Kloraminasyon reaksiyonu..... 20
Şekil 2.3. Klorheksidin molekülünün şematik çizimi..... 24
Şekil 2.4. EDTA'nın kimyasal yapısı ve bağlanma mekanizması..... 26
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bir diş örneği..... 43
Şekil 3.2. Kuronu uzaklaştırılmış olan ve 4 mm yüksekliğinde silindirik blok elde etmek için işaretlenen kök örneği..... 44
Şekil 3.3. Silindirik dentin blokları..... 45
Şekil 3.4. Silindirik dentin bloğunun uzunlamasına ikiye bölünmesi ile oluşturulmuş yarım silindirik dentin bloğu..... 46
Şekil 3.5. Örnek standardizasyonu için sementi uzaklaştırılmış yarım silindirik dentin blokları..... 46
Şekil 3.6. Örnek yüzeylerinin zımparalanması için kullanılan manuel parlatma cihazı..... 46
Şekil 3.7. Örnek yüzeylerinin zımparalanması..... 47
Şekil 3.8. Örnek kalınlıklarının dijital kumpas ile kontrol edilmesi..... 47
Şekil 3.9. Ependorf tüplerine yerleştirilen örnekler ve sterilizasyon için paketlenmeleri..... 48
Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan SEM Cihazı..... 48
Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan enzimler; Tripsin ve DNase 1..... 50
Şekil 3.12a. Kitosanın SEM görüntüsü; 20000X..... 51
Şekil 3.12b. Gümüş nanopartiküller ile sentezlenmiş kitosanın SEM görüntüsü; 20000X..... 51
Şekil 3.12c. Gümüş nanopartiküller ile sentezlenmiş kitosanın SEM görüntüsü; 100000X..... 52
Şekil 3.13. Dentin örneğinin %2,5 NaOCl ile irrigasyonu..... 54
Şekil 3.14. Dentin örneğinin %2 CHX ile irrigasyonu..... 55
Şekil 3.15. Dentin örneğinin irritrol ile irrigasyonu..... 55
Şekil 3.16. Dentin örneğinin AgCNP ile irrigasyonu..... 56
Şekil 3.17. Floresan LIVE/ DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti..... 57

Şekil 3.18. Dentin bloğunun kanal boşluğuna odaklanmış lazer ışını. 58
Şekil 3.19. Çalışmada kullanılan KLTM. 58
Şekil 3.20. KLTM görüntüleri; a) Kırmızı (ölü bakteriler) ve yeşil (canlı bakteriler) floresan çakıştırılmış 3D görüntü, b) Kırmızı floresan 2D görüntü, c) Yeşil floresan 2D görüntü, d) b ve c görüntülerinin çakıştırılmış görüntüsü. 59
Şekil 4.1a. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 5000X. 60
Şekil 4.1b. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 10000X. 61
Şekil 4.1c. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 20000X. 61
Şekil 4.2a. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 5000X. 62
Şekil 4.2b. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 10000X. 62
Şekil 4.2c. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 20000X. 63
Şekil 4.3. Gruplara ait 2D KLTM görüntüleri. 64
Şekil 4.4. Gruplara ait 3D KLTM görüntüleri. 66
Şekil 4.5. Gruplar arası ölü bakteri yüzdesi ortalamalarını ve stardat sapmalarını gösteren grafik. 68
Şekil 4.6. Grupiçi ölü bakteri yüzdesi ortalamalarını ve stardat sapmalarını gösteren grafik. 69

SİMGELER ve KISALTMALAR

AgCNP	Gümüş Kitosan Nanopartikül
AgNP	Gümüş Nanopartikül
ark.	Arkadaşları
ATCC	Amerikan Tip Kültür Koleksiyonu
BHI	Beyin Kalp İnfüzyonu
$Ca(OH)_2$	Kalsiyum Hidroksit
CFU	Koloni Oluşturan Birim
CHX	Klorheksidin
CNP	Kitosan Nanopartikül
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNase 1	Deoksiribonükleaz 1
E. faecalis	Enterococcus Faecalis
ECA	Elektrokimyasal Olarak Aktive Edilmiş Su
eDNA	Ekstrasellüler Deoksiribonükleik Asit
EDTA	Etilen Diamin Tetraasetik Asit
EPS	Ekstrasellüler Polimerik Matriks
FISH	Floresan İn Situ Hibridizasyon
H_2O_2	Hidrojen Peroksit
HEBP	Etidronik Asit
HOCl	Hipokloröz Asit
IKI	İyodin Potasyum İyodit
kDA	Kilodalton
KLTM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
mg	Miligram
mL	Mililitre
Na	Sodyum
NaOCl	Sodyum Hipoklorit
NH	Amino Grubu
NP	Nanopartikül
OCl^-	Hipoklorit
OH^-	Hidroksil İyonu

PAA	Parasetik Asit
PCA	Parakloroanilin
PI	Propidium İyodür
qPCR	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
SH	Sülfidril Grubu
VBNC	Görülebilen Fakat Kültüre Edilemeyen Faz
µg	Mikrogram
°C	Derece Santigrat

1. GİRİŞ

Başarılı bir endodontik tedavi çürük, travma ve iyatrojenik nedenlerle polimikrobiyal flora ile enfekte olmuş kök kanal sistemindeki tüm mikroorganizmaların ve yan ürünlerinin hem mekanik hem de kimyasal olarak dezenfeksiyonu sonrasında kök kanal sisteminin sızdırmaz bir şekilde üç boyutlu olarak doldurulup apikal ve koronal bölge ile temasın kesilmesine bağlıdır (1, 2).

Kök kanal sisteminin kompleks anatomisi, dentin duvarlarında veya dentin tübüllerinde smear tabakasının varlığı, bakteriyel çeşitlilik, bakteriyel biyofilm formasyonu (3) ve bunların dentin tübüllerinin çeşitli derinliklerine (> 500 μm) nüfuz etmesi nedeniyle kök kanal sisteminin dezenfeksiyonunda mekanik enstrümantasyonun tek başına yetersiz kaldığı bilinmektedir (1). Literatürede kök kanal sisteminde kemomekanik preperasyon sonrasında bile kök kanal sisteminin %40-60'ının bakteriler veya bunların yan ürünleri ile kontamine olduğu belirtilmiştir (4, 5). Günümüzde mevcut kimyasal irrigasyon solüsyonlarının ve mekanik stratejilerin çeşitliliğine rağmen hiçbir dezenfeksiyon prosedürünün kök kanalındaki mikroorganizmaları %100 elimine edemediği rapor edilmiştir (6-8). Bu nedenle endodontide kök kanal sisteminin optium dezenfeksiyonu sağlayabilmek için mekanik enstrumantasyona ilave olarak kullanılacak ideal irrigasyon solüsyonu için arayışlar devam etmektedir.

Bakteriler ve yan ürünleri, pulpal ve periradiküler dokuları irrite eden toksinlerin üretimine bağlı olarak pulpal ve periapikal patolojilerin primer nedeni olarak kabul edilir (9-11). Kök kanal tedavisinin başarısı pulpal dokuların, dentin debrislerinin ve enfekte mikroorganizmaların kemomekanik olarak uzaklaştırılmasına bağlıdır. Literatürde iyi tedavi edilmiş dişlerde bile, endodontik tedavinin başarısız olmasının kök kanal sisteminin apikal kısmındaki inatçı/dirençli mikroorganizmalardan kaynaklandığı bildirilmiştir (12). Başarısız kök kanal tedavilerinde en sık izole edilen türler streptokoklar, enterokoklar, stafilokoklar, fusobacterium ve lactobasillerdir. Bu türler arasında en çok izole edilen gram pozitif fakültatif anaerob olan *Enterococcus faecalis'in (E. faecalis)* primer endodontik

enfeksiyonların % 4- 40' ında ve inatçı endodontik enfeksiyonların % 24- 77' sinde bulunduğu rapor edilmektedir (13). *E. faecalis* tek bir organizma olarak kök kanalında hayatta kalabilme, uzun süre gıda açlığına direnebilme ve dentin tübüllerine penetrasyon kabiliyetine sahiptir (14). Bu nedenle *E. faecalis* farklı irrigasyon solüsyonlarının, ilaçların ve kanal patlarının antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmek için sıklıkla bir model organizma olarak kullanılır (15). Literatürde *E. faecalis'in* biyofilm gelişimi ve mimarisinin klinik bir izolata benzer olduğu bildirilmiştir (16). Tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak tasarlanan bu çalışmada endodontik açıdan kök kanallarından eliminasyonu zor olan *E. faecalis* ATCC 29212 suşu üzerinde çalışma modeli test edildi.

Kök kanalının bakteriyel eliminasyonu hem kimyasal dezenfeksiyon hem de kök kanal sisteminin mekanik olarak hazırlanmasıyla sağlanır. Literatürde kök kanal dezenfeksiyonunda kullanılan farklı tedavi yaklaşımlarındaki etkinliğini değerlendirmek için agar difüzyon testi (ADT) ve direk temas testi (DCT) yaygınlıkla kullanılmıştır (17-19). Agar difüzyon testinin agar ortamındaki materyalin difüzyon kapasitesine bağlı olduğu için yanlış sonuçlar verebildiği rapor edilmiştir (20). DCT' de deneysel ortamda dişin kimyası ve biyofilm oluşumu gibi çeşitli faktörler göz önüne alınmadığı bildirilmiştir (15). Bununla birlikte bu test yöntemlerinin sadece yüzeydeki mikroorganizmaları değerlendirme imkânı sağlaması ve dentin tübüllerindeki rezidüel olarak kalan mikroorganizmalar hakkında bilgi vermemesi bir dezavantaj olarak bildirilmiştir. Bu sınırlamaların üstesinden gelmek için Zapata ve ark. (21) tarafından *E. faecalis* hücrelerinin dentin tübülleri içindeki metabolik aktivitesi ve canlılığı iki çeşit boyama ile rapor edilmiştir. Bununla birlikte Ma ve ark. (8) tarafından dentindeki bakteriyel canlılığın kantitatif değerlendirmesi amacıyla, dentin tübüllerinin enfeksiyonu ve dezenfeksiyonu sonrasında konfokal lazer tarama mikroskobu (KLTM*)* kullanılarak üç boyutlu bir *in vitro* model bildirilmiştir. Mevcut çalışmada da dentin tübüllerindeki rezidüel mikroorganizmaları kantitatif bir şekilde değerlendirme olanağı sağlayan KLTM kullanılarak yapıldı.

Literatürde endodontide kullanılan irrigasyon solüsyonlarının antimikrobiyal etkinliğini arttırmak için birçok enzim (22-24) irrigasyon solüsyonları ile kombine kullanılmıştır. Test edilen irrigasyon solüsyonları arasında klorheksidin (CHX)'in yer

aldığı görülmüştür. Bununla birlikte klinik rutinde altın standart olan irrigasyon solüsyonu sodyum hipoklorit (NaOCl), henüz çok yaygın kullanılmayan gümüş ilave edilmiş kitosan nanopartükülü (AgCNP) ve irritrol'ün bazı enzimler ile kombine kullanımının antibakteriyel etkinliği araştırılmamıştır. Bu bilgiler ışığında literatürdeki bu eksikliği gidermek için tasarlanan bu çalışmada final irrigasyon solüsyonu olarak NaOCl, CHX, İrritrol, AgCNP'nin önceki çalışmalarda (22-26) antibakteriyel etkinliğe olan etkisi kanıtlanmış DNase 1 ve tripsin enzimleri ile kombine kullanımının *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antibakteriyel etkinliği araştırıldı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endodontik Tedavinin Amacı

Herhangi bir nedenle enfekte olmuş (dentin tübüllerinin açığa çıkması, lateral kanallar, çürük, travma, periodontal nedenler vb. ile) kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların yok edilmeleri veya sayılarının ve ürünlerinin azaltılması ile enfeksiyon odağının ortadan kaldırılması, kök kanal sisteminde ve çevre dokularda yeniden enfeksiyon oluşumunun engellenmesi endodontik tedavinin temel amacıdır. Endodontik enfeksiyonun derecesi, sadece patojenlerin varlığıyla değil, aynı zamanda enfekte bölgedeki mikroorganizmaların sayısıyla da ilgilidir (27). Bu nedenle endodontik tedavi ile enfekte kök kanal sisteminin optimum düzeydeki dezenfeksiyonu hedeflenmektedir. Bu amaçla mekanik preperasyona ilave olarak farklı içeriğe sahip irrigasyon solüsyonlarının kullanımı endodontik tedavinin vazgeçilmez bir aşamasıdır.

2.2. Endodontik Enfeksiyonlarda Mikroorganizmaların Rolü

Pulpa-dentin kompleksi normal şartlar altında üzerindeki mine, dentin ve sement tarafından oral mikrobiyotadan korunması nedeniyle sterildir (28). Mikroorganizmalar pulpa ve periradiküler hastalıkların en önemli etkenidir. Mikroorganizmalar koronal, retrograd veya organizmanın herhangi bir yerinden kan veya lenfatik dolaşım yoluyla (anakorezis) pulpaya ulaşabilmektedir. Normal şartlarda steril olan pulpa-dentin kompleksi çürük lezyonları, periodontal harabiyet, azalmış dişeti oluğu sıvısı, lokal veya genel immün defektler, kötü ağız hijyeni, bakteri plağı ve diş taşları, atrizyon, abrazyon, yetersiz restorasyon ve travmaya bağlı kırık ve/ veya çatlakların varlığında mikroorganizmalar için hedef haline gelir. Böylece mikroorganizmalar pulpa-dentin kompleksinin bütünlüğünün bozulmasına neden olarak endodontik tedavi gereksinimine yol açar (29, 30).

Biyofilm yapılarının alt kısmındaki bakteri hücrelerinin sıklıkla dentin tübüllerinin çeşitli derinliklerine nüfuz ettiği görülür. Apikal periodontitis lezyonlarıyla ilişkili dişlerin yaklaşık %70-80'inde dentin tübül enfeksiyonunun meydana geldiği bildirilmiştir (31). Sığ bir penetrasyon daha yaygındır ancak bazı

dişlerde bakteri hücrelerinin yaklaşık 300 μm'ye ulaştığı gözlemlenmiştir (32). Enfeksiyon ayrıca yan kanallara, apikal dallara, istmuslara ve kök kanal sistemindeki diğer alanlara da yayılabilir (33).

Endodontik enfeksiyon primer veya sekonder olabilir. Genel olarak, primer enfeksiyon, mikroorganizmalar veya mikrobiyal yan ürünler tarafından istilayı takiben pulpa iltihabı ve kök kanalı enfeksiyonunu içerir ve destekleyici dokuların iltihaplanması yani apikal periodontitis ile sonuçlanır. Sekonder enfeksiyon, daha önce kanal tedavisi görmüş dişlerde yeniden enfeksiyon, kalan enfeksiyon veya tekrarlayan enfeksiyon olarak ortaya çıkar. Primer endodontik enfeksiyonlar polimikrobiyal bir floraya sahiptir (34). Primer endodontik enfeksiyonlarda ağırlıklı olarak *Bacteroides, Prophyromonas, Prevotella, Fusobacterium, Treponema, Peptostreptococcos, Eubacterium* ve *Camphylobacter* türleri mevcuttur (35).

Pulpitis ile ilişkili endodontik biyofilm temel olarak çürüklerle ilişkili bakterilerden oluşurken, mikroorganizmaların dentin tübüllerini istila etmesi Gram negatif anaerobik çubukların ve proteolitik bakterilerin baskınlığı ile biyofilm bileşiminde değişikliklere neden olur (36). Primer intraradiküler enfeksiyonlar, *Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri, Gram negatif anaerobik çubuklar, periodontal patojen *Tannerella forsythia*, asakkarolitik zorunlu Gram-negatif *Dialister* türleri, *Fusobacterium* türleri ve *Treponema* türleri gibi periplazmik kamçılı Gram-negatif bakterilerden kaynaklanır (11). Başarısız tedavilerde, tedavi sonrası kök kanal sistemi içinde kalan mikroorganizmaların başlıca neden olduğuna inanılmaktadır (37). Sekonder enfeksiyonlar, daha önce kanal tedavisi görmüş dişlerde yeniden enfeksiyon, kalan enfeksiyon veya tekrarlayan enfeksiyondan kaynaklanabilir. Sekonder enfeksiyonlar; *Enterokoklar, Streptokoklar, Laktobasiller, Aktinomiçesler*, mantarlar ve özellikle *E. faecalis*'in kalıcılığı ile karakterizedir (35). Bununla birlikte Bacteroides benzeri türler ve Dialister türleri kronik periradiküler lezyonlarla ilişkili asemptomatik endodontik enfeksiyonlarda tespit edilirken, klinik olarak akut apse olarak teşhis edilen semptomatik enfeksiyonlarda zorunlu anaeroblar *Fusobacterium nucleatum, P. intermedia, Dialister pneumosintes* bulunmuştur (30). Ayrıca Jung ve ark. (38) tarafından başlangıç bakteri kolonizasyonunu sığır mine ve dentin plaklarında

değerlendirdikleri in situ çalışmada bakteri kolonizasyonunun dentin üzerinde mineye göre daha yüksek olduğu bildirilmiştir.

2.3. Endodontik Enfeksiyonlarda Biyofilm

İnsanların ağız boşluğunda 700'den fazla farklı bakteri türü tespit edilmiştir (39). Tükürük mililitrede 10^8 ila 10^9 bakteri içerir ve dişlere tutunan mikroorganizmalar dental plak olarak adlandırılan dental biyofilminin oluşumunu başlatırlar (36). Olgunlaşmış bir dental biyofilm, 100 farklı mikrobiyal tür içerebildiği için polimikrobiyal bir yapıya sahiptir. Biyofilmde bakteriler hakimdir ancak mayalar, *protozoa, archaea* ve virüsü de içerebilir (40).

Oral bakteriler besin içeren sıvıların varlığında katı yüzeyler üzerinde biyofilm oluşturma yeteneğine sahiptir (41). Biyofilmler polisakkaritler, proteinler ve nükleik asitlerden oluşan hücre dışı bir matriks içine gömülü bakteri kolonilerini temsil eder. Bu mikrokoloniler içindeki mikroorganizmalar fonksiyonel heterojenliğe sahip organize topluluklara dönüşmüştür. Bu ortamda büyüyen bakteriler olumsuz ortam koşullarında çeşitli adaptasyon mekanizmalarıyla hayatta kalma, virülansa yardımcı olan hücre-hücre iletişimi, virülansı kodlayan genleri içeren hücreler arasında genetik değişim ve antibiyotiklere karşı bakteriyel direnç, çevresel stresden korunma ve konak savunması gibi avantajlara sahiptir (22). Biyofilmlerdeki organizmalar, büyüme hızı ve gen transkripsiyonu açısından değişmiş bir fenotip sergiler (42).

Ricucci ve Siqueira (43), kanal içi biyofilmlerin varlığını doğrulayan araştırmacılardır. Bakteriyel biyofilmler hem birincil hem de ikincil kök kanal enfeksiyonunun ana nedeni olarak kabul edilir (44, 45). Yeterli doğal ve adaptif bağışıklık yanıta sahip bireylerde bile, bir biyofilm enfeksiyonunun nadiren tamamen ortadan kaldırıldığı bildirilmiştir (46). Bakteri hücreleri kanal duvarlarına bağlanır ve kendi ürettikleri hücre dışı bir matriks içine gömülürler. Bakteriyel biyofilmin bakterisidal ajanlara karşı planktonik bakteri formuna göre daha yüksek dirence sahip olduğu ve konakçı savunmasına çok daha toleranslı olduğu bildirilmiştir (3, 47). Bu da intrakanal ilaçların ve antibakteriyel ajanların bakterilere erişimini sınırlar.

Kök kanal enfeksiyonundaki bakterilerin ayrı koloniler veya planktonik hücreler olarak değil de kök kanal duvarlarına bağlı biyofilm adı verilen entegre topluluklar olarak ortaya çıktığı genel olarak kabul görmüştür (43, 48, 49).

Biyofilm formlarında bakteriler antimikrobiyal ajanlara planktonik formlarından 1000 kat daha dayanıklıdır (50). Biyofilm direncinin bazı yönleri tam olarak anlaşılmasa da baskın mekanizmaların hem bağışıklık sistemine hem de antimikrobiyal ajanlara bir bariyer görevi gören hücre dışı polimerik matriksi (EPSs) içerdiği düşünülmektedir (51). *E. faecalis* biyofilmleri ekzopolisakkaritler, proteinler, lipidler ve hücre dışı deoksiribonükleik asitten (eDNA) oluşur (52, 53). *E. faecalis*'in hücre yüzeylerinde bulunan ve mikrobiyal maddelerden oluşan EPS matriksi, proteinlerin, polisakkaritlerin, lipitlerin ve DNA'nın karmaşık bir karışımı ile kaplıdır. Bazı çalışmalar EPS'lerin abiyotik ve biyotik yüzeylerin planktonik hücreler tarafından kolonizasyonunu başlattığını ve tüm biyofilmlerin yüzeylere uzun süreli bağlanmasını sürdürdüğünü bildirmektedir (54). EPS'ler ayrıca biofilm hücrelerini üç boyutlu bir polimer ağı ile birbirine bağlayarak biyofilmlere mekanik stabilite sağlar (24). Bununla birlikte dekstran ve eDNA *E. faecalis* biyofilmlerinin matriksinde tespit edilmiştir, bu durum dekstran ve eDNA'nın bakteriyel toplulukların gelişiminde rol oynadığını düşündürmektedir (55).

Bununla birlikte *"Quorum Sensing"* olarak adlandırılan sistem bakterilerin kimyasal sinyal moleküllerini kullanarak hücreden hücreye iletişim kurmalarını sağlar (56). *Quorum Sensing*'in biyofilm oluşumunda rol oynadığı ve çevresel streslerle başa çıkmayı sağladığı bilinmektedir (57).

Endodontik biyofilmin morfolojik (yapısal) tanımının yanı sıra, mikrobiyal bileşimi bir başka önemli özelliktir. Primer kök kanal enfeksiyonlarının polimikrobiyal olduğu ve anaerobik Gram-negatif bakterilerin baskın olduğu günümüzde bilinmektedir (58). Endodontik tedavili dişlerin mikrobiyotası, primer enfeksiyonlara göre daha düşük bir tür çeşitliliği sergiler. İnatçı veya sekonder apikal periodontitise sahip endodontik tedavili dişlerde 1-5 tür arasında (59, 60) ve çoğunlukla Gram-pozitif fakültatif anaerobların baskın tür olduğu bildirilmiştir (61).

2.4. Enterococcus faecalis

Enterococcus faecalis (E. faecalis), endodontik tedavi görmüş kronik apikal periodontitisli dişlerden en sık izole edilen anaerobik Gram-pozitif bir bakteridir (13, 62). Mikroskop altında *E. faecalis'in* kendi başına, çiftler halinde veya zincirler halinde var olduğu ve insan bağırsaklarında bol miktarda bulunduğu bildirilmiştir (63).

E. faecalis'in primer endodontik enfeksiyonların %18' inden ve başarısız endoodontik tedavilerin %67'sinden izole edildiği bildirilmiştir (64). Bununla birlikte Zhang ve ark. (65) tarafından tedavi edilmemiş kronik apikal periodontitis ile karşılaştırıldığında *E. faecalis*'in inatçı endodontik enfeksiyonu olan dişlerle daha ilişkili olduğu rapor edilmiştir (18). Doğal antibiyotik direncine sahip olması, kötü çevresel değişikliklere iyi adaptasyon sağlaması ve dentin tübüllerinde 200–1500 µm derinliğe kadar nüfuz etme kabiliyeti endodontik başarısızlıktan sorumlu olmasının ana nedenleridir (13, 24, 62). Sedgley ve ark. (66) tarafından ex vivo koşullar altında gerçekleştirilen bir çalışmada kök kanallarına inoküle edilen *E. faecalis*'in besin olmadan bir yıl boyunca canlılığını sürdürebildiği bildirilmiştir. Bu nedenle pulpal ve periapikal hastalıkların başlangıç ve gelişiminde büyük rol oynayan bu mikroorganizmaların enfekte kök kanalından eliminasyonunun da oldukça zor olduğu rapor edilmiştir. Gomes ve ark. (67) tarafından primer ve sekonder endodontik enfeksiyonlarda bulunan endotoksin düzeylerini karşılaştıran bir klinik çalışmada, primer endodontik enfeksiyonlu dişlerin, sekonder enfeksiyonlu dişlere kıyasla daha yüksek endotoksin ve daha karmaşık gram negatif bakteriyel topluluğuna sahip olduğu bildirilmiştir. Henderson ve ark. (68) tarafından *E. faecalis* yüzeyinde 37 kDa'lık bir plazmidle kodlanmış yapışma proteininin bulunduğu bildirilmiştir (68). Bu adezyon proteini sayesinde hücre-hücre teması ile alıcı ve verici bakteri suşları arasındaki plazmid değişiminin kolaylaştığıve bu şekilde, antibiyotik direnci üreten genetik materyalin *E. faecalis* tarafından diğer bakteri türlerine transfer edilebildiği bildirilmiştir (69). *E. faecalis*'in doku istilasını kolaylaştıran konakçı hücrelere ve hücre dışı matrikse invazyonuna izin veren virülans faktörlerine ve diğer bakterilerle kümelenme ve biyofilmler üretme kabiliyetine sahip olması tekrar eden endodontik enfeksiyonlardaki rolünü açıklamaktadır (70). *E. faecalis* kolonize olarak biyofilm oluşturabildiği için kök kanal duvarlarına tutunur. Biyofilm oluşumu bu türün değişen

büyüme koşullarına hızla alışmasına ve yüksek konsantrasyonlarda antimikrobiyal ajanların varlığında bile hayatta kalmasına yardımcı olur (71). Bu durum kök kanallarında var olan *E. faecalis* biyofilmlerinin endodontik tedavi prosedürleri ile eliminasyonunda ciddi zorluklar oluşturmaktadır. Bu nedenle, endodontik tedavinin farklı basamakları sırasında *E. faecalis* enfeksiyonlarını ortadan kaldırmak için alternatif tedavi protokolleri ve yöntemlerin geliştirilmesi önemlidir.

2.5. Kök kanal sistemindeki mikroorganizmaların değerlendirilmesi

2.5.1. Işık mikroskobu

Mikroskopi yöntemleri, biyofilmin görselleştirilmesini sağlar ve biyofilmin kök kanalı içindeki uzaysal dağılımı, yapısı ve substratla bağlantısı hakkında basit bilgiler sağlar. Dişleri değerlendirmek için ışık mikroskobu kullanılacaksa, genellikle örneklerin görselleştirilmeden önce fiksasyonu, dekalsifikasyonu, kesit alınması ve boyanması gerekmektedir. Bu adımlar zahmetlidir ve özellikle dekalsifikasyon zaman alıcı bir süreçtir. Bu teknikle genellikle kesitsel biyofilm görüntüleri elde edilir. Sonuç olarak, tüm kanal veya kanal bir bölümü içindeki durumun anlaşılması için çok sayıda ardışık kesitin değerlendirilmesi gerekir. Işık mikroskobu, geniş bir büyütme aralığı sağlar ve her bölüm için hem biyofilmin genel görünümüne hem de mikrobiyal hücre morfolojisi ve organizasyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağlar. Ancak canlı ve ölü bakteriler arasında ayrım yapılamaz ve kesit alma işlemi sırasında diş yüzeyinden biyofilm ayrılması gibi artefaktlar meydana gelebilir. Bu açıdan ele alındığında ışık mikroskobu biyofilm giderimini değerlendirmek birçok dezavantaj oluşturmaktadır. Bununla birlikte, ışık mikroskobu geniş bir büyütme aralığı sağlar ve her bölüm için hem biyofilmin genel görünümüne hem de mikrobiyal hücre morfolojisi ve organizasyonu hakkında ayrıntılı bilgi sağlar. Ancak bu yöntemde canlı ve ölü bakteriler arasında ayrım yapılamaz ve kesit alma işlemi sırasında diş yüzeyindeki biyofilm ayrılabilir. Bu sebeplerle ışık mikroskobu, biyofilmin kantitatif olarak değerlendirilmesinde uygun bir yöntem değildir (72).

Bununla birlikte Peters ve ark. (73) kalan kanaliçi bakterileri/ biyofilmi ve bunların dentin tübül penetrasyonunu ışık mikroskobu ile değerlendirmişlerdir. Ayrıca, klinik koşulların histobakteriyolojik analizlerle incelendiği çok sayıda çalışma

ve vaka raporu, endodontik araştırmalara önemli ölçüde katkıda bulunmuştur (43, 74, 75).

2.5.2. Mikrobiyolojik kültür yöntemi

Mikrobiyolojik kültür yönteminde, antimikrobiyal işlem adımından sonra hayatta kalan mikroorganizmalar örnekleme olarak adlandırılan bir adım ile kök kanalından uzaklaştırılmaları gerekir. Örnekleme ile hayatta kalan bakterilerin mümkün olduğunca kanaldan uzaklaştırılması amaçlanır. Bu işlem genellikle kanala sıvı ilave edilerek ve bu sıvının steril kâğıt konlar ile absorbe edilmesi ile yapılır, ya da bir eğenin kazıma hareketiyle ile biyofilm bakterileri gevşetilerek toplanabilir. Başka bir örnekleme yöntemi ise kök kanalının örnekleme sıvısı ile güçlü bir şekilde yıkanmasıdır. Kanala sadece örnekleme sıvısının verilmesi kanal yüzeyine tutunmuş bakterileri gevşetmez ve örnekleme sıvısında yalnızca yüzen gevşek bakteriler toplanılabilir. Bu nedenle, kâğıt konlar ile absorbe edilmesi öncesi bir tür kazıma veya başka bir fiziksel ayırma yöntemi uygulanır. Bu yöntemde karmaşık kök kanal anatomisine sahip dişlerde ulaşılamayan bölgeler nedeniyle mikrobiyal yükün hangi oranda kanaldan uzaklaştırıldığı net değildir ve yeterince örneklenememesi dezavantaj oluşturmaktadır (72). Baron ve ark. (76) tarafından dişlerin toz haline getirilmesinin örnekleme sorununu çözdüğü ve tespit oranını artırdığı bildirilmiştir. Alves ve ark. (77) tarafından kriyojenik öğütme olarak adlandırılan bu teknikte, diş örnekleri sıvı nitrojenle soğutulur ve daha kırılgan hale gelen diş örnekleri öğütülerek tüm kök kanal sistemi teorik olarak analize dahil edilmiş olur. Bununla birlikte bazı çalışmalarda, mikrobiyolojik kültür yöntemi ile dişlerin koronal, orta veya apikal bölgeleri arasında ayrım yapılamayacağı bildirilmiştir (77, 78).

Değerlendirme yapılabilmesi için alınan örnekleme sıvısının kültüre edilmesi gerekmektedir. Bu adım, örnekleme sıvısının seri seyreltilmesini ve büyüme ortamı içeren agar plaklarına eşit hacimlerde ekilmesi ile gerçekleştirilir. İnkübasyon sürecinden sonra, plaklar üzerinde görülen koloniler sayılarak, koloni oluşturan birimlerin (CFU) sayıları belirlenmiş olur. Bu yönteme plaka sayma yöntemi de denir ve yaygın olarak kullanılır. Ancak bu durum sadece laboratuvarda kültürlenebilen mikroorganizmaların tespitine izin verir. Bununla birlikte, bakteriler durağan fazlı planktonik duruma benzer şekilde düşük metabolik aktivite durumunda olabilir ve bu

bakteriler normal kültür teknikleriyle saptanamayabilir. Bu durum ve örnekleme yöntemlerinin sınırlamaları nedeniyle, negatif bir kanal kültürü steril bir kanalı garanti etmez (72). Bununla birlikte bazı çalışmalarda NaOCl'nin antimikrobiyal etkinliği geleneksel olarak agar plakları üzerinde mikroorganizmanın kültürlenmesi ve CFU sayılması ile ölçülmüştür (79, 80).

2.5.3. Taramalı elektron mikroskobu

Biyofilm uzaklaştırılma etkinliğini incelemenin alternatif bir diğer yolu intraradiküler biyofilmlerin taramalı elektron mikroskobu (SEM) aracılığıyla görselleştirilmesidir. Literatürde birçok çalışmada kanal duvarlarındaki biyofilmin göreselleştirilmesi için SEM kullanılmıştır (81-85). Bir SEM analizi yapmak için, kanal duvarlarını açığa çıkarılması amacıyla köklerin bölünmesi gerekir. Daha sonra numuneler SEM ile görüntülemek için bir dizi hazırlıktan geçer. Görüntüleme işlemi yüksek vakum altında gerçekleşir, katı ve kuru bir numune gerektirir. Görüntü bozulmasına neden olabilecek elektrik yükünün oluşmasını önlemek için numune iletken bir kaplama ile kaplanır. Bu nedenle numunelerin fiksasyonu (tespit), dehidrasyonu (kurutma), dondurulmaları ya da kritik noktada kurutulmaları ve püskürtmeyle kaplamaya tabi tutulması gerekir. Işık mikroskobunun aksine SEM'de, mikroorganizmaların ya da biyofilmlerin boyanması mümkün değildir. Bu nedenle biyofilmin SEM ile görselleştirmesi, yüksek büyütme gerektirir (72).

SEM ile değerlendirmenin bazı sınırlamaları vardır. Bergmans ve ark. (86) tarafından ışık mikroskobu ile biyofilmin kesitsel görüntüleri elde edilebilirken, SEM ile çok katmanlı biyofilmin tam derinliğine kadar görüntülenmesinin mümkün olmayacağı ve bu nedenle SEM ile yalnızca topografik değerlendirmeler yapılabileceği rapor edilmiştir. SEM'in diğer bir sınırlaması ise, numune hazırlama adımlarının biyofilm morfolojisini önemli ölçüde etkileyebilmesidir. Kritik noktada kurutma ve dondurarak kurutma, suyun büyük bir bölümünü oluşturan EPS matriksinin neredeyse tamamen yok olmasına neden olur (72, 87). Bununla birlikte Sutton ve ark. (88) bu işlem adımlarının biyofilmin yüzeyden ayrılmasına neden olabileceği bildirmiştir. Fiksasyondan sonra bakteriyel hücreler şekil ve boyutlarını vakumda korurlar ve SEM ile açıkça tanımlanabilirler ancak ışık mikroskobunda olduğu gibi hücrelerin canlılığı belirlenemez. Bununla birlikte SEM, iki boyutlu

görüntü vermesi ve yarı nicel analizle sınırlı olmasına rağmen, yüksek çözünürlüğü nedeniyle diğer mikroskopi tekniklerine kıyasla sıklıkla tercih edilir (72).

2.5.4. Konfokal lazer taramalı mikroskop

Endodontik çalışmalarda kullanılan çeşitli antimikrobiyal uygulamaların etkinliğini değerlendirmek için kullanılan görüntüleme yöntemlerinden biri de konfokal lazer tarama mikroskopisi (KLTM)'dir (8, 89). Bu yöntemde test edilen örnekler ilk olarak bir canlılık boyası ile boyanır, KLTM'de incelenir ve ardından ölü ve canlı bakterilerin oranları bir yazılım vasıtasıyla analiz edilir (90-92). Yöntem tüm hücrelere veya sadece hasarlı bir hücre duvarına sahip hücrelere nüfuz eden iki floresan reaktif boyanın kullanımına dayanır (90). En sık kullanılan boyama, SYTO-9 ve propidyum iyodür (PI) kombinasyonudur. SYTO-9 canlı hücrelerin yeşil floresan boyamasına, PI ise ölü hücrelerin kırmızı floresan boyamasına neden olur. Floresan boyaların kullanılması biyofilmin mimarisinin ve uzaysal dağılımının görselleştirilmesine izin verir. Bu teknik biyofilmin floresan boyanması ardından biyofilm yüzeyinden 200 µm'ye kadar çeşitli derinliklerde numunenin birkaç µm kadar çok ince optik dilimlerinin görüntülenmesini içerir. Bu optik kesitler daha sonra tüm biyofilmin üç boyutlu yeniden yapılandırılmış görüntüsünü oluşturmak için yazılım vasıtasıyla istiflenir. Ek olarak, canlılık boyaları kök kanalındaki biyofilm bakterilerinin canlılık profilinin belirlenmesine izin verir. Bu nedenle, biyofilm mimarisinin tanımlanmasının yanı sıra, yarı kantitatif bir analiz mümkündür ve hem biyofilmin uzaklaştırılması hem de mikrobiyal canlılık değerlendirilebilir (72).

Bridier ve ark. (93) tarafından KLTM'nin çözünürlüğünün SEM'e göre daha az olduğu fakat numunenin üç boyutlu mimarisinin belirlenmesine ve biyofilm hacmi, kalınlığı, pürüzlülüğü ve biyofilm yapısındaki hücrelerin dağılımı gibi nicel parametrelerin çıkarılmasına olanak tanıdığı rapor edilmiştir. KLTM ışık mikroskobu ve SEM'in aksine numunede fiksasyon adımı gerektirmez ve numune nemli kalır. SEM'e benzer şekilde KLTM, kanal içi biyofilmi göstermek için dişin bölünmesini gerektirir. Çoğunlukla kanal yüzeyinin sadece bir kısmı analiz edilir. Bununla birlikte, KLTM minimum numune hazırlığı ve iyi uzaysal çözünürlük ile biyofilmin doğrudan, invazif olmayan, optik taranmasına olanak sağladığı için mikrobiyal biyofilmler için popüler bir görüntüleme yöntemidir (72). Del Carpio-Perochena ve ark.

polimikrobiyal biyofilmlerdeki hücre canlılığını ve bakteri hacmini ölçmek için KLTM kullanmıştır (94). KLTM kullanan yeni biyofilm çalışmaları biyofilmde mevcut olan tüm bakterilerin öldürülmesinin endodontide mevcut olan maddeler ve yöntemler ile mümkün olmadığını açıkça göstermektedir (91, 92).

2.5.5. Floresan in situ hibridizasyon

Floresan in situ hibridizasyon (FISH) tekniği, özgün mikrobiyal hücrelerin görselleştirilmesine, tanımlanmasına ve miktarlarının belirlenmesine izin verir ve mikroorganizmaların doğrudan miktarlarının belirlenmesi için hızlı ve objektif bir teknik olarak kabul edilir. Bu teknik, nükleik asitlerin önceden kültürü veya amplifikasyonu olmaksızın doğrudan niceliksel sonuçlar sağlayan hızlı ve objektif bir yöntemdir. Bu teknikte mikroorganizmalar mikroskopi veya akış sitometrisi ile görselleştirilebilir ve miktarları belirlenebilir. Mikroskopla incelemek ayrıca mikrobiyal hücrelerin morfolojik özelliklerinin ve uzaysal dağılım modellerinin (kümelenme, yapışma ve izole edilmiş hücreler) analizine izin verir (95).

2.5.6. Moleküler teknikler

Bir moleküler biyoloji yöntemi olan kantitatif gerçek zamanlı polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR), polimeraz zincir reaksiyonu sırasında hedeflenen bir DNA parçasının amplifikasyonunu gerçek zamanlı olarak ölçerek toplam hücre sayısını dolaylı olarak değerlendirir. Gerçek zamanlı PCR, kantitatif sonuçlar sağlayan tek testtir. Bu yöntem oldukça hassas, spesifik ve hızlıdır. Kültürleme yöntemleriyle karşılaştırıldığında moleküler yöntemler yalnızca kültüre edilebilen bakterileri değil, zor üreyen türleri, canlı ancak kültüre alınamayan (VBNC) durumdaki bakterileri ve henüz kültürlenmemiş türleri de tespit etme avantajına sahiptir (72).

2.6. Endodontik Tedavide İrrigasyon

İrrigasyon " bir vücut boşluğunu veya yarayı su veya ilaçlı bir sıvı ile yıkamak" olarak tanımlanmaktadır (96).

Günümüzde mekanik enstrümantasyonla kök kanal sisteminin %35 veya daha fazlasının dokunulmadan kaldığı bildirilmiştir (97). Yalnızca mekanik enstrümantasyon kullanılarak gerçekleştirilen endodontik tedaviler sonrasında kök

kanal sistemindeki vital, nekrotik dokular ve mikroorganizmalar belirli oranlarda uzaklaştırılılırken, lateral kanallar, isthmuslar, apikal deltalar ve dentin tübülleri gibi kompleks anatomik alanlara ulaşılamamaktadır (72, 98, 99). Bu nedenle kök kanallarının mekanik enstrümantasyonu daima etkin bir irrigasyon solüsyonu ile desteklenmelidir. Mekanik enstrümentasyonla birlikte irrigasyon prosedürünün uygulanması kemomekanik preperasyon olarak adlandırılmaktadır. Kök kanal sisteminin kemomekanik preperasyonunda mekanik enstrümantasyon irrigasyon solüsyonlarının kök kanal boşluğunda daha etkili hacimde dolaşmasını, kök kanal sistemine penetre olmasını ve kök kanal sisteminde bulunan mikrobiyal yükün önemli oranda azaltılması ile kök kanalının üç boyutlu olarak dezenfeksiyonunu hedefler. Kemomekanik enstrümantasyonda kullanılan irrigasyon solüsyonları ile kök kanal sistemi içerisindeki organik bileşenleri, kalıntıları çözmek ve inorganik bileşeni demineralize etmek amaçlanır (100).

İrrigasyon solüsyonu kök kanal sistemindeki mekanik preparasyon sonrası oluşan debrisleri uzaklaştırması ile mekanik, inorganik ve organik yapıları çözmesi ve antibakteriyel etkisi ile de kimyasal ve biyolojik etki gösterir. İrrigasyon solüsyonun etkinliği kök kanalının apikalinde enstrümente edilmemiş bölgelerdeki debrisleri temizleyebilmesine, nekrotik dokuları uzaklaştırabilmesine ve kök kanallarında bulunan planktonik veya biyofilm oluşturmuş mikroorganizmaları öldürebilme kabiliyetine bağlıdır.

Kök kanal tedavisinde irrigasyon solüsyonu kullanılmasının avantajları (96);

- Organik ve inorganik debris çözünür, enfekte materyalleri fiziksel ve kimyasal olarak uzaklaştırılır. Bu sayede kök kanallarında mikroorganizmaların yaşam kaynakları ve beslenmeleri engellenerek sayıları azaltılır.
- Belli derecelerde antimikrobiyal etki göstererek mikroorganizmalar yok edilir.
- Smear tabakası kaldırılarak dentin tübülleri açılır. Kök kanalında kullanılan dezenfektanların ve kök kanal patlarının penetrasyonunu arttırılır ve böylece sızıntı azaltılır.
- Endodontik enstrümanlarla erişilemeyen lateral kanallar, isthmuslar ve deltalar gibi düzensiz alanların dezenfeksiyonuna katkı sağlanır.

- Kanal duvarlarını ıslatılır ve kayganlaştırılır, böylece kök kanallarını şekillendirme işlemi kolaylaşır ve prosedürel hatalar azaltılır.
- Debrisin apikalde birikmesi, apeksin tıkaması ve kök kanal içeriğinin periapikal alana taşma riski ve buna bağlı olarak da inflamasyon gelişme riski de azaltır.

Günümüzde kök kanal tedavisinde kullanılacak ideal bir irrigasyon solüsyonundan beklenen özellikler (96, 101, 102);

- Germisid ve fungisid olmalıdır.
- Toksik ve alerjen olmamalı, periapikal dokuları irrite etmemelidir.
- Uzun süre stabil kalmalı, kolay nötralize olmamalıdır.
- Uzun süreli ve geniş spektrumlu antimikrobiyal etkiye sahip olmalıdır.
- Mikroorganizmaların endotoksinlerini inaktive etmelidir.
- Kan, serum ve dokunun protein türevleri varlığında da aktif olmalıdır.
- Kök kanalında daha derinlere penetre olabilmesi için düşük yüzey gerilimine sahip olmalıdır. Bu sayede kök kanal aletleri ile ulaşılamayan bölgelere solüsyonun akışı arttılacaktır. Solüsyona alkol ilave edilmesi veya solüsyonun ısıtılması ile solüsyonun yüzey gerilimi düşürülebilir.
- Periapikal dokuların onarımına engel olmamalıdır.
- Diş ve çevresindeki dokuları boyamamalıdır.
- Kültür ortamında inaktive olabilmelidir.
- Hücre aracılı immun yanıtı indüklememelidir.
- Smear tabakasını tamamen uzaklaştırabilmeli ve altındaki dentin ve tübüllerini dezenfekte etmelidir.
- Diş ve çevre dokular üzerinde antijenik, toksik ve karsinojenik etki göstermemelidir.
- Maruz kalan dentinin fiziksel özelliklerini olumsuz etkilememelidir.
- Dentine ve diğer solüsyonlara temas ettiğinde etkisini kaybetmemelidir.
- Dolgu malzemelerinin sızdırmazlığını ve kanala bağlanmasını olumsuz etkilememelidir.
- Pratik uygulamaya sahip olmalıdır.

- Raf ömrü uzun, maliyeti düşük ve kolay erişilebilir olmalıdır.

Yukarıda belirtilen bu özelliklerin, solüsyonun dentinle temas ettiği süreye, penetrasyon gücüne, uygulandığı yüzeyin sertliği ve gerilimine, kimyasal yapısına, pH'ına, konsantrasyonuna, tazeliğine, sıcaklığına, uygulanması sırasında kullanılan enjektörün tipine bağlı olduğu literatürde gösterilmiştir (103, 104).

Farklı içeriğe ve farklı etki mekanizmasına sahip birçok irrigasyon solüsyonu mevcut olmasına rağmen günümüzde kök kanal sisteminin %100 dezenfeksiyonunu sağlayan ve ideal bir irrigasyon solüsyonundan beklenen tüm özelliklere sahip olan bir irrigasyon solüsyonu rapor edilmemiştir. Bu nedenle günümüzde mevcut olan güncel hiçbir irrigasyon solüsyonun/ protokolünün kök kanal sistemindeki mevcut mikrobiyal yükü tamamen elimine edemediği bilinmektedir. Bu durum endodontik tedavi sonrasında kök kanalında rezidüel olarak kalan mikroorganizmaların kök kanal sistemi içerisinde yeniden enfeksiyon oluşturarak tedavinin başarısız olmasına neden olabilmektedir. Tüm bu bilgiler doğrultusunda endodontide ideal irrigasyon solüsyonu/ protokolü arayışı devam etmektedir. Bu nedenle yakın zamanda irrigasyon solüsyonlarının farklı konsantrasyonlarda kullanımı, kombine kullanımı ya da farklı solüsyon içeriklerinin birleştirilmesi gibi güncel yaklaşımlar endodontik tedavinin önemli araştırma konusu olmuştur.

2.6.1. Kök Kanal Sisteminin Dezenfeksiyonunda Kullanılan İrrigasyon Solüsyonları

Endodontik tedavide mekanik enstrümantasyona ilaveten kök kanal sisteminin dezenfeksiyonu, enstrümantasyon sırasında meydana gelen debrisin uzaklaştırılması, organik ve inorganik dokuların çözülmesi ve enstrümantasyon sırasında gerekli olan lubrikasyonu sağlamak için çeşitli içeriklere sahip irrigasyon solüsyonları kullanılmaktadır (Tablo 2.1). Geçmişten günümüze kadar antibakteriyel etkinliği olmayan sodyum klorür (salin) gibi solüsyonlar veya formaldehit gibi yüksek derecede toksik ve alerjenik özelliğe sahip biyositler gibi farklı içeriğe sahip birçok solüsyon kök kanal sisteminin dezenfeksiyonunda kullanılmıştır (105). Fakat geçmişte kullanılan birçok irrigasyon solüsyonunun çevre dokularda oluşturduğu toksisite gibi

olumsuz faktörler nedeniyle bir kısmı terk edilmiş, bir kısmı modifiye edilmiş veya solüsyonların kombine kullanımları önerilmiştir (106).

NaOCl antimikrobiyal etkinliği, organik doku çözme kapasitesi ve kök kanalıyla sınırlı olduğunda kabul edilebilir biyolojik uyumluluğu nedeniyle günümüzde en çok tercih edilen irrigasyon solüsyonudur (107, 108). Ayrıca sitrik asit, laktik asit, tannik asit ve poliakrilik asit gibi organik asitler, *bis-dequalinium asetat* gibi şelatlama solüsyonları, kitosan gibi doğal polisakarit ve tetrasiklinler gibi geniş spektrumlu antibiyotikler de içeren sulu çözeltiler içinde çözünmüş çok sayıda bileşik alternatif kök kanal irrigasyon solüsyonu olarak önerilmiştir (101).

Tablo 2.1. Endodontik irrigasyon solüsyonları (105-109).

Alkalin solüsyonlar	Sodyum hipoklorit, Kalsiyum hidroksit
Katyonik bisquanidler	Klorheksidin, Cloreximit
Asitler ve şelasyon ajanları	EDTA, REDTA, Rc-Prep, EDTAC, EDTA-T, SmearClear, Sitrik asit, Etidronik asit (HEBP), Maleik asit, Tannik asit, Poliakrilik asit, Perasetik asit
Tetrasiklin içerikliler	MTAD, Tetraclean
Oksitleyici ajanlar	Hidrojen Peroksit, Karbamid Peroksit, İyodin potasyum iyodit, Ozonlu su
Elektrokimyasal olarak aktive edilmiş solüsyonlar	Oksidatif potansiyel su
Doğal ajanlar	Kitosan, Propolis, Humik asit, Yeşil çay, Trifala, Kurkumin
Kombine solüsyonlar	Qmix, İrritrol, SmearOFF

2.6.1.1. Alkalin solüsyonlar

2.6.1.1.1. Sodyum hipoklorit

Sodyum hipokloritin (NaOCl) seyreltik bir çözeltisinden oluşan antiseptik olan Dakin'in solüsyonu ilk olarak Birinci Dünya Savaşı'nda doktorlar tarafından topçu yaralanmalarını tedavi etmek için kullanılmıştır (109). Klor salınımı yapan ajanların en önemlilerinden biri olan NaOCl, 1920'li yılların başında endodontik tedavide irrigasyon solüsyonu olarak kullanılmaya başlanmıştır (110). NaOCl lubrikant etkisi, (vital ve/veya nekrotik) organik dokuyu çözme kapasitesi ve geniş bir antimikrobiyal aktiviteye sahip olması nedeniyle günümüzde en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonudur (108, 111).

NaOCl su içinde Na^+ ve hipoklorit (OCl^-) iyonlarına ayrışarak iyonize olur ve hipokloröz asit (HOCl) ile dinamik bir denge kurar (Şekil 2.1) (112). NaOCl'in pH'ı 4 ve 7 arasında olduğunda klor ağırlıklı olarak hipokloröz asit aktif kısım olarak bulunurken, pH 9'un üzerinde olduğunda hipoklorit iyonu baskındır (113). Bakterilerin inaktivasyonundan esas olarak hipokloröz asitin sorumlu olduğu ve çözünmemiş hipokloröz asitin hipoklorit iyonundan daha etkili olduğu bildirilmiştir. Hipokloröz asit, oksidatif fosforilasyonu ve membran ile ilişkili diğer aktivitelerin yanı sıra mikroorganizmaların yaşamsal faaliyetlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan DNA sentezini bozar (114, 115).

$$NaOCl = H_2O \leftrightarrow NaOH + HOCl \leftrightarrow Na^+ + OH^- + H^+ + OCl$$

Şekil 2.1. NaOCl'nin dinamik denge reaksiyonu (112).

NaOCl çok güçlü bir antimikrobiyal ajan olmakla beraber ve pulpa artıklarını ve dentinin organik bileşenlerini etkili bir şekilde çözmektedir. NaOCl kök kanal sistemine uygulandığında organik doku ile etkileşime girerek doğrudan üç kimyasal reaksiyon oluşmaktadır (116). Bu reaksiyonlardan birincisi; NaOCl organik doku ile

temas ettiğinde yağ asitlerini yağ asiti tuzlarına (sabun) ve gliserole parçalar, böylece kalan solüsyonun yüzey gerilimini azaltılarak organik doku ve yağ çözücü olarak etki gösterir (Şekil 2.2.a) (112).

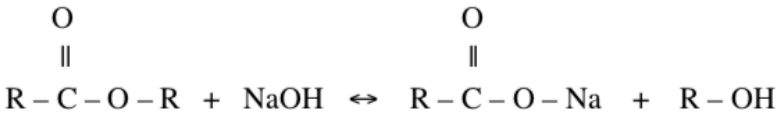
İkincisi; NaOCl, amino asitleri nötralize ederek su ve tuza dönüştürür (Şekil 2.2.b). Üçüncüsü ise; NaOCl'in aktif bileşeni hipokloröz asit organik doku ile temas ettiğinde çözücü etki göstererek klorini serbest bırakır ve klorin de protein amino grubu (NH) ile birleşerek kloraminleri oluşturur (Şekil 2.2.c). Klorin bakteriyel enzimlerin sülfidril gruplarında (SH) geri dönüşümsüz oksidasyona yol açarak bakteriyel enzimleri inhibe eder ve böylece antimikrobiyal etki sağlar (112).

Ayrıca NaOCl'nin yüksek pH'ı (pH>11) (hidroksil iyonları etkisi) ile bakterilerin sitoplazmik membranında, lipit peroksidasyonunda ve hücre metabolizmasında bozulmalara yol açmaktadır (112).

Kısaca NaOCl, OH^- (hidroksil) iyonları ve kloraminasyon reaksiyonu ile bakteriyel esansiyel enzimatik bölgeler üzerinde geri dönüşümsüz inaktivasyona neden olan bir etki ile antimikrobiyal aktivite sunar.

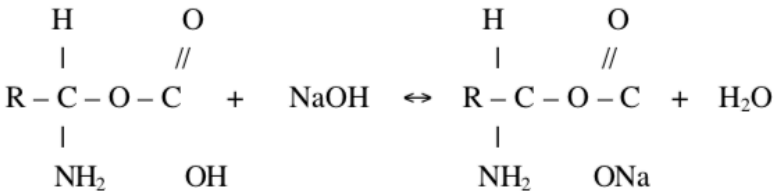
NaOCl'nin doku çözücü etkisi ve antimikrobiyal etkisi konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (116). NaOCl tümü antibakteriyel aktivite gösteren %0,5 ile %6 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılır (117). Fakat endodontik tedavi için hala ideal konsantrasyon üzerinde fikir birliği yoktur. Düşük konsantrasyonlarda hacminin arttırılması, ısıtılması gibi ilave işlemler NaOCl'nin etkinliğini artırmaktadır. NaOCl solüsyonunun antibakteriyel etkinliğini ve doku çözme kapasitesini artırmak amacıyla konsantrasyonunun arttırılması toksisitesinin de artmasına yol açmaktadır. NaOCl solüsyonunun birçok olumlu özelliğinin yanında; kötü kokusu, tadı, sitotoksik etkisi ve smear tabakasını tek başına uzaklaştırmada yetersiz kalması dezavantajıdır (118).

a



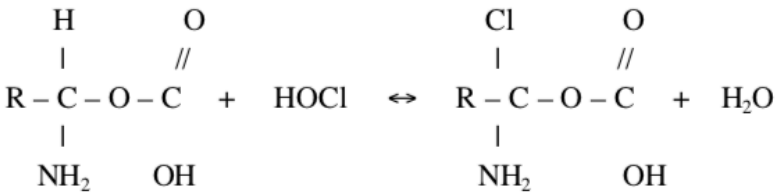
Yağ asidi — Sodyum hidroksit — Sabun — Gliserol

b



Amino asit — Sodyum hidroksit — Tuz — Su

c



Amino asit — Hipokloröz asit — Kloramin — Su

Şekil 2.2.a. Sabunlaşma reaksiyonu, b. Amino asit nötralizasyon reaksiyonu, c. Kloraminasyon reaksiyonu (112).

NaOCl'nin kök kanal sistemine uygulanmasının ardından dentinin mikro sertlik, eğilme mukavemeti ve esneklik modülü gibi kimyasal ve yapısal değişikliklere sebep olabildiği bildirilmiştir (110, 119, 120). Bununla birlikte bazı çalışmalarda antimikrobiyal aktivitenin konsantrasyona bağlı olmadığı ancak doku çözünmesinin ve biyofilm bozulmasının konsantrasyona bağlı olduğu gösterilmektedir (85, 121). Bununla birlikte NaOCl'nin sonik veya ultrasonik yollar ile aktivasyonu ve artan sıcaklığı da dokunun daha hızlı çözünmesine katkıda bulunmaktadır. Stojicic ve ark. (122) tarafından devamlı aktive edilen %2 NaOCl'nin, aktive edilmeden kullanılan %6 NaOCl'ye benzer şekilde hızlı organik dokuyu çözme kabiliyeti olduğunu bildirilmiştir. Benzer şekilde, NaOCl'nin 45 °C ila 60 °C arasında ısıtılmasının organik doku çözme etkinliğini hızlandırdığı rapor edilmiştir (122).

NaOCl mineralize (inorganik) dokuyu çözmez (123). Bu nedenle kök kanal preparasyonu sırasında oluşan smear tabakasını tamamen uzaklaştırmak için, sadece organik debrisi uzaklaştırmada etkili olan NaOCl'nin demineralize edici ajanlarla (EDTA, sitrik asit veya diğer şelatörler/ asidik bileşikler) kombine kullanımı tavsiye edilmektedir (124). Klinik rutinde kemomekanik preperasyonda NaOCl kullanımına ilave olarak en yaygın kullanılan inorganik doku çözücü EDTA'dır. NaOCl, EDTA ile birlikte kullanıldığında solüsyonda hipoklorit anyonu mevcudiyetini azaltır ve bu da NaOCl'in hem nekrotik pulpa dokusunu çözmede daha az etkili hale getirir hem de antibakteriyel aktivitesini azaltır (108, 125). Ayrıca NaOCl'in özellikle EDTA ile kombine kullanıldığında proteolitik bozulma ile peritübüler ve intratübüler dentinde erozyona sebep olduğu bildirilmiştir. Bu nedenlerle klinik olarak NaOCI ve EDTA ayrı olarak uygulanmalıdır (119, 126).

Ultramorfoloji çalışmalarında NaOCl'in kök dentininin kollajen yapısında ciddi değişikliklere neden olduğu (kırılgan ve süngerimsi dentin) gösterilmiştir (127). Bu durumun kök dentininin yapısını önemli ölçüde zayıflattığı için dişin ağızda kalma süresini azaltabileceği bildirilmiştir. Ayrıca dentinin uzun süreli NaOCl ile teması da dişleri çiğneme kuvvetleri altında kırılmaya daha yatkın hale getirebildiği rapor edilmiştir (110).

NaOCl endodontide temel irrigasyon solüsyonu olmasına karşın, yüksek oranlarda sitotoksik olduğu ve potansiyel yan etkileri sebebiyle çok dikkatli kullanılmalıdır. NaOCl' nin apikal foramenlerden ekstrüze edilmesi ya da yumuşak dokular içeresine zerk edilmesi gibi hatalı kullanımı ağrı, şişlik, parestezi, ödem, doku nekrozu ve ekimoz gibi ciddi klinik komplikasyonlara neden olabilir (128).

2.6.1.1.2. Kalsiyum hidroksit

Endodontide ilk olarak 1920'de Hermann tarafından pulpa kaplama ajanı olarak kullanılan kalsiyum hidroksitin kimyasal formülü $Ca(OH)_2$ olup, beyaz renkli kokusuz bir tozdur. $Ca(OH)_2$'in sudaki çözünürlüğü düşüktür ve sıcaklık arttıkça çözünürlüğü azalır (129). Saf kalsiyum hidroksit yüksek bir pH'a (yaklaşık 12.5-12.8) sahiptir ve kimyasal olarak güçlü bir baz olarak sınıflandırılır. Sudaki $Ca(OH)_2$ tiksotropik davranışa sahiptir ve ajite edildiğinde vizkozitesi azalır. $Ca(OH)_2$'in vizkozitesi ne kadar düşük olursa, iyonik ayrışma o kadar yüksek olur (130).

$Ca(OH)_2$ su içeren sıvılarla temas ettiğinde Ca^{+2} ve OH^- iyonlarına ayrışarak vital dokular üzerinde etki gösterir böylece sert doku birikimi indüklenir ve antibakteriyel etki gösterir (129). Siqueira ve Lopes (129) tarafından $Ca(OH)_2$'in antimikrobiyal aktivitesinin sulu ortamda yüksek oranda reaktif hidroksil iyonlarının salınımı ile bakteriyel sitoplazmik zar hasarı, protein denatürasyonu ve DNA'larındaki hasar mekanizmalarından kaynaklanıyor olabileceğini rapor edilmiştir. Ayrıca $Ca(OH)_2$'in yüksek pH değeri korunduğu sürece kök kanal sisteminde antibakteriyel etkisinin devam edeceği bildirilmiştir (129). Ayrıca $Ca(OH)_2$'in mineralizasyon etkisi yüksek pH'sından doğrudan etkilenir. Alkalin pH laktik asiti osteoklastlardan nötralize eder, aynı zamanda sert doku oluşumunda önemli bir rol oynayan alkalin fosfatazları da aktive eder (osteojenik bir ortamı teşvik eder) (130).

$Ca(OH)_2$ endodontide tedavi randevuları arasında kanal içi ilaç, pulpa kaplama ajanı ve kök kanal patı olarak da kullanılmaktadır. Bununla birlikte $Ca(OH)_2$'in çeşitli formülasyonları apeksifikasyon, travmatik diş yaralanmaları, kök perforasyonları, kök kırıkları ve kök rezorpsiyonunun tedavisi sırasında da kullanılır (130).

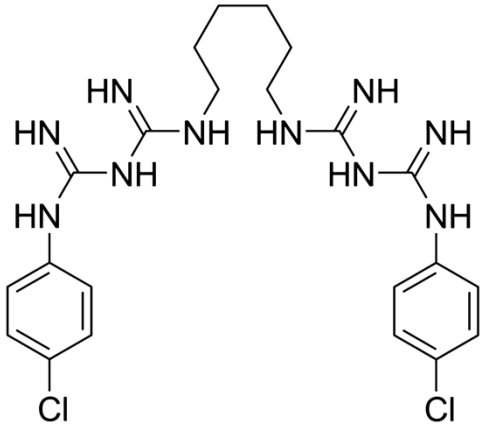
Kanal içi ilaç olarak kullanılacak $Ca(OH)_2$'in CHX ile karıştırılması, $Ca(OH)_2$'in antimikrobiyal aktivitesini arttırmaktadır (130).

Morgan ve ark. (131) tarafından kalsiyum hidroksit çözeltisi ile izotonik salin arasında doku çözme kabiliyetleri açısından anlamlı bir fark olmadığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada sırasıyla kalsiyum hidroksit çözeltisi ve NaOCl'nin kullanılması, tek başına NaOCl'den daha fazla doku çözmüş olsa da bu farkın anlamlı olmadığı bildirilmiştir. Barbosa ve ark. (132) tarafından kalsiyum hidroksit çözeltisine bir deterjan ilavesinin antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı rapor edilmiştir.

2.6.1.2. Katyonik bisquanidler

2.6.1.2.1. Klorheksidin glukonat

Klorheksidin Glukonat (CHX) 1959'da bakteri plağını kontrol etmek için kullanılmasına rağmen diş hekimliğinde kullanımı 1970'lerde Löe ve Schiött tarafından yapılan çalışmalardan sonra yaygınlaşmıştır (133, 134). Yapısal formülü iki simetrik 4-klorofenil halkasından ve merkezi bir heksametilen zinciri ile bağlanan iki biguanid grubundan oluşur (Şekil 2.3) (135). Renksiz, hafif opalesant veya soluk saman rengi olabilen CHX baziktir, neredeyse kokusuzdur ve acı bir tada sahiptir. Piyasada bulunan CHX ağız gargaralarında en sık kullanılan konsantrasyonları %0,12 ve %0,20'dir. Sıvı veya jel formda mevcut olan CHX endodontide genellikle %2 konsantrasyonunda kullanılır (135, 136). Endodontide CHX tek başına veya kalsiyum hidroksit ile kombinasyon halinde bir irrigasyon solüsyonu veya intrakanal ilaç olarak kullanılmaktadır (135). Suda çözünebilir bir madde olan CHX serum fizyolojik ile yıkama ile kök kanalından rahatlıkla uzaklaştırılabilir (137).



Şekil 2.3. Klorheksidin molekülünün şematik çizimi (138).

CHX'in pH'ı 5.5 ile 7 arasındadır ve antimikrobiyal aktivitesinin pH'ı ile ilişkili olmadığı bildirilmiştir (138). CHX fizyolojik pH'da kolayca ayrışarak pozitif yüklü CH bileşenini serbest bırakır. CHX'in katyonik (+) molekülleri mikrobiyal komplekslere ve bakteriyel hücre duvarı üzerindeki negatif yüklü fosfat gruplarına bağlanarak hücrelerin ozmotik dengesini değiştirir ve böylece bakterisidal etki gösterir. CHX'in düşük konsantrasyonlarında, özellikle potasyum ve fosfor gibi düşük molekül ağırlıklı maddeler hücre dışına sızarak bakteriyostatik bir etkiye neden olur. CHX daha yüksek konsantrasyonlarda bakteri hücrelerinin sitoplazmasının çökelmesi ve/ veya pıhtılaşması ile proteinlerin çapraz bağlanması yoluyla da hücre ölümüne neden olan bakterisidal bir etkiye sahiptir (135).

CHX gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, fakültatif ve sıkı anaeroblara, mayalara ve mantarlara, özellikle *Candida albicans*'a karşı etkilidir (135). CHX solunum virüsleri, herpes, sitomegalovirüs, HIV gibi virüslere karşı etkili iken, oda sıcaklığında bakteri sporlarına karşı etkisizdir (139). CHX bakteri sporlarına karşı etkisiz olsada, gütaperka ve resilon konlarını dezenfekte etmede etkilidir. Bununla birlikte CHX kan ve organik maddeler varlığında da etkinliğini korur (135). Vianna ve ark. (136) tarafından sıvı formda olan CHX'in mikroorganizmaları 30 sn veya daha kısa sürede öldürdüğü, jel formda ise bu sürenin 22 sn (%2 CHX jel) ile 2 sa (%0,2 CHX jel) arasında olduğu bildirilmiştir.

CHX geniş spektrumlu antimikrobiyal etkisi, kontrollü salınımı (substantivite) ve düşük toksitesi nedeniyle kök kanal irrigantı olarak önerilmiştir (100). Bununla birlikte CHX'in doku çözücü özelliğinin olmayışı en büyük dezavantajı olarak bildirilmiştir (140). CHX ağız içerisindeki negatif yüklü yüzeylerden absorbe edilir ve bu alanlarından yavaşça salınır ve bu nedenle birkaç saat boyunca uzun süreli antimikrobiyal aktivite sağlanır (135). Kök kanal irrigasyonunda kullanılan CHX'in mikrobiyal aktiviteyi Leonardo ve ark. (141) tarafından 48 saat, Dametto ve ark. (142) tarafından 7 gün, Komorowski ve ark. (143) tarafından 21 gün, Khademi ve ark. (144) tarafından 4 hafta ve Rosenthal ve ark. (145) tarafından 12 haftaya kadar engellediği rapor edilmiştirdir.

İntrakanal ilaç olarak kullanıldığında CHX'in, dentinal tübüllerde *E. faecalis* enfeksiyonuna karşı kalsiyum hidroksitten daha etkili olduğu bildirilmiştir (146). CHX'in diğer maddelerle (kalsiyum hidroksit, çinko oksit vb.) kombine kullanıldığında CHX'in antimikrobiyal aktivitesinin azaldığı (146-148), kalsiyum hidroksitin CHX ile kombine kullanıldığında ise $Ca(OH)_2$ antimikrobiyal aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (146, 147, 149). Bununla birlikte Mohammadi ve Abbott (150) tarafından CHX'e $Ca(OH)_2$ ilavesi ile pH'ın alkalileştirilmesinin, CHX moleküllerinin çökelmesine sebep olarak etkinliğinin azalacağı bildirilmiştir. Erdemir ve ark. (151) tarafından CHX ile kök kanalı irrigasyonunun kök dentinine bağlanma gücünü önemli ölçüde arttırdığı bildirilmiştir.

CHX endodontik enfeksiyonlarda yer alan patojenlerin öldürülmesinde etkili olmasına rağmen, kök kanallarındaki biyofilmler CHX'e dirençlidir. Bu direncin CHX'in biyofilmlere derinlemesine nüfuz edememesinden kaynaklanabileceği rapor edilmiştir (24). Bununla birlikte CHX'in mekanik ajitasyonunun antimikrobiyal etkinliğini arttırdığı kanıtlanmıştır. CHX ve NaOCl karşılaştırıldığında, CHX'in de antibakteriyel aktivite sergilediği ancak biyofilm yapısını yok edemediği artık bilinmektedir (152, 153).

Arias-Moliz ve ark. (154) tarafından CHX ve setrimitin ard arda uygulanmasının, bu 2 ajanın kombine kullanımına kıyasla *E. faecalis* üzerinde daha yüksek bir antimikrobiyal aktivite gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte Baca ve

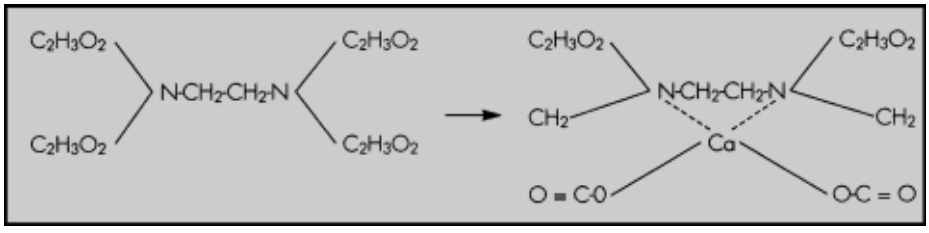
ark. (155) tarafından setrimit'in EPS matriksinin yok edilmesini kolaylaştırarak CHX'in *E. faecalis* üzerinde daha doğrudan hareket etmesini sağlayarak daha büyük bir bakterisidal potansiyeli sağladığı bildirilmiştir.

2.6.1.3. Asitler ve şelasyon ajanları

2.6.1.3.1. Etilendiamin tetraasetik asit

Etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'in diş sert dokuları üzerinde demineralize edici etkisi olduğu ilk kez 1951 yılında rapor edilmiştir (156, 157). EDTA 1957 yılında Nygaard-Òstby tarafından dar ve kalsifiye kök kanallarının hazırlanmasına yardımcı olarak tanıtılması ile de endodonti pratiğinde kullanılmaya başlamıştır. EDTA etilendiamin, sodyum siyanür ve formaldehitin kombinasyonundan meydana gelmektedir. EDTA solüsyonunun kök dentinini kimyasal olarak yumuşattığı, smear tabakasını çözdüğü ve ayrıca dentin geçirgenliğini arttırdığı rapor edilmiştir (158).

EDTA şelatlasyon etkisi olan, iki ve üç değerlikli metal iyonlarını ayırabilen, $[CH_2N(CH_2COOH)_2]_2$ molekül formülüne sahip bir amino asittir (Şekil 2.4). Karboksilat ve amin grupları, EDTA'da metal bağlanmasından sorumludur. EDTA özellikle Cu^{+2}, Mn^{+2}, Fe^{+3} ve Co^{+3} ile güçlü kombinasyonlar oluşturur (159).



Şekil 2.4. EDTA'nın kimyasal yapısı ve bağlanma mekanizması (159).

Kalsiyum iyonları ile EDTA reaksiyonu sonucunda çözünür kalsiyum şelatları oluşmaktadır (158). Bu özelliği nedeniyle de kök kanallarından kalsiyum hidroksiti uzaklaştırmak için sıklıkla kullanılır. Ayrıca EDTA'nın ısıtılması önerilmez. Sıcaklığı 20 °C'den 90 °C'ye çıkarılan EDTA'nın kalsiyum bağlama kapasitesinin azaldığı rapor edilmiştir (160). Bununla birlikte EDTA'nın kök kanallarına uygulama süresi ile ilgili farklı çalışmalar mevcut olup genellikle %17'lik konsantrasyonda kullanılan EDTA

kanal duvarlarına doğrudan temas ettiğinde 1 dakikadan çok daha kısa sürede smear tabakasını uzaklaştırdığı bildirilmiştir. EDTA'nın kendi kendini sınırlandırıcı bir etkisi olmasına rağmen, kanalda uzun süre bırakıldığında veya EDTA'dan sonra NaOCl kullanıldığında dentin erozyonu yaptığı rapor edilmiştir (160). Düşük antibakteriyel özelliklere sahip olmasına rağmen EDTA'nın NaOCl gibi antibakteriyel ajanların enfekte dentin tübüllerine nüfuzunu artırabileceği bildirilmiştir (161).

2.6.1.3.2. EDTA modifikasyonları

REDTA

REDTA yüzey gerilimini azaltmak için %17 EDTA'ya Setrimid (Setil trimetil amonyum bromit) ilavesi ile elde edilmiştir. REDTA'nın diğer bileşenleri ise sodyum hidroksit ve distile sudur (158).

Rc-Prep

%15 EDTA, %10 üreperoksit ve glikolün bir kombinasyonudur ve jel formundadır. Rc-Prep içinde bulunan üreperoksitin NaOCl ile reaksiyona girdiği ve reaksiyon sonucunda da açığa çıkan oksijenin pulpa artıklarını ve kan pıhtılarını kök kanallarından kolayca uzaklaştırılabildiği bildirilmiştir. Üretici (Premier Dental, Philadelphia, PA, ABD) renklenmiş dişlerin bu şekilde ağartılabileceğini ileri sürmektedir. Üreperoksit, kan varlığında antibakteriyel etkisini korumaktadır. Ayrıca Rc-Prep içerisindeki glikol bileşeni de kanal aletleri için lubrikant görevi görmektedir (158).

EDTAC

EDTA'nın antimikrobiyal etkinliğinin arttırılması ve yüzey geriliminin düşürülmesi amacıyla %15 EDTA'ya quaerterner amonyum bileşiği olan Setrimid ilavesiyle elde edilmiştir (158). EDTAC'ın smear tabakasını uzaklaştırma etkinliğinin EDTA'ya benzer olduğu ancak EDTA'ya kıyasla çok daha kostik olduğu bildirilmiştir (160).

EDTA-T

%17'lik EDTA ile katyonik bir deterjan olan %0,2'lik sodyum lauril sülfatın kombinasyonundan oluşan bir irrigasyon solüsyonudur. Deterjan ilavesi ile EDTA'nın dentin tübüllerine difüzyonunu ve etkinliğini arttırmak amaçlanmıştır (162). Bununla birlikte Iwanami ve ark. (163) tarafından EDTA solüsyonuna deterjan ilavesinin solüsyonun dentin yüzeyi üzerinde yayılma kabiliyetini arttırdığı rapor edilmiştir. Smear tabakasının EDTA-T solüsyonu ile uzaklaştırılması için 3 dakikalık bir uygulamanın yeterli olduğu rapor edilmiştir (164).

SmearClear

SmearClear (SybronEndo, Orange, CA, ADB), smear tabakasını uzaklaştırmak için kullanılan anyonik ve katyonik bir yüzey aktif madde (setrimid) içeren %17'lik bir EDTA solüsyonudur. Literatürde smear tabakasının uzaklaştırılma etkinliği açısından %17 EDTA, SmearClear ve %10 sitrik asit arasında fark olmadığı bildirilmiştir (165). Bununla birlikte Wu ve ark. (166) tarafından %17 EDTA'nın smear tabakasını uzaklaştırma etkinliğinin BioPure MTAD ve SmearClear'dan daha başarılı olduğu bildirilmiştir.

Farklı irrigasyon solüsyonlarının *E. faecalis* biyofilmlerine karşı etkinliğinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, test edilen solüsyonlardan biri olan NaOCl'in hem %1'lik hem de %6'lık konsantrasyonu SmearClear'dan daha etkili bulunmuştur (167). Bu solüsyonlar dışında Calcinase, EGTA, CDTA, Largal Ultra, Salvizol, Decal, Tubulicid Plus, Hypaque, Calcinase slide, Glyde file, FileCare EDTA, File-EZE gibi EDTA modifikasyonları da bulunmaktadır (158).

2.6.1.3.3. Etidronik asit

Etidronat olarak da bilinen ve tıpta 1977'de kullanılmaya başlanan etidronik asit (HEBP; Hidroksietilen difosfonik asit), osteoporozu ve paget hastalığını tedavi etmek için kullanılan bir bisfosfonat türevidir (101).

Ana irrigasyon solüsyonu olarak sık kullanılan NaOCl, antibakteriyeldir ve organik doku çözme özelliklerine sahiptir, ancak smear tabakasını (inorganik içeriği) etkili bir şekilde uzaklaştıramaz (101). Bu amaçla asitler ve şelasyon ajanları

kullanılmaktadır. Etidronik asit, NaOCl'nin proteolitik veya antimikrobiyal özelliklerini etkilemediği için NaOCl ile kombine kullanılabilen zayıf bir şelasyon ajanıdır (101, 159). EDTA veya sitrik asit gibi güçlü şelasyon ajanları NaOCl ile kombine kullanıldığında hipokloriti hemen klorite indirgemekte ve aktif kloru çözeltide tutamadıkları için etkinlik gösterememektedir (168).

2.6.1.3.4. Sitrik asit

Oda sıcaklığında beyaz kristal bir toz olan sitrik asit (169), kuvvetli şelat yapma özelliğine sahip, zayıf bir organik asittir. Bu hafif asidik pH ortamında Ca^{+2} iyonlarının şelasyonu ile sitrik asit diş sert dokularını dekalsifiye etme yeteneğine sahiptir (159).

Sitrik asit çözeltileri, %25 ile %50 konsantrasyonları arasında irrigasyon solüsyonu olarak kullanılmıştır (108). Farklı konsantrasyonlardaki sitrik asit çözeltilerinin (0.5, 1, 2 M) irrigasyon solüsyonu olarak kullanıldıklarında anaerobik bakteri türlerine karşı antimikrobiyal bir potansiyele sahip olabileceği bildirilmiştir (170).

2.6.1.3.5. Maleik asit

Esas olarak fumarik asidin öncüsü olan maleik asit, butendioik asidin trans-izomeri ve fumarik asidin cis-izomeri olan bir dikarboksilik organik asittir. Restoratif diş hekimliğinde bir asitleme ajanı olarak kullanılan maleik asit, smear tabakasını uzaklaştırma özelliğine sahiptir (159).

Ferrer-Luque ve ark. (171) tarafından maleik asitin %0,88 konsantrasyonu 30 saniye ve %0,11 konsantrasyonu da 2 dakika boyunca *E. faecalis* biyofilmine temas ettiğinde biyofilmi uzaklaştırabildiği bildirilmiştir. Ayrıca %0,2 setrimid ile kombine edilen maleik asitin 30 saniye uygulama süresinin biyofilmi uzaklaştırmada etkili olduğu rapor edilmiştir (171).

2.6.1.3.6. Tannik asit

Tannik asitin %25 konsantrasyonu ilk olarak Graham Mount tarafından antiseptik bir ajan olarak kullanılması önerildi. Tannik Asit 1925 yılında Davidson

tarafından da yanıkların tedavisinde önerilmiş ve kullanılmıştır. Kanama durudurucu olarak da kullanılan tannik asitin protein çökelterek pıhtılaşma sağladığı rapor edilmiştir (172).

Tanizaki ve Inoue (173) tarafından tannik asitin dentin tübüllerini tıkaması ile dentin sertliğinde bir değişiklik oluşturduğunu ve dentindeki organik maddeyi güçlendirirken kalsiyum çözünmesi üzerinde de inhibe edici bir etki gösterdiği bildirilmiştir (173).

Takahashi ve ark (174) tarafından SEM kullanarak gerçekleştirilen bir çalışmada dentine 60 saniye boyunca %2 tannik asit veya 15, 30 ve 60 saniye boyunca %5 tannik asit uygulamasının smear tabakasını etkili bir şekilde uzaklaştırdığını ve dentin tübüllerinin tıkandığı bildirilmiştir (174).

2.6.1.3.7. Poliakrilik asit

Poliakrilik asit (Fuji II sıvısı, Durelon sıvısı)' in %40 konsantrasyonu, çok etkili bir smear tabakası uzaklaştırma ajanı olarak rapor edilmiştir. Bununla birlikte dentinin aside maruz kalma süresinin 30 saniyeden az olması gerektiği rapor edilmiştir (175).

2.6.1.3.8. Perasetik asit

Kalsiyum ile kompleksler oluşturan perasetik asit (PAA)'in %0,5 ile %2,25 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanımının etkili olduğu ve dentin duvarlarından smear tabakasının uzaklaştırılmasında EDTA ile karşılaştırılabilir olduğu rapor edilmiştir (176, 177). Ulusoy ve ark. (178) tarafından kök kanallarının final irrigasyonunda PAA kullanılmasının, benzer smear tabakası uzaklaştırma yeteneklerinden dolayı EDTA'ya alternatif olabileceği ve PAA'in %0,5'lik konsantrasyonuna kıyasla %2,25'lik konsantrasyonunun smear tabakasını uzaklaştırmada daha etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte McDonnell ve Russell (113) tarafından perasetik asitin ideal bir kök kanal irrigasyon solüsyonu olması için gerekli olan antibakteriyel, sporisidal ve antiviral özelliklere sahip olduğu bildirilmiştir.

2.6.1.4. Tetrasiklin içerikli solüsyonlar

Tetrasiklinler, çeşitli bakterileri kapsayan bakteriyostatik antibiyotikler olarak tetrasiklin-HCl, demeklosiklin, monosiklin ve doksisiklinden oluşur (179). Antimikrobiyal etkilerinin yanı sıra tetrasiklinler, memeli kollajenazlarını ve klastik hücreleri inhibe ederek doku bozulması gibi birçok spesifik özelliğe sahiptir (180). Tetrasiklinler smear tabakasının kaldırılması için kök kanal sisteminin enstrümantasyonu sırasında, periapikal cerrahi prosedürlerde retrograt kavite irrigasyonu için ve intrakanal ilaç olarak kullanılır (181-183).

2.6.1.4.1. MTAD

MTAD (Mixture of tetracycline, acid and detergent) olarak da bilinen BioPure (Dentsply, OK, ABD, Tulsa Dental) 2003 yılında Torabinejad ve ark. (179) tarafından sunuldu. MTAD %4,25 sitrik asit, %3 doksisiklin ve bir deterjan olan %0,5 polisorbat 80'den oluşur. Torabinejad ve ark. (179) tarafından, özellikle NaOCl ile kanalların irrigasyonu ardından dentin tübül yapısında minimum değişikliklerle smear tabakasını uzaklaştımak için etkili bir solüsyon olarak önerilmiştir (179).

2.6.1.4.2. Tetraclean

Tetraclean (Ogna Laboratori Farmaceutici, Muggiò, İtalya), MTAD'a benzer bir asit, bir antibiyotik ve bir deterjanın bir kombinasyonudur. Fakat Tetraclean deterjan tipi olarak polipropilen glikol içermektedir ve doksisiklin konsantrasyonu 50 mg/ mL'dir (159).

2.6.1.5. Oksitleyici ajanlar

2.6.1.5.1. Hidrojen peroksit

Berrak renksiz bir sıvı olan hidrojen peroksit (H_2O_2) dezenfeksiyon ve sterilizasyon için yaygın olarak kullanılan bir biyosittir. Bununla birlikte H_2O_2 günümüzde endodontik tedavide çok sık kullanılmaktadır. %1- %30 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılan H_2O_2, proteinler ve DNA gibi mikrobiyal bileşenlere hücum eden serbest hidroksil radikalleri (HO.) üretir. H_2O_2 çözeltide nispeten kararlıdır, suya ve oksijene dönüştüğü için çevresel açıdan sorun yaratmaz (184).

H_2O_2 virüsler, bakteriler, mayalar ve hatta bakteri sporları dahil olmak üzere çeşitli mikroorganizmalara karşı antimikrobiyal aktiviteye sahiptir. Gram-pozitiflere bakterilere karşı Gram-negatif bakterilere göre daha etkili bir antimikrobiyal aktivite gösterir. Bazı bakteriler tarafından üretilen katalaz veya süperoksit dismutaz H_2O_2'ye karşı kısmi koruma sağlayabilmektedir (184). Siqueira ve ark. (185) tarafından ex vivo çalışmalarında *E. faecalis* ile kontamine kök kanallarında NaOCl ve H_2O_2 kombinasyonunun tek başına NaOCl'e kıyasla hiçbir avantaj sağlamadığı rapor edilmiştir. Diğer taraftan Al-Ali ve ark. (186) tarafından H_2O_2'in NaOCl ardından kullanılmasının kök kanallarından yumuşak dokuyu uzaklaştırmada daha etkili olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte Heling ve Chandler (187) tarafından enfekte dentin dezenfeksiyonunda kullandıkları düşük konsantrasyonlardaki H_2O_2 ve CHX arasında güçlü bir sinerjizm olduğu bildirilmiştir.

2.6.1.5.2. Karbamid peroksit

Diş hekimliğinde genellikle beyazlatma ajanı olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte Yao ve ark. (188) tarafından in vitro hidroksiapatit disklerinde kültürlenen oral biyofilme uygulama sonrası durulanan %5 ve %10 karbamid peroksit jelin, CHX jelden hem daha bakterisit hem de daha hızlı etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte çalışmada kullanılan CHX ve karbamid peroksit ajanlarının negatif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha etkin bir antimikrobiyal aktivite sağladığı ve ajanların konsantrasyonu ve uygulama süresi ile antimikrobiyal aktivitelerinin de arttığı rapor edilmiştir.

2.6.1.5.3. İyodin potasyum iyodit

İyodin potasyum iyodit (IKI) ilk olarak 1829'da bir Fransız doktor olan Lugol tarafından *scrofula*yı (sıraca hastalığı) tedavi etmek için kullanıldı. Daha sonra 1927'de iyodin ürünleri başlangıçta kök kanal solüsyonu olarak kullanıldı. Doku çözme yeteneklerinin olmaması nedeniyle, IKI'nin, kanal enstrümantasyonu ve NaOCl ile irrigasyondan sonra kullanılması önerilmiştir (189).

Günümüzde yüzeyler, cilt ve operasyon alanlarının dezenfeksiyonunda kullanıldıkları bilinen iyot bileşikleri en eski dezenfektanlardan biridir. İyodin (iyot), hipoklorit içerisinde bulunan klordan daha az reaktiftir. Bununla birlikte

mikroorganizmaları hızla öldürür ve bakterisidal, fungisidal, tüberkülosidal, virüdal ve hatta sporisidal aktiviteye sahiptir. Sulu çözeltilerde iyodin stabilitesinin kötü olması povidon-iyodin ve poloksamer-iyodin gibi iyodoforların (iyodin taşıyıcılar) gelişimini sağlamıştır. İyodoforlar iyodin komplekslerini ve iyodini yavaş yavaş serbest bırakan çözücü etkili bileşiklerdir ve alkollü iyodin çözeltilerine kıyasla bazı mayalara ve bakteri sporlarına karşı daha az etkilidir (190).

IKI, %2 ve %5 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılan bir kök kanal dezenfektanıdır (191). IKI solüsyonu %2 iyodin ve %4 potasyum iyodit içermektedir (192). Potasyum iyodit, sudaki iyodini çözmek için kullanılır ve antimiktobiyal aktiviteye sahip değildir, antimikrobiyal aktivite iyodin tarafından sağlanır (190). İyodin, bakteriyel enzimlerin serbest sülfhidril gruplarıyla reaksiyona girer ve disülfür bağlarını parçalayarak oksitleyici bir ajan olarak işlev görür (193). Siren ve ark. (192) *E. faecalis*'e karşı $Ca(OH)_2$'in IKI ve CHX preperatları ile kombine kullanımının $Ca(OH)_2$'in antibakteriyel etkinliği arttırdığını bildirmişlerdir. Bununla birlikte Stojicic ve ark. (92) in vitro biyofilmlerin farklı dezenfektanlara üç dakika maruziyeti sonucu %0,6 IKI'nın biyofilm üzerinde %2 CHX ile aynı ve her ikisinin de %1 NaOCl'den daha zayıf bir etkiye sahip olduğunu bildirmişlerdir. Wang ve ark. (194) tarafından IKI'ye bir deterjan ilavesinin, dentin tübüllerinde *E. faecalis*'e karşı IKI'nın antibakteriyel etkilerini artırdığını bildirilmiştir. Ayrıca NaOCl allerjisinde alternatif olarak kullanılması önerilen ilk solüsyon IKI'dır. İyodin genellikle bir alerjen olarak görülmese de bazı hastalar bu bileşiğe aşırı duyarlı olabilmektedir (191).

2.6.1.6. Elektrokimyasal olarak aktive edişmiş solüsyonlar

Oksidatif potansiyel su

Elektrokimyasal olarak aktive edilmiş su (ECA) veya oksidatif potansiyel su olarak da adlandırılan süperoksitlenmiş su, hipokloröz asit ve serbest klor radikalleri oluşturmak için salinin elektrolize edilmiş halidir (195-197). Bu asidik solüsyon biyolojik dokular için toksik değildir, ancak mikroorganizmaları öldürebilir (196). Akış elektrolitik modülü kullanılarak musluk suyundan ve salinden iki çeşit ECA üretilebilir. Bunlardan biri pH'ı 2-9 arasında değişen bir antimikrobiyal anolittir diğeri ise alkalin bir deterjan olarak işlev görebilen bir katolittir (198). Yarı kararlı bir halde

olan ECA bazı serbest radikal türleri, sodyum hidroksit ve hidrojen peroksit gibi biyosidal maddeler de içerir (199).

Gulabivala ve ark. (195) tarafından ex vivo bir modelde kök kanallarında *E. faecalis*'in ortadan kaldırılmasında %3 NaOCl'nin elektrokimyasal olarak aktive edilmiş sudan daha etkili olduğu bildirilmiştir.

2.6.1.7. Doğal ajanlar

2.6.1.7.1. Kitosan

Genellikle yengeç, karides, midye gibi kabuklu deniz hayvanlarının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin dış iskeletini oluşturan kitinin deasetillenmiş bir türevi olan kitosan, doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci doğal biyopolimerdir (200, 201). Kitosan, hücre dışı matriks bileşenlerine benzer bir yapıya sahiptir ve bu nedenle kolajen yapılarını güçlendirmek için kullanılır. Bununla birlikte kitosan çok iyi antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklere sahiptir (201).

2.6.1.7.2. Propolis

Propolis, arı kovanındaki boşlukları kapatmak ve onu ışığa, neme, istilacılara ve dış etkenlere karşı korumak, kovanın iç ortamını dezenfekte etmek ve iç sıcaklığı ayarlamak için bitkisel kaynaklardan toplanan balmumu ve eksüdalı arı salyasıdır. Propolisin bileşenleri arasında reçine ve balzamlar (%50-70), balmumu (%30-50), polenler (%5-10), amino asitler, mineraller, A, B ve E vitaminleri, fenoller ve aromatik bileşikler bulunmakla beraber, içeriğindeki karbonhidrat yüzdesi farklı propolis türlerine göre değişmektedir (202).

Propolisin aktif bileşini olan flavonoidler, reçineli kısmının büyük bir bölümünü oluşturur ve propolisin antioksidatif, antibakteriyel, antiviral, antifungal, antikaryojenik ve antiinflamatuvar özelliklerinin çoğundan sorumludurlar (203).

Qathami ve Al-Madi (21) tarafından, kanal içi irrigasyon için propolis, sodyum hipoklorit ve tuzun antimikrobiyal etkinliğini koloni oluşturan birim sayısı üzerindeki etkisini değerlendirdikleri çalışmalarında, propolisin antimikrobiyal aktivitesinin NaOCl'e benzer olduğunu rapor edilmiştir.

2.6.1.7.3. Humik asit

Humik asit birçok farklı maddeden meydana gelen ve doğadaki karbon rezervlerinin büyük bir bölümünü meydana getiren doğal bir maddedir (204). Humik maddeler vanillin asit, resorkinol, ferulik asit, protokateşik asit ve benzoik asit gibi değişik fenolik asitler içermektedirler (205).

Ziraat alanında yaygın kullanılan humik maddeler tıbbi alanda da antibakteriyel, antiviral, antitoksik, antiartrik, antialerjik, antiülserojenik, antiinflamatuar ve immünomodülatör özelliklere sahip olması nedeniyle kullanılmaktadır (206, 207). Humik asitin tüm bu özelliklerin yanında kollajen sentezini indükleyerek yara dokusunun iyileşmesinde rol oynadığı da bildirilmektedir (208).

2.6.1.8. Diğer kombine solüsyonlar

2.6.1.8.1. QMix

2011 yılında piyasaya sürülen QMix (Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK, ABD) final irrigasyon solüsyonu olarak tavsiye edilen, önceden karıştırılmış, antibiyotik içermeyen, renksiz ve kokusuz kullanıma hazır kombine bir solüsyondur. Antimikrobiyal etkinliğinin yanısıra smear tabakasını ve debrisi kaldırmak için tasarlanmıştır. QMix antimikrobiyal bir ajan olan bisquanid (%2 klorheksidin), yüzey aktif madde olan Triklosan (N-cetyl-N,N,N-trimethylammonium bromide) ve dekalsifiye edici ajan olan EDTA içerir (96, 209, 210).

Bilindiği üzere NaOCl ve CHX'in kombine kullanımı sonucu turuncu/ kahverengi renkte, çözünmeyen ve karsinojenik parakloroanilin (PCA) adı verilen bir çökelti oluşturur (211). Ayrıca CHX'in EDTA ile kimyasal reaksiyonu da beyaz bir tuz çökeltisi meydana getirmektedir (212). QMix diğer kök kanal solüsyonları ile istenmeyen reaksiyonları en aza indiren bir kimyasal tasarıma sahiptir (213). Bu sayede Qmix, CHX içeriğinden dolayı, EDTA ile beyaz tuz çökeltisi ve NaOCl ile de PCA oluşturmamaktadır (214).

Üretici firma tarafından kök kanal dolumundan önce final irrigasyon solüsyonu olarak tam bir etkinlik için 60-90 saniyelik sürekli irrigasyon yapılmasını önerir.

Üretici QMix'in dirençli Enterococcus faecalis türleri de dahil olmak üzere planktonik bakterilerin %99,99'dan fazlasını ortadan kaldırdığını iddia etmektedir (215).

Stojicic ve ark. (214) tarafından QMix'in EDTA'ya benzer oranda smear tabakası uzaklaştırdığı rapor edilmiştir (214).

2.6.1.8.2. İrritrol

Üretici firma (Essential Dental Systems, S. Hackensack, New Jersey, ABD) tarafından final irrigasyon solüsyonu olarak kullanımı önerilen İrritrol, EDTA ve CHX içeren bir çözeltidir. İrritrol'ün smear tabakasını geleneksel irrigasyon solüsyonlarına göre daha az agresif bir şekilde uzaklaştırdığı ve böylece dentinin daha az demineralize olmasına neden olduğu bildirilmiştir (216).

2.6.1.8.3. SmearOFF

SmearOFF (Vista Dental Products, Racine, WI, ABD), yüzey aktif madde ve yüzey modifikatörleri ile formüle edilmiş EDTA ve CHX karışımıdır. Piperidou ve ark. (217) tarafından SmearOFF'un NaOCl ile etkileşiminin PCA oluşturmadığı rapor edilmiştir. Bununla birlikte üretici SmearOFF'un NaOCl ile karıştırıldığında bir çökelti oluşturmadığını iddia etse de, Krishnan ve ark. (218) tarafından mevcut klorun NaOCl'de hızla yer değiştirdiği ve SmearOFF'un NaOCl ile karıştırılmadan kullanılması gerektiği bildirilmiştir.

2.6.2. İrrigasyon Solüsyonları Etkileşimleri

Çeşitli irrigasyon solüsyonlarının kombinasyonunun antibakteriyel aktiviteyi geliştirebileceği bildirilmiştir (219). Zehnder (101) tarafından önerilen protokole göre enstrümantasyon boyunca organik yapıları çözmek için NaOCl, enstrümantasyon sırasında dentini yumuşatması ve smear tabakasının kaldırılması için EDTA ve antimikrobiyal aktivite ve dayanıklılığı arttırmak amacıyla final irrigasyon solüsyonu olarak da CHX'in kullanılabileceği bildirilmiştir (101).

İrrigasyon solüsyonları arasında yapılan kombinasyonlar ile antimikrobiyal etkinliği arttırması amaçlanmasına rağmen solüsyonlar arasında kimyasal etkileşimler gerçekleşebilir (211).

2.6.2.1. NaOCl ile CHX arasındaki etkileşim

NaOCl'den sonra direkt CHX uygulamasının asit-baz reaksiyonu ile parakloroanilin (PCA) adı verilen nötr ancak toksik olduğu bilinen, kırmızı/ kahverengi çözünmeyen bir çökelti (presipitat) oluşumu ile sonuçlandığı çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir (211, 220, 221). NaOCl bir alkali bir bileşik olarak dikatyonik asitten proton alma yeteneğine sahipken, CHX bir dikatyonik asit olarak proton bırakma yeteneğine sahiptir (222). Bu proton değişimi sonucunda meydana gelen çökelti ile dentin tübüllerinin tıkanabileceği ve dişi boyayabileceği rapor edilmiştir (217, 222). PCA'in insanlarda metoglobin oluşumuna yol açabileceği (223) ve hayvanlarda kanserojen olabileceği de bildirilmiştir (224).

Ayrıca bazı araştırmacılar (225) tarafından CHX ve NaOCl karıştırıldığında oluşan çökelti de *parachlorophenylurea* (PCU) ve *parachlorophenylguanidyl-1, 6-diguanidyl-hexane* (PCGH) bileşiklerinin de bulunduğu rapor edilmiştir.

2.6.2.2. NaOCl ile EDTA arasındaki etkileşim

NaOCI ve EDTA arasındaki etkileşim üzerine yapılan bir çalışmada NaOCI ile beraber kullanılan EDTA'nın kalsiyum şelasyon özelliğinin değişmediği fakat EDTA ve NaOCI'in doku çözme yeteneğinde azalma olduğu ve karışımda hiç serbest klorin bulunmadığı rapor edilmiştir (226).

2.6.2.3. CHX ile EDTA arasındaki etkileşim

Rasimick ve ark. (212) tarafından CHX ve EDTA'nın kimyasal reaksiyonu sonucu beyaz bir çökelti şeklinde bir tuz oluştuğu bildirilmiştir.

2.6.3. İrrigasyon Solüsyonlarının Etkinliğinin Arttırılmasında Kullanılan Yaklaşımlar

Kök kanal sisteminin karmaşık anatomisi, dentin duvarlarında veya dentin tübüllerinde smear tabakasının varlığı, bakteriyel biyofilm oluşumu ve çeşitli derinliklerde (> 500 μm) dentin tübüllerine nüfuz etmesi kök kanal sisteminin eksik debridmanından sorumludur (1). Bu parametreler, intrakanal ilaçların ve antibakteriyel

solüsyonların bakterilere erişimini sınırlar. Bu sebeple irrigasyon solüsyonlarının etkinliğinin arttırılmasında bazı yöntem ve sistemler kullanılmaktadır. İrrigasyon solüsyonlarının etkinliğinin arttırılmasında kullanılan bazı yöntem ve sistemler arasında; irrigasyon solüsyonlarının ısıtılması, ucu kapalı ve yandan açılır özel irrigasyon iğneleri, irrigasyon fırçaları, master guta perkanın itme ve çekme hareketiyle irrigasyon solüsyonunun manuel dinamik aktivasyonu, sonik ve ultrasonik aktivasyon, çeşitli lazerler ile aktivasyon, negatif ve pozitif basınçlı mekanizma ile çalışan cihazlar ile aktivasyon, kanalların enstrümantasyonu ile aynı esnada kanal irrigasyonu da yapan sitemler (Self Adjusting File), ultraviyole ile dezenfeksiyon, fotoaktivasyon ile dezenfeksiyon, ozon ile irrigasyon yer almaktadır.

Bununla birlikte irrigasyon solüsyonlarının içerisine antibakteriyel nonopartiküllerin ve çeşitli enzimlerin ilavesi ile de solüsyonların antibakteriyel özellikleri arttırılmaya çalışılmıştır.

2.6.3.1. Antibakteriyel nanopartiküller

Mikroorganizmaların kök kanallarından elimine edilmesi için farklı ajanlar değişik konsantrasyonlarda kullanılmasına rağmen enfekte kök kanalları %100 dezenfekte edilememektedir (227-230). Son yıllardaki nanoteknoloji alanındaki gelişmeler ile ultra küçük boyut, geniş yüzey alanı, artmış kimyasal aktivite gibi benzersiz fizikokimyasal özelliklere sahip olan nanopartiküllerin (NP) dental enfeksiyonların tedavisinde kullanımı umut vericidir. Materyaller nanoboyutlu olduğundan kök kanalının kompleks anatomik bölgelerine ulaşması ve bakteri hücresine daha kolay penetre olması ile daha etkin dezenfeksiyon sağlanmaktadır (201). Nanopartiküllerin daha büyük yüzey alanı ve yük yoğunluğu, bakteriyel hücrelerin negatif yüklü yüzeyiyle daha büyük ölçüde etkileşime girmelerini sağlar ve antimikrobiyal aktivitenin artmasına neden olur (228, 231). Antibakteriyel NP'in irrigasyon solüsyonu veya kanal içi ilaç olarak (231-235) ya da kanal patları (236, 237) ve restoratif materyallere (238-241) eklenerek antibakteriyel etkinliğin arttırılması hedeflenmektedir (201).

NP'lerin antibakteriyel mekanizması temel olarak üç şekilde açıklanabilir, 1) peptidoglikan hücre duvarı ve membranı ile etkileşime girerek hücre lizizine neden

olma; 2) bakteri proteinleri ile etkileşim ve protein sentezini bozma; 3) bakteriyel (sitoplazmik) DNA ile etkileşim ve DNA replikasyonunun engellenmesi, ancak spesifik etki mekanizması henüz net değildir (242-245).

Metal ve organik NP'ler geniş spektrumlu bakterisidal özelliklerinden dolayı diş hekimliğinin çeşitli alanlarında uygulanmıştır (246). Ancak NP'lerin önemli antibakteriyel aktivitelerine rağmen, mikrobiyofilm, toksisite ve insan vücudu üzerindeki potansiyel olarak istenmeyen etkileri nedeni ile değişken antibakteriyel konsantrasyonları içeren uygulamaları için limitasyonlar hala mevcuttur (245). Bazı araştırmacılar, NP'lerin toksisitesinin doza bağlı bir etki sergilediğini bildirmişlerdir (247-249).

2.6.3.1.1. Gümüş nanopartikülleri

Gümüş bileşikleri, değişen düzeylerde antimikrobiyal etki sağlayabilmeleri nedeni ile tıp ve diş hekimliğinde kullanım alanı bulmuştur (250, 251). Gümüş iyonları, biyofilm oluşumunu engelleyen bakterisidal metal katyonlarıdır (252). Gümüş iyonları ve nanopartikülleri hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilerin hücre zarı ile etkileşime girdiğinde serbest kalır ve DNA replikasyonlarını olumsuz etkileyerek bakterinin ölümüne yol açabilmektedir (108, 201). Bu nedenle nanopartiküller ilaca dirençli mikroorganizmaların neden olduğu hastalıkların tedavisi ve biyofilm oluşumunun engellenmesi için avantaj sağlamaktadır (245). Gümüş iyonları etkisi ile ölen bakteriler, canlı bakterilerle bir araya geldiğinde gümüş tekrar aktive olur ve "zombi etkisi" olarak adlandırılan bir etki ile etkileşimde olduğu canlı bakterileri de öldürür. Bu durum dentin proteinlerinde biriken gümüşün uzun süreli antimikrobiyal etkisini açıklamaya yardımcı olur (253).

Bununla birlikte inorganik NP'lerin temsilcisi olarak gümüş nanopartikül (AgNP)'lerin bakteriyel yapılarla etkileşime girerek solunum zinciri enzimlerini inhibe ettiği ve membran geçirgenliğine müdahale etttiği bildirilmiştir. AgNP'ler, katalitik etkisiyle oksijeni aktif oksijene dönüştürebilir ve mikroorganizmaların yapısal hasarına yol açabilir ve bu da gümüşün "oligodinamik etkisi" olarak adlandırılmıştır (254).

AgNP'ler, *E. faecalis* suşu da dahil olmak üzere ilaçlara dirençli mikroorganizmalarda bile çok iyi bilinen antimikrobiyal özelliklerinden dolayı çeşitli mikroorganizma türlerinin kontrolü için kullanılan en yaygın metalik nanomateryallerdir (228, 255-258). Son yıllarda endodonti alanında kök kanal sisteminin dezenfekte edilmesinde gümüş nanopartükülllerinin kullanılabileceği düşünülmektedir.

Afkhami ve ark. (259) tarafından *E. faecalis* inoküle edilmiş kök kanallarının dezenfeksiyonu için 100 ppm AgNP solüsyonu ile irrigasyonun, %2,5 NaOCl irrigasyonundan daha iyi antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte Rodriguez ve ark. (228) tarafından 94 ppm AgNP solüsyonu ile irrigasyonun, *E. faecalis* biyofilmine ve enfekte sığır dentin tübüllerine karşı %2,5 NaOCl irrigasyonundan daha az etkili olduğunu bildirilmiştir.

Bununla birlikte gümüş nanopartiküllerin sitotoksisitesinin yüksek konsantrasyonlarda arttığı ve küçük boyutları, kimyasal bileşimleri, yüzey özellikleri ve spesifik olmayan oksidatif hasarları nedeniyle konakçı hücreler için toksik olabileceği bildirilmiştir (201, 228, 260).

2.6.3.1.2. Kitosan nanopartikülleri

Genellikle yengeç, karides, midye gibi kabuklu deniz hayvanlarının ve çekirge, örümcek gibi bazı böceklerin dış iskeletini oluşturan kitinin deasetillenmiş bir türevi olan kitosan, doğada selülozdan sonra en çok bulunan ikinci doğal biyopolimerdir (200, 201). Kitosan, glukozamin ve N-asetil glukozamin kopolimerlerini içerir (261). Kitosan, toz (mikro ve nanopartiküller), kapsül, film, iskele, hidrojel, boncuk ve bandaj gibi çeşitli formlarda sentezlenebilir. Kitosan, hücre dışı matriks bileşenlerine benzer bir yapıya sahiptir ve bu nedenle kolajen yapılarını güçlendirmek için kullanılır. Bununla birlikte kitosan çok iyi antibakteriyel, antiviral ve antifungal özelliklere sahiptir (201). CNP'lerin, AgNP'ler ile benzer bir antibakteriyel mekanizmaya sahip olduğu bildirilmiştir (245). Pozitif yüklü CNP'lerin negatif yüklü bakteri membranı ile elektrostatik etkileşime girmesi ile membran permeabilitesinin artması sonucu membranın parçalanarak hücre içi elemanların hücre dışına sızmasına neden olur (201, 262, 263). Bu durum CNP'lerinin antibakteriyel mekanizmasını

açıklar. Kitosanın ayrıca hücre çekirdeğine ulaşarak DNA'ya bağlandığı, böylece RNA ve protein sentezini engellediği düşünülmektedir. Bu nedenlerle CNP'lerinin kök kanal sistemindeki enfekte kompleks anatomik bölgelere ve dentin tübüllerine ulaşarak burada dezenfeksiyonu artırmak için kullanılabileceği düşünülmektedir (201). Kishen ve ark. (231) tarafından dentin yüzeyinde biriken CNP'lerinin yeniden bakteriyel kolonileşmeyi de engellediği rapor edilmiştir.

Perochena ve ark. (94) tarafından CNP'lerin smear tabakasını çözme ve şelasyon etkinliğinin EDTA ile benzer olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte aynı çalışmada kitosan nanopartiküllerinin dentin üzerine bakteri yapışmasına direnç göstermesi ve erken dönem biyofilm formasyonuna engel olması nedeniyle EDTA'ya alternatif olabileceği ve final irrigasyon ajanı olarak kullanılabileceği bildirilmiştir (94).

Ballal ve ark. (261) kök kanallarında, kitosanın kalsiyum hidroksit patına eklenmesiyle uzun süreli kalsiyum hidroksit iyon salınımının gerçekleştiğini bildirmişlerdir. Bununla birlikte kitosanın, nötr sulu çözeltiler veya organik çözücüler içinde çözünmediği ve bu sebeple belirli alanlarda uygulanmasının sınırlı olduğu rapor edilmiştir. Ayrıca nötr ortamlarda antibakteriyel etkinin daha zayıf olduğu bildirilmiştir (264).

2.6.3.1.3. Gümüş kitosan nanopartikülleri

Gümüş kitosan nanopartikülleri **(**AgCNP), gümüş ve kitosan nanopartüküllerinin belli oranlarda karıştırılması ile elde edilir.

2.6.3.2. Enzimler

Literatürde pek çok çalışmada (22-26, 265-268) proteazlar, deoksiribonükleazlar ve glikozidazlar gibi çeşitli enzimlerin bakteriyel matriksi bozabileceği ve daha iyi bir antibakteriyel etkinlik için antimikrobiyal ajan penetrasyonunu kolaylaştırabileceği rapor edilmişitir.

2.6.3.2.1. DNase 1

Biyofilm içerisinde bakteriler EPS ile çevrelenmişlerdir ve bu matriks hücrelere yaşayacakları bir ortam sağlar. Hücreler tarafından salgılanılan bu matriksin en temel görevi, biyofilm içerisinde bakteri hücrelerinin immobilizasyonun sağlanması ve hücrelerin birbirine yakınlaştırılmasıdır. Önceki çalışmalar da biyofilm yapısını stabilize etmek için eDNA'nın gerekli olduğunu ve eksojen DNase'ların eklenmesinin, biyofilm büyümesini kontrol etmek için güçlü bir etken olabileceği bildirilmiştir (269, 270). Bununla birlikte bazı çalışmalarda *E. faecalis* biyofilmlerindeki eDNA'nın biyofilm oluşumunun erken safhasında önemli bir rol oynadığını bildirilmiştir (52, 55).

2.6.3.2.2. Tripsin

Proteolitik bir enzim olan tripsinin, bakterilerin EPS matriksindeki lizin ve arginin peptit bağlarına etki gösterdiği rapor edilmiştir (271). Bu şekilde tripsinin bakteriler tarafından salgılanan proteinlerden oluşan EPS'yi parçalayabileceği ve böylece biyofilmin kohezyonunu azaltabileceği bildirilmiştir (26).

Bu çalışmanın amacı, final irrigasyon solüsyonu olarak NaOCl, CHX, İrritrol, AgCNP'nin tek başına ve DNase 1 ve tripsin enzimleri ile kombine kullanımının insan dentininde oluşturulan *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin KLTM ile değerlendirilmesidir.

Çalışmanın sıfır hipotezi; H_0 hipotezi: *E. faecalis* biyofilmleri üzerinde test edilecek tüm final irrigasyon protokollerinin antibakteriyel etkinliklerinde fark olmayacağı yönündedir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışmanın tasarımı Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 17.03.2020 /2020/62 tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

3.1. Güç Analizi ve Örnek Sayılarının Belirlenmesi

Litereatürde benzer bir metodolojiye sahip olan bir çalışma (20) temel alınarak örneklem büyüklüğü hesaplandı. Varyans istatistiksel testi (G*Power 3.1 Yazılımı, Heinrich Heine Üniversitesi, Düsseldorf, Almanya; $\alpha = 0,05$ ve $\beta = 0,95$) kullanılarak gerçekleştirilen güç analizi sonucunda, kullanılarak gerçekleştirilen güç analizinin sonucunda, her bir grupta istatistiksel açıdan en az 12 dişin olması gerektiği tespit edildi. Bu nedenle çalışmaya 76 diş (152 örnek) dahil edildi.

3.2. Dişlerin Seçimi ve Hazırlanması

Çalışmaya periodontal veya ortodontik sebeplerle çekilmiş çürüksüz, kök ucu kapanmış, tek kök, tek kanal ve düz kök yapısına sahip olan (272) dişler dahil edildi (Şekil 3.1). Herhangi bir kırık, çatlak, kök kanal obliterasyonu, tam veya kısmı kök kanal dolgusuna ve iç veya dış rezorpsiyonuna sahip olan dişler çalışmaya dahil edilmedi.

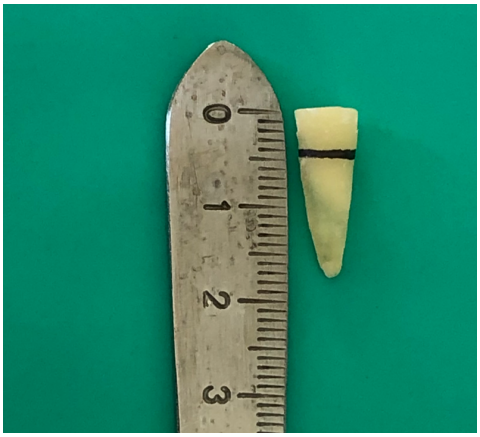


Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan bir diş örneği.

Çalışmaya dahil edilen dişler üzerindeki sert ve yumuşak doku eklentileri periodontal küret ile mekanik olarak uzaklaştırıldı. Dahil edilen dişlere elmas frez (G&Z Instrumente, Lustenau, Avusturya) kullanılarak geleneksel giriş kavitesi açıldı ve apikal açıklık 10 numara K tipi eğe (Dentsply Maillefer, Ballaigues, İsviçre) ile kontrol edildi. Hazırlanan dişler ilk olarak dezenfeksiyon için 48 saat %0,5 lik Cholarimine-T (Sigma- Aldrich, Missouri, ABD) solüsyonunda bekletildi. Daha sonra kullanılıncaya kadar %0,5 Timol solüsyonunda (Acros Organics, Thermo Fisher Scientific, ABD) +4°C'de saklandı.

3.3. Dişlerden Yarım Silindirik Dentin Bloklarının Elde Edilmesi

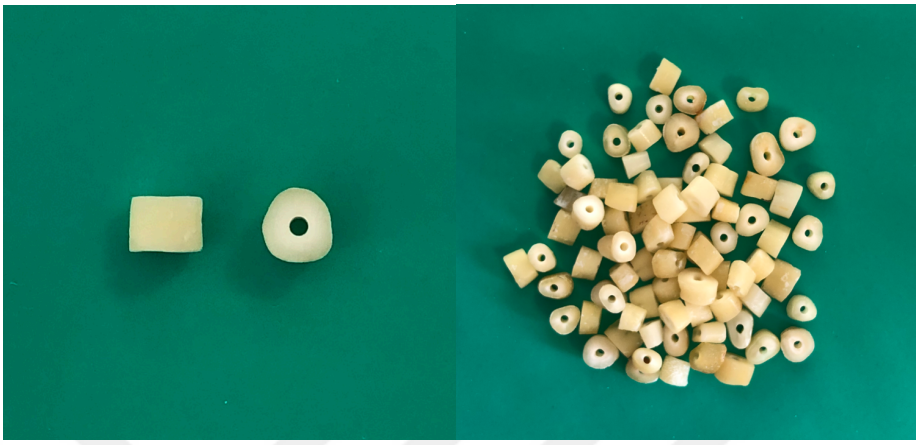
Dişlerden yarım silindirik dentin bloklarının elde edilmesinde Ruiz-Linares ve ark. (273) tarafından tarif edilen prosedür uygulandı. Dahil edilen dişlerin kuronları mine-sement seviyesinde su soğutması altında elmaz fissür frez (G&Z Instrumente, Lustenau, Avusturya) kullanılarak uzaklaştırıldı ve diş kökleri koronalden apikale doğru 4±1 mm olacak şekilde işaretlendi (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Kuronu uzaklaştırılmış olan ve 4 mm yüksekliğinde silindirik blok elde etmek için işaretlenen kök örneği.

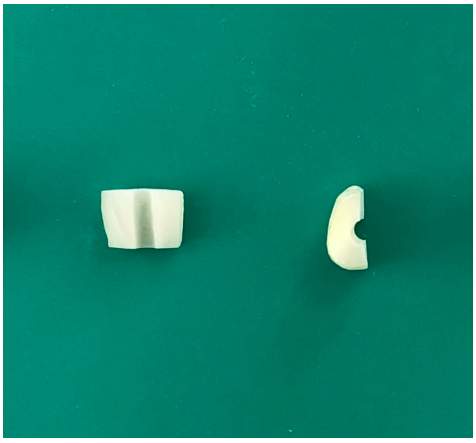
Ardından 4±1 mm yüksekliğinde silindirik dentin bloğu elde etmek için kök apeksleri işaretlenen yerden uzaklaştırıldı. Blokların kök kanalları 1,5 mm çapa ulaşmak ve standartlaştırmak için su soğutması altında 300 rpm' de sırasıyla 1, 2, 3, 4,

5 ve 6 numaralı gates glidden frezlerinin (Proud, Londra, İngiltere) tam bir geçişi ile genişletildi (Şekil 3.3).

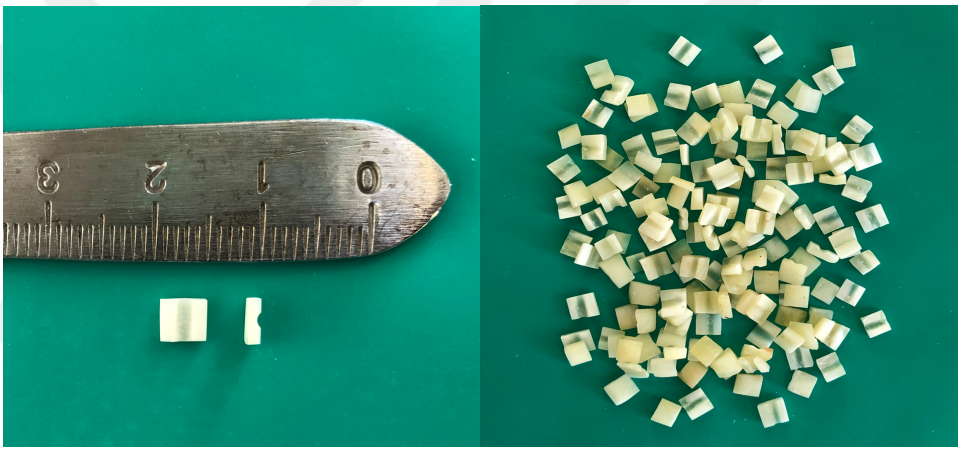


Şekil 3.3. Silindirik dentin blokları.

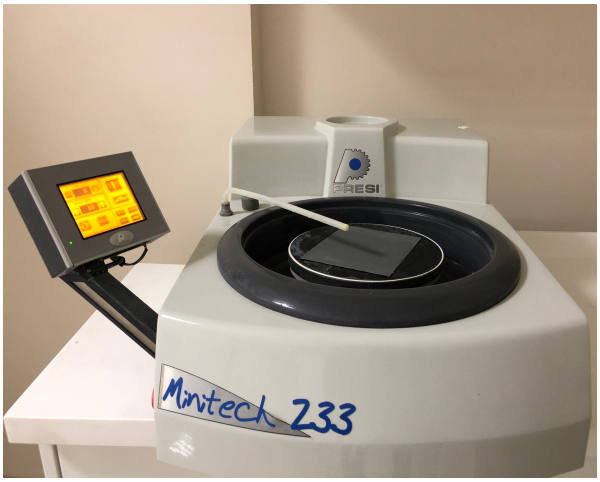
Daha sonra 4±1 mm yüksekliğindeki silindirik bloklar sonsuz elmas separe (Sunshine Diamonds, Langenhagen, Almanya) ile uzunlamasına yarım silindirik iki eşit parçaya ayrıldı (Şekil 3.4). Örnek standardizasyonu için 152 yarım silindirik bloğunun dış yüzeylerinden her bir örneğin boyutları yaklaşık 4 mm x 4 mm x 0,7 mm olacak şekilde sonsuz elmas separe kullanılarak sement uzaklaştırıldı (Şekil 3.5). Örneklerin nihai şekillendirilmesi ve KLTM'de daha iyi görüntü elde edebilmek için dentin yüzeyleri manuel bir parlatma cihazı (Presi, Minitech 233, Fransa) (Şekil 3.6) üzerine çift taraflı silikon bant ile yapıştırılan 2000 grit silikon karbit su zımparası (Atlas Brand, Gebze, Kocaeli) kullanılarak zımparalandı (Şekil 3.7). Örnek kalınlıkları dijital kumpas (Mitutoyo Absolute, Kanagawa, Japonya) ile ölçülerek kontrol edildi (Şekil 3.8).



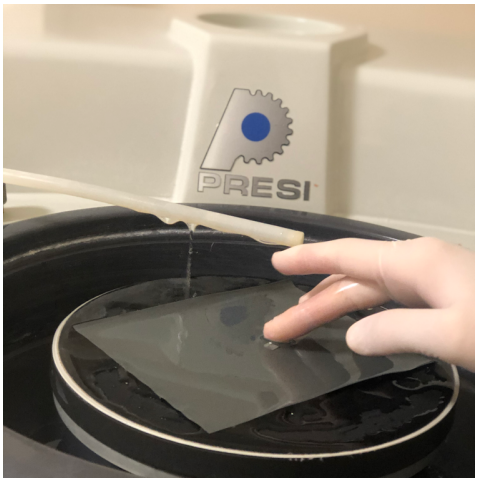
Şekil 3.4. Silindirik dentin bloğunun uzunlamasına ikiye bölünmesi ile oluşturulmuş yarım silindirik dentin bloğu.



Şekil 3.5. Örnek standardizasyonu için sementi uzaklaştırılmış yarım silindirik dentin blokları.



Şekil 3.6. Örnek yüzeylerinin zımparalanması için kullanılan manuel parlatma cihazı.



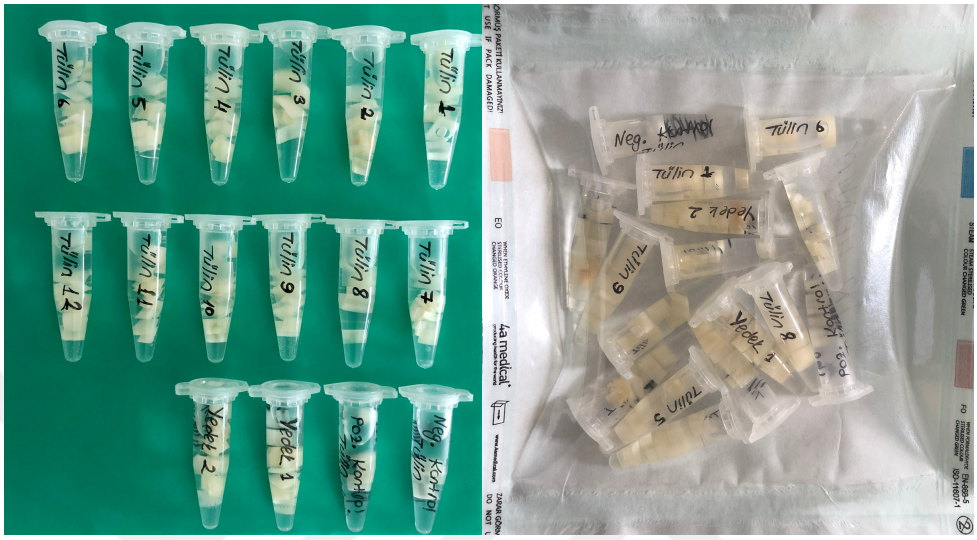
Şekil 3.7. Örnek yüzeylerinin zımparalanması.



Şekil 3.8. Örnek kalınlıklarının dijital kumpas ile kontrol edilmesi.

Örneklerdeki smear tabakasının kaldırılması için ultrasonik banyoda sırasıyla 4 dk boyunca sırasıyla %5 NaOCl (Wizard, İstanbul, Türkiye) ve %17 EDTA kullanıldı. Örnek yüzeylerinde kalan EDTA ve NaOCl'yi elimine etmek için örnekler 5 dk boyunca sodyum tiyosülfat ve ardından 10 dk boyunca distile su ile yıkandı. Örnekler PBS içeren 1.5 mL eppendorf tüplere yerleştirildikten sonra Albuquerque ve ark. (274) ile benzer şekilde 20 dk boyunca 121 °C'de ve 15 psi'de otoklavda steril edildi (Şekil 3.9). Sterilizasyon sonrası dentin blokları 37°C de 2 saat süre ile etüvde bekletildi. Smear tabakasının uzaklaştırıldığını ve kök kanallarının streril edildiğini doğrulamak için rastgele seçilen 4 örnek SEM (Carl Zeiss Sigma 300VP SEM Cihazı,

Oberkochen, Almanya) kullanılarak incelendi (Şekil 3.10). Sterilizasyonu ve smear tabakasının olmadığı onaylanan örnekler negatif kontrol olarak kabul edildi.



Şekil 3.9. Ependorf tüplerine yerleştirilen örnekler ve sterilizasyon için paketlenmeleri.



Şekil 3.10. Çalışmada kullanılan SEM Cihazı.

3.4. Örneklerin *E. faecalis* ile Kontaminasyonu

Bu çalışmada laboratuvar temelli endodontik araştırmalarda kullanılan en yaygın enterokokal referans suşu olan *E. Faecalis* ATCC 29212 kullanıldı (72). +4°C'de muhafaza edilen bakteri kültüründen tek koloni seçilip, 50 mL beyin kalp infüzyonu (BHI; Difco Laboratories, Detroit, MI, ABD) ve %0,25 glukoz içeren besiyerine inoküle edildi ve 24 saat 37°C'de inkübe edildi. Daha sonra, aynı inkübasyon koşulları altında 148 adet örneğin bulunduğu BHI besiyerine McFarland (1) bulanıklık standardına ($3x10^8$ hücre / mL) uygun olarak ayarlanmış bakteri kültürü inokülasyonu gerçekleştirildi. 5 mL sterilize BHI ve 5 mL bakteriyel inokulum ile karıştırılacak ve numuneler, her bir örneği kontamine etmek için sterilize 0,1-10 Ul pipet ucu kullanılacak ve 3 hafta boyunca *E. faecalis* ile kontaminasyonu sağlandı. Bu işlemler, 48 saatlik aralıklarla her zaman yeni hazırlanmış ve McFarland standardına ayarlanmış 24 saatlik saf kültürler kullanılarak tekrarlandı. Örnekler uygun atmosfer koşullarında ve %95 nemli bir ortamda 37°C'de tutuldu. Tüm deney prosedürleri aseptik koşullar altında gerçekleştirildi. Dentin örnekleri her bir tüpten aseptik olarak alınacak ve gevşek bir şekilde yapışık olan planktonik bakterileri çıkarmak için 1 dakika boyunca steril fosfat tamponlu salinle nazikçe yıkandı (6).

3.5. Örneklerin SEM ile İncelemesi

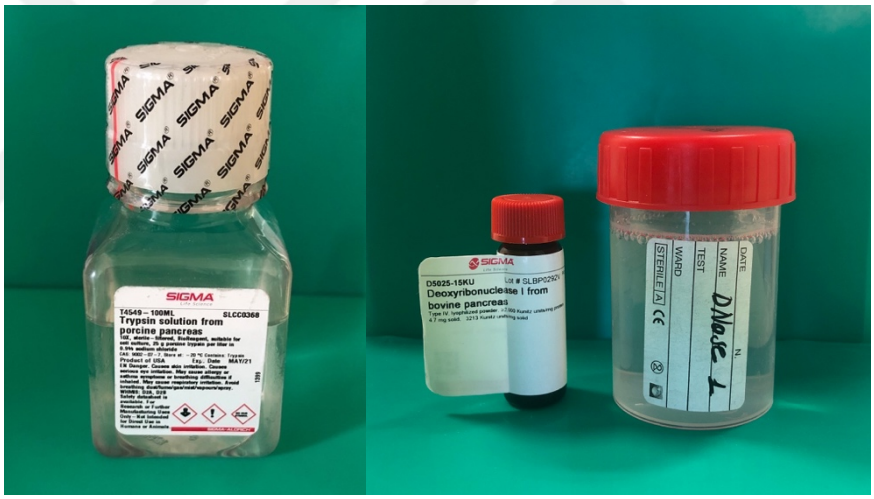
Örnekler üzerinde *E. faecalis* biyofilmlerinin oluşumunu kontrol etmek amacıyla rastgele seçilen 4 dentin örneği SEM ile inceleme için 1 hafta boyunca %10'luk tamponlu formalinde bekletildi. Örnekler kademeli olarak etanol çözeltileri (%70, %95, %100) ile dehidrate edildi ve oda sıcaklığında 1 saat süreyle kurutuldu. Daha sonra örnekler altın paladyum ile kaplandı ve her bir örnek SEM cihazı ile 5.000x, 10.000x ve 20.000x büyütme altında incelendi.

3.6. Örneklerin Çalışma Gruplarına Ayrılması ve Test Edilecek Solüsyonların Uygulanması

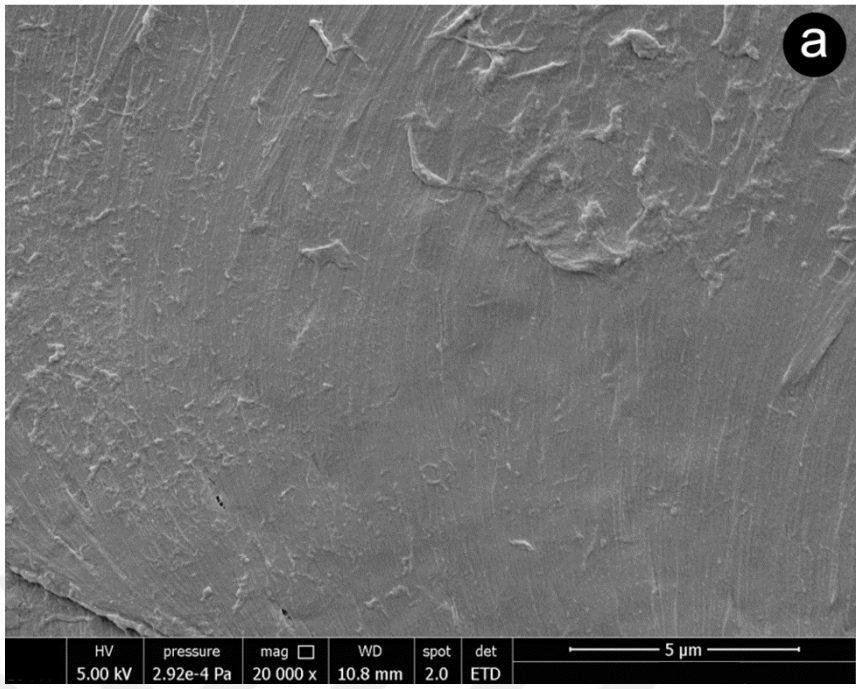
Kök kanal yüzeylerinde *E. faecalis* biyofilmi oluşturulmuş toplam 144 örnek test edilecek final irrigasyon solüsyonları gruplarına göre 3 ana 4 alt grup olacak şekilde toplam 12 deney (n=12) grubuna rastgele ayrıldı. Gruplar Tablo 3.1'de gösterilmiştir.

Çalışmamızda proteolitik bir enzim olan ve domuz pankreasından elde edilen tripsin (Sigma- Aldrich, Missouri, ABD) ile EPS parçalayıcı enzim olan ve sığır pankreasından elde edilen DNase 1 (Sigma- Aldrich, Missouri, ABD) kullanılmıştır (Şekil 3.11). Literatürde benzer çalışmalar referans alınarak tripsin ve DNase 1'in 100 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı (22-26). Her iki enzimin de kullanılacak olan 100 µg/mL'lik konsantrasyonları üretici talimatlarına göre hazırlandı.

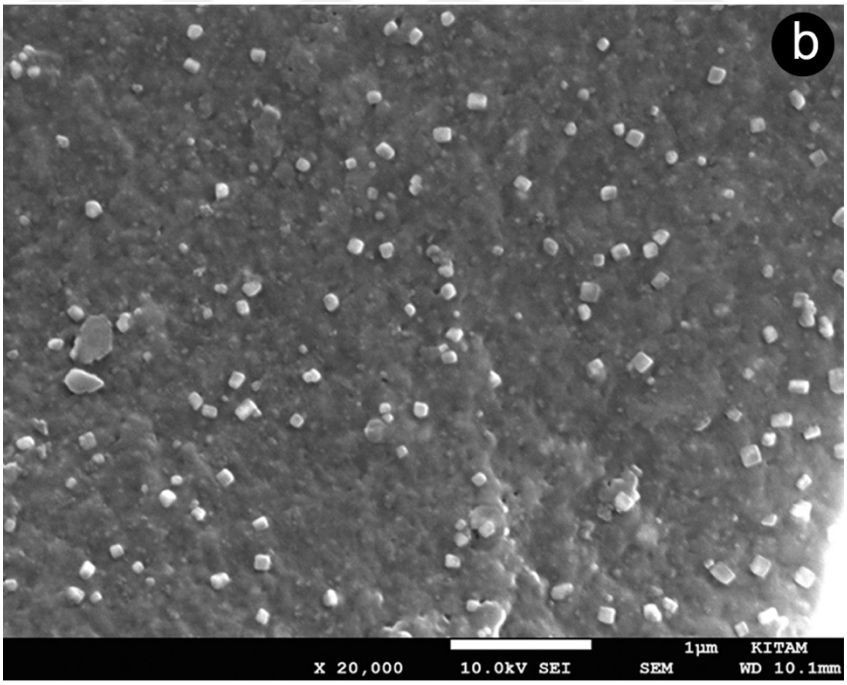
Mevcut çalışmada kullanılan AgCNP, Bin Ahmad ve ark. (275)'nın bildiriği yönteme göre sentezlendi ve elde edilen solüsyonun nanopartikül özelliği kazandığını doğrulanmak amacıyla SEM ile incelendi (Şekil 3.12a, 12b, 12c). SEM görüntülerinden sentezlenen AgNP'lerin boyutunun 50-82 nm arasında değiştiği gözlendi.



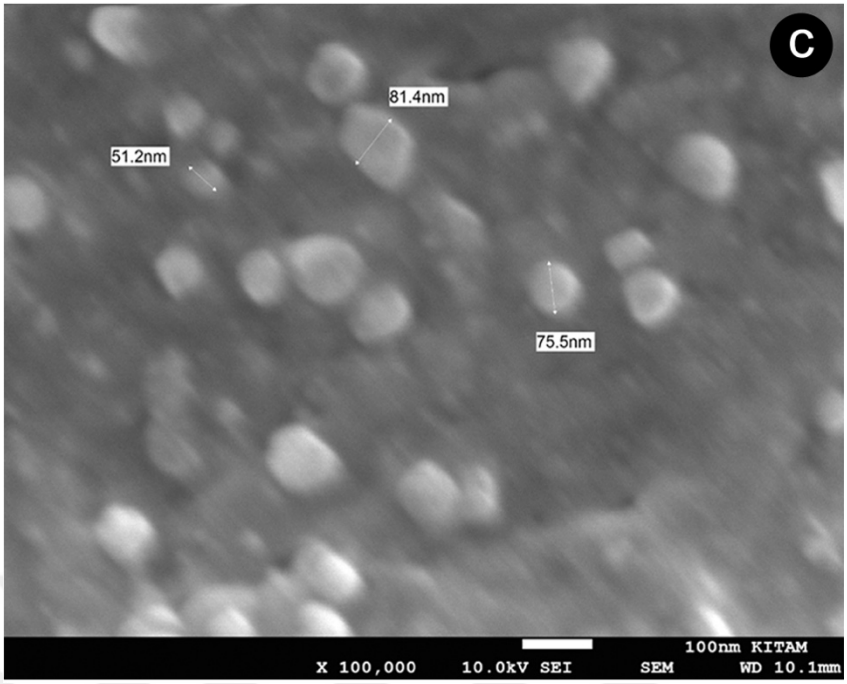
Şekil 3.11. Çalışmada kullanılan enzimler; Tripsin ve DNase 1.



Şekil 3.12a. Kitosanın SEM görüntüsü; 20000X.



Şekil 3.12b. Gümüş nanopartiküller eklenmiş kitosanın SEM görüntüsü; 20000X.



Şekil 3.12c. Gümüş nanopartiküller eklenmiş kitosanın SEM görüntüsü; 100000X.

Tablo 3.1. Örneklerin gruplara göre ayrılması gösterilmiştir.

	Ön Enzim Uygulaması	Final İrrigasyon Solüsyonu
Grup 1	-	%2,5 NaOCl
Grup 2	-	%2 CHX
Grup 3	-	İrritrol
Grup 4	-	AgCNP
Grup 5	Tripsin	%2,5 NaOCl
Grup 6	Tripsin	%2 CHX
Grup 7	Tripsin	İrritrol
Grup 8	Tripsin	AgCNP
Grup 9	DNase 1	%2,5 NaOCl
Grup 10	DNase 1	%2 CHX
Grup 11	DNase 1	İrritrol
Grup 12	DNase 1	AgCNP

Test edilecek final irrigasyon solüsyonlarından önce normal irrigasyon prosedürünü taklit etmek için tüm örneklere 2 mL NaOCl ve ardından 2 mL distile su ile irrigasyon yapıldı.

NaOCl grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından örneklere yalnızca 6 mL %2,5 NaOCl ile 5 dk irrigasyon yapıldı (Şekil 3.13). Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

CHX grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından örneklere yalnızca 6 mL %2 CHX (Prochex, Promida, Türkiye) ile 5 dk irrigasyon yapıldı (Şekil 3.14). Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

İrritrol grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından örneklere yalnızca 6 mL irritrol ile 5 dk irrigasyon yapıldı (Şekil 3.15). Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

AgCNP grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından ardından yalnızca 6 mL AgCNP solüsyonu ile irrigasyon yapıldı (Şekil 3.16). Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

Tripsin/ NaOCl grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL tripsin solüsyonu ve Grup 1'deki gibi 6 mL %2,5 NaOCl ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

Tripsin/ CHX grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL tripsin enzim solüsyonu ve Grup 2'deki gibi 6 mL %2 CHX ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

Tripsin/ İrritrol grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL tripsin enzim solüsyonu ve Grup 3'deki gibi 6 mL irritrol ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

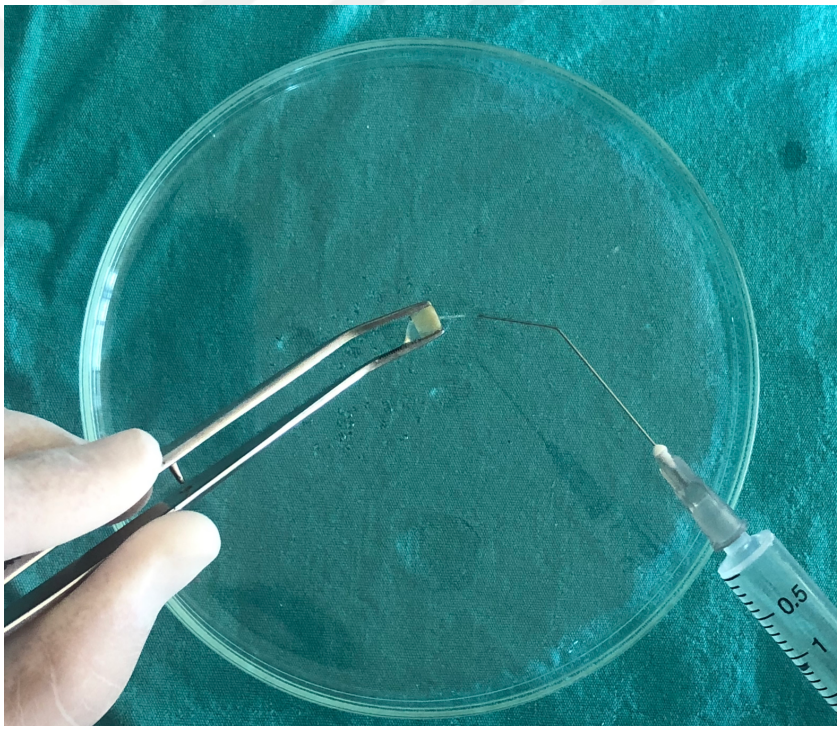
Tripsin/ AgCNP grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL tripsin enzim solüsyonu ve Grup 4'deki gibi 6 mL AgCNP solüsyonu ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

DNase 1/ NaOCl grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL DNase 1 enzim solüsyonu ve Grup 1'deki gibi 6 mL %2,5 NaOCl ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

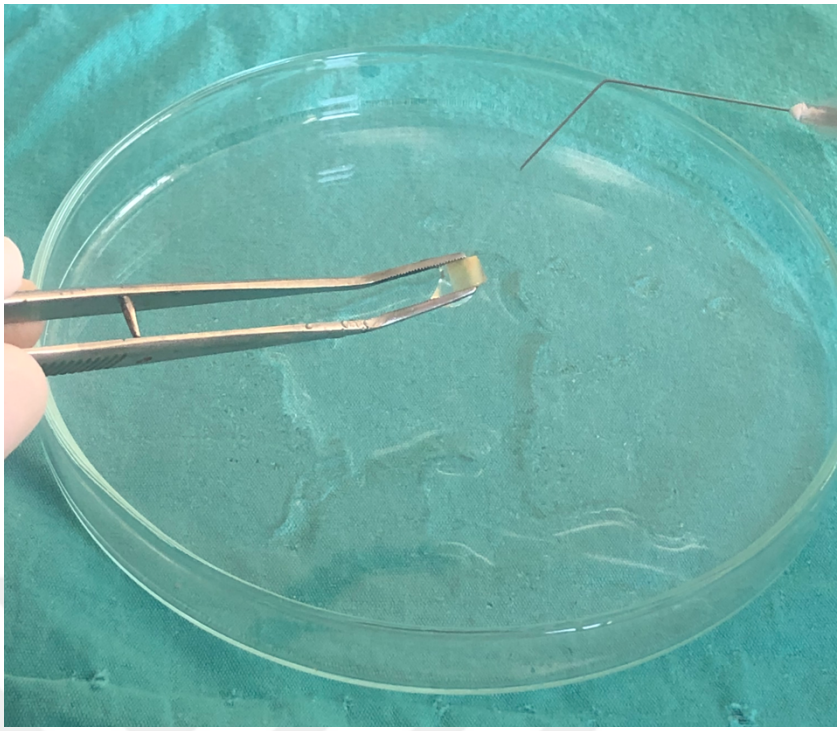
DNase 1/ CHX grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL DNase 1 enzim solüsyonu ve Grup 2'deki gibi 6 mL %2 CHX ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

DNase 1/ İrritrol grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL DNase 1 enzim solüsyonu ve Grup 3'deki gibi 6 mL irritrol ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.

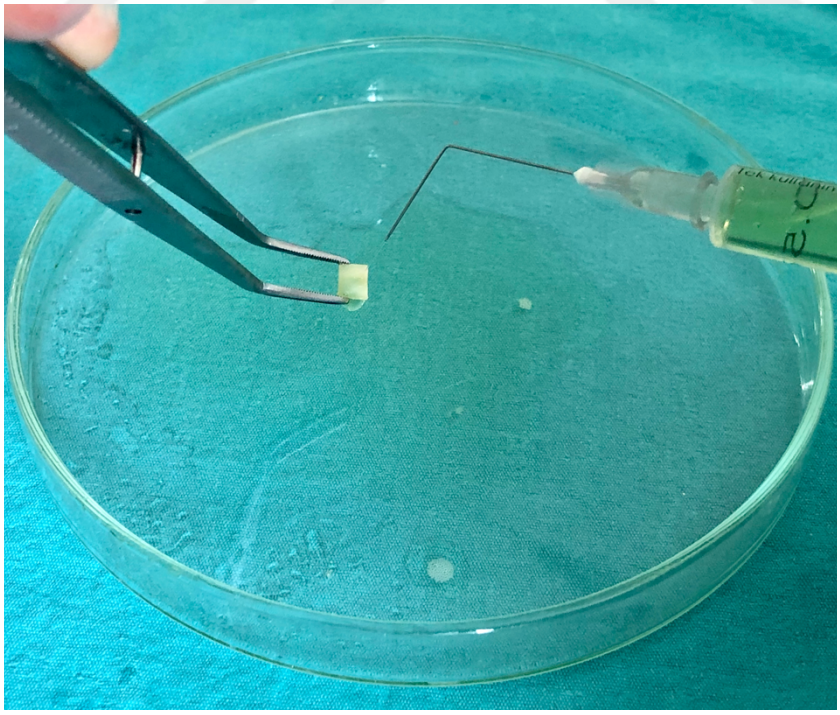
DNase 1/ AgCNP grubu; Standart irrigasyon prosedürünün ardından 6 mL DNase 1 enzim solüsyonu ve Grup 4'deki gibi 6 mL AgCNP solüsyonu ile 5'er dk irrigasyon yapıldı. Daha sonra 2 mL distile su ile irrige edildi.



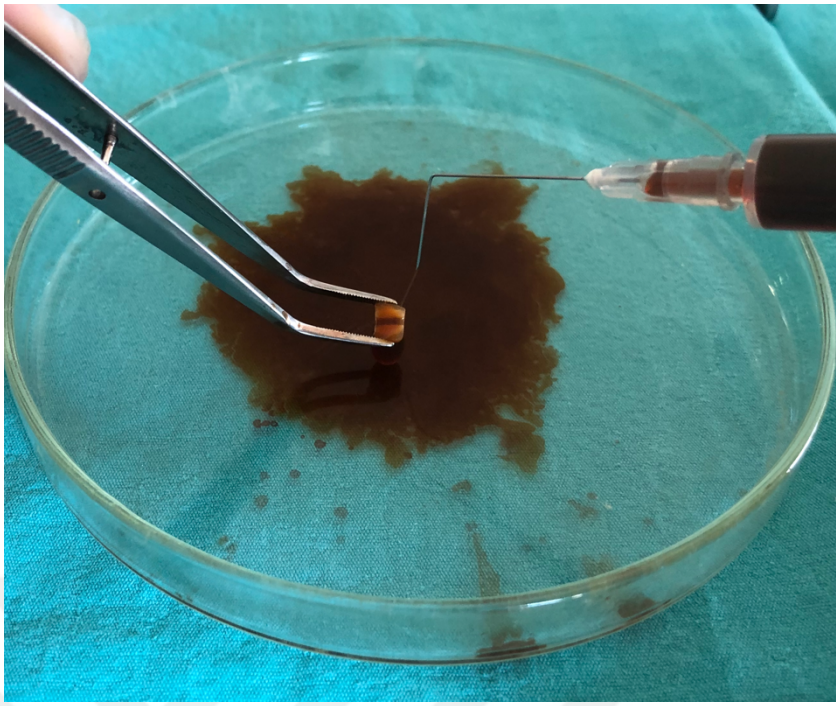
Şekil 3.13. Dentin örneğinin %2,5 NaOCl ile irrigasyonu.



Şekil 3.14. Dentin örneğinin %2 CHX ile irrigasyonu.



Şekil 3.15. Dentin örneğinin irritrol ile irrigasyonu.



Şekil 3.16. Dentin örneğinin AgCNP ile irrigasyonu.

Özetle ön enzim uygulaması olmayan gruplarda 6 mL test edilecek final irrigasyon solüsyonu ile 5 dk irrigasyon yapıldı. Ön enzim uygulaması olan gruplarda geleneksel iğne irrigasyon yöntemiyle 6 mL enzim solüsyonu ile 5 dk süreyle irrigasyon yapıldı. Ardından dentin blokları 2 mL distile su ile yıkandı. Daha sonra 6 mL test edilecek final irrigasyon solüsyonu ile 5 dk irrigasyon yapıldı. Negatif kontrol grubunda ise; örneklerin her birine 2 mL distile su ile irrigasyon yapıldı.

Bütün gruplarda irrigasyon prosedürlerinin ardından canlılık boyası ile final irrigasyon solüsyonlarının etkileşimi önlemek için örnekler %5'lik sodyum tiyosülfat solüsyonu ile 5 dk boyunca inaktive edildi. Daha sonra numuneler %0,9'luk salin ile durulandı.

3.7. Örneklerin Boyanması ve KLTM Analizi

Boyama için sırasıyla yeşil ve kırmızı floresan nükleik asit boyasından (SYTO 9 ve propidium iyodür) oluşan floresan LIVE/ DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti (Molecular Probes, Eugene, OR, ABD) (lot: 1919628) kullandı (Şekil 3.17). Üretici boyama sonrası sağlam hücre zarlarına sahip bakterilerin yeşil, hasarlı membranlara sahip olan bakterilerin ise kırmızı renk olacağını rapor etmiştir. Üretici

talimatlarına göre hazırlanan boya her bir örneğe mikropipet ucu ile 5µl uygulandı ve boyaların bakterilere penetrasyonu için karanlık ortamda 15 dk bekletildi. Örnekler 1 dakika PBS ile durulandı.

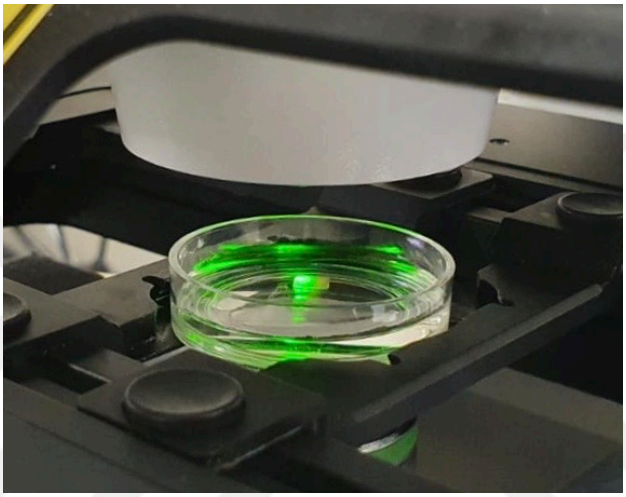


Şekil 3.17. Floresan LIVE/ DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti.

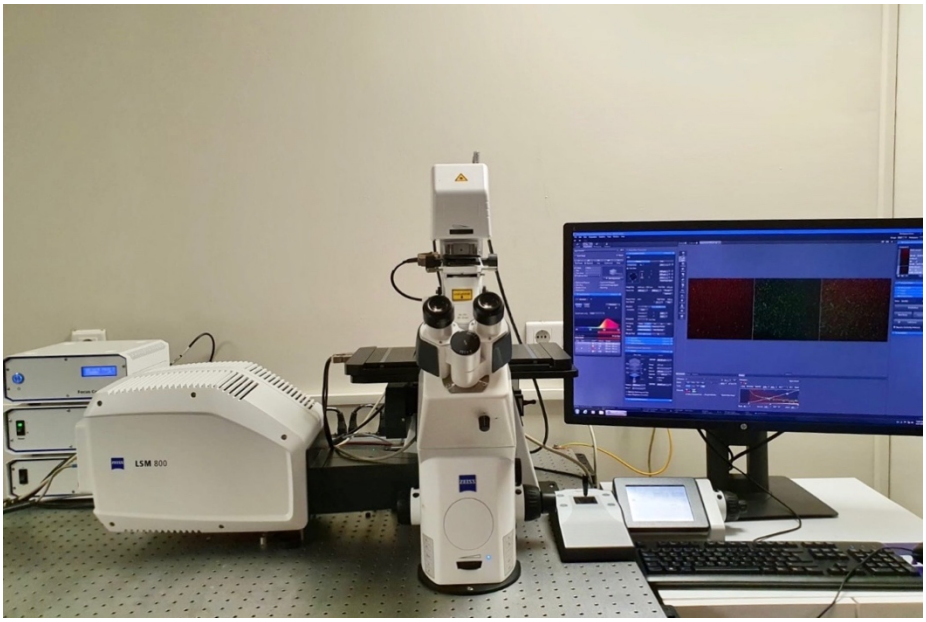
Örnekler boyama işleminin ardından kanal boşluğu aşağı bakacak şekilde KLTM objektifindeki cam tabanlı petriye (Ibidi 81218-200, Münih, Almanya) yerleştirildi ve 1 mL PBS (pH 7.4) içerisinde görüntülendi (Şekil 3.18). Görüntüleme işlemi invert konfokal mikroskobu (Carl Zeiss LSM 800, Jena, Almanya) (Şekil 3.19) ile boyalara uygun dalga boyundaki eksitasyon lazerleri (SYTO 9- 488nm ve propidium iyodür- 543nm) ile yapıldı. Her bir örnek yüzeyinde rastgele seçilen 5 farklı alanda x20/0.8 NA kuru objektif ile 2 farklı kanalda (SYTO 9-yeşil ve PI-kırmızı), 1024x1024 piksel lateral (xy) çözünürlükte, 1 µm z-düzlemi adımlarıyla 3 boyutlu (z-stacks) olarak görüntüler alındı (Şekil 3.20). Elde edilen 7-20 dilim (tarama alanı) z-stack görüntüler ZEN lite yazılımı (ZEISS, Oberkochen, Almanya) ile "*maximum intensity projection*" metodu ile tek düzlemde birleştirildi. Böylece 7-20 tarama alanını temsil eden iki boyutlu görüntüler alındı. Her grupta görüntü analizi için 12 dentin bloğu kullanıldı. Her bir örnekteki hem canlı (yeşil florasans) hem de ölü (kırmızı florasans) bakterilerin yoğunluğu ImageJ 1.8 yazılımı (Wayne Rasband, NIH, ABD)

kullanılarak otomatik olarak hesaplandı. Ardından hesaplanan değerler ile ölü bakteri yüzdeleri aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır (20).

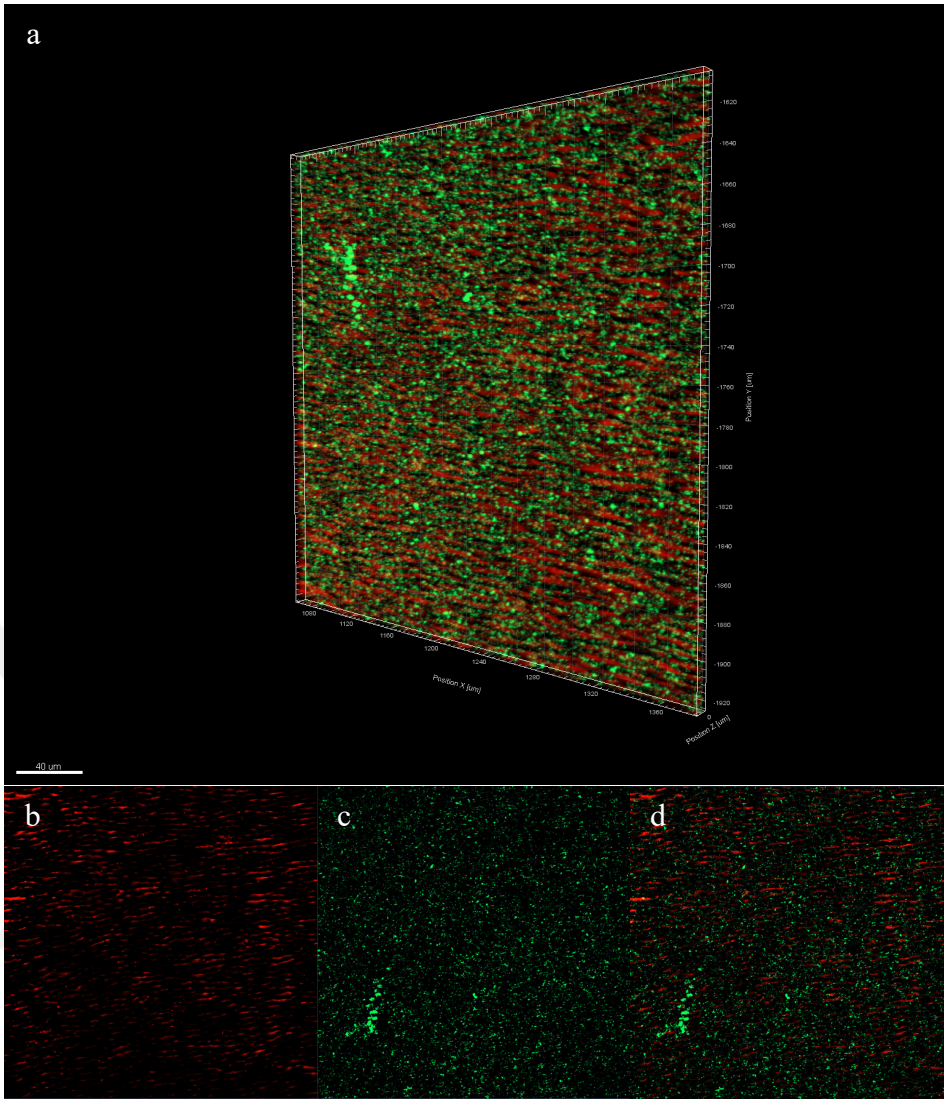
$$\text{Ölü Bakteri Yüzdesi} = \frac{\text{Kırmızı floresan alanı}}{\text{Kırmızı floresan alanı} + \text{Yeşil floresan alanı}} \text{ x } 100$$



Şekil 3.18. Dentin bloğunun kanal boşluğuna odaklanmış lazer ışını.



Şekil 3.19. Çalışmada kullanılan KLTM.



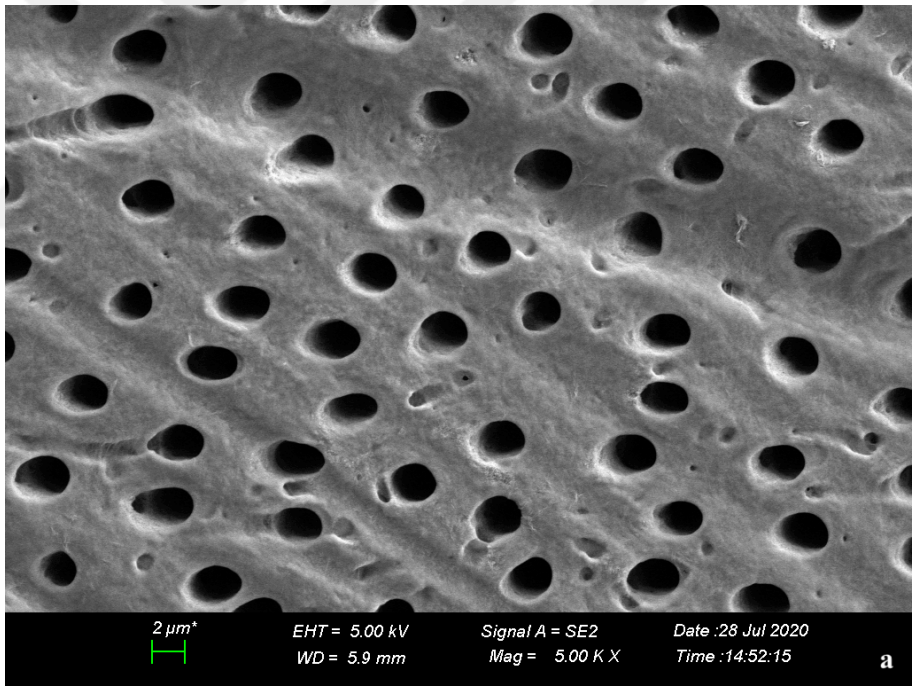
Şekil 3.20. KLTM görüntüleri; a) Kırmızı (ölü bakteriler) ve yeşil (canlı bakteriler) floresan çakıştırılmış 3D görüntü, b) Kırmızı floresan 2D görüntü, c) Yeşil floresan 2D görüntü, d) b ve c görüntülerinin çakıştırılmış görüntüsü.

3.8. İstatistiksel Analiz

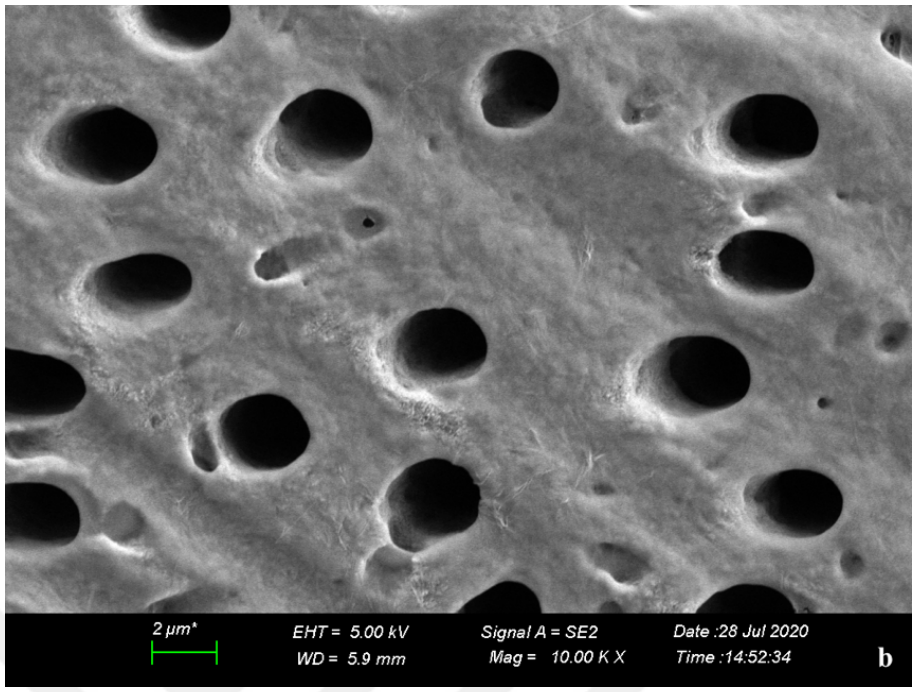
Elde edilen verilerin normalliğini doğrulamak için *Shapiro-Wilk* testi uygulandı. Veriler normal dağılım gösterdiği için test edilen final irrigasyon protokolleri uygulamaları sonrası KLTM görüntülemesi ile elde edilen görüntüler üzerinde hesaplanan ölü bakteri yüzdelerini karşılaştırmak için *One-Way Anova* ve *Post-Hoc Tukey* testleri kullanıldı. $p<0,05$ anlamlılık seviyesinde SPSS yazılımı 17 versiyonu (IBM, Armonk, NY, ABD) kullanıldı.

4. BULGULAR

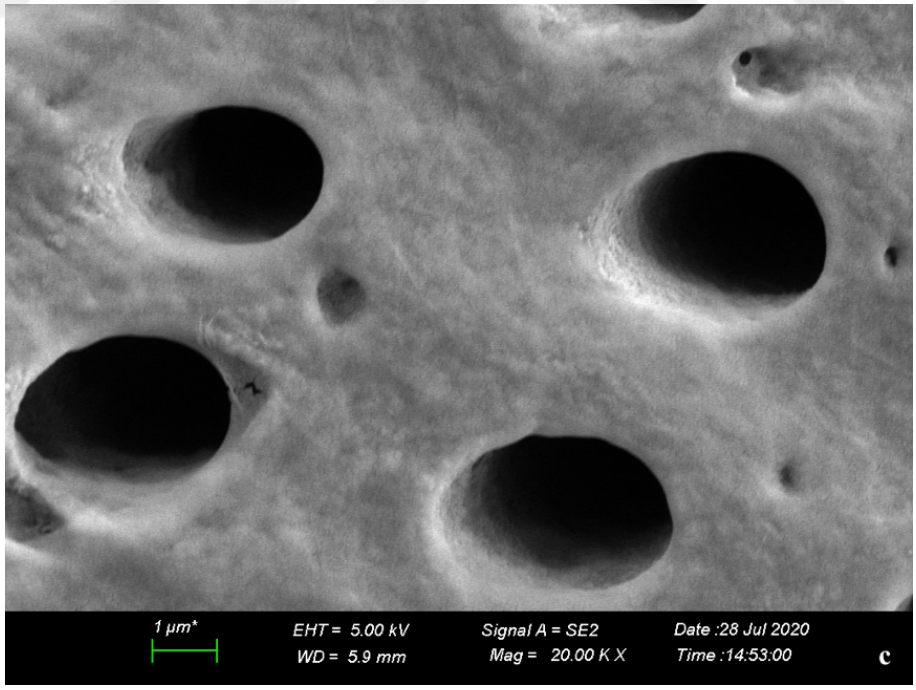
Mevcut çalışmada bakteriyel kontaminasyondan önce gerçekleştirilen sterilizasyon işlemi sonrası rastgele seçilen negatif kontrol grubuna ait örneklerin dentin tübüllerinde herhangi bir mikrobiyal kontaminasyonun olmadığı SEM ile elde edilen görüntülerde doğrulandı (Şekil 4.1a, 1b, 1c). 21 günlük *E. faecalis* inkübasyon süresinden sonra pozitif kontrol grubuna ait örnekler arasından rastgele seçilen 4 örnekte biyofilm oluşumu SEM görüntüleri ile doğrulandı. SEM mikrograflarında dentin yüzeyinde kalınlığı yer yer değişen bakteri toplulukları içeren biyofilm formasyonu oluşumu izlendi (Şekil 4.2a, 2b, 2c).



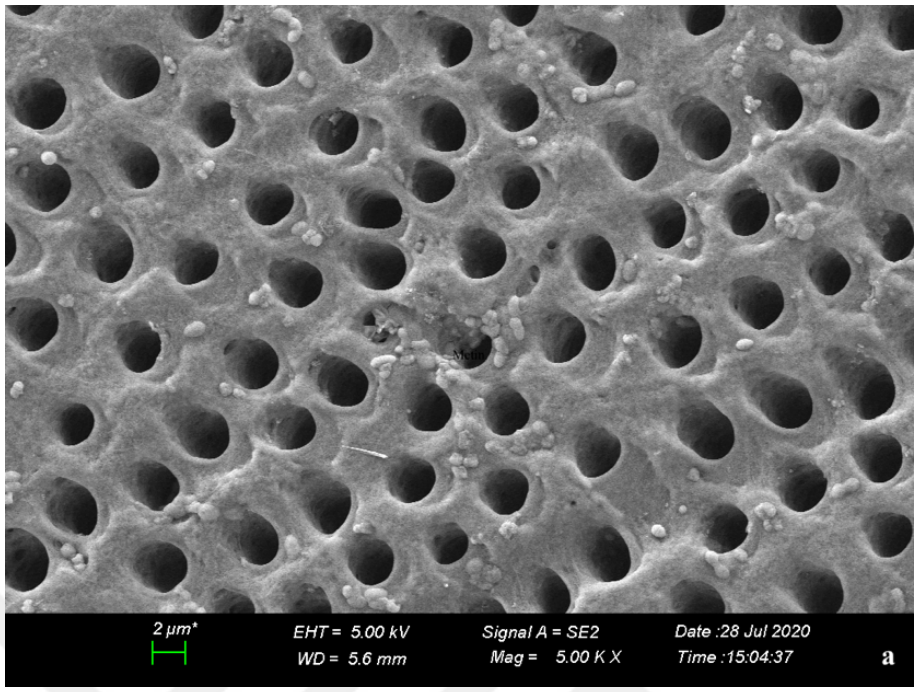
Şekil 4.1a. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 5000X.



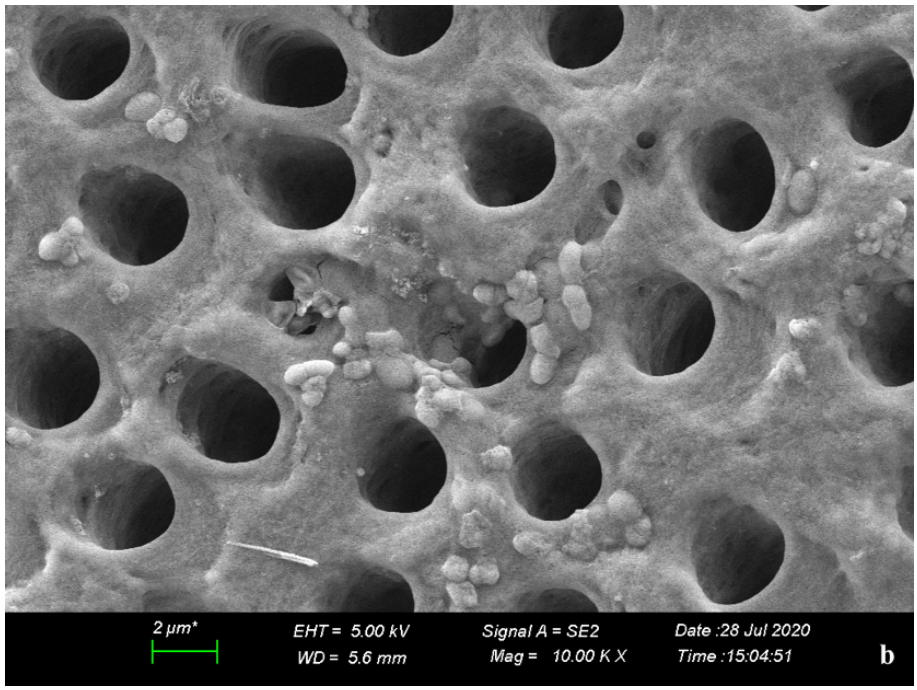
Şekil 4.1b. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 10000X.



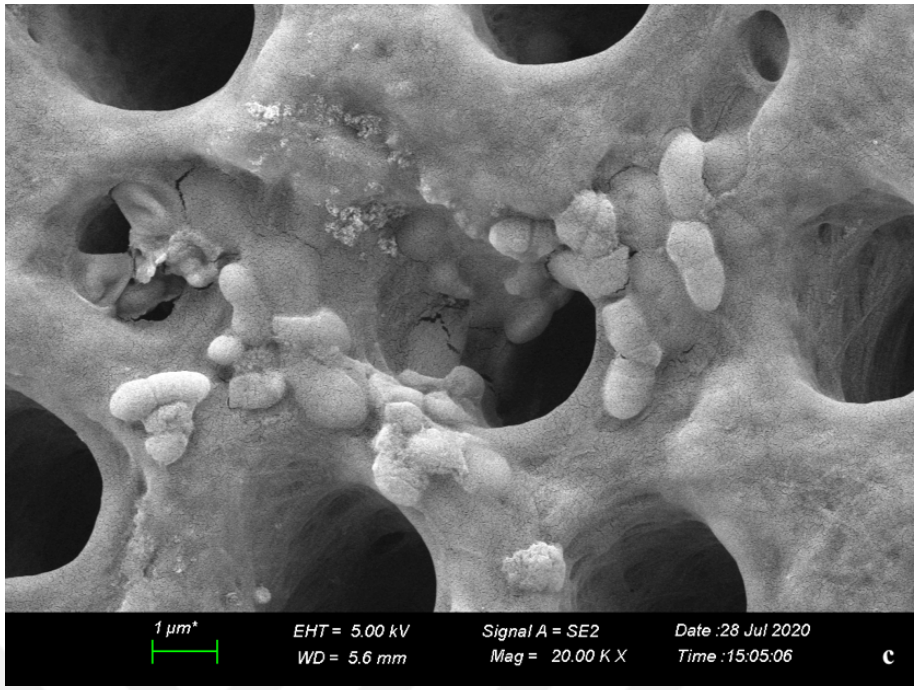
Şekil 4.1c. Smear tabakasının uzaklaştırıldığının ve örneklerin sterilliğinin SEM ile doğrulanması; 20000X.



Şekil 4.2a. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 5000X.

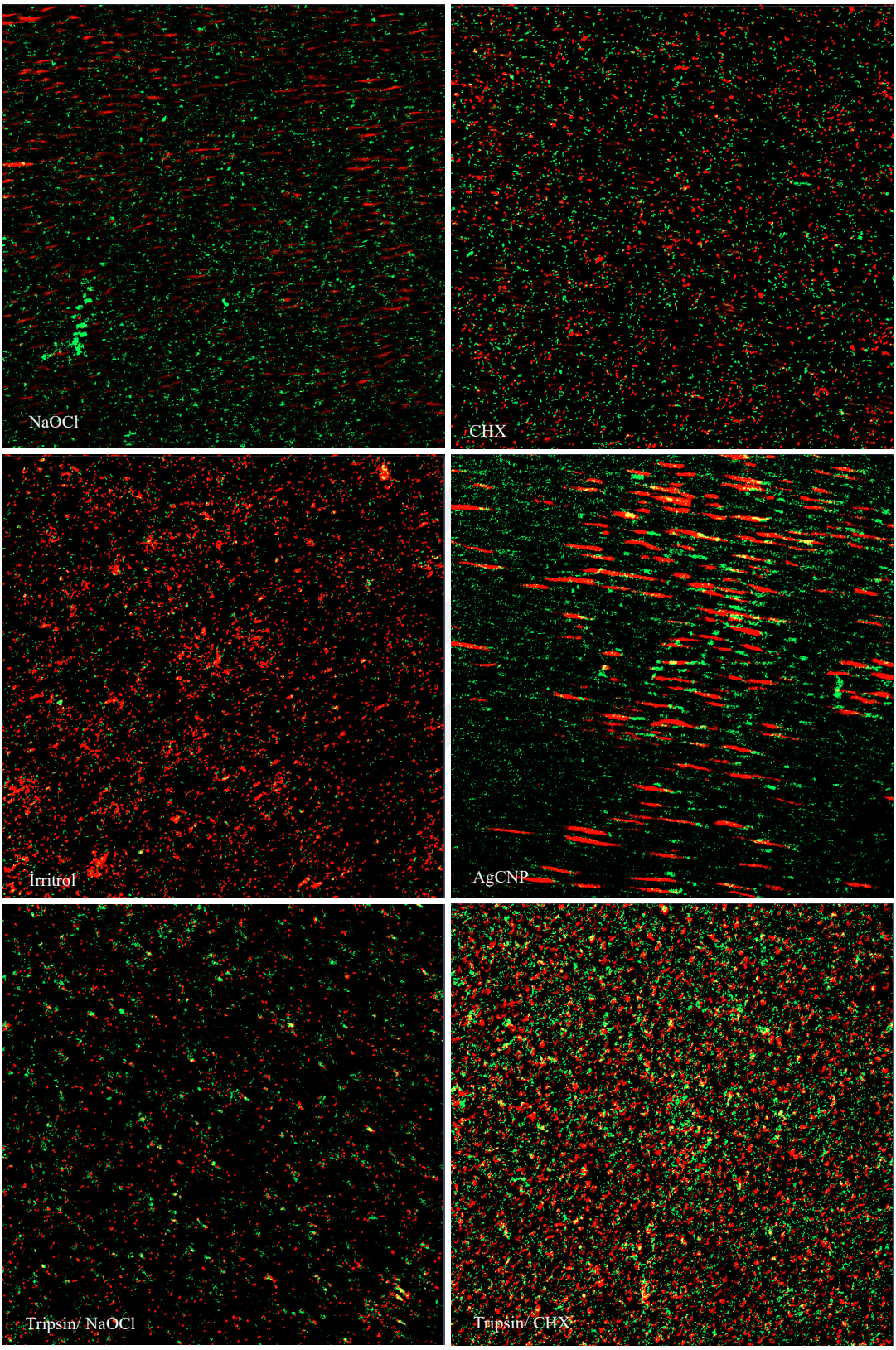


Şekil 4.2b. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 10000X.

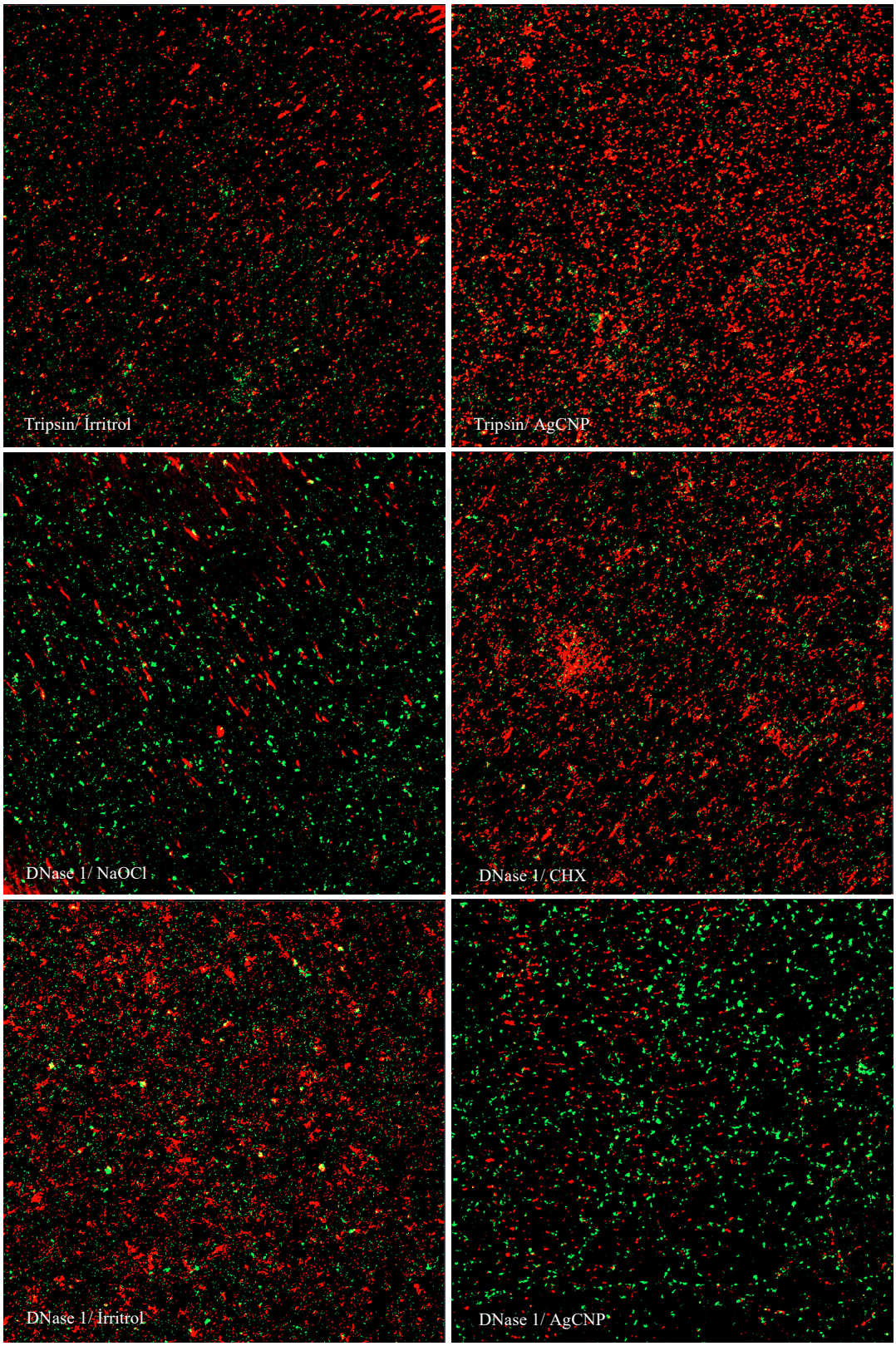


Şekil 4.2c. Dentin yüzeyini kaplayan *E. faecalis* biyofilmin SEM mikrografisi; 20000X.

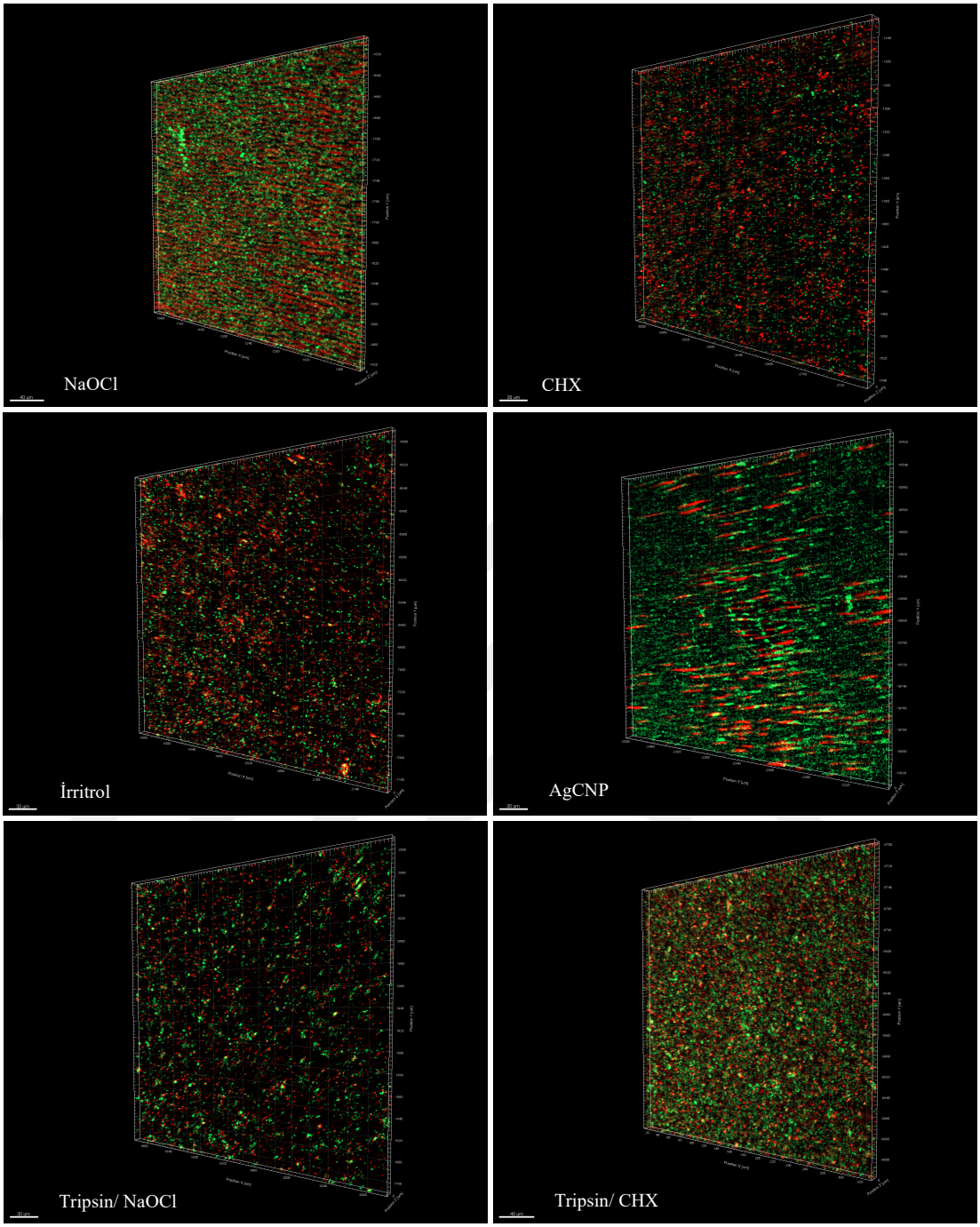
Mevcut çalışma sonucunda test edilen final irrigasyon protokollerinden hiçbirinin kök kanalındaki *E. faecalis* biyofilmini %100 elimine edemediği tespit edildi. Test edilen final irrigasyon protokollerine ait iki boyutlu (2D) ve üç boyutlu (3D) KLTM görüntüleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'de sunulmuştur. Test edilen final irrigasyon protokollerine ait KLTM görüntülemesi sonucu elde edilen görüntüler üzerinde hesaplanan toplam bakteri yüzdesine oranla ölü bakteri yüzdelerinin ortalama (Ort) ve standart sapma değerleri (SS) Tablo 4.1 ve Şekil 4.5'de sunulmuştur. Test edilen final irrigasyon protokolleri sonrasında dentin bloklarındaki *E. faecalis* biyofilmlerinin KLTM görüntülemesi sonucu elde edilen görüntüler üzerinde hesaplanan ölü bakteri yüzdesi açısından gruplar arasında anlamlı farklılık belirlendi ($P<0,05$).



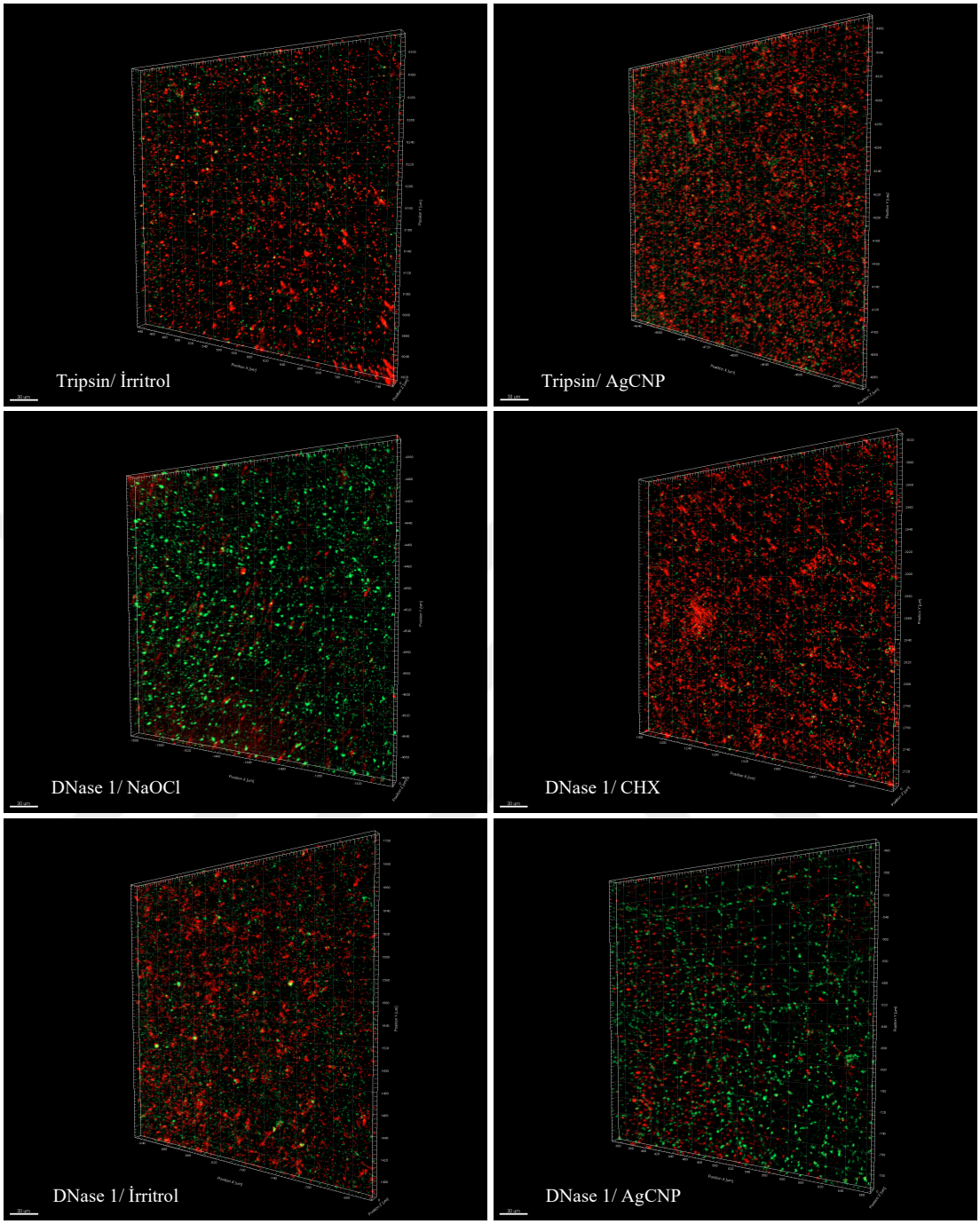
Şekil 4.3. Gruplara ait 2D KLTM görüntüleri.



Şekil 4.3. (Devam) Gruplara ait 2D KLTM görüntüleri.



Şekil 4.4. Gruplara ait 3D KLTM görüntüleri.

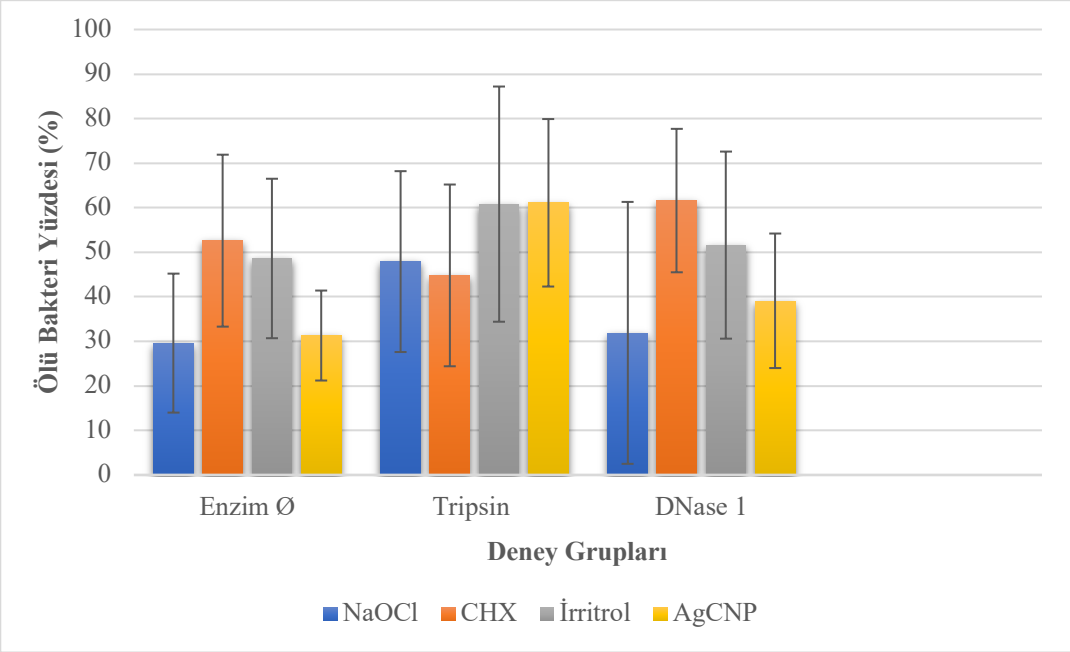


Şekil 4.4. (Devam) Gruplara ait 3D KLTM görüntüleri.

Tablo 4.1. Test gruplarına ait ölü bakteri yüzdesi ortalamaları ve standart sapma değerleri.

	NaOCl (Ort ± SS)	**CHX** (Ort ± SS)	**İrritrol** (Ort ± SS)	**AgCNP** (Ort ± SS)
Enzim Ø	29,6± 15,6^{Aa}	52,6± 19,3^{Ba}	48,6± 17,9^{ABa}	31,3± 10,1^{ABa}
Tripsin	47,9± 20,3^{Aa}	44,8± 20,4^{Aa}	60,8± 26,4^{Aa}	61,1± 18,8^{Ab}
DNase 1	31,9± 29,4^{Aa}	61,6± 16,1^{Ba}	51,6± 21^{ABa}	39,1± 15,1^{ABa}

*Satırlar arasındaki anlamlı farklılıklar üst karakterlerdeki A, B, C, sutunlar arasındaki anlamlı farklılıklar ise üst karakterlerdeki a, b, c ile belirtilmiştir.

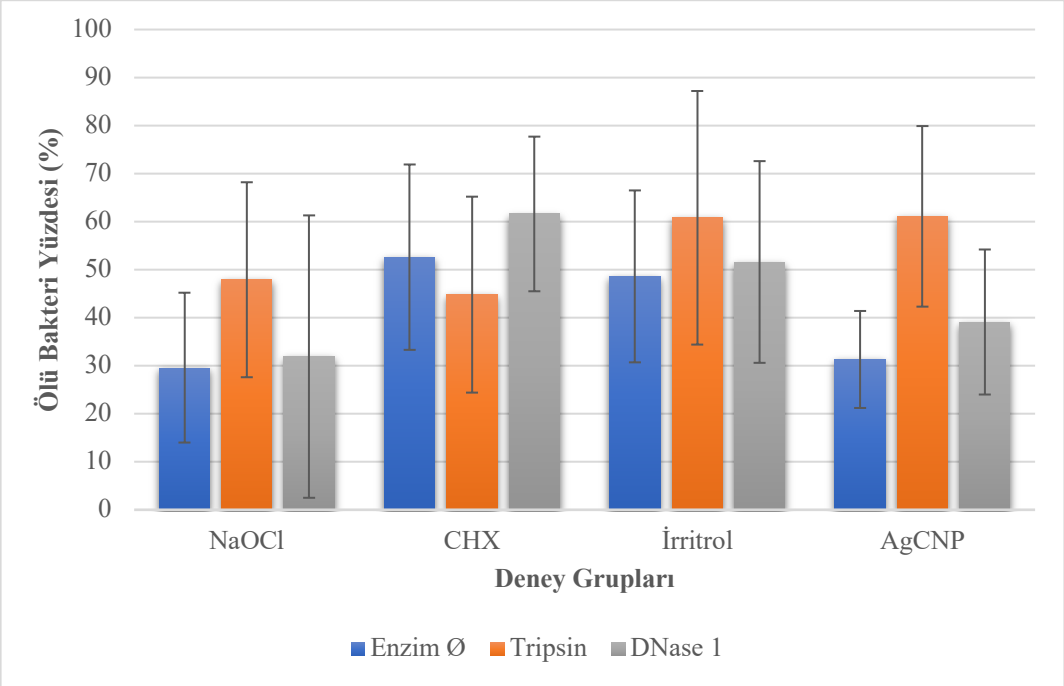


Şekil 4.5. Gruplar arası ölü bakteri yüzdesi ortalamalarını ve stardart sapmalarını gösteren grafik.

Ön enzim uygulaması olmayan gruplarda final irrigasyon solüsyonu olarak CHX'de NaOCl'ye kıyasla daha fazla ölü bakteri yüzdesi elde edildi ($p<0,05$) ve diğer final irrigasyon solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktu ($p>0,05$). Ön enzim olarak tripsin uygulanan gruplarda ise gruplar arasında istatistiksel olarak fark bulunmadı ($p>0,05$). Ön enzim olarak DNase 1 uygulanan gruplarda ise CHX'de,

NaOCl'ye göre daha fazla ölü bakteri yüzdesi izlendi ($p<0,05$) ve diğer final irrigasyon solüsyonları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark izlenmedi ($p>0,05$).

NaOCl, CHX ve irritrol'ün yer aldığı bütün gruplarda ön enzim uygulanıp uygulanmaması istatistiksel bir fark oluşturmadı ($p>0,05$). Yalnızca AgCNP'nin yer aldığı gruplardan tripsin ile ön enzim uygulaması olan grupta diğer final irrigasyon solüsyonlarına göre daha fazla ölü bakteri yüzdesi izlendi ($p<0,05$) (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. Grupiçi ölü bakteri yüzdesi ortalamalarını ve stardat sapmalarını gösteren grafik.

5. TARTIŞMA

Mevcut çalışmada final irrigasyon solüsyonu olarak NaOCl, CHX, İrritrol, AgCNP'ün tek başına ve DNase 1 ve tripsin enzimleri ile kombine kullanımının *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin KLTM ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmamızın sonucunda test edilen final irrigasyon protokollerinin *E. faecalis* biyofilmleri üzerindeki antimikrobiyal etkinlikleri arasında fark bulunduğu için sıfır hipotez reddedilmiştir.

Başarılı bir endodontik tedavi için kök kanal yüzeyindeki biyofilmin yok edilmesi önemli bir işlem basamağıdır. Bu durum enfekte olmuş pulpa dokusunun mekanik olarak çıkarılmasını, kanal duvarlarının ve dentin tübüllerinin dezenfeksiyonunu ve kök kanalının NaOCl gibi antiseptiklerle irrigasyonun ardından yeniden enfeksiyonu önlemek için kök kanalının tamamen kapatılmasını gerektirir (36). Kök kanalındaki mikrobiyal biyofilmler endodontik tedavide kullanılan dezenfektan maddelere karşı oldukça dirençlidir. Ayrıca kök kanal anatomisinin karmaşık ve öngörülemez doğası, çok türlü biyofilmlerin ve mikrobiyal biyokütlelerin varlığı kök kanalının dezenfeksiyonunundaki zorluğu artırmaktadır (35). Bu nedenle pulpal ve periapikal hastalıkların başlangıcında ve gelişiminde büyük rol oynayan mikroorganizmaların uzaklaştırılması amacıyla endodontide ideal irrigasyon protokolü arayışı devam etmektedir.

Son yıllarda Enterokoklar β-laktam penisilin, amoksisilin ve klindamisin içeren antibiyotik tedavilerinden sonra çoklu antimikrobiyal ilaç direncinin gelişmesi nedeniyle tıpın diğer alanlarında olduğu gibi endodontide de artan bir şekilde ilgi görmüştür (276). *E. faecalis* primer endodontik enfeksiyonlardan kalıcı periradiküler enfeksiyonlara kadar değişen farklı periradiküler hastalık formları ile ilişkilendirilmiş olan patojenik bir mikroorganizmadır (277). *E. faecalis* litik enzimler, feromonlar, agregasyon maddeleri, sitolizin ve lipoteikoik asit gibi bir dizi virülans faktörüne sahiptir (278). Bu virülans faktörleri *E. faecalis*'in endodontide kullanılan irrigasyon solüsyonlarına ve kanal içi medikamanlar gibi antimikrobiyal ajanlara direnerek düşük pH ve yüksek sıcaklık gibi çok zorlu ortamlarda bile hayatta kalmalarını sağlamaktadır. Ayrıca *E. faecalis,* lenfositlerin etkisini baskılama yeteneğine sahiptir

ve bu nedenle de endodontik başarısızlığa neden olabilmektedir (279). Bununla birlikte *E. faecalis*'in serin proteaz, jelatinaz ve kollajen bağlayıcı proteine (Ace) sahip olması dentine bağlanma ve yapışma yeteneği sağlar (280). Tüm bu faktörlerin yanında *E. faecalis*'in en önemli virulans faktörü, bakteri kolonisinin planktonik bakterilere kıyasla antikorlara, fagositoza ve antimikrobiyal ajanlara 1000 kat daha dirençli hale gelmesini sağlayarak bozulmasını önleyen bir biyofilm oluşturma kabiliyetidir (13). *E. faecalis* tarafından oluşturulan sert bir hücre dışı polimerik matriks içeren biyofilm yapısı antibakteriyel ajanlara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür (1, 281). Bununla birlikte Seneviratne ve ark. (16) ATCC 29212 suşunun CFU sayımlarının, biyofilm gelişiminin ve mimarisinin klinik bir izolata benzer olduğunu bildirmiştir. Swimberghe ve ark. (72) tarafından endodontik literatürde tanımlanan biyofilm model sistemlerinin incelendiği bir çalışmada literatürdeki *E. faecalis* ile yapılan çalışmaların yarısında ATCC 29212 suşunun kullanıldığı rapor edilmiştir. Ayrıca literatürde birçok çalışmada çok türlü biyofilmlerin tek türlü biyofilmlere kıyasla antimikrobiyal uygulamalara tedaviye karşı daha fazla direnç gösterdiği bildirilmiştir (282-284). Benzer şekilde Ozok ve ark. (285) çift tür biyofilmlerin, tek tür biyofilmlere kıyasla NaOCl tedavisine karşı daha dirençli olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte çok türlü biyofilmlerdeki karmaşıklık deneysel çalışmalarda bir dizi zorluğu da beraberinde getirmektedir. Karışık tür biyofilmin kültürlenmesi daha fazla başlangıç kültürü, daha fazla ortam türü ve daha fazla işlem adımı gerektirir. Bu nedenle çok tür biyofilm içeren deney modeli oluşturmak genellikle daha zaman alıcı ve maliyetli bir işlemdir. Ayrıca çok türlü deney modeli sisteminin oluşturulması için karmaşık bir sürece ihtiyaç duyulması deneyin tekrarlanabilirliğini de azaltmaktadır (72). Bu nedenlerle mevcut çalışmada tek türlü deney modeli üzerinde gerçekleştirildi. Dentin örneklerinin kontaminasyonunda tüm bu faktörler göz önünde bulundurularak *E. faecalis* ve ATCC 29212 suşu kullanıldı.

Swimberghe ve ark. (72) endodontik literatürde tanımlanan laboratuvar temelli kök kanal biyofilm modellerini inceledikleri bir çalışmada *E. faecalis*'in en sık kullanılan test bakterisi (tüm çalışmaların %79'unda, tek tür çalışmalarının % 92'sinde) olduğunu ve insan dentinininde en sık kullanılan substrat olduğunu (çalışmaların %88'inde) rapor edilmiştir. Bununla birlikte in vitro şartlarda gerçekleştirilen mikrobiyolojik temelli çalışmalarda biyofilm oluşturmak için kullanılan subratın da

önemli olduğu bildirilmiştir. Literatürde substrat olarak insan dentini yaygın olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte endodontide biyofilm substratı olarak sığır dentini ve polimetilmetakrilat, metakrilat, polietilen glikol, modifiye polidimetil siloksan gibi sentetik materyaller de kullanılmıştır (286-288). Fakat substrat olarak biyolojik olmayan malzemeler kullanıldığında yapı ve nitelik aynı olacağı için standardizasyonun daha iyi sağlanacağı rapor edilmiştir. Bununla birlikte mikroorganizmaların yüzeye tutunmasında sentetik ve doğal yüzeylerde farklılıklar olduğu, dentinin kendine özgü organik-inorganik yapısının irrigasyon solüsyonları karşısında tamponlayabilme özelliği gösterdiği bildirilmiştir. Bu nedenle sentetik malzemelerin klinik koşulları tam olarak taklit edemediği rapor edilmiştir (72). Tüm bu bilgiler göz önüne alınarak mevcut çalışmada substrat olarak insanlara ait dişlerden elde edilen dentin blokları kullanılmıştır.

Literatürde in vitro ortam şartlarında gerçekleştirilen mikrobiyolojik temelli çalışmalarda biyofilmin olgunlaşma aşamasının önemli bir faktör olduğu bildirilmiştir. Önceki çalışmalarda *E. faecalis* türünün biyofilm oluşumu için farklı inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyduğu rapor edilmiştir. Du ve ark. (289) genç biyofilmlerdeki bakterilerin daha az EPS matrikse sahip olması nedeniyle antimikrobiyal ilaçlara karşı daha duyarlı olduğunu bildirmiştir. Stojicic ve ark. (92) farklı dezenfekte edici ajanların polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki etkisini araştırdıkları çalışmanın sonucunda 3 haftalık inkübasyonun ardından biyofilmdeki bakterilerinin dezenfekte edici ajanlara karşı daha az duyarlı olduğunu bildirmiştir. Benzer şekilde Shen ve ark. (90, 290) ve Wang ve ark. (291) tarafından gerçekleştirilen çalışmalarda 3 haftalık olgun biyofilmlerin daha genç biyofilmlere göre antimikrobiyal tedavilere karşı daha dirençli olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte Swimberghe ve ark. (72) mikrobiyolojik temelli in vitro çalışmalarda bakterilerin inkübasyon sürelerinin (1- 70 gün arasında) önemli ölçüde farklılık gösterdiği bildirmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen verilere göre, NaOCl'nin test edilen tüm konsantrasyonlarda *E. faecalis* biyofilmlerine karşı antibakteriyel aktivitesinin, biyofilm yaşı arttıkça azaldığı bildirilmiştir (72). Bu nedenlerle mevcut çalışmada 3 haftalık inkübasyon süresi ile *E. faecalis* inokülasyonu gerçekleştirildi ve inkübasyonun ardından dentin blokları üzerinde biyofilm formasyonunun oluştuğu SEM analizi ile doğrulandı.

Biyofilmlerin EPS matriksi proteinler, karbonhidratlar ve nükleik asitlerden oluşmaktadır (292). Bakteriyel biyofilmde EPS varlığının, bağışıklık sistemi ve antibakteriyel ajanlara karşı bakteriyel koloni direncini artırdığı düşünülmüştür. EPS matriksi biyofilm için mekanik stabilite ve yapışkanlık, birbirine bağlı bir 3D polimer ağı sağlamaktadır. Bununla birlikte hücre dışı enzimleri hücrelere yakın tutarak, çözünmüş, koloidal ve katı biyopolimerleri metabolize etmelerini sağlayan harici bir sindirim sistemi görevi görür (293). Ayrıca EPS matriksi bakterileri kurumaya, oksitleyici veya yüklü biyositlere, bazı antibiyotiklere, metalik katyonlara, ultraviyole radyasyona ve konakçı bağışıklık savunmalarına karşı korur (24). Tüm bu özelliklere sahip olması nedeniyle *E. faecalis* endodontide kullanılan antimikrobiyal prosedürlere karşı direnç göstermektedir. Bu nedenle endodontik tedavide uygulanan antimikrobiyal uygulamalara direnç sağlayan bu mikrobiyal yapıyı elimine edebilmek adına yeni tedavi stratejilerinin arayışı devam etmektedir.

Son yıllarda *E. faecalis* biyofilmlerinin matriksinde yer alan dekstran ve hücre dışı DNA (eDNA)'nın bakteri topluluklarının gelişiminde önemli rol oynadığı bildirilmiştir (55). eDNA, *E. faecalis* biyofilmlerinin hücre dışı matriksinde önemli bir bileşendir (52, 53). Bununla birlikte eDNA'nın endodontik patojen *E. faecalis*'in biyofilm stabilitesi için önemli olduğu da bildirilmiştir. Başarısız endodontik tedavi ile ilişkilendirilen *E. faecalis*'in biyofilm oluşturmasında eDNA üretiminin oldukça belirleyici bir faktör olduğu rapor edilmiştir (294). *E. faecalis* biyofilmlerinin özellikle gelişimin erken aşamalarında DNase'a duyarlılığı daha önce bildirilmiştir (53, 295). Önceki çalışmalarda biyofilm yapısını stabilize etmek için eDNA'nın gerekli olduğunu ve ekzojen DNase'ların eklenmesinin biyofilm büyümesini kontrol etmek için güçlü bir strateji kanıtlayabildiği gösterilmiştir (269, 270). Benzer şekilde Tetz ve ark. (267) tarafından DNase 1 varlığında oluşan *Escherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* biyofilmlerinde eDNA'nın hücreden ayrılmasının, antibiyotik penetrasyonunun artmasına, biyofilm biyokütlesi ve CFU sayımlarında azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca DNase 1 varlığı ile oluşan biyofilmlerde eDNA'nın yok edilmesinin çevresel faktörlere karşı toleransı azalmış, değişmiş bir mikrobiyal topluluğun oluşumuna yol açtığı rapor edilmiştir (267). Bu nedenle Li ve ark. (24) tarafından *E. faecalis* büyüme ortamına eklenen iki EPS parçalayıcı enzim olan dekstranaz ve DNase 1'in biyofilm üzerindeki etkisini KLTM ve CFU sayma yöntemi

ile değerlendirdikleri çalışmada, dekstranaz ve DNase 1'in *E. faecalis* oluşumunu inhibe ettiği, *E. faecalis*'in dentine olan adezyonu azalttığı ve biyofilmin %2 CHX'e olan duyarlılığını arttırdığı bildirilmiştir. İlave olarak dekstran ve eDNA'nın *E. faecalis* biyofilmlerinde bakteriyel yapışmayı teşvik ederek biyofilm oluşumuna doğrudan katıldığı rapor edilmiştir (24). Niazi ve ark. (26) tarafından proteolitik enzimlerin, bakteriler tarafından salgılanan proteinlerden üretilen hücre dışı matriksi de bozabileceği, böylece biyofilmin kohezyonunu azaltabileceği bildirilmiştir. Ayrıca proteazın bakteriyel hücre duvarlarının ve zarlarının protein bileşenlerini parçalayarak, hücresel hasara ve sonuçta hücre lizizine ve ölümüne neden olabileceği rapor edilmiştir (26). Son çalışmalarda bu yüzey yapılarının proteaz duyarlı olduğu tespit edildiğinden, hücre yüzeyi proteinlerinin biyofilm oluşumu sırasında birlikte toplanma faktörleri olarak işlev görebileceği bildirilmiştir (296). Tüm bu bilgiler ışığında mevcut çalışmada enzimlerin biyofilmin bozulmasına yardımcı olabileceği ve böylece tek kalan bakteri hücrelerininin diğer güçlü antimikrobiyaller tarafından öldürülmeye karşı daha duyarlı hale getirebileceği (antibakteriyel potansiyellerini arttırabileceği) düşünüldüğünden mevcut çalışmada final irrigasyon solüsyonları öncesi proteolitik bir enzim olan tripsin ve EPS parçalayıcı enzim olan DNase 1 ile ön enzim uygulaması yapılmıştır. Literatürde tripsin ve DNase 1, biyofilmin oluşturulması esnasında ve/ veya sonrasında ve farklı derişimlerde kullanılmıştır (22-26, 268, 294). Mevcut çalışmada tripsin ve DNase 1'in 100 µg/mL'lik konsantrasyonları kullanıldı ve klinik uygulamaya benzer olması açısından enzim uygulaması biyofilm oluşturulduktan sonra deney modeline eklendi.

Günümüzde kök kanal dezenfeksiyonu kök kanallarının mekanik olarak temizlenmesini ve antimikrobiyal potansiyele sahip solüsyonlarının kullanılmasını içerir. Pulpal ve periapikal hastalıkların başlangıç ve gelişiminde büyük rol oynayan mikroorganizmaların enfekte kök kanalından eliminasyonu oldukça zordur. NaOCl, antimikrobiyal etkinliği ve doku çözme kapasitesi nedeniyle endodontide en yaygın kullanılan irrigasyon solüsyonudur (123). NaOCl endodontide %0,5 ile %6 arasında değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Ancak endodontik tedavide özellikle yüksek konsantrasyonlarda NaOCl kullanılmasının doğrudan ya da apikalden taşırılması nedeniyle çevre dokularla istenmeyem teması dokuların hücresel yıkımına ve potansiyel diğer birçok ciddi komplikasyonlara neden olabilmektedir (297, 298).

NaOCl güçlü bir oksitleyici ajandır ve dokuyla doğrudan temas halinde olduğunda hızlı bir hemoliz ve ülserasyon, nötrofil göçünün inhibisyonu ile fibroblast ve endotelyal hücrelerinin yıkımı gibi ciddi hasarlara neden olabilir (299). Bu nedenlerle endodontik tedavide kullanılan antibakteriyel irrigasyon solüsyonlarının konsantrasyonun azaltılarak toksisitesinin önlenmesi ve bunun yanında antimikrobiyal özelliklerinin artılımlasın için nanopartiküller gibi yenilikçi antimikrobiyal tedavi stratejileri geliştirilmiştir (300). Nanopartiküller dış boyutları 1-100 nm olan, küçük boyutlar, geniş yüzey/ alan kütle oranı ve artan kimyasal reaktivite sunan parçacıklar olarak tanımlanmaktadır (201, 301). Nanopartikül içeren antimikrobiyal ajanlar biyofilmi bozma ve dentine bakteriyel tutunmayı önleme kabiliyetleri nedeniyle intrakanal enfeksiyonlara karşı alternatif bir antimikrobiyal uygulama olarak önerilmiştir (231, 234, 235, 302). Literatürde kimya alanında AgNP'ler sinerjistik bir etki oluşturabilmek için stabilizatör olarak kullanılan doğal bir polimer olan kitosan süspansiyonlarında sentezlenmiştir (275). Yoksan ve ark. (303) kitosan çözeltisine dağılmış gümüş nanopartiküllerin, antimikrobiyal gıda paketleme ve biyomedikal uygulamalar da dahil olmak üzere antimikrobiyal alanlarda doğrudan uygulanabileceğini bildirdi. Endodontide kök kanallarının dezenfeksiyonunda antimiktobiyal etkinliği arttırmak amacıyla farklı içeriğe ve farklı konsantrasyonlara sahip pek çok nanopartikül türevi solüsyon kullanılmaktadır. Mevcut çalışmada Bin Ahmad ve ark. (275) tarafından tarif edilen yöntem temel alınarak sentezlenen AgCNP kullanıldı. Yaptığımız literatür taramasında endodonti alanında AgCNP'in kullanımına rastlanmamıştır. Bu bilgiler ışığında mevcut çalışma ile hem tek başına hem de tripsin ve DNase 1 ile ön enzim uygulamasının ardından kullanılan AgCNP'ün ilk defa test edilmesi ile literatüre veri sağlanması amaçlandı.

Enfekte olmuş kök kanallarının tedavisinde temel amaç kanal içi mikrobiyal yükü ortadan kaldırmaktır. İdeal olarak, mikroorganizmalar ve yan ürünleri kanal sisteminden tamamen uzaklaştırılmalıdır. Bu nedenle biyofilmin giderilmesi kök kanal tedavisindeki en önemli hedeflerden biridir (304). Literatürde biyofilmin giderilip giderilmediğinin değerlendirilmesinde KLTM, SEM, moleküler yöntemler, histokimyasal yöntemler ve plak kültür metodu dahil olmak üzere farklı birçok yöntem ve teknik kullanılmıştır. Fakat bu yöntemlerin birçoğu uygulama sonrasında dentin tübüllerinde kalan ölü bakterileri canlı bakterilerden ayırt edememektedir. Plak kültür

metodu ile az sayıda yaşayan bakterilerin kültüre edilmesi, ayrıca kültür ortamda yaşaması zor olan aneorobik türlerin ve *in vitro* olarak kültüre edilemeyen oral bakterilerin tespit edilememesi gibi dezavantajların mevcut olduğu bildirilmiştir (305, 306). Ayrıca dentin örneklerinde kültür yöntemi geleneksel olarak bakteri canlılığını ve dezenfeksiyon etkinliğini değerlendirmek için kullanılsa da (79) dentin tübüllerindeki hücre canlılığının uzaysal dağılımı hakkında çok az bilgi vermektedir (6). SEM analizi ise kök kanalındaki yüzeyel biyofilmin değerlendirilmesinde görsel bilgi sunmasına rağmen biyofilmin derinliği ve bakterilerin yaşayabilirliği üzerine bilgi verememektedir (84, 307). Moleküler yöntemlerin bakteriyel yükteki azalmayı belirlemede kullanılan en hassas yöntemlerden biri olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte moleküler yöntemlerde, yaşayan ve ölen mikroorganizmaların birlikte tespit edilmesi işlem sonrası yaşayan bakterilerin kantitatif analizinde yanıltıcı sonuçlara neden olabilmektedir (305). Bununla birlikte Alves ve ark. (308) kanal içi bakteriyel azalmayı değerlendirmede polimeraz zincir reaksiyon tekniği ile plak kültür metodunun benzer sonuçlar verdiğini rapor etmiştir. Tüm bu yöntemlerin eksikliklerinin üstesinden gelmek amacıyla enfekte dentin ve dentin tübüllerindeki bakterilerin uzaysal dağılımının kantitatif analizine ve görselleştirilmesine izin veren KLTM tabanlı bir yaklaşım geliştirilmiştir (21). KLTM odak düzleminden arka plan bilgisinin ortadan kaldırılması veya azaltılmasıyla alan derinliğini kontrol etme ve böylece görüntü bozulmasını önleme ve kalın örneklerden seri optik kesitler elde etme potansiyeli ile diğer mikroskobik sistemlere göre iki farklı avantaj sunmaktadır (309). KLTM canlı ve ölü bakterilerin görselleştirilmesine yardımcı olur ve örnek yüzeyinin 10 μm altına nüfuz etme kabiliyetine sahiptir (22). Kishen ve ark. (310) canlılık boyaları ile birlikte KLTM analizinin inkübasyondan sonra dentin tübüllerinde bakteriyel biyofilm oluşumunu değerlendirmek için güvenilir bir yöntem olduğunu bildirmiştir. Bununla birlikte Del Carpio-Perochena ve ark. (94) polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki hücre canlılığını ve bakteri hacmini ölçmek için KLTM kullanmıştır. Tüm bu bilgiler değerlendirilerek mevcut çalışmada test edilen irrigasyon protokollerinin ardından antimikrobiyal etkinliği KLTM analizi ile değerlendirildi. Böylece işlemlerin ardından rezidüel olarak dentin tübüllerinde kalan bakteriyel yükün kantitatif analizi ve görselleştirilmesi sağlandı (8, 311).

Biyofilmde bulunan canlı-ölü mikroorganizmaları tespit edebilmek için yapılan KLTM çalışmalarında kullanılan yarım silindirik dentin bloklarının kalınlığı Ruiz Linares ve ark. (273) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 0,7 mm, Albuquerque ve ark. (274) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 1 mm ve Ma ve ark. (8) tarafından gerçekleştirilen çalışmada 2 mm olarak bildirilmiştir. Mevcut çalışmada uygulamalar öncesinde tarafımızca gerçekleştirilen ön çalışmada optimal görüntü 0,7 mm kalınlığındaki dentin bloklarından elde edildiği için yarım silindirik dentin bloklarının ölçüleri 4 mm x 4 mm x 0,7 mm (genişlik x uzunluk x yükseklik) olacak şekilde hazırlandı. Ayrıca kökün apikal kısmında daha fazla sklerotik dentin olduğu için yarım silindirik dentin bloklarını hazırlamak için köklerin yalnızca koronal kısımları kullanıldı. Literatürdeki birçok çalışma ile benzer şekilde mevcut çalışmada hem ölü hem de yaşayan mikroorganizmaların KLTM altında görünürlüğünün sağlanabilmesi amacıyla floresan özelliğe sahip LİVE/ DEAD BacLight bakteriyel canlılık boyası kullanıldı. Floresan LİVE/ DEAD BacLight bakteriyel canlılık boyasının kullanımının bir yüzeye tutunmuş olan bakteri hücresi miktarının ve canlılığının belirlenmesinde oldukça etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (90, 92, 290, 312, 313). Buna karşın canlılık boyasını kullanan önceki çalışmalarda SYTO 9 ve propidyum iyodür (PI) ile boyamanın her zaman canlı ve ölü popülasyonlar oluşturmadığı, ara hücresel bir durumun da gözlemlendiği rapor edilmiştir (314-316). Üretici kılavuzuna göre kısmen hasarlı bakteriyel membranlara, hücreler canlı olduğunda bile kırmızı floresan PI boyasının nüfuz edebildiği ve bu hücrelerin uygun büyüme koşullarında canlanma kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (26). Çalışmalardaki kültür yöntemi ile KLTM sonuçları arasındaki tutarsızlık bu ara hücresel durum bakterilerine atfedilebilir.

Mevcut çalışmanın sonucunda test edilen final irrigasyon protokollerinden hiçbirinin kök kanalındaki *E. faecalis* biyofilmini %100 elimine edemediği bulundu. Çalışmamızın bulgularıyla uyumlu olarak literatürde çalışmamızda test edilen irrigasyon protokollerinin ve diğer protokollerin uygulandığı birçok çalışmada da kök kanal sistemindeki mikrobiyal yükün %100 elimine edilemediği rapor edilmiştir (6-8, 22-26, 228, 268, 273, 294). Giardino ve ark. (7) KLTM metodu ile %5 NaOCl'ye etidronat tozu ve %17 EDTA ilavesinin örneklerin hiçbirinde %100 bakteriyel azalma elde edilmediğini rapor etmiştir. Benzer şekilde Ganesh ve ark. (22) %2 CHX'e ilave edilmek üzere detarjan içeren ve içermeyen EPS parçalayıcı enzim kullandıkları

çalışmada, Del Caprio Perochena ve ark. (94) NaOCl'nin farklı konsantrasyonları ve farklı pH'larını kombine olarak kullandıkları çalışmada ve Bukhari ve ark. (6) antibakteriyel aktiviteyi arttırmak için demir oksit nanopartikülleri kullandıkları örneklerin hiçbirinde %100 bakteriyel azalma elde edilmediğini bildirmiştir. Bu bulguların aksine Gomes ve ark. (100) plak kültür yöntemi ile %5,25 NaOCl, %1 CHX ve %2 CHX solüsyonlarının 30 saniyeden daha kısa bir sürede *E. faecalis* üzerinde %100 bakteriyel azalma sağlandığını bildirmişlerdir. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıkların nedeninin irrigasyon solüsyonu seçimi, irriganın konsantrasyonu, volümü, uygulama süresi gibi metadolojik farklılıkların yanında farklı değerlendirme yöntemleri kullanılmasına bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Bununla birlikte kök kanallarındaki mikrobiyal yükün tamamen elimine edilememesi irrigasyon solüsyonlarının mikroorganizmaların yerleştiği dentin tübüllerine kadar ulaşamamasına, test edilen antimikrobiyal ajanlara karşı mikroorganizmaların direnç göstermesine ve uygulanan antimikrobiyal ajanın yeterli konsantrasyonda, hacimde ve sürede uygulanmamasına bağlı olabilir.

Mevcut çalışmanın sonucunda ön enzim uygulaması olmayan gruplarda dentin bloklarına uygulanan CHX, NaOCl'ye kıyasla daha fazla ölü bakteri yüzdesi gösterdi. Benzer şekilde Menezes ve ark. (317) kültür yönteminde %2,5 NaOCl'nin E. faecalis'i tamamen ortadan kaldıramadığını ve %2 CHX'in, %2,5 NaOCl'den daha iyi antibakteriyel etki gösterdiğini, Dametto ve ark. (142) 7. gün CFU sayımlarında %2 CHX'in %5,25 NaOCl'den daha iyi antibakteriyel özellik sağladığını bildirmiştir. Bu bulguların aksine Hope ve ark. (318) kültür yöntemi ile %1 NaOCl'nin %2 CHX'e göre daha iyi antimikrobiyal etkinlik sağladığını, Rodrigues ve ark. (228) KLTM analiziyle sığır dentin bloklarında *E. faecalis* biyofilmi üzerinde %2,5 NaOCl'in %2 CHX'e kıyasla daha iyi antibakteriyel etki gösterdiğini, Ruiz-Linares ve ark. (273) KLTM analiziyle %2,5 NaOCl, %2 CHX, %2 alexidin ve %0,2 setrimidin tek başına ve kombine halinde uygulamalarında insan dentin örneklerinde NaOCl'nin bakterilere karşı daha iyi bir antimikrobiyal aktivite sağladığını bildirmiştir. Bununla birlikte Ma ve ark. (8) dentin dezenfeksiyonu üzerindeki etkinliğini KLTM ile değerlendirdikleri çalışmalarında %1 NaOCl, %2 NaOCl ve %2 CHX'in arasında ölü bakteri yüzdesi bakımından fark olmadığını bildirmiştir. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıkların irrigasyon solüsyonlarının konsantrasyonundaki, hacmindeki ve uygulama süresindeki

farklılıklar ile birlikte değerlendirme yöntemi ve kullanılan substratın farklılığından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Tarafımızca yapılan literatür taramasında endodonti alanında irrigasyon solüsyonu olarak AgCNP'ün antibakteriyel aktivitesini değerlendiren bir çalışmaya rastlanmamıştır. Benzer şekilde henüz çok yaygın kullanım kazanmayan irritrolün de literatürde dentin tübül penetresyonuna etkisi, dolgu malzemelerinin adezyonuna etkisi ve smear tabakasını uzaklaştırmadaki etkinliği araştırılmasına rağmen, antibakteriyel etkinliği ile ilgili bir çalışmanın olmadığı tespit edildi. Bu nedenle mevcut çalışmanın AgCNP ve irritrol ile ilgili sonuçları herhangi bir çalışma ile doğrudan karşılaştırılamamıştır. Literatürdeki bu eksikliği gidermek amacıyla bu çalışmada ilk defa AgCNP ve irritrolün hem tek başına hem de enzimler ile kombine kullanımının antimikrobiyal etkinliği endodontik bir patojen olan *E. faecalis* üzerinde test edildi. Bu çalışmanın sonucunda ön enzim uygulamadan gerçekleştirilen irrigasyon protokolü sonrasında ölü bakteri yüzdesi açısından NaOCl, irritrol ve AgCNP arasında ve CHX, irritrol ve AgCNP arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Çalışmamızın sonuçlarıyla benzer şekilde Moghadas ve ark. (319) tarafından AgNP içeren, etanol ve sodyum hidroksitten oluşan irrigasyon solüsyonunun kanal içi ortamda bakteri büyümesini kontrol etmeye yardımcı olarak *E. faecalis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı %5,25 NaOCl kadar etkili olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte AgCP'ün memeli hücrelerine karşı potansiyel sitotoksisiteye sebep olabileceği, kanal içi ilaç olarak iyi bir seçenek olmasına rağmen zayıf bir irrigan olduğu ve etkili bir eliminasyon için bakterilerle uzun süreli temas süresi olması gerektiği rapor edilmiştir (235). Çalışmamızla benzer şekilde Roshdy ve ark. (320) *E. faecalis* eliminasyonunda %2,5 NaOCl'yi CNP kadar etkili bulmuştur. Bununla birlikte Jaiswal ve ark. (321) %5 NaOCl'nin, %2 kitosan ve %2 CHX'in kombine kullanılmasıyla eşit derecede antimikrobiyal etkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızın bulgularının aksine Rodrigues ve ark. (228) KLTM analiziyle test edilen tüm zaman aralıklarında 94 ppm AgNP'ün, %2,5 NaOCl'ye kıyasla daha az antibakteriyel etkinlik gösterdiği bildirmiştir. Bununla birlikte Afkhami ve ark. (259) *E. faecalis* inoküle edilmiş kök kanallarının dezenfeksiyonunda kültür yöntemi ile 100 ppm AgNP'ün, %2,5 NaOCl'de daha iyi antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu rapor etmiştir. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıkların test edilen irrigasyon

solüsyonlarının konsantrasyonuna, değerlendirme yöntemine ve nanopartiküllerin sentezlenme prosedürlerindeki farklılıklara bağlı olduğunu düşünmekteyiz. Kültür yöntemi ile KLTM arasındaki farklılık, KLTM'de canlılık boyası ile boyanan örneklerde ara hücresel durumun oluşmasına atfedilebilir. Bu boyama işlemi ile kısmen hasarlı bakteriyel membranlı hücrelere de kırmızı floresan PI boyasının nüfuz edebildiği ve bu hücrelerin uygun büyüme koşullarında canlanma kabiliyetine sahip olduğu bildirilmiştir (26). Ayrıca çalışmamızın sonucunda irritrol ve AgCNP'nin endodontide klinik uygulamada antimikrobiyal etkinlikleri nedeniyle rutin kullanım kazanan CHX ve NaOCl kadar antimikrobiyal aktivite göstermesi bu iki solüsyonun da endodontide kullanımının umut verici olduğunu göstermiştir.

Ön enzim olarak tripsin uygulanmasının ardından geçekleştirilen irrigasyon solüsyonu protokollerinde ise NaOCl, CHX, irritrol ve AgCNP arasında ölü bakteri yüzdesi açısından farklılık bulunmadı. Bu bulguların aksine Niazi ve ark. (23)'nın KLTM analizi kullanarak gerçekleştirdikleri çalışmada çok türlü biyofilmlere sahip dişlerde büyüme ortamlarına ilave edilen tripsinin biyofilmleri CHX'e daha duyarlı hale getirdiği bildirmiştir. Ayrıca aynı çalışmada biyofilm yapısının deformasyonunda ve biyofilmdeki mikroorganizmaların eliminasyonunda ultrasonik yardımı ile uygulanan tripsin ve CHX'in beraber kullanımının en efektif uygulama olduğu bildirilmiştir. Bu nedenle çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar bizim çalışma protokolümüzün aksine Niazi ve ark. (23)'nın gerçekleştirdiği çalışmada tripsinin biyofilm oluşturulurken büyüme ortamlarına ilave edilmiş olması daha sınırlı hacimde ve daha gevşek bir biyofilm oluşumuna sebep olması nedeniyle, biyofilmi uygulanan irrigasyon solüsyonlarına daha duyarlı hale getirmiş olabileceğinden kaynaklanıyor olabilir. Bununla birlikte solüsyonların ultrasonikler tarafından aktivasyonuyla üretilen ısının tripsinin antibakteriyel özelliklerini de arttırmış olabileceğini düşünmekteyiz.

Literatürde endodonti alanında tek başına tripsinin antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği yalnızca bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada Niazi ve ark. (26) çok türlü biyofilm ile enfekte edilen hidroksiapatit disklerde ve tek köklü dişlerde tripsin, proteinaz K, %0,2 CHX, %1 NaOCl ve salinin antibakteriyel etkinliğini değerlendirmiştir. KLTM analiziyle gerçekleştirilen bu çalışmanın sonucunda hem

pasif ultrasonik irrigasyonla hem de geleneksel iğne irrigasyonuyla kullanılan NaOCl'nin en etkili antimikrobiyal ajan olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte en iyi biyofilm deformasyonunu pasif ultrasonik irrigasyonla kullanılan CHX'de olduğu bildirilmiştir. Hidroksiapatit disklerde ise aerobik kültürleme ortamında tripsin ve proteinaz K'nın CHX'den daha fazla antibakteriyel özellik gösterdiği ancak anaerobik ortamda solüsyonlar arasında antibakteriyel etkinlikte bir fark olmadığı bildirilmiştir. Ayrıca hem kantitatif canlı sayımlarında hem de KLTM 'nin sonuçlarında, geleneksel iğne irrigasyonuna kıyasla tripsinin ultrasonik aktivasyonla birlikte kullanıldığında daha iyi antibakteriyel aktiviteye sahip olduğu bildirilmiştir (26). Tüm bu bilgiler doğrultusunda çalışmalar arasındaki farklılıkların besin stresli çok türlü bir biyofilm kullanılanımına, solüsyonların konsantrasyonlarının ve substratın farklı olmasına atfedilebilir.

Ön enzim olarak DNase 1 uygulanmasının ardından geçekleştirilen irrigasyon solüsyonu protokollerinde ise CHX, NaOCl'ye göre daha fazla ölü bakteri yüzdesi gösterdi. NaOCl, irritrol ve AgCNP arasında ve CHX, irritrol ve AgCNP arasında anlamlı farklılık bulunmadı. Mevcut çalışmanın sonuçlarıyla uyumlu olarak Li ve ark. (24) biyofilm büyüme ortamına ekledikleri EPS parçalayıcı enzim olan dekstranaz ve DNase 1'in biyofilme etkilerini CFU sayımlarıyla değerlendirdikleri çalışmada, DNase 1'in *E. faecalis*'in adezyonunu azalttığı ve biyofilmlerin CHX'e olan duyarlılığını arttığını bildirmiştir. Mevcut çalışmanın sonuçlarının aksine Ganesh ve ark. (22) KLTM analiziyle %2 CHX'e Tween 80 içeren ya da içermeyen DNase 1 ilavesinin *E. faecalis* biyofilmi üzerinde antibakteriyel etkinlikte fark oluşturmadığını bildirmiştir. Çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar bakteri inkübasyon sürelerinin farklı olmasına, DNase 1'in biyofilm büyüme ortamına ilave edilmesine ve DNase 1'in uygulama şeklinin farklı olmasına atfedilebilir. Literatürde EPS parçalayıcı enzim olan DNase'ların tek başına antibakteriyel etkinliği de değerlendirilmiştir. Schlafer ve ark. (294) 96 kuyucuklu bir plaka içinde tek köklü premolar dişlerde *E. faecalis* biyofilminin 1 saatlik DNase tedavisi sonucu in vitro koşullarda *E. faecalis*'in adezyonunu engellediği fakat ex vivo koşullarda dişlerin kök kanallarına tutunan *E. faecalis* sayısını azalmadığını bildirmiştir. Ayrıca DNase'ın biyofilmi deforme edemediği ve endodontik tedavilerde DNase'ın antibiyofilm ajan olarak tek başına kullanımının önerilmediği rapor edilmiştir (294). Bununla birlikte Torelli ve ark. (25)

96 kuyucuklu plakalarda oluşturulan *E. faecalis* ve *E. faecium* biyofilmlerinde matriks parçalayıcı enzimler olan Alginate Lyase (AlgL) ve DNase 1'in Vankomisin ile kombine kullanıldıklarında, XTT testi sonucu her iki enzimin de hücre canlılığını etkilediği ve Vankomisinin de MBEC (Minimum biyofilm eradikasyon konsantrasyonu) değerini düşürdüğü bildirmiştir.

NaOCl, CHX ve irritrol'ün yer aldığı bütün gruplarda ön enzim uygulanması ölü bakteri yüzdesinde herhangi bir farklılık oluşturmadı. Benzer şekilde Ganesh ve ark. (22) %2 CHX'e DNase 1 ilavesinin *E. faecalis* biyofilmi üzerinde antibakteriyel etkinliğinde fark yaratmadığını bildirmiştir. Çalışmamızın sonuçlarının aksine Niazi ve ark. (23) büyüme ortamlarına ilave edilen tripsinin biyofilmleri CHX'e daha duyarlı hale getirdiği bildirmiştir. Yu ve ark. (268) sığır kök kanal sistemlerinde *E. faecalis* besiyerine 2 günlük kültürleme süresince veya biyofilm oluşumu sonrası 1 saat süre ile eklenen DNase'ın biyofilm oluşumunu azalttığını ve biyofilmdeki eDNA'yı ortadan kaldırarak *E. faecalis*'in düşük konsantrasyonlarda (%0,5) bile NaOCl'ye duyarlılığının arttığını bildirmiştir. Ayrıca DNase ile kombine kullanılan %0,5 NaOCl ile %5 NaOCl arasında fark olmadığı rapor edilmişitir (268). Çalışma sonuçları arasındaki farklılıklar enzimlerin besiyerine ilave edilmesine ve irrigasyon solüsyonlarının konsantrasyonlarının farklı olmasına bağlı olabilir.

Mevcut çalışmada yalnızca tripsin ile ön enzim uygulaması AgCNP'ün antimikrobiyal etkinliğini geliştirdiği belirlendi. Bu durumun nedeni proteolitik bir enzim olan tripsinin, bakterilerin EPS matriksindeki lizin ve arginin peptit bağlarına etki gösterek AgCNP'ün biyofilme daha iyi entegre olmasıyla daha iyi antimikrobiyal etkinlik göstermesine neden olmuş olabilir. Bu nedenle bu iki solüsyonun kombine kullanımı bakterileri biyofilm matriksinden ayırmaya yardımcı olduğu için gelecekte tedaviye destek olarak faydalı olabilirler. Bununla birlikte tripsinin domuz pankreasından elde edilmiş olması klinik kullanımını sınırlayabilir

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmanın sınırlamaları dahilinde *E. faecalis* ile kontamine edilmiş dentin bloklarında NaOCl, CHX, irritrol ve AgCNP'ün tek başına ve hem DNase 1 hem de tripsin enzimleriyle kombine kullanımının %100 bakteriyel eliminasyon sağlayamadığı belirlendi. Mevcut çalışmada hem ön enzim uygulaması yapılmayan ve hem de DNase 1 ön enzim uygulaması yapılan grupta CHX, NaOCl'den daha iyi antimikrobiyal aktivite gösterdi. Bununla birlikte hem NaOCl, irritrol ve AgCNP arasında hem de CHX, irritrol ve AgCNP arasında antimikrobiyal etkinlik açısından bir fark bulunmadı. Ön enzim olarak tripsinin uygulanması AgCNP'ün antimikrobiyal aktivitesini geliştirirken, DNase 1 uygulaması AgCNP üzerinde herhangi bir fark oluşturmadı. Bununla birlikte klinik olarak kök kanalları çok türlü biyofilm içermesine rağmen mevcut çalışmada tek türlü biyofilm modeli kullanılması önemli bir limitasyondur. Ayrıca bu çalışmada dentin bloklarının kullanılması nedeniyle endodontik tadavi işleminin ayrılmaz bir parçası olan mekanik preparasyonun uygulanmaması da önemli bir diğer limitasyondur. Bu nedenle bu çalışmada test edilen final irrigasyon protokollerinin çok türlü biyofilm modelleri üzerinde, farklı kök morfolojsine sahip dişlerde ve köklerin farklı segmentleri üzerindeki etkinliklerinin araştırılmasına ihtiyaç vardır. Ayrıca test edilen final irrigasyon protokollerinin farklı konsantrasyonlarda ve hacimlerde, farklı kök kanal anatomisine sahip dişlerdeki etkinliğinin araştırılacağı randomize kontrollü klinik çalışmaların gerçekleştirilmesinin literatüre klinik veri sağlanması bakımından önemli olduğu düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. **Ghorbanzadeh A, Bahador A, Sarraf P, Ayar R, Fekrazad R, Asefi S.** Ex Vivo Comparison of Antibacterial Efficacy of Conventional Chemomechanical Debridement Alone and in Combination with Light-Activated Disinfection and Laser Irradiation Against Enterococcus Faecalis Biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther,* **2020**: 101648.

2. **Paiva SS, Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Carmo FL, Leite DC, Ferreira DC, et al.** Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J,* **2013;** 46(3): 225-233.

3. **Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J.** Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2005;** 99(2): 231-252.

4. **Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M.** Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod,* **2000;** 26(12): 751-755.

5. **Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Paiva SS, Guimaraes-Pinto T, Magalhaes KM, Lima KC.** Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2007;** 104(1): 122-130.

6. **Bukhari S, Kim D, Liu Y, Karabucak B, Koo H.** Novel Endodontic Disinfection Approach Using Catalytic Nanoparticles. *J Endod,* **2018;** 44(5): 806-812.

7. **Giardino L, Del Fabbro M, Morra M, Pereira T, Bombarda de Andrade F, Savadori P, et al.** Dual Rinse((R)) HEDP increases the surface tension of NaOCl but may increase its dentin disinfection efficacy. *Odontology,* **2019;** 107(4): 521-529.

8. **Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M.** A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod,* **2011;** 37(10): 1380-1385.

9. **Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ.** The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **1965;** 20: 340-349.

10. **Chiniforush N, Pourhajibagher M, Shahabi S, Kosarieh E, Bahador A.** Can Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Enhance the Endodontic Treatment? *J Lasers Med Sci,* **2016;** 7(2): 76-85.

11. **Narayanan LL, Vaishnavi C.** Endodontic microbiology. *J Conserv Dent,* **2010;** 13(4): 233-239.

12. **Şimşek N, Tekin Bulut E.** Biyofilm ve endodonti: bölüm 1. **2012**.

13. **Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB.** Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod,* **2006;** 32(2): 93-98.

14. **George S, Kishen A, Song KP.** The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis. *J Endod,* **2005;** 31(12): 867-872.

15. **Wang Z, Shen Y, Haapasalo M.** Dentin extends the antibacterial effect of endodontic sealers against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod,* **2014;** 40(4): 505-508.

16. **Seneviratne CJ, Yip JW, Chang JW, 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;** 58(10): 1327-1334.

17. **Siqueira JF, Jr., Favieri A, Gahyva SM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP.** Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod,* **2000;** 26(5): 274-277.

18. **Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z.** Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol,* **1996;** 12(4): 179-184.

19. **Anumula L, Kumar S, Kumar VS, Sekhar C, Krishna M, Pathapati RM, et al.** An Assessment of Antibacterial Activity of Four Endodontic Sealers on Enterococcus faecalis by a Direct Contact Test: An In Vitro Study. *ISRN Dent,* **2012;** 2012: 989781.

20. **Alsubait S, Albader S, Alajlan N, Alkhunaini N, Niazy A, Almahdy A.** Comparison of the antibacterial activity of calcium silicate- and epoxy resin-based endodontic sealers against Enterococcus faecalis biofilms: a confocal laser-scanning microscopy analysis. *Odontology,* **2019;** 107(4): 513-520.

21. **Zapata RO, Bramante CM, de Moraes IG, Bernardineli N, Gasparoto TH, Graeff MS, et al.** Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of Enterococcus faecalis in infected dentin. *J Endod,* **2008;** 34(10): 1198-1201.

22. **Ganesh A, Nagendrababu V, John A, Deivanayagam K.** The Effect of Addition of an EPS Degrading Enzyme with and without Detergent to 2% Chlorhexidine on Disruption of Enterococcus faecalis Biofilm: A Confocal Laser Scanning Microscopic Study. *J Clin Diagn Res,* **2015;** 9(11): ZC61-65.

23. **Niazi SA, Al-Ali WM, Patel S, Foschi F, Mannocci F.** Synergistic effect of 2% chlorhexidine combined with proteolytic enzymes on biofilm disruption and killing. *Int Endod J,* **2015;** 48(12): 1157-1167.

24. **Li W, Liu H, Xu Q.** Extracellular dextran and DNA affect the formation of Enterococcus faecalis biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. *J Endod,* **2012;** 38(7): 894-898.

25. **Torelli R, Cacaci M, Papi M, Paroni Sterbini F, Martini C, Posteraro B, et al.** Different effects of matrix degrading enzymes towards biofilms formed by E. faecalis and E. faecium clinical isolates. *Colloids Surf B Biointerfaces,* **2017;** 158: 349-355.

26. **Niazi SA, Clark D, Do T, Gilbert SC, Foschi F, Mannocci F, et al.** The effectiveness of enzymic irrigation in removing a nutrient-stressed endodontic multispecies biofilm. *Int Endod J,* **2014;** 47(8): 756-768.

27. **Jung IY, Choi B, Kum KY, Yoo YJ, Yoon TC, Lee SJ, et al.** Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2001;** 92(3): 329-334.

28. **Taschieri S, Del Fabbro M, Samaranayake L, Chang JW, Corbella S.** Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *J Investig Clin Dent,* **2014;** 5(3): 163-170.

29. **Chawla A, Kumar V.** Evaluating the efficacy of different techniques and irrigation solutions for removal of calcium hydroxide from the root canal system: A scanning electron microscope study. *J Conserv Dent,* **2018;** 21(4): 394-400.

30. **Lukic D, Karygianni L, Flury M, Attin T, Thurnheer T.** Endodontic-Like Oral Biofilms as Models for Multispecies Interactions in Endodontic Diseases. *Microorganisms,* **2020;** 8(5).

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

32. **Siqueira JF, Jr., Rocas IN, Lopes HP.** Patterns of microbial colonization in primary root canal infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2002;** 93(2): 174-178.

33. **Ricucci D, Siqueira JF, Jr.** Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. *J Endod,* **2008;** 34(9): 1124-1129.

34. **Rocas IN, Siqueira JF, Jr.** Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod,* **2010;** 36(1): 45-52.

35. **Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, et al.** Biofilms in Endodontics-Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci,* **2017;** 18(8).

36. **Larsen T, Fiehn NE.** Dental biofilm infections - an update. *APMIS,* **2017;** 125(4): 376-384.

37. **Alves FR, Andrade-Junior CV, Marceliano-Alves MF, Perez AR, Rocas IN, Versiani MA, et al.** Adjunctive Steps for Disinfection of the Mandibular Molar Root Canal System: A Correlative Bacteriologic, Micro-Computed Tomography, and Cryopulverization Approach. *J Endod,* **2016;** 42(11): 1667-1672.

38. **Jung DJ, Al-Ahmad A, Follo M, Spitzmuller B, Hoth-Hannig W, Hannig M, et al.** Visualization of initial bacterial colonization on dentine and enamel in situ. *J Microbiol Methods,* **2010;** 81(2): 166-174.

39. **Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner AC, Yu WH, et al.** The human oral microbiome. *J Bacteriol,* **2010;** 192(19): 5002-5017.

40. **Do T, Devine D, Marsh PD.** Oral biofilms: molecular analysis, challenges, and future prospects in dental diagnostics. *Clin Cosmet Investig Dent,* **2013;** 5: 11-19.

41. **Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, et al.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol,* **1987;** 41: 435-464.

42. **Diaz PI.** Microbial diversity and interactions in subgingival biofilm communities. *Front Oral Biol,* **2012;** 15: 17-40.

43. **Ricucci D, Siqueira JF, Jr.** Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod,* **2010;** 36(8): 1277-1288.

44. **Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, et al.** Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol,* **2004;** 19(2): 71-76.

45. **Nair PN.** On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J,* **2006;** 39(4): 249-281.

46. **Moser C, Pedersen HT, Lerche CJ, Kolpen M, Line L, Thomsen K, et al.** Biofilms and host response - helpful or harmful. *APMIS,* **2017;** 125(4): 320-338.

47. **Bjarnsholt T.** The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS Suppl,* **2013;** (136): 1-51.

48. **Ramachandran Nair PN.** Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod,* **1987;** 13(1): 29-39.

49. **Siqueira JF, Jr., Rocas IN.** Community as the unit of pathogenicity: an emerging concept as to the microbial pathogenesis of apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2009;** 107(6): 870-878.

50. **Simoes M.** Antimicrobial strategies effective against infectious bacterial biofilms. *Curr Med Chem,* **2011;** 18(14): 2129-2145.

51. **Goodman SD, Obergfell KP, Jurcisek JA, Novotny LA, Downey JS, Ayala EA, et al.** Biofilms can be dispersed by focusing the immune system on a common family of bacterial nucleoid-associated proteins. *Mucosal Immunol,* **2011;** 4(6): 625-637.

52. **Barnes AM, Ballering KS, Leibman RS, Wells CL, Dunny GM.** Enterococcus faecalis produces abundant extracellular structures containing DNA in the absence of cell lysis during early biofilm formation. *mBio,* **2012;** 3(4): e00193-00112.

53. **Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS.** Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science,* **2002;** 295(5559): 1487.

54. **Cerca N, Pier GB, Vilanova M, Oliveira R, Azeredo J.** Quantitative analysis of adhesion and biofilm formation on hydrophilic and hydrophobic surfaces of clinical isolates of Staphylococcus epidermidis. *Res Microbiol,* **2005;** 156(4): 506-514.

55. **Thomas VC, Hiromasa Y, Harms N, Thurlow L, Tomich J, Hancock LE.** A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of Enterococcus faecalis. *Mol Microbiol,* **2009;** 72(4): 1022-1036.

56. **Majumdar S, Pal S.** Cross- species communication in bacterial world. *J Cell Commun Signal,* **2017;** 11(2): 187-190.

57. **Lillicrap A, Macken A, Wennberg AC, Grung M, Rundberget JT, Fredriksen L, et al.** Environmental fate and effects of novel quorum sensing inhibitors that can control biofilm formation. *Chemosphere,* **2016;** 164: 52-58.

58. **Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG.** Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res,* **2002;** 81(11): 761-766.

59. **Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Sousa EL, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J,* **2003;** 36(1): 1-11.

60. **Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Aboim MC, Rosado AS.** Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2004;** 98(6): 741-749.

61. **Chavez De Paz LE, Dahlen G, Molander A, Moller A, Bergenholtz G.** Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J,* **2003;** 36(7): 500-508.

62. **Arafa MG, Mousa HA, Afifi NN.** Preparation of PLGA-chitosan based nanocarriers for enhancing antibacterial effect of ciprofloxacin in root canal infection. *Drug Deliv,* **2020;** 27(1): 26-39.

63. **Wang N, Ji Y, Zhu Y, Wu X, Mei L, Zhang H, et al.** Antibacterial effect of chitosan and its derivative on Enterococcus faecalis associated with endodontic infection. *Exp Ther Med,* **2020;** 19(6): 3805-3813.

64. **Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S.** Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er:YAG laser in vitro. *Int Endod J,* **2015;** 48(6): 602-610.

65. **Zhang C, Du J, Peng Z.** Correlation between Enterococcus faecalis and Persistent Intraradicular Infection Compared with Primary Intraradicular Infection: A Systematic Review. *J Endod,* **2015;** 41(8): 1207-1213.

66. **Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK.** Survival of Enterococcus faecalis in root canals ex vivo. *Int Endod J,* **2005;** 38(10): 735-742.

67. **Gomes BP, Endo MS, Martinho FC.** Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod,* **2012;** 38(8): 1082-1086.

68. **Henderson IR, Nataro JP.** Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun,* **2001;** 69(3): 1231-1243.

69. **Seneviratne CJ, Suriyanarayanan T, Swarup S, Chia KHB, Nagarajan N, Zhang C.** Transcriptomics Analysis Reveals Putative Genes Involved in Biofilm Formation and Biofilm-associated Drug Resistance of Enterococcus faecalis. *J Endod,* **2017;** 43(6): 949-955.

70. **Loyola-Rodriguez JP, Torres-Mendez F, Espinosa-Cristobal LF, Garcia-Cortes JO, Loyola-Leyva A, Gonzalez FJ, et al.** Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against Enterococcus faecalis. *J Appl Biomater Funct Mater,* **2019;** 17(3): 2280800019851771.

71. **Persoon IF, Hoogenkamp MA, Bury A, Wesselink PR, Hartog AF, Wever R, et al.** Effect of vanadium chloroperoxidase on Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod,* **2012;** 38(1): 72-74.

72. **Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA.** Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J,* **2019;** 52(5): 604-628.

73. **Peters OA, Bardsley S, Fong J, Pandher G, Divito E.** Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. *J Endod,* **2011;** 37(7): 1008-1012.

74. **Ricucci D, Siqueira JF, Jr.** Recurrent apical periodontitis and late endodontic treatment failure related to coronal leakage: a case report. *J Endod,* **2011;** 37(8): 1171-1175.

75. **Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Loghin S, Lin LM.** Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: A histologic and histobacteriologic study. *J Dent,* **2017;** 56: 19-32.

76. **Baron A, Lindsey K, Sidow SJ, Dickinson D, Chuang A, McPherson JC, 3rd.** Effect of a Benzalkonium Chloride Surfactant-Sodium Hypochlorite Combination on Elimination of Enterococcus faecalis. *J Endod,* **2016;** 42(1): 145-149.

77. **Alves FR, Siqueira JF, Jr., Carmo FL, Santos AL, Peixoto RS, Rocas IN, et al.** Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod,* **2009;** 35(4): 486-492.

78. **Sathorn C, Parashos P, Messer HH.** How useful is root canal culturing in predicting treatment outcome? *J Endod,* **2007;** 33(3): 220-225.

79. **Haapasalo M, Orstavik D.** In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res,* **1987;** 66(8): 1375-1379.

80. **Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M.** Killing of Enterococcus faecalis by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod,* **2006;** 32(2): 138-141.

81. **Bhuva B, Patel S, Wilson R, Niazi S, Beighton D, Mannocci F.** The effectiveness of passive ultrasonic irrigation on intraradicular Enterococcus faecalis biofilms in extracted single-rooted human teeth. *Int Endod J,* **2010;** 43(3): 241-250.

82. **Grundling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA.** Effect of ultrasonics on Enterococcus faecalis biofilm in a bovine tooth model. *J Endod,* **2011;** 37(8): 1128-1133.

83. **Li Y, Sun K, Ye G, Liang Y, Pan H, Wang G, et al.** Evaluation of Cold Plasma Treatment and Safety in Disinfecting 3-week Root Canal Enterococcus faecalis Biofilm In Vitro. *J Endod,* **2015;** 41(8): 1325-1330.

84. **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;** 39(5): 658-663.

85. **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): 659-666.

86. **Bergmans L, Moisiadis P, Van Meerbeek B, Quirynen M, Lambrechts P.** Microscopic observation of bacteria: review highlighting the use of environmental SEM. *Int Endod J,* **2005;** 38(11): 775-788.

87. **Baldasso FE, Sturmer CP, Luisi SB, Petruzzi MN, Scarparo RK, De Figueiredo JA.** Microflora associated with primary endodontic infections: correlations among SEM evaluation, clinical features, and radiographic findings. *Microsc Res Tech,* **2012;** 75(11): 1557-1563.

88. **Sutton NA, Hughes N, Handley PS.** A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and the electroscan wet scanning electron microscope to study the structure of a biofilm of Streptococcus crista CR3. *J Appl Bacteriol,* **1994;** 76(5): 448-454.

89. **Wang Z, Shen Y, Haapasalo M.** Effect of smear layer against disinfection protocols on Enterococcus faecalis-infected dentin. *J Endod,* **2013;** 39(11): 1395-1400.

90. **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;** 35(7): 981-985.

91. **Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M.** Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod,* **2010;** 36(11): 1820-1823.

92. **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;** 39(4): 473-477.

93. **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;** 82(1): 64-70.

94. **del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AG, Cavenago BC, Marciano MA, et al.** Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig,* **2015;** 19(8): 2067-2073.

95. **Lemos SS, Cesar DE, ProcOpio SW, Machado FC, Ribeiro LC, Ribeiro RA.** Qualitative and quantitative molecular analysis of bacteria in root canals of primary teeth with pulp necrosis. *Braz Oral Res,* **2020;** 34: e093.

96. **Peters OA**, **Peters CI**. Cleaning and Shaping the Root Canal System. In: Hargreaves, KM. Cohen's Pathways of the Pulp. 11th, Canada: Elsevier, 2016: 900-1189.

97. **Peters OA, Schonenberger K, Laib A.** Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J,* **2001;** 34(3): 221-230.

98. **Versiani MA, Pecora JD, de Sousa-Neto MD.** Root and root canal morphology of four-rooted maxillary second molars: a micro-computed tomography study. *J Endod,* **2012;** 38(7): 977-982.

99. **Vertucci FJ.** Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **1984;** 58(5): 589-599.

100. **Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis. *Int Endod J,* **2001;** 34(6): 424-428.

101. **Zehnder M.** Root canal irrigants. *J Endod,* **2006;** 32(5): 389-398.

102. **Ozturk B, Ozer F.** Effect of NaOCl on bond strengths of bonding agents to pulp chamber lateral walls. *J Endod,* **2004;** 30(5): 362-365.

103. **Cunningham WT, Balekjian AY.** Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **1980;** 49(2): 175-177.

104. **Mader CL, Baumgartner JC, Peters DD.** Scanning electron microscopic investigation of the smeared layer on root canal walls. *J Endod,* **1984;** 10(10): 477-483.

105. **Harrison JW.** Irrigation of the root canal system. *Dent Clin North Am,* **1984;** 28(4): 797-808.

106. **Alaçam T.** Kök kanallarının irrigasyonu. Endodonti. Ankara: Özyurt matbaacılık, 2012: 529.

107. **Uzunoglu-Ozyurek E, Dik Guzel C, Dogan Buzoglu H.** Effect of different irrigation methods in the presence of a separated instrument: an in vitro study. *Acta Odontol Scand,* **2020**: 1-8.

108. **Tonini R, Giovarruscio M, Gorni F, Ionescu A, Brambilla E, Mikhailovna IM, et al.** In Vitro Evaluation of Antibacterial Properties and Smear Layer Removal/Sealer Penetration of a Novel Silver-Citrate Root Canal Irrigant. *Materials (Basel),* **2020;** 13(1).

109. **Dakin HD.** On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br. Med. J.,* **1915;** 2: 318-320.

110. **Gu LS, Huang XQ, Griffin B, Bergeron BR, Pashley DH, Niu LN, et al.** Primum non nocere - The effects of sodium hypochlorite on dentin as used in endodontics. *Acta Biomater,* **2017;** 61: 144-156.

111. **Vallabhaneni K, Kakarla P, Avula SSJ, Reddy NVG, Gowd MP, Vardhan KR.** Comparative Analyses of Smear Layer Removal Using Four Different Irrigant Solutions in the Primary Root Canals - A Scanning Electron Microscopic Study. *J Clin Diagn Res,* **2017;** 11(4): ZC64-ZC67.

112. **Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD.** Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J,* **2002;** 13(2): 113-117.

113. **McDonnell G, Russell AD.** Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev,* **1999;** 12(1): 147-179.

114. **McKenna SM, Davies KJ.** The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J,* **1988;** 254(3): 685-692.

115. **Barrette WC, Jr., Hannum DM, Wheeler WD, Hurst JK.** General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry,* **1989;** 28(23): 9172-9178.

116. **Cullen JK, Wealleans JA, Kirkpatrick TC, Yaccino JM.** The effect of 8.25% sodium hypochlorite on dental pulp dissolution and dentin flexural strength and modulus. *J Endod,* **2015;** 41(6): 920-924.

117. **Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, et al.** Evaluation of the Susceptibility of Multispecies Biofilms in Dentinal Tubules to Disinfecting Solutions. *J Endod,* **2016;** 42(8): 1246-1250.

118. **Dioguardi M, Gioia GD, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G.** Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J Dent,* **2018;** 12(3): 459-466.

119. **Wagner MH, da Rosa RA, de Figueiredo JAP, Duarte MAH, Pereira JR, So MVR.** Final irrigation protocols may affect intraradicular dentin ultrastructure. *Clin Oral Investig,* **2017;** 21(7): 2173-2182.

120. **Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K.** Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J,* **2001;** 34(2): 113-119.

121. **Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM.** Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J Appl Oral Sci,* **2016;** 24(3): 291-298.

122. **Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M.** Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod,* **2010;** 36(9): 1558-1562.

123. **Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y.** Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am,* **2010;** 54(2): 291-312.

124. **Martinho FC, Gomes BP.** Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod,* **2008;** 34(3): 268-272.

125. **Dalpino PH, Francischone CE, Ishikiriama A, Franco EB.** Fracture resistance of teeth directly and indirectly restored with composite resin and indirectly restored with ceramic materials. *Am J Dent,* **2002;** 15(6): 389-394.

126. **Qian W, Shen Y, Haapasalo M.** Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod,* **2011;** 37(10): 1437-1441.

127. **Moreira DM, Almeida JF, Ferraz CC, Gomes BP, Line SR, Zaia AA.** Structural analysis of bovine root dentin after use of different endodontics auxiliary chemical substances. *J Endod,* **2009;** 35(7): 1023-1027.

128. **Zhu WC, Gyamfi J, Niu LN, Schoeffel GJ, Liu SY, Santarcangelo F, et al.** Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis - a review. *J Dent,* **2013;** 41(11): 935-948.

129. **Siqueira JF, Jr., Lopes HP.** Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J,* **1999;** 32(5): 361-369.

130. **Mohammadi Z, Dummer PM.** Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J,* **2011;** 44(8): 697-730.

131. **Morgan RW, Carnes DL, Jr., Montgomery S.** The solvent effects of calcium hydroxide irrigating solution on bovine pulp tissue. *J Endod,* **1991;** 17(4): 165-168.

132. **Barbosa SV, Spangberg LS, Almeida D.** Low surface tension calcium hydroxide solution is an effective antiseptic. *Int Endod J,* **1994;** 27(1): 6-10.

133. **Loe H, Schiott CR.** The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res,* **1970;** 5(2): 79-83.

134. **Loe H, Schiott CR, Karring G, Karring T.** Two years oral use of chlorhexidine in man. I. General design and clinical effects. *J Periodontal Res,* **1976;** 11(3): 135-144.

135. **Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC.** Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J,* **2013;** 24(2): 89-102.

136. **Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ.** In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2004;** 97(1): 79-84.

137. **Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ.** Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J,* **2002;** 35(9): 791-795.

138. **Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ.** The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J,* **2007;** 52(1 Suppl): S64-82.

139. **Gomes BP, Vianna ME, Matsumoto CU, Rossi Vde P, Zaia AA, Ferraz CC, et al.** Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2005;** 100(4): 512-517.

140. **Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA.** Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J,* **2004;** 37(1): 38-41.

141. **Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY.** In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod,* **1999;** 25(3): 167-171.

142. **Dametto FR, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ.** In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against Enterococcus faecalis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2005;** 99(6): 768-772.

143. **Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S.** Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J Endod,* **2000;** 26(6): 315-317.

144. **Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A.** Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J,* **2006;** 32(3): 112-115.

145. **Rosenthal S, Spangberg L, Safavi K.** Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2004;** 98(4): 488-492.

146. **Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al.** Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent,* **2009;** 37(1): 76-81.

147. **de Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP.** Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J,* **2008;** 19(1): 28-33.

148. **Gomes BP, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ.** In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2006;** 102(4): 544-550.

149. **Zerella JA, Fouad AF, Spangberg LS.** Effectiveness of a calcium hydroxide and chlorhexidine digluconate mixture as disinfectant during retreatment of failed endodontic cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2005;** 100(6): 756-761.

150. **Mohammadi Z, Abbott PV.** The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J,* **2009;** 42(4): 288-302.

151. **Erdemir A, Ari H, Gungunes H, Belli S.** Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. *J Endod,* **2004;** 30(2): 113-116.

152. **Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Garcia Garcia E, Hungaro Duarte MA, et al.** Antimicrobial activity of Chlorhexidine, Peracetic acid and Sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against Enterococcus faecalis biofilms. *Int Endod J,* **2015;** 48(12): 1188-1193.

153. **Bukhary S, Balto H.** Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against Enterococcus faecalis Biofilms. *J Endod,* **2017;** 43(4): 643-647.

154. **Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM, Gonzalez-Rodriguez MP, Valderrama MJ, Baca P.** Eradication of Enterococcus faecalis biofilms by cetrimide and chlorhexidine. *J Endod,* **2010;** 36(1): 87-90.

155. **Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Ferrer-Luque CM.** Residual effectiveness of final irrigation regimens on Enteroccus faecalis-infected root canals. *J Endod,* **2011;** 37(8): 1121-1123.

156. **Hahn FL, Reygadas F.** Demineralization of hard tissues. *Science,* **1951;** 114(2966): 462-463.

157. **Sreebny LM, Nikiforuk G.** Demineralization of hard tissues by organic chelating agents. *Science,* **1951;** 113(2941): 560.

158. **Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A.** Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J,* **2003;** 36(12): 810-830.

159. **Mohammadi Z, Shalavi S, Yaripour S, Kinoshita JI, Manabe A, Kobayashi M, et al.** Smear Layer Removing Ability of Root Canal Irrigation Solutions: A Review. *J Contemp Dent Pract,* **2019;** 20(3): 395-402.

160. **Peters OA, Peters CI.** Cleaning and Shaping the Root Canal System. In: Hargreaves, KM. Cohen's Pathways of the Pulp. 11th, Canada: Elsevier, 2016: 258
.

161. **Guzel C, Uzunoglu E, Dogan Buzoglu H.** Effect of Low-surface Tension EDTA Solutions on the Bond Strength of Resin-based Sealer to Young and Old Root Canal Dentin. *J Endod,* **2018;** 44(3): 485-488.

162. **Aktener BO, Bilkay U.** Smear layer removal with different concentrations of EDTA-ethylenediamine mixtures. *J Endod,* **1993;** 19(5): 228-231.

163. **Iwanami M, Yoshioka T, Sunakawa M, Kobayashi C, Suda H.** Spreading of root canal irrigants on root dentine. *Aust Endod J,* **2007;** 33(2): 66-72.

164. **Scelza MF, Pierro V, Scelza P, Pereira M.** Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **2004;** 98(4): 499-503.

165. **Khedmat S, Shokouhinejad N.** Comparison of the efficacy of three chelating agents in smear layer removal. *J Endod,* **2008;** 34(5): 599-602.

166. **Wu L, Mu Y, Deng X, Zhang S, Zhou D.** Comparison of the effect of four decalcifying agents combined with 60 degrees C 3% sodium hypochlorite on smear layer removal. *J Endod,* **2012;** 38(3): 381-384.

167. **Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL.** Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms. *J Endod,* **2006;** 32(6): 527-531.

168. **Paque F, Rechenberg DK, Zehnder M.** Reduction of hard-tissue debris accumulation during rotary root canal instrumentation by etidronic acid in a sodium hypochlorite irrigant. *J Endod,* **2012;** 38(5): 692-695.

169. **Lotfy WA, Ghanem KM, El-Helow ER.** Citric acid production by a novel Aspergillus niger isolate: I. Mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresour Technol,* **2007;** 98(18): 3464-3469.

170. **Yamaguchi M, Yoshida K, Suzuki R, Nakamura H.** Root canal irrigation with citric acid solution. *J Endod,* **1996;** 22(1): 27-29.

171. **Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodriguez MP, Baca P.** Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against Enterococcus faecalis biofilm. *J Endod,* **2010;** 36(10): 1673-1675.

172. **Bitter NC.** A 25% tannic acid solution as a root canal irrigant cleanser: a scanning electron microscope study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **1989;** 67(3): 333-337.

173. **Tanizaki K, Inoue K.** Effect of tannin-fluoride preparation on the reduction of secondary caries. *J Osaka Univ Dent Sch,* **1979;** 19: 129-146.

174. **Takahashi H, Okamoto Y, Fujinaka S, Shintani H.** A pilot study of exposure of the smear layer to tannic acid solutions. *J Prosthet Dent,* **1993;** 70(3): 261-263.

175. **Berry EA, 3rd, von der Lehr WN, Herrin HK.** Dentin surface treatments for the removal of the smear layer: an SEM study. *J Am Dent Assoc,* **1987;** 115(1): 65-67.

176. **De-Deus G, Souza EM, Marins JR, Reis C, Paciornik S, Zehnder M.** Smear layer dissolution by peracetic acid of low concentration. *Int Endod J,* **2011;** 44(6): 485-490.

177. **Lottanti S, Gautschi H, Sener B, Zehnder M.** Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *Int Endod J,* **2009;** 42(4): 335-343.

178. **Ulusoy OI, Zeyrek S, Celik B.** Evaluation of smear layer removal and marginal adaptation of root canal sealer after final irrigation using ethylenediaminetetraacetic, peracetic, and etidronic acids with different concentrations. *Microsc Res Tech,* **2017;** 80(7): 687-692.

179. **Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, et al.** A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod,* **2003;** 29(3): 170-175.

180. **Bryson EC, Levin L, Banchs F, Abbott PV, Trope M.** Effect of immediate intracanal placement of Ledermix Paste(R) on healing of replanted dog teeth after extended dry times. *Dent Traumatol,* **2002;** 18(6): 316-321.

181. **Barkhordar RA, Russel T.** Effect of doxycycline on the apical seal of retrograde filling materials. *J Calif Dent Assoc,* **1998;** 26(11): 842-845.

182. **Barkhordar RA, Watanabe LG, Marshall GW, Hussain MZ.** Removal of intracanal smear by doxycycline in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,* **1997;** 84(4): 420-423.

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

184. **Haapasalo M SY, Lin JS, Park E, Qian W, Wang Z.** Irrigants and Intracanal Medicaments. In: Rotstein I, Ingle JI. Ingle's Endodontics 7. 7, North Carolina: PMPHUSA, 2019: 645-647.

185. **Siqueira JF, Jr., 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;** 30(4): 279-282.

186. **Al-Ali M, Sathorn C, Parashos P.** Root canal debridement efficacy of different final irrigation protocols. *Int Endod J,* **2012;** 45(10): 898-906.

187. **Heling I, Chandler NP.** Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J,* **1998;** 31(1): 8-14.

188. **Yao CS, Waterfield JD, Shen Y, Haapasalo M, Macentee MI.** In vitro antibacterial effect of carbamide peroxide on oral biofilm. *J Oral Microbiol,* **2013;** 5.

189. **Tello-Barbaran J, Nakata HM, Salcedo-Moncada D, Bramante CM, Ordinola-Zapata R.** The antimicrobial effect of iodine-potassium iodide after cleaning and shaping procedures in mesial root canals of mandibular molars. *Acta Odontol Latinoam,* **2010;** 23(3): 244-247.

190. **Haapasalo M SY, Lin JS, Park E, Qian W, Wang Z.** Irrigants and Intracanal Medicaments. In: Rotstein I, Ingle JI. Ingle's Endodontics 7. 7, North Carolina: PMPHUSA, 2019: 648-649.

191. Peters OA, Peters CI, Basrani B. Cleaning and Shaping the Root Canal System. In: Hargreaves, KM. Cohen's Pathways of the Pulp. 11th, Canada: Elsevier, 2016: 296. In.

192. **Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D.** In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on Enterococcus faecalis. *Eur J Oral Sci,* **2004;** 112(4): 326-331.

193. Peters OA, Peters CI, Basrani B. Cleaning and Shaping the Root Canal System. In: Hargreaves, KM. Cohen's Pathways of the Pulp. 11th, Canada: Elsevier, 2016: 260. In.

194. **Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M.** The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod,* **2012;** 38(7): 948-953.

195. **Gulabivala K, Stock CJ, Lewsey JD, Ghori S, Ng YL, Spratt DA.** Effectiveness of electrochemically activated water as an irrigant in an infected tooth model. *Int Endod J,* **2004;** 37(9): 624-631.

196. **Hata G, Hayami S, Weine FS, Toda T.** Effectiveness of oxidative potential water as a root canal irrigant. *Int Endod J,* **2001;** 34(4): 308-317.

197. **Marais JT, Williams WP.** Antimicrobial effectiveness of electro-chemically activated water as an endodontic irrigation solution. *Int Endod J,* **2001;** 34(3): 237-243.

198. **Jaju S, Jaju PP.** Newer root canal irrigants in horizon: a review. *Int J Dent,* **2011;** 2011: 851359.

199. **Russell SM.** The effect of electrolyzed oxidative water applied using electrostatic spraying on pathogenic and indicator bacteria on the surface of eggs. *Poult Sci,* **2003;** 82(1): 158-162.

200. **Del Carpio-Perochena A, Bramante CM, Duarte MA, de Moura MR, Aouada FA, Kishen A.** Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. *Restor Dent Endod,* **2015;** 40(3): 195-201.

201. **Shrestha A, Kishen A.** Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. *J Endod,* **2016;** 42(10): 1417-1426.

202. **Abbasi AJ, Mohammadi F, Bayat M, Gema SM, Ghadirian H, Seifi H, et al.** Applications of Propolis in Dentistry: A Review. *Ethiop J Health Sci,* **2018;** 28(4): 505-512.

203. **Park YK, Alencar SM, Aguiar CL.** Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem,* **2002;** 50(9): 2502-2506.

204. **Vetvicka V, Baigorri R, Zamarreno AM, Garcia-Mina JM, Yvin JC.** Glucan and humic acid: synergistic effects on the immune system. *J Med Food,* **2010;** 13(4): 863-869.

205. **Vengerovskii AI, Golovina EL, Burkova VN, Saratikov AS.** [Enteric sorbents potentiate hepatoprotective effect of eplir in experimental toxic hepatitis]. *Eksp Klin Farmakol,* **2001;** 64(1): 46-48.

206. **van Rensburg CE, van Straten A, Dekker J.** An in vitro investigation of the antimicrobial activity of oxifulvic acid. *J Antimicrob Chemother,* **2000;** 46(5): 853.

207. **Zhang H, Feng J, Zhu W, Liu C, Gu J.** Bacteriostatic effects of cerium-humic acid complex: an experimental study. *Biol Trace Elem Res,* **2000;** 73(1): 29-36.

208. **Cheng ML, Ho HY, Huang YW, Lu FJ, Chiu DT.** Humic acid induces oxidative DNA damage, growth retardation, and apoptosis in human primary fibroblasts. *Exp Biol Med (Maywood),* **2003;** 228(4): 413-423.

209. **Jose J, Krishnamma S, Peedikayil F, Aman S, Tomy N, Mariodan JP.** Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of QMiX, 2.5% Sodium Hypochlorite, 2% Chlorhexidine, Guava Leaf Extract and Aloevera Extract Against Enterococcus faecalis and Candida albicans - An in-vitro Study. *J Clin Diagn Res,* **2016;** 10(5): ZC20-23.

210. **Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, et al.** The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod,* **2011;** 37(1): 80-84.

211. **Nocca G, Ahmed HMA, Martorana GE, Calla C, Gambarini G, Rengo S, et al.** Chromographic Analysis and Cytotoxic Effects of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite Reaction Mixtures. *J Endod,* **2017;** 43(9): 1545-1552.

212. **Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS.** Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod,* **2008;** 34(12): 1521-1523.

213. **Jain P**. Rotary instruments. In: Jain P. Current Therapy in Endodontics. 1th, Dubai, UAE: Wiley Blackwell, **2016**: 76.

214. **Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M.** Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J,* **2012;** 45(4): 363-371.

215. Dentsply Sirona. Available from: https://www.dentsplysirona.com (30/06/20).

216. Essential Dental Systems. Available from: http://edsdental.com/irritrol/index.htm (30/06/20).

217. **Piperidou M, Sodhi RNS, Kolosowski KP, Basrani BR.** Effects of Final Irrigation with SmearOFF on the Surface of Dentin Using Surface Analytical Methods. *J Endod,* **2018;** 44(11): 1714-1719.

218. **Krishnan U, Saji S, Clarkson R, Lalloo R, Moule AJ.** Free Active Chlorine in Sodium Hypochlorite Solutions Admixed with Octenidine, SmearOFF, Chlorhexidine, and EDTA. *J Endod,* **2017;** 43(8): 1354-1359.

219. **Kuruvilla JR, Kamath MP.** Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod,* **1998;** 24(7): 472-476.

220. **Basrani BR, Manek S, Fillery E.** Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *J Endod,* **2009;** 35(9): 1296-1299.

221. **Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN.** Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod,* **2010;** 36(2): 312-314.

222. **Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A.** Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod,* **2007;** 33(8): 966-969.

223. **Messmer AS, Nickel CH, Bareiss D.** P-chloroaniline poisoning causing methemoglobinemia: a case report and review of the literature. *Case Rep Emerg Med,* **2015;** 2015: 208732.

224. **Matsumoto M, Aiso S, Senoh H, Yamazaki K, Arito H, Nagano K, et al.** Carcinogenicity and chronic toxicity of para-chloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J Environ Pathol Toxicol Oncol,* **2006;** 25(3): 571-584.

225. **Nowicki JB, Sem DS.** An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod,* **2011;** 37(7): 983-988.

226. **Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M.** Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J,* **2003;** 36(6): 411-417.

227. **Barakat I, ElPatal MA, Abushanan A, Abd Elrady BEA.** Antibacterial Effect of Metronidazole vs Chlorhexidine Solutions in Treatment of Root Canals of Primary Anterior Teeth. *J Contemp Dent Pract,* **2020;** 21(4): 396-399.

228. **Rodrigues CT, de Andrade FB, de Vasconcelos L, Midena RZ, Pereira TC, Kuga MC, et al.** Antibacterial properties of silver nanoparticles as a root canal irrigant against Enterococcus faecalis biofilm and infected dentinal tubules. *Int Endod J,* **2018;** 51(8): 901-911.

229. **Wen C, Kong Y, Zhao J, Li Y, Yu M, Zeng S, et al.** Efficacy of the photon-initiated photoacoustic streaming combined with different solutions on Enterococcus faecalis in the root canals. *Microsc Res Tech,* **2020;** 83(6): 647-657.

230. **Ye WH, Fan B, Purcell W, Meghil MM, Cutler CW, Bergeron BE, et al.** Anti-biofilm efficacy of root canal irrigants against in-situ Enterococcus faecalis biofilms in root canals, isthmuses and dentinal tubules. *J Dent,* **2018;** 79: 68-76.

231. **Kishen A, Shi Z, Shrestha A, Neoh KG.** An investigation on the antibacterial and antibiofilm efficacy of cationic nanoparticulates for root canal disinfection. *J Endod,* **2008;** 34(12): 1515-1520.

232. **Abbaszadegan A, Nabavizadeh M, Gholami A, Aleyasin ZS, Dorostkar S, Saliminasab M, et al.** Positively charged imidazolium-based ionic liquid-protected silver nanoparticles: a promising disinfectant in root canal treatment. *Int Endod J,* **2015;** 48(8): 790-800.

233. **Shrestha A, Fong SW, Khoo BC, Kishen A.** Delivery of antibacterial nanoparticles into dentinal tubules using high-intensity focused ultrasound. *J Endod,* **2009;** 35(7): 1028-1033.

234. **Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A.** Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod,* **2010;** 36(6): 1030-1035.

235. **Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B.** Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against Enterococcus faecalis biofilm. *J Endod,* **2014;** 40(2): 285-290.

236. **Correa JM, Mori M, Sanches HL, da Cruz AD, Poiate E, Jr., Poiate IA.** Silver nanoparticles in dental biomaterials. *Int J Biomater,* **2015;** 2015: 485275.

237. **Mohamed Hamouda I.** Current perspectives of nanoparticles in medical and dental biomaterials. *J Biomed Res,* **2012;** 26(3): 143-151.

238. **Cheng L, Weir MD, Xu HH, Antonucci JM, Kraigsley AM, Lin NJ, et al.** Antibacterial amorphous calcium phosphate nanocomposites with a quaternary ammonium dimethacrylate and silver nanoparticles. *Dent Mater,* **2012;** 28(5): 561-572.

239. **Cheng L, Zhang K, Weir MD, Liu H, Zhou X, Xu HH.** Effects of antibacterial primers with quaternary ammonium and nano-silver on Streptococcus mutans impregnated in human dentin blocks. *Dent Mater,* **2013;** 29(4): 462-472.

240. **Durner J, Stojanovic M, Urcan E, Hickel R, Reichl FX.** Influence of silver nano-particles on monomer elution from light-cured composites. *Dent Mater,* **2011;** 27(7): 631-636.

241. **Garcia-Contreras R, Argueta-Figueroa L, Mejia-Rubalcava C, Jimenez-Martinez R, Cuevas-Guajardo S, Sanchez-Reyna PA, et al.** Perspectives for the use of silver nanoparticles in dental practice. *Int Dent J,* **2011;** 61(6): 297-301.

242. **Cao W, Zhang Y, Wang X, Chen Y, Li Q, Xing X, et al.** Development of a novel resin-based dental material with dual biocidal modes and sustained release of Ag(+) ions based on photocurable core-shell AgBr/cationic polymer nanocomposites. *J Mater Sci Mater Med,* **2017;** 28(7): 103.

243. **Chen R, Han Z, Huang Z, Karki J, Wang C, Zhu B, et al.** Antibacterial activity, cytotoxicity and mechanical behavior of nano-enhanced denture base resin with different kinds of inorganic antibacterial agents. *Dent Mater J,* **2017;** 36(6): 693-699.

244. **Moreira DM, Oei J, Rawls HR, Wagner J, Chu L, Li Y, et al.** A novel antimicrobial orthodontic band cement with in situ-generated silver nanoparticles. *Angle Orthod,* **2015;** 85(2): 175-183.

245. **Song W, Ge S.** Application of Antimicrobial Nanoparticles in Dentistry. *Molecules,* **2019;** 24(6).

246. **Magalhaes AP, Moreira FC, Alves DR, Estrela CR, Estrela C, Carriao MS, et al.** Silver nanoparticles in resin luting cements: Antibacterial and physiochemical properties. *J Clin Exp Dent,* **2016;** 8(4): e415-e422.

247. **Cao W, Zhang Y, Wang X, Li Q, Xiao Y, Li P, et al.** Novel resin-based dental material with anti-biofilm activity and improved mechanical property by incorporating hydrophilic cationic copolymer functionalized nanodiamond. *J Mater Sci Mater Med,* **2018;** 29(11): 162.

248. **Niska K, Knap N, Kedzia A, Jaskiewicz M, Kamysz W, Inkielewicz-Stepniak I.** Capping Agent-Dependent Toxicity and Antimicrobial Activity of Silver Nanoparticles: An In Vitro Study. Concerns about Potential Application in Dental Practice. *Int J Med Sci,* **2016;** 13(10): 772-782.

249. **Perez-Diaz MA, Boegli L, James G, Velasquillo C, Sanchez-Sanchez R, Martinez-Martinez RE, et al.** Silver nanoparticles with antimicrobial activities against Streptococcus mutans and their cytotoxic effect. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,* **2015;** 55: 360-366.

250. **Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS, Gully NJ.** An in vitro model to measure the effect of a silver fluoride and potassium iodide treatment on the permeability of demineralized dentine to Streptococcus mutans. *Aust Dent J,* **2005;** 50(4): 242-245.

251. **Peng JJ, Botelho MG, Matinlinna JP.** Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *J Dent,* **2012;** 40(7): 531-541.

252. **Wu MY, Suryanarayanan K, van Ooij WJ, Oerther DB.** Using microbial genomics to evaluate the effectiveness of silver to prevent biofilm formation. *Water Sci Technol,* **2007;** 55(8-9): 413-419.

253. **Horst JA, Ellenikiotis H, Milgrom PL.** UCSF Protocol for Caries Arrest Using Silver Diamine Fluoride: Rationale, Indications and Consent. *J Calif Dent Assoc,* **2016;** 44(1): 16-28.

254. **Suganya S, Ahila SC, Kumar BM, Kumar MV.** Evaluation and comparison of anti-Candida effect of heat cure polymethylmethacrylate resin enforced with silver nanoparticles and conventional heat cure resins: an in vitro study. *Indian J Dent Res,* **2014;** 25(2): 204-207.

255. **de Almeida J, Cechella BC, Bernardi AV, de Lima Pimenta A, Felippe WT.** Effectiveness of nanoparticles solutions and conventional endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilm. *Indian J Dent Res,* **2018;** 29(3): 347-351.

256. **Espinosa-Cristobal LF, Martinez-Castanon GA, Loyola-Rodriguez JP, Nino-Martinez N, Ruiz F, Zavala-Alonso NV, et al.** Bovine Serum Albumin and Chitosan Coated Silver Nanoparticles and Its Antimicrobial Activity against Oral and Nonoral Bacteria. *Journal of Nanomaterials,* **2015;** 2015.

257. **Espinosa-Cristobal LF, Martinez-Castanon GA, Martinez-Martinez RE, Loyola-Rodriguez JP, Patino-Marin N, Reyes-Macias JF, et al.** Antibacterial effect of silver nanoparticles against Streptococcus mutans. *Materials Letters,* **2009;** 63(29): 2603-2606.

258. **Halkai KR, Mudda JA, Shivanna V, Rathod V, Halkai R.** Antibacterial Efficacy of Biosynthesized Silver Nanoparticles against Enterococcus faecalis Biofilm: An in vitro Study. *Contemp Clin Dent,* **2018;** 9(2): 237-241.

259. **Afkhami F, Akbari S, Chiniforush N.** Entrococcus faecalis Elimination in Root Canals Using Silver Nanoparticles, Photodynamic Therapy, Diode Laser, or Laser-activated Nanoparticles: An In Vitro Study. *J Endod,* **2017;** 43(2): 279-282.

260. **Takamiya AS, Monteiro DR, Bernabe DG, Gorup LF, Camargo ER, Gomes-Filho JE, et al.** In Vitro and In Vivo Toxicity Evaluation of Colloidal Silver Nanoparticles Used in Endodontic Treatments. *J Endod,* **2016;** 42(6): 953-960.

261. **Ballal NV, Shavi GV, Kumar R, Kundabala M, Bhat KS.** In vitro sustained release of calcium ions and pH maintenance from different vehicles containing calcium hydroxide. *J Endod,* **2010;** 36(5): 862-866.

262. **Ionescu A, Harris D, Selvaganapathy PR, Kishen A.** Electrokinetic transport and distribution of antibacterial nanoparticles for endodontic disinfection. *Int Endod J,* **2020;** 53(8): 1120-1130.

263. **Shariatinia Z.** Pharmaceutical applications of chitosan. *Adv Colloid Interface Sci,* **2019;** 263: 131-194.

264. **Kong M, Chen XG, Xing K, Park HJ.** Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *Int J Food Microbiol,* **2010;** 144(1): 51-63.

265. **Cordeiro AL, Hippius C, Werner C.** Immobilized enzymes affect biofilm formation. *Biotechnol Lett,* **2011;** 33(9): 1897-1904.

266. **Tetz GV, Artemenko NK, Tetz VV.** Effect of DNase and antibiotics on biofilm characteristics. *Antimicrob Agents Chemother,* **2009;** 53(3): 1204-1209.

267. **Tetz VV, Tetz GV.** Effect of extracellular DNA destruction by DNase I on characteristics of forming biofilms. *DNA Cell Biol,* **2010;** 29(8): 399-405.

268. **Yu MK, Kim MA, Rosa V, Hwang YC, Del Fabbro M, Sohn WJ, et al.** Role of extracellular DNA in Enterococcus faecalis biofilm formation and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Appl Oral Sci,* **2019;** 27: e20180699.

269. **Jakubovics NS, Shields RC, Rajarajan N, Burgess JG.** Life after death: the critical role of extracellular DNA in microbial biofilms. *Lett Appl Microbiol,* **2013;** 57(6): 467-475.

270. **Molin S, Tolker-Nielsen T.** Gene transfer occurs with enhanced efficiency in biofilms and induces enhanced stabilisation of the biofilm structure. *Curr Opin Biotechnol,* **2003;** 14(3): 255-261.

271. **Chaignon P, Sadovskaya I, Ragunah C, Ramasubbu N, Kaplan JB, Jabbouri S.** Susceptibility of staphylococcal biofilms to enzymatic treatments depends on their chemical composition. *Appl Microbiol Biotechnol,* **2007;** 75(1): 125-132.

272. **Schneider SW.** A comparison of canal preparations in straight and curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol,* **1971;** 32(2): 271-275.

273. **Ruiz-Linares M, Aguado-Perez B, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM.** Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. *Int Endod J,* **2017;** 50(1): 77-83.

274. **Albuquerque MTP, Nagata J, Bottino MC.** Antimicrobial Efficacy of Triple Antibiotic-eluting Polymer Nanofibers against Multispecies Biofilm. *J Endod,* **2017;** 43(9S): S51-S56.

275. **Bin Ahmad M, Lim JJ, Shameli K, Ibrahim NA, Tay MY.** Synthesis of silver nanoparticles in chitosan, gelatin and chitosan/gelatin bionanocomposites by a chemical reducing agent and their characterization. *Molecules,* **2011;** 16(9): 7237-7248.

276. **Soares GM, Figueiredo LC, Faveri M, Cortelli SC, Duarte PM, Feres M.** Mechanisms of action of systemic antibiotics used in periodontal treatment and mechanisms of bacterial resistance to these drugs. *J Appl Oral Sci,* **2012;** 20(3): 295-309.

277. **Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR.** Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases. *J Endod,* **2004;** 30(5): 315-320.

278. **Sedgley CM, Lennan SL, Clewell DB.** Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci. *Oral Microbiol Immunol,* **2004;** 19(2): 95-101.

279. **Lee W, Lim S, Son HH, Bae KS.** Sonicated extract of Enterococcus faecalis induces irreversible cell cycle arrest in phytohemagglutinin-activated human lymphocytes. *J Endod,* **2004;** 30(4): 209-212.

280. **Hubble TS, Hatton JF, Nallapareddy SR, Murray BE, Gillespie MJ.** Influence of Enterococcus faecalis proteases and the collagen-binding protein, Ace, on adhesion to dentin. *Oral Microbiol Immunol,* **2003;** 18(2): 121-126.

281. **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;** 36(5): 842-846.

282. **Burmolle M, Webb JS, Rao D, Hansen LH, Sorensen 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;** 72(6): 3916-3923.

283. **Kara D, Luppens SB, 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;** 114(1): 58-63.

284. **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;** 29(8): 917-928.

285. **Ozok AR, Wu MK, Luppens SB, 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): 819-822.

286. **De Meyer S, Meire MA, Coenye T, De Moor RJ.** Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. *Int Endod J,* **2017;** 50(5): 472-479.

287. **Layton G, Wu WI, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A.** Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *J Endod,* **2015;** 41(6): 884-889.

288. **Mohmmed SA, Vianna ME, Penny MR, Hilton ST, Mordan N, Knowles JC.** A novel experimental approach to investigate the effect of different agitation methods using sodium

hypochlorite as an irrigant on the rate of bacterial biofilm removal from the wall of a simulated root canal model. *Dent Mater,* **2016;** 32(10): 1289-1300.

289. **Du T, Wang Z, Shen Y, Ma J, Cao Y, Haapasalo M.** Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. *J Endod,* **2014;** 40(4): 509-514.

290. **Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M.** Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *Journal of endodontics,* **2011;** 37(5): 657-661.

291. **Wang Z, Shen Y, Haapasalo M.** Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals. *J Endod,* **2012;** 38(10): 1376-1379.

292. **Chambless JD, Hunt SM, Stewart PS.** A three-dimensional computer model of four hypothetical mechanisms protecting biofilms from antimicrobials. *Appl Environ Microbiol,* **2006;** 72(3): 2005-2013.

293. **Flemming HC, Wingender J.** The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol,* **2010;** 8(9): 623-633.

294. **Schlafer S, Garcia J, Meyer RL, Vaeth M, Neuhaus KW.** Effect of DNase Treatment on Adhesion and Early Biofilm Formation of Enterococcus Faecalis. *Eur Endod J,* **2018;** 3(2): 82-86.

295. **Guiton PS, Hung CS, Kline KA, Roth R, Kau AL, Hayes E, et al.** Contribution of autolysin and Sortase a during Enterococcus faecalis DNA-dependent biofilm development. *Infect Immun,* **2009;** 77(9): 3626-3638.

296. **Furukawa S, Nojima N, Yoshida K, Hirayama S, Ogihara H, Morinaga Y.** The importance of inter-species cell-cell co-aggregation between Lactobacillus plantarum ML11-11 and Saccharomyces cerevisiae BY4741 in mixed-species biofilm formation. *Biosci Biotechnol Biochem,* **2011;** 75(8): 1430-1434.

297. **Bramante CM, Duque JA, Cavenago BC, Vivan RR, Bramante AS, de Andrade FB, et al.** Use of a 660-nm Laser to Aid in the Healing of Necrotic Alveolar Mucosa Caused by Extruded Sodium Hypochlorite: A Case Report. *J Endod,* **2015;** 41(11): 1899-1902.

298. **Spencer HR, Ike V, Brennan PA.** Review: the use of sodium hypochlorite in endodontics--potential complications and their management. *Br Dent J,* **2007;** 202(9): 555-559.

299. **Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH.** Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod,* **1985;** 11(12): 525-528.

300. **Samiei M, Farjami A, Dizaj SM, Lotfipour F.** Nanoparticles for antimicrobial purposes in Endodontics: A systematic review of in vitro studies. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl,* **2016;** 58: 1269-1278.

301. **Rai MK, Deshmukh SD, Ingle AP, Gade AK.** Silver nanoparticles: the powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J Appl Microbiol,* **2012;** 112(5): 841-852.

302. **Del Carpio-Perochena A, Kishen A, Shrestha A, Bramante CM.** Antibacterial Properties Associated with Chitosan Nanoparticle Treatment on Root Dentin and 2 Types of Endodontic Sealers. *J Endod,* **2015;** 41(8): 1353-1358.

303. **Yoksan R, Chirachanchai S.** Silver nanoparticles dispersing in chitosan solution: preparation by γ-ray irradiation and their antimicrobial activities. *Materials Chemistry and Physics,* **2009;** 115(1): 296-302.

304. **Jacinto RC, Gomes BP, 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;** 54(Pt 8): 777-783.

305. **Rocas IN, Lima KC, Siqueira JF, Jr.** Reduction in bacterial counts in infected root canals after rotary or hand nickel-titanium instrumentation--a clinical study. *Int Endod J,* **2013;** 46(7): 681-687.

306. **Siqueira JF, Jr., Rocas IN.** Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res,* **2009;** 88(11): 969-981.

307. **Ureyen Kaya B, Erik CE, Sesli Cetin E, Kole M, Maden M.** Mechanical reduction in intracanal Enterococcus faecalis when using three different single-file systems: an ex vivo comparative study. *Int Endod J,* **2019;** 52(1): 77-85.

308. **Alves FR, Rocas IN, Almeida BM, Neves MA, Zoffoli J, Siqueira JF, Jr.** Quantitative molecular and culture analyses of bacterial elimination in oval-shaped root canals by a single-file instrumentation technique. *Int Endod J,* **2012;** 45(9): 871-877.

309. **Amos WB, White JG.** How the Confocal Laser Scanning Microscope entered Biological Research. *Biology of the Cell,* **2003;** 95(6): 335-342.

310. **Kishen A, Shrestha A, Del Carpio-Perochena A.** Validation of Biofilm Assays to Assess Antibiofilm Efficacy in Instrumented Root Canals after Syringe Irrigation and Sonic Agitation. *J Endod,* **2018;** 44(2): 292-298.

311. **Parmar D, Hauman CH, Leichter JW, McNaughton A, Tompkins GR.** Bacterial localization and viability assessment in human ex vivo dentinal tubules by fluorescence confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J,* **2011;** 44(7): 644-651.

312. **Du T, Shi Q, Shen Y, Cao Y, Ma J, Lu X, et al.** Effect of modified nonequilibrium plasma with chlorhexidine digluconate against endodontic biofilms in vitro. *J Endod,* **2013;** 39(11): 1438-1443.

313. **Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Junior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M.** Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J,* **2014;** 47(11): 1058-1063.

314. **Berney M, Hammes F, Bosshard F, Weilenmann HU, Egli T.** Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight Kit in combination with flow cytometry. *Appl Environ Microbiol,* **2007;** 73(10): 3283-3290.

315. **Christiansen T, Michaelsen S, Wumpelmann M, Nielsen J.** Production of savinase and population viability of Bacillus clausii during high-cell-density fed-batch cultivations. *Biotechnol Bioeng,* **2003;** 83(3): 344-352.

316. **Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP.** Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods,* **2003;** 55(3): 585-597.

317. **Menezes MM, Valera MC, Jorge AO, Koga-Ito CY, Camargo CH, Mancini MN.** In vitro evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J,* **2004;** 37(5): 311-319.

318. **Hope CK, Garton SG, Wang Q, Burnside G, Farrelly PJ.** A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using Enterococcus faecalis. *Arch Microbiol,* **2010;** 192(9): 775-781.

319. **Moghadas L, Shahmoradi M, Narimani T.** Antimicrobial activity of a new nanobased endodontic irrigation solution: In vitro study. *Dental Hypotheses,* **2012;** 3(4): 142.

320. **Roshdy NN, Kataia EM, Helmy NA.** Assessment of antibacterial activity of 2.5% NaOCl, chitosan nano-particles against Enterococcus faecalis contaminating root canals with and without diode laser irradiation: an in vitro study. *Acta Odontol Scand,* **2019;** 77(1): 39-43.

321. **Jaiswal N, Sinha DJ, Singh UP, Singh K, Jandial UA, Goel S.** Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on Enterococcus faecalis biofilm : An in vitro study. *J Clin Exp Dent,* **2017;** 9(9): e1066-e1074.

8. EKLER

8.1. Etik Kurul Onay Formu

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU ONAYI
BOLU ABANT IZZET BAYSAL UNIVERSITY CLINICAL RESEARCHES ETHICS COMMITTEE APPROVAL

Sayı : 129 — 27./6./2020

Konu: Kararlar

BAŞVURU BİLGİLERİ (APPLICATION INFORMATION)		
	ARAŞTIRMANIN ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Farklı İçeriğe Sahip İrrigasyon Solusyonları ve Çeşitli Enzimlerin Kombine Kullanımının *Enterococcus Faecalis* Biyofilmi Üzerindeki Antimikrobiyal Etkinliğinin Değerlendirilmesi.
	ARAŞTIRMANIN İNGİLİZCE ADI (TITLE OF THE PROJECT)	Evaluation of the Antimicrobial Effectiveness Combined Use of Different Content Irrigation Solutions and Various Enzymes on *Enterococcus Faecalis* Biofilm.
	SORUMLU ARAŞTIRMACI (PRINCIPAL INVESTIGATER)	Dr.Öğr.Üyesi Zeliha UĞUR AYDIN
	DİĞER ARAŞTIRMACILAR (OTHER INVESTIGATERS)	Arş.Gör.Tülin DOĞAN
	ARAŞTIRMA MERKEZİ (RESEARCH CENTER)	Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı

KARAR (DECISION)		
	Karar no (Decision No): 2020/62	**Tarih (Date) 17.03.2020**
	Dr.Öğr.Üyesi Zeliha UĞUR AYDIN 'ın sorumluluğunda yapılması tasarlanan ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma dosyası ve ilgili belgelerin incelenmesi sonucunda araştırmanın gerçekleştirilmesinde etik yönden sakınca olmadığına mevcudun oy birliği/oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

Üyeler	Uzmanlık alanı	Kurumu	İmzası
Prof. Dr. Mehmet Hayri ERKOL (Başkan)	Genel Cerrahi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç.Dr. Erkan KILINÇ (Başkan Yardımcısı)	Fizyoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Mehmet Hamid BOZTAŞ (Üye)	Ruh Sağlığı Hastalıkları	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Doç. Dr. Akif Hakan KURT (Üye)	Farmakoloji	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Oya KALAYCIOĞLU (Bildirimden Sorumlu Üye)	Biyoistatistik	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Makbule TOKUR KESGİN (Üye)	Hemşirelik	BAİBÜ Sağlık Bilimleri Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Ahmet YÜKSEL (Üye)	Kalp Damar Cerrahisi	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Hamit YOLDAŞ (Üye)	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Öğr. Üyesi Abdulgani KAYMAZ (Üye)	Göz Hastalıkları	BAİBÜ Tıp Fakültesi	
Dr. Hatice Selen SÖYLEMEZ (Üye)	Farmakolog/Eczacı	Özel Eczane (BOLU)	
Av. Huri Hülya GÜNEŞ COŞKUN (Üye)	Hukukçu	Özel Hukuk Bürosu (BOLU)	
Ramazan KAYNARPINAR (Sivil-Üye)	Esnaf	Serbest Meslek (BOLU)	

9. ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

AD/ SOYAD: Tülin DOĞAN
ADRES: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı/ BOLU
e-posta: dt.tulin153@gmail.com
UYRUK: T.C.
DOĞUM TARİHİ VE YERİ: 28.09.1990/ ANKARA
CİNSİYET: Kadın

Eğitim ve Öğretim

LİSE: İzmir Nevvar Salih İşgören Lisesi (2004-2007)
ÜNİVERSİTE: Cumhuriyet Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi (2008-2013)
UZMANLIK: Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı (2017-2020)
YABANCI DİL: İngilizce