



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ

**DİYOT LAZER KULLANIMININ *ENTEROCOCCUS FAECALIS*
BİYOFİLMİ ÜZERİNE ETKİSİNİN *İN VİTRO* OLARAK
İNCELENMESİ**

DİŞ HEKİMLİĞİ UZMANLIK TEZİ

Dt. Mira KEBUDİ BENEZRA

Endodonti Anabilim Dalı

DANIŞMAN

Yrd.Doç.Dr. Asiye Nur Dinçer

Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası:12.2016/22)

İSTANBUL-2017

ONAY

TEŞEKKÜRLER

İÇİNDEKİLER

ONAY	ii
TEŞEKKÜRLER	iii
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
KISALTMALAR VE SİMGELER LİSTESİ.....	viii
ÖZET.....	x
SUMMARY.....	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Kök Kanal Mikroflorası:	4
2.1.1 Primer endodontik enfeksiyonlar :	4
2.1.2 Sekonder ve inatçı endodontik enfeksiyonlar:.....	4
2.2 Biyofilm	5
2.2.1 Endodontik biyofilm	6
2.2.1.1 <i>Enterococcus faecalis</i> 'in endodontik biyofilmdeki yeri	8
2.3.1 İrrigasyon solüsyonları	10
2.3.1.1 Serum fizyolojik (SF).....	12
2.3.1.2 Sodyum Hipoklorit (NaOCl).....	12
2.3.1.3 Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)	14
2.3.2 Lazer	16
2.3.2.1 Diyet lazer	22
3.GEREÇ VE YÖNTEM.....	25
3.1 Örneklerin Hazırlanması.....	25
3.2 Kök kanallarının <i>E. faecalis</i> ile enfekte edilmesi.....	27
3.3 DeneY ve kontrol gruplarının oluşturulması.....	29
3.3.1 Tedavi öncesi kök kanallarından örnek alınması.....	29
3.3.2 DeneY gruplarına uygulanan tedavi protokolleri.....	31
3.3.3 Tedavi sonrası örneklerin alınması	35
3.4 SEM için Örneklerin Hazırlanması ve İncelenmesi	36
3.5 Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Değerlendirme.....	37
4. BULGULAR.....	38
5.TARTIŞMA	43

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	51
7. ÖZGEÇMİŞ.....	52
8. KAYNAKLAR	53

TABLolar LİSTESİ

Tablo2.1 Diş hekimliğinde en sık kullanılan lazerler.....	22
Tablo4.1 Gruplar arası tedavi öncesi ve tedavi sonrası bakteri sayısı değerlendirilmesi.....	38
Tablo4.2: Gruplar arası tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayılarında görülen yüzde değişimin değerlendirilmesi.....	39
Tablo4.2a Post hoc değerlendirme.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil2.1 Bazı moleküllerin çeşitli dalga boylarına göre absorpsiyon katsayılar.....	18
Şekil2.2 Lazer ışığı-doku etkileşimleri.....	19
Şekil2.3 Lazer ışığının farklı yayılma şekilleri.....	21
Şekil 2.4 Elektromanyetik spektrumda LAZER dalga boyları.....	21
Şekil2.5 810 nm diyot lazer, fiber uç apiklenden 1mm geride ve ışının dentin tubülündenki penetrasyon derinliği 750µm.....	24
Şekil3.1 Şekillendirme işlemi tamamlanan ve apikalleri kompozit ile kapatılan dişler.....	26
Şekil3.2 Bakteri süspansiyonu eklenmiş mikro santrifüj tüpler içindeki dişler.....	27
Şekil3.3 Kültürün saflığını kontrol amaçlı yapılan ekimler.....	27
Şekil3.4Vitek cihazı.....	28
Şekil3.5 Sonikasyon cihazı.....	29
Şekil3.5a Vorteks işlemi.....	30
Şekil3.6 Farklı dilüsyonların hazırlanması	30
Şekil3.7 Birinci grup, birinci dişten alınan örneğin tedavi öncesi koloni sayımı.....	31
Şekil3.8 Fiber uç ile apikalden koronale doğru dairesel hareketlerle lazer uygulanması.....	32
Şekil3.9 Grup 1: 1 W, 810 nm diyot lazer.....	32
Şekil3.10 Grup 2: 1,5 W, 810nm diyot lazer.....	33
Şekil3.11 Grup 3: 5ml %5,25 NaOCl ile 1dk irrigasyon.....	34
Şekil3.12 Grup 4: 5ml serum fizyolojik ile irrigasyon.....	34
Şekil3.13 Tedavi öncesi ve sonrası örneklerin hazırlanması.....	35
Şekil3.13a <i>E. faecalis</i> inokülasyonları yapılmış farklı tedavi grupları.....	36
Şekil4.1 Tüm gruplardaki öncesi-sonrası bakteri sayıları.....	39
Şekil4.2 Tedavi sonrası bakteri yüzde değişimi.....	40
Şekil4.3 SF grubu dişlerden alınan SEM görüntüsü.....	41
Şekil4.3a: SF grubu dişlerden alınan SEM görüntüsü.....	41
Şekil4.4: Negatif grup dişlerden alınan SEM görüntüsü.....	42
Şekil4.4a: Negatif grup dişlerden alınan SEM görüntüsü.....	42

KISALTMALAR ve SİMGELER LİSTESİ

ark.: arkadaşları

ace: Kollojen bağlayan protein

ATCC: Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu

CFU: Koloni Oluşturan Birimler (Colony Forming Units)

CO₂: Karbondioksit

EDTA: Etilendiamintetraasetik Asit

E. coli: Esherichia coli

E. faecalis: *Enterococcus faecalis*

efa A: Enterococcus faecalis antijen A

EPS: Ekstraselüler Polimerik Matriks

Er,Cr:YSGG: Erbium, Chromium-doped:Yttrium, Scandium, Gallium ve Garnet

Er:YAG: Erbiyum:Yttrium-Aluminyum-Garnet

EPS: ekstraselüler polimerik yapı (extracellular polymeric structure)

Esp: Enterokokal yüzey proteini

G: Gauge

geIE: Jelatinaz enzimi

Ga-Al-As: Galyum Alüminyum Arsenik

Hz: Hertz

In-Ga-As: İndiyum Galyum Arsenik

IBM: International Business Machines (Uluslararası İş Makineleri)

LASER: Light Amplification by Stimulated Emission of Raddition

J: MiliJoule

ml: Mililitre

NaCl: salin

NaOCl: Sodyum Hipoklorit

Nd:YAG: Neoymium:Yttrium-Aluminium-Garnet

nm: Nanometre

PBS: Fosfat tamponlanmış solüsyon

PDT: Fotodinamik Tedavi

pH: Hidrojenin Gücü (Power of Hydrogen)

RCC: Bakteri yüzde değişimi (Colony count reduction)

sn: Saniye

SEM: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)

TEM: Taramalı elektron mikroskobu

TSA: Triptik soy agar

W: Watt

µm: Mikrometre

°C: Santigrat derece

%: Yüzde

ÖZET

Bu *in vitro* çalışmanın amacı, 810 nm lazer'in *Enterococcus faecalis* üzerindeki etkinliğinin incelenmesi ve NaOCl irrigasyon solüsyonu ile karşılaştırılmasıdır. Böylece kök kanal dezenfeksiyonunda alternatif bir yöntem olarak öne sürülen lazer sistemlerinden 810 nm lazerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin değerlendirilmesidir.

Bu çalışmada 50 adet çekilmiş tek kök insan dişi kullanıldı. Dişler elmas frez (Dentsply / Maillefer, Tulsa, OK, ABD) ile kron kısımlarından kesilerek kanal boyları 14 mm olacak şekilde ayarlandı. Kök kanallarının kemomekanik şekillendirilmesi paslanmaz çelik el aletleri ile %5,25 NaOCl (Cerkamed, Pawłowski, Polonya) solüsyonu kullanılarak yapıldı. Şekillendirme sonrası 5 ml %17 EDTA (MD-Cleanser™, Meta Biomed Co. Ltd., Cheongju City, Chungbuk, Korea) solüsyonu ile smear tabakası uzaklaştırıldı ve en son 5 ml salin ile irrigasyon işlemi tamamlandı. 2 ml'lik tüplere yerleştirilen dişler 121° C'de 15 dakika otoklavda steril edildi. Kökler rastgele 4 deney ve negatif kontrol grubuna ayrıldı. Tüm deney grupları negatif kontroller hariç 21 gün süresince *E. faecalis* ATCC 29212 suşu ile inkübe edildi. Tedavi öncesi örnekler 40 numara H- tipi eğe ile kazıma işlemi ve kök kanalında 30 sn bekletilen kağıt kon ile örnek alındı. Ardından deney gruplarına şu şekilde tedavi prokolleri uygulandı; Grup 1: %17 EDTA + 1W diyot lazer + salin, Grup 2: %17 EDTA +1,5W diyot lazer + salin, Grup 3: % 17 EDTA + %5,25 NaOCl + salin, Grup 4: 5 ml Serum fizyolojik (SF). Tedavi sonrası mikrobiyolojik örnek toplamak için 45 numara H- tipi eğe ile kazıma işlemi yapıldı. Hem H- tipi eğe hem de kanal içinde bekletilen kağıt kon fosfat tamponlanmış solüsyon (PBS) içeren mikrosantifüj tüplerine aktarıldı. Mikrobiyolojik değerlendirme, koloni oluşturan birimler (CFU) sayımı ile yapıldı. Her bir diş tedavi öncesi ve sonrası için koloni sayısındaki azalma yüzde olarak hesaplandı. Her deney grubunda yer alan negatif kontrol dişlerden ve 4 adet SF grubu dişinden taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile görüntüler alındı.

İstatistiksel değerlendirmeler için Wilcoxon testi ile Mann Whitney U testi kullanıldı.

Anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi. Sonuç olarak Grup 4 ($p:0.386$; $p > 0,05$) dışında her deney grubu kendi içinde değerlendirildiğinde bakteri sayısındaki azalma tedavi öncesine (Grup 1 $p:0.012$; $p < 0.05$; Grup 2 $p:0.012$; $p < 0.05$; Grup 3 $p:0.002$; $p < 0.05$) göre anlamlı bulunmuştur. Ancak Grup 3'te görülen yüzde düşüş miktarı Grup 1 ($p:0.000$), Grup 2 ($p:0.000$) ve Grup 4'ten ($p:0.000$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$).

Deney gruplarının hiçbirinde *E. faecalis* tümüyle elimine edilememiştir ve diyet lazerin antibakteriyel etkinliği NaOCl'den daha az bulunmuştur. Ancak lazer güç parametresindeki artış antibakteriyel etkinliği arttırmıştır.

Anahtar Kelimeler: biyofilm, diyet lazer, *E. faecalis*, sodyum hipoklorit,

SUMMARY

The aim of this *in vitro* study is to evaluate the antibacterial efficacy of 810 nm diode laser on the root canals infected with *E. Faecalis*.

In this study 52 single-rooted permanent human teeth were used. The teeth were cut from the crowns with diamond-bur and the root canal lengths were adjusted to be 14 mm. Root canals were instrumented using stainless steel hand instruments up to #40 H file with 5.25% NaOCl irrigation. After completion of the instrumentation, the canals rinsed with 5ml of 17% EDTA solution to remove the smear layer. Eventually all canals rinsed with 5 ml saline solution. The teeth placed in 2 ml tubes were sterilized in an autoclave for 15 minutes at 121 °C. Roots were randomly assigned to 4 experimental and negative control groups. All experimental groups were incubated with strains for 21 days (ATCC 29212) except for negative controls. Pre-treatment (PT) samples were obtained from all experimental groups by excavation with # 40 H files. The treatment groups applied to the experimental groups are as follows; Group 1: 17% EDTA + 1W diode laser + saline, Group 2: 17% EDTA + 1.5W diode laser + saline, Group 3: 17% EDTA + 5,25% NaOCl + saline, Group 4: saline. After treatment dentin scraped from the inside root canals using a # 45 H file and paper point placed root canal 20 seconds were transferred into steril microtube. Colony forming units (CFU) were counted by microbiological evaluation in pre-treatment and post-treatment samples. The reduction in the number of colonies before and after each dental treatment was calculated as a percentage. Negative control teeth and four teeth from SF group were examined in SEM.

Wilcoxon test and Mann Whitney U test were used for statistical evaluations. Significance level was accepted as $p < 0,05$. According to the results; significant microbial reduction was found both laser groups (Group 1 $p:0.012$, $p < 0.05$, Group 2 $p:0.012$, $p < 0.05$) and Group 3 ($p: 0.002$; $p < 0.05$) post disinfection procedure.

However, the percentage of reduction in Group 3 was significantly higher than other groups (Group 1 (p: 0.000), Group 2 (p: 0.000) and Group 4 (p: 0.000); $p < 0.05$) and diode laser were not found as effective as NaOCl irrigation.

Key words: biofilm, diode laser, *E. faecalis*, sodium hypochloride,

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Başarılı kök kanal tedavisi, pulpa dokusunun, dentin debrisinin ve enfektif doku ve mikroorganizmaların kemomekanik şekillendirme ile uzaklaştırılmasına ve ardından kök kanal sisteminin üç boyutlu sızdırmaz bir şekilde doldurulmasına bağlıdır [1, 2]

Pulpal ve periodontal hastalıkların meydana gelmesinde birincil etiyolojik faktörün bakteriler olduğu çok uzun zamandır bilinmektedir ve kök kanal tedavisinde uzun süreli başarı, enflamasyona neden olan bakterilerin yok edilmesiyle yakından ilişkilidir [3, 4] Başarısız kök kanal tedavilerinde en çok izole edilen bakteri *Enterococcus faecalis*'tir (*E. faecalis*) [5]. Fakültatif anaerob gram pozitif kok olan *E. faecalis*, tedaviye dirençli apikal periodontitisin en sık görülen etkeni olarak kabul edilmektedir [6, 7]. Başarısız kök kanal tedavilerinde yoğun olarak gözlenmesinin nedeni, diğer mikroorganizmalara oranla dentin kanalcıklarına daha yoğun invazyon göstererek diğer mikroorganizmaların yaşamalarına olanak bırakmayacak şekilde ortamdaki besinleri tüketmeleri ve yaşamsal virulans faktörlerinin fazla olması ile açıklanmaktadır [8, 9].

Kök kanalının geleneksel dezenfeksiyonu, geleneksel mekanik şekillendirme, dezenfeksiyon solüsyonlarının kullanımı ve seanslar arasında kanal içi medikamentlerin yerleştirilmesiyle gerçekleştirilir [10]. Mekanik şekillendirme ile antibakteriyel irrigasyonun kombinasyonu olan kemomekanik şekillendirme kök kanal dezenfeksiyonunda önemli bir rol oynamaktadır [11]. Ancak kök kanal sisteminde bakterilerin tamamen eliminasyonu çoğu zaman karışık kök kanal geometrisi ve anatomik karmaşıklıklar nedeniyle zordur [12].

Günümüzde sodyum hipoklorit (NaOCl) en yaygın olarak kullanılan dezenfeksiyon solüsyonudur [13]. Ancak bununla birlikte NaOCl biyolojik olarak sitotoksik bir maddedir. Etkinliğinin konsantrasyonuna bağlı olması, periapikal bölgedeki dokular için toksik etkisinin olması, tadı ve kokusunun kötü olması, el aletlerinde korozyona neden olması, etki süresinin uzun olması, alerjik reaksiyonlara yol açabilmesi gibi yan etkileri bulunmaktadır [2].

Geleneksel endodontik tedavide asıl sorun, dezenfeksiyon işlemleriyle ulaşılabilen penetrasyon derinliğidir. Bakteriler dentinal tübüllere 1000 µm derinliğe kadar kolonize olabilirken, geleneksel yıkama solüsyonları yüzey gerilimlerine bağlı olarak yaklaşık 100-130µm kadar penetre olabilmektedirler [13]. NaOCl dentin tübüllerine 130 µm derinliğe kadar penetre olabilmesine rağmen, daha derin tabakalara etki edememektedir. *E. faecalis* gibi inatçı bakteriler ise dentinal tübüllerin 500 µm içerisine kadar penetre olabilmekte dolayısıyla endodontide kullanılan pek çok kimyasal dezenfektana direnç gösterebilmektedirler [14].

Son yıllarda endodontik tedavide farklı dalga boylarında lazerler kullanılmaktadır. Kök kanal dezenfeksiyonunda kullanılan lazer ışını ile geleneksel yöntemlerle ulaşılamayan dentin tübülleri, lateral kanal, isthmus gibi bölgelere ulaşabildiği düşünülmektedir. Bu yönüyle endodonti pratiğinde lazerlerin dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaya başlanmasıyla kök kanal tedavisi başarısında artış olduğu bildirilmektedir [15].

Bu çalışmada amaç; farklı güçlerde uygulanan 810 nm diyot lazerin üç haftalık *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin *in vitro* olarak incelenmesi ve altın standart olarak kabul edilen NaOCl irrigasyon solüsyonu ile karşılaştırılmasıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Kök kanalı tedavisi ile kök kanal sisteminin orjinal formu korunarak kemomekanik olarak şekillendirilmesi, dezenfekte edilmesi ve iritan olmayan kanal dolgu maddeleriyle üç boyutlu olarak sızdırmaz bir şekilde doldurulması amaçlanmaktadır [16]. Ancak kök kanal sisteminin karmaşık yapısı ve özellikle biyofilm oluşturma yeteneği ile inatçı enfeksiyonlara neden olan mikroorganizmaların etkisiz hale getirilmesinde yaşanan problemler uzun dönemde kök kanal tedavisinin başarısını olumsuz etkilemektedir [4, 17, 18].

Mantar, virüs ve arkeaların son dönemlerde endodontik enfeksiyonlar ile bağlantısı bulunmuş olmasına rağmen, apikal periodontitis patogeneğinde ana mikroorganizma bakterilerdir [19-22]. Bakterilerin kök kanal sistemine girişi koronal, retrograd yollarla ve kana veya lenfatik dolaşıma geçen bir bakterinin pulpaya sürüklenmesi (anakorezis) ile olabilir. Pulpa ve periodontal dokular; dentin tübülleri, lateral veya aksesuar kanallar, furkasyon kanalları ve apikal foramen aracılığı ile yakın ilişkidedir. Buna bağlı olarak pulpa enfeksiyonunda periodontal ligament ve çevre destek dokular, çevre dokuların enfeksiyonunda da pulpa dokusu birbirlerini etkilemektedir [1].

İnsan vücudunun deri, göz, ağız, kulak yolu gibi çeşitli bölgelerinde organizmaya zarar vermeksizin gruplaşmış olarak yaşayan mikroorganizma toplulukları bulunur ve flora adını alır. Dış çevre ile teması olmayan boşluk, sıvı ve organlar ise flora taşımazlar ve sterildirler. Örneğin kanın florası olmaz. Mine - dentin bütünlüğü bozulmamış sağlıklı bir diş pulpasının da florası olmaz ve sterildir [23].

Organ ve dokuların daha lokal bir bölgesinde yaşayan mikroorganizma topluluğunu tanımlamak için mikroflora terimi kullanılır. Enfekte kök kanal florası ağız florasının herhangi bir kombinasyonundan ibarettir [2, 24].

2.1 Kök Kanal Mikroflorası:

Oral kavitede % 50 ila % 60'ının tamamen karakterize edilebildiği yaklaşık 10 milyar bakteri hücresi bulunmaktadır [6, 25, 26]. Teorik olarak oral kavitede bulunan bütün bakteri türleri kök kanalı enfeksiyonuna katılma kapasitesine sahiptir. Fakat oral kavitenin toplam florası ile kıyaslandığında sınırlı sayıda bakteri grup ve türünün enfekte kök kanallarında bulunduğu bilinmektedir [27, 28]. Farklı endodontik enfeksiyonlarda, çoğunluğu bakteri olmak üzere yaklaşık 500 farklı mikrobik tür tespit edilmiştir [29].

Endodontik enfeksiyonlar anatomik olarak buldukları yere göre intraradiküler veya ekstraradiküler olarak sınıflandırılabilirler. İnaradiküler enfeksiyonlara, kök kanal sisteminde kolonize olan mikroorganizmalar neden olmaktadır ve kök kanal sistemine girme zamanlarına göre üç alt gruba ayrılabilirler; primer, sekonder ve inatçı endodontik enfeksiyonlar [23].

2.1.1 Primer endodontik enfeksiyonlar :

Nekrotik pulpa dokusunu kolonize eden ve ilk olarak işgal eden mikroorganizmalar tarafından oluşturulmaktadır [30-33]. Primer enfeksiyonlar, anaerobik bakterilerin hakim olduğu karışık toplulukla karakterizedir. Bakteri hücrelerinin sayısı kök kanalı başına 10^3 ila 10^8 arasında değişebilmektedir. Moleküler çalışmalar, enfekte bir kanalda kanal başı ortalama 10 ila 20 farklı türün bulunduğunu göstermektedir [34-37]. Örneğin; sinüs yolu bulunan dişler ortalama 17 farklı türe sahiptir [35].

Gram negatif anaerobik türler (*Prevotella* ve *Porphyromonas* türleri), *Fusobacterium nucleatum*, streptokoklar, spiroketlar (*Treponema* türleri), *Dialister* türleri, *Psödoramibakterium* türleri, *Parvimonas micra*, *Tannerella forsthia*, *Filifactor alocis*, *Eubacterium* türleri ve *Olsenella* türleri primer enfeksiyonlarda en yaygın ve yoğun bulunan bakteri türleridir [30, 32, 38-40].

2.1.2 Sekonder ve inatçı endodontik enfeksiyonlar:

Sekonder endodontik enfeksiyonlar; primer enfeksiyonda yer almayan ve kök kanalına profesyonel müdahaleden sonra girip yerleşmiş mikroorganizmalar tarafından oluşturulan enfeksiyonlar olarak tanımlanır. İnatçı enfeksiyonlar ise primer ve sekonder enfeksiyon bakterilerince oluşturulur. Bir şekilde kemomekanik şekillendirme sırasında antimikrobiyal işlemlere direnç göstermiş ve tedavi edilen

kök kanal sisteminde besin yokluğuna dayanabilmiş bakteri türleri sorumludur [41].

Kemomekanik şekillendirme sonrası kök kanal sisteminde bir türden beş türe kadar farklılık gösterebilen ve 10^2 - 10^5 sayıda bakteri bulunabileceği gösterilmiştir. Kök kanalındaki tüm bakterileri yok etmek mümkün değilse de en azından mevcut bakteri türlerini ve sayısını en aza indirmek hedeflenmektedir [30, 33, 42-45].

Primer enfeksiyonlarda yaygın olarak bulunan gram negatif bakteriler genellikle tedavi sırasında elimine edilmektedir. Ancak istisna olarak, *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella* türleri, ve *Campylobacter rectus* gibi gram negatif anaerob türler, kök kanal şekillendirmesi ve medikasyonu sonrası kök kanalından alınan örneklerde tespit edilmiştir [30, 31, 42, 43, 46].

Kemomekanik şekillendirme ve intrakanal medikament uygulamasından hemen sonra numuneler alınarak yapılan çalışmalar kök kanal tedavisi işlemlerine direnç gösteren türlerin belirlenmesini amaçlamaktadır. Bu çalışmalarda bulunan bakteri türleri, tedavi sonucunu etkileme potansiyeline sahiptir. Birçok araştırma, hem kemomekanik şekillendirme hem de medikament uygulanması sonrası kök kanalından alınan örneklerde Gram pozitif bakterilerin daha yüksek bir oranda bulunduğunu ortaya koymaktadır [42, 47, 48]. Tespit edilen gram pozitif fakültatif veya anaerob bakteriler arasında; *Parvimonas Micra*, *Actinomyces* türleri, *Propionibacterium* türleri, *Pseudoramibacter alactolyticus*, laktobasili, *E. faecalis* ve *Olsenella uli* yer almaktadır [30, 42-46, 48-55].

Kök kanal tedavisi yapılmış ancak apikal periodontitisli, inatçı veya ikincil enfeksiyonlu dişlerdeki bakteri türlerini tanımlamak için yapılan çalışmalara göre *E. faecalis*, kök kanal tedavili dişlerde en sık rastlanan türdür ve vakaların % 90'ında görülmektedir. [56-64].

2.2 Biyofilm

Biyofilm; canlı veya cansız, herhangi bir yüzeye geri dönüşümsüz olarak mikroorganizmaların yapışması ve oluşturdukları mikrokoloniler tarafından üretilen ekstrasellüler polimerik yapı (EPS), proteinler, çevreden bağladıkları organik ve inorganik maddelerin birleşiminden oluşan bir tabaka olarak tanımlanmaktadır [65].

Biyofilm kavramı ilk olarak 17. yüzyılda Van Leeuwenhoek'un kendi dişlerindeki plaklarda, mikroskopla saptanabilen varlıkları göstermesi ile ortaya çıkmıştır ancak

biyofilmlerin tanımlanması son 40 yılda gelişmiştir [66].

Biyofilm oluşumu beş aşamadan oluşmaktadır [67, 68];

Birinci aşama: Ortamdaki protein, glikoprotein ve mikrobiyal ürünler bir yüzeye yapışarak organik bir film tabakası meydana getirir ve bakteriler bu film tabakasına tutunarak biyofilm meydana getirmek için bir dizi genetik işlem başlatmaktadır. Tutunmayı takiben biyofilm oluşumunu sağlamak amacıyla farklılaşma işleminin başlaması, “quorum sensing” yani “yeterli çoğunluk” algılaması diye de isimlendirilen bu haberleşme sistemine bağlı olarak devam etmektedir. Yüzeye tutunmuş olan her bir bakteri, ortama mesaj veren bir molekül salgılamaktadır. Yüzeye tutunan bakterilerin sayısı arttıkça, bu sinyalin lokal konsantrasyonları da artmaktadır ve sinyal moleküllerinin konsantrasyonundaki artışla birlikte biyofilm oluşumu başlamaktadır.

İkinci aşama: Bakterilerin yüzeye yapışması (adezyon) ve kuvvetli bir şekilde tutunmasından oluşmaktadır.

Üçüncü aşama: Bu evre biyofilm kalınlığı 10 μm 'yi aştığında başlar. Birinci olgunlaşma basamağı da denir. Yüzeye tutunan mikroorganizmaların çoğalmalarını ve metabolizmasını içermektedir. Bu evrede bakteriler biyofilmin en küçük birimi olan mikrokoloniler meydana getirmektedir.

Dördüncü aşama: Bu aşamada 100 μm kalınlığı aşmış olan biyofilmde mikrokoloniler büyüyerek kompleks yapılar meydana getirmektedir. İkinci olgunlaşma dönemi denir.

Beşinci aşama: Bakteri veya bakteri kümeleri biyofilm tabakasından koparak ortama yayılmaktadır. Mikroorganizmaların yüzeyden ayrılmaları gelişim sırasında sürekli devam eden bir süreç olup bu durum mikroorganizmaların başka alanlara yayılmaları ve kolonize olmaları anlamına gelmektedir.

2.2.1 Endodontik biyofilm

Endodontik mikroflora, oral mikrofloraya göre daha az çeşitlilik göstermektedir.

Endodontik enfeksiyonun ilerleyen safhalarında kök kanal sistemindeki ekolojik ortam ve besin kaynaklarının durumu değişmektedir, daha oksijensiz ve besin kaynaklarının az olduğu bir ortam oluşmaktadır. Bu değişimler ve kompleks kök kanal anatomisi hayatta kalan mikroorganizmalar için zorlu bir ekolojik ortam sunmaktadır [69]. Bu durum kök kanal sisteminde olumsuz çevresel ve beslenme koşullarında hayatta kalmayı destekleyen biyofilm oluşumunu desteklemektedir [70, 71].

Kök kanallarında biyofilm varlığı Nair tarafından ilk kez 1987 yılında geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile ortaya konmuştur [72]. Çekilmiş periapikal lezyonlu dişlerden alınan görüntülerde kanal duvarları boyunca biyofilm yapısına benzeyen yoğun rod ve kok bakteri hücrelerinden oluşan bakteri topluluğu ekstrasellüler polimer matris içine gömülü olarak görülmüştür. Daha sonra primer veya sekonder/inatçı enfeksiyonlu dişlerle yapılan morfolojik *in situ* araştırmalarda benzer görüntüler tespit edilmiştir [73-77].

Sen ve ark. enfekte dişlerin kök kanal duvarlarını SEM ile incelemiş ve bakterilerin kanal duvarlarında ve dentin tübüleri (intratübüler ve intertübüler dentin) içinde yoğun koloniler oluşturduğunu bulmuştur [78].

Ricucci & Siqueira, histobakteriyolojik ve histopatolojik bir çalışmada primer veya kanal tedavili apikal periodontitisli dişlerde biyofilm varlığını araştırmış ve primer apikal periodontitisli dişlerin %80'inde ve kanal tedavili dişlerin %74'ünde intraradiküler biyofilm yapısı bulmuştur. Biyofilm yapısı büyük apikal lezyonlu ve histopatolojik olarak kist teşhisi konulmuş dişlerde daha sık tespit edilmiştir. Büyük lezyonlar ve kistler uzun süredir devam eden bir patolojik sürece işaret eder, bu süre içinde ilgili bakteriler olgunlaşmak ve organize bir biyofilm topluluğu oluşturmak için yeterli zaman ve koşullara sahip olabilmektedir. Ekstraradiküler biyofilm yapısı, tümü semptomatik olan vakaların %6'sında tespit edilmiştir. Bu nedenle nadiren olduğu ve her zaman intraradiküler biyofilm yapısı ile ilişkili olduğu kabul edilmiştir [79].

İntraradiküler biyofilm tabakası çoğunlukla kalın olup, birkaç hücre tabakasından meydana gelmektedir [79]. Genellikle her bir biyofilm yapısında farklı morfolojik özelliklerde bakteriler tespit edilmektedir. Bu durum kültür ve moleküler çalışmalarda belirtildiği üzere endodontik enfeksiyonların çok yönlü doğası ile uyumludur. Bakteri hücreleri ile EPS arasındaki oran vakadan vakaya değişmektedir. Farklı türler farklı miktarda EPS üretmektedir ve kalınlığı genellikle biyofilmin yaşı

ile orantılı olarak artmaktadır [80-82].

Bakteri biyofilm yapısında yer alan EPS sayesinde, geleneksel irrigasyon solüsyonlarına karşı oldukça dirençlidir [83]. Bunun yanı sıra bakteri biyofilmi, bakterileri vücudun savunma sisteminden korur ve besin sağlar, sonuç olarak mikroorganizmaların direncini arttırmaktadır [84].

E. faecalis, birçok vakada endodontik tedavinin başarısızlığından sorumludur [85]. Neelakantan ve ark., primer enfeksiyonların %18'inde ve endodontik tedavinin başarısız olduğu vakaların %67'sinde *E. faecalis*'in izole edildiğini göstermiştir [86]. *E. faecalis* vücudun savunma sistemini uyarmakta ve lenfositlerin işlevini bozmaktadır [85]. Yetersiz beslenme koşullarında dahi hayatta kalabilmesi ve tek bir mikroorganizma olarak yaşayabilmesinin yanı sıra dentin tübüllerinin içine nüfuz edip biyofilm oluşturabilmektir [87, 88].

2.2.1.1 *Enterococcus faecalis*'in endodontik biyofilmdeki yeri

Endodontik enfeksiyonlardan izole edilen farklı bakteri türleri arasında *E. faecalis* biyofilm oluşturma kapasite nedeniyle yaygın olarak incelenen tek türdür [89, 90].

Enterokoklar gastrointestinal sistemdeki normal floranın bir parçasıdır. Hastane enfeksiyonlarının %12'sine neden olan potansiyel bir insan patojeni olarak tanınmaktadırlar [91]. Çeşitli antibiyotiklere karşı çoklu direnç geliştirebilmeleri ciddi terapötik problemleri beraberinde getirmektedir. *E. faecalis* enterokokların neden olduğu tüm enfeksiyonların % 80'inden sorumludur [92, 93].

Küresel veya ovoid şekildeki enterokok bakteri hücreleri, sıvı ortamda çiftler veya kısa zincirler meydana getirir, krem renkte beyaz renkli koloniler oluşturur, gram pozitif, katalaz negatiftir ve 10°C ile 45°C arasında değişen sıcaklıklarda %6,5 salin solüsyonunda (NaCl) büyüebilmektedir. Karbonhidrat, gliserol, laktat, sitrat, aljinin ve birçok keto asit türevini parçalayabilen enterokoklar oldukça yüksek pH (9,6) ve tuz konsantrasyonlarında bile canlılığını koruyabilmektedir. Çoğu enterokok fakültatif anaerobdur ancak bazı türleri zorunlu aerobdur [94-96].

Kültür yönteminin kullanıldığı çalışmalara göre kök kanal tedavili dişlerde *E. faecalis*'in bulunma oranı %24 ve %70 arasında değişirken, moleküler metotların uygulandığı çalışmalara göre de %66 ile %77 arasında değişmektedir [18, 53, 97-102]. Bunun yanı sıra tedavi edilmemiş endodontik enfeksiyonlu dişlerde veya tükürükten alınan örneklerde ise *E. faecalis* nadiren tespit edilmektedir. Hem kültür hem de moleküler yöntemlerin kullanıldığı mikrobiyolojik çalışmalara göre, primer

enfeksiyonlarda, *E.faecalis*'in bulunma oranı ortalama %9 olup %4-40 arasında dağılım göstermektedir. [59]. Aynı şekilde ağız durulma suları ile alınan örneklerde ortalama değerin %11 gibi düşük olması, *E. faecalis*'in oral kavitede kommensal olmadığı ancak oral florada geçici olarak bulunduğunu göstermektedir. Bu durum endodontik enfeksiyonlarda *E.faecalis* 'in kaynağını hala cevapsız bırakmaktadır [25, 103].

Anderson ve ark. oral kavite, gıda ve klinik örneklerden izole ettikleri *E. faecalis*'lerin virülans özelliklerini detaylıca incelemiş ve virülans genler, ekstrasellüler enzim ve biyofilm oluşturma kapasitesi en fazla olan suşlar oral kaviteden izole edilenler olarak bulunmuştur. Bu nedenle oral kavitenin, virülan ve antibiyotik dirençli *E. faecalis* suşlarının kritik bir rezervuarını oluşturabileceğini belirtmişlerdir [104].

E. faecalis besin ve oksijen kaynaklarının kısıtlı olduğu kanal tedavili dişleri enfekte edip canlılığını koruyarak inatçı apikal periodontitislere sebep olmaktadır. *E. faecalis* antijen A (*efaA*), agregasyon maddesi ve kollojen bağlayan protein (*ace*) gibi bağlanmayı sağlayan faktörleri sayesinde kök kanalı içerisinde kolonize olabilmektedir [105]. Küçük boyutu sayesinde dentin kanalcıklarında 400 ile 1000 µm ilerleyebilmektedir [106]. Özellikle, apikal periodontitisin patogenezinde önemli olan ve virülans faktörleri olarak kabul edilen enterokokal yüzey proteini (*esp*) ve jelatinaz enzimi (*gelE*) ile biyofilm oluşumuna neden olmakta ve kök ucu çevresindeki doku hasarını ve kemik rezorpsiyonunu arttırmaktadır [107-109]. *E. faecalis*'in biyofilm oluşturarak bu yapıyı oluşturamayan bakterilerle karşılaştırıldığında 1000 kat daha dirençli hale geldiği belirtilmektedir [110].

Kompleks kök kanal anatomisi ve buna ek olarak kök dentinin tübüler yapısı ve bileşimi, kök kanal dezenfeksiyonunu kısıtlayan belirleyici faktörlerdir. Aksesuar ve lateral kanallar, apikal dallanmalar, anastomozlar kök kanal sisteminin kompleksliğine katkıda bulunmaktadır [111]. Bu kompleks anatomik yapı içinde kolonize olan biyofilm yapısı endodontik tedavideki başarısızlığın başlıca sebeplerinden biri olan inatçı enfeksiyonlara neden olmaktadır. Biyofilm yapısının kök kanal sisteminden etkin bir dezenfeksiyon işlemi ile uzaklaştırılması, tedavinin prognozunda kritik önem taşımaktadır [112].

2.3 Kök Kanal Dezenfeksiyonu

Kök kanal tedavisinde kök kanal sisteminin mekanik şekillendirilmesi tedavinin ana basamağını oluşturmaktadır. Etkin irrigasyon ve dezenfeksiyonun gerçekleşebilmesi için kök kanalında yeterli alan yaratılmasını sağlar. Ancak, dentin kanalları, aksesuar kanallar, kanal ramifikasyonları, apikal deltalar ve transvers anastomozlar gibi karmaşık bölgelere yerleşen bakterileri ve biyofilm yapısını elimine etmede geleneksel kemomekanik şekillendirme yöntemleri her zaman başarılı olamamaktadır [12, 113]. Bunun yanı sıra *E. faecalis* gibi inatçı bakteriler endodontide kullanılan pek çok irrigasyon solüsyonuna ve kimyasal dezenfektana yüksek direnç göstererek, eliminasyonda güçlüğü ve dolayısıyla tedavinin başarısızlıkla sonuçlanmasına neden olabilmektedir [114].

Lazer ışını ile geleneksel yöntemlerle ulaşılamayan dentin tübülleri, lateral kanal, isthmus gibi bölgelere ulaşılabilirdiği düşünülmektedir. Son yıllarda endodontik tedavide farklı dalga boylarında lazerler kullanılmaktadır. Önceki çalışmalar, lazer ışığının ulaşılamayan kök dentinin daha derin tabakalarına etki edebildiğini ve böylece mikroorganizmaların tamamen eliminasyonunda ve kök kanal tedavisi başarısında artış olduğu belirtmiştir [15, 115, 116]. Bu yönüyle kök kanal tedavisi pratiğinde lazerler dezenfeksiyon amacıyla kullanılmaktadır.

2.3.1 İrrigasyon solüsyonları

Enfekte kök kanallarından, el aletleri veya herhangi bir döner alet sistemi kullanılarak yalnızca mekanik şekillendirme ile mikroorganizmaların elimine edilmesi güçtür [1]. Kök kanal sisteminin kompleks yapısından dolayı kök kanal aletleri şekillendirme sırasında kök kanal sistemindeki tüm bölgelere erişememektedir ve ulaşılması güç olan bu bölgelerde uzaklaştırılması zor olan biyofilm tabakası oluşmaktadır [117]. Oval şekilli kanallarda apikal bölgede kök kanal duvarlarının %40'ının kanal aletleri ile temizlenebildiği gösterilmiştir [118]. Bunun yanı sıra mekanik şekillendirme sırasında oluşan smear tabakası hem kök kanal sisteminin etkili bir şekilde dezenfekte edilmesini hem de kök kanal dolumu sırasında kanal patlarının dentin yüzeyi ile olan bağlantısını olumsuz etkileyerek kök kanal sisteminin üç boyutlu hermetik tıkanmasını engellemektedir [119]. Bütün bu nedenlerden dolayı kanal aletlerinin ulaşamadığı bölgelerde dezenfeksiyonu ve temizliği mümkün kılması nedeniyle irrigasyon işlemi kök kanal tedavisinin önemli bir parçasıdır [120].

İdeal bir irrigasyon solüsyonunda bulunması gereken özellikler şu şekilde sıralanabilir [18, 121, 122].

- Geniş antimikrobiyal spektrumu olmalı ve kalıcı etki göstermeli
- Periapikal ve periodontal dokulara antijenik toksik ve karsiyojenik etkileri bulunmamalı
- Kök kanal şekillendirilmesi sırasında oluşan smear tabakasını uzaklaştırabilmeli
- Kan, serum, protein gibi organik ve inorganik doku artıklarının varlığında etkinliğini kaybetmemeli
- Nekrotik doku artıklarını, organik ve inorganik doku ve debrisleri çözebilmeli
- Düşük yüzey gerilimi ile ulaşılması zor olanlara nüfuz edebilmeli
- Kanal dolgu maddesini olumsuz etkilememeli
- Dişi boyamamalı
- Kolayca nötralize edebilmeli
- Restoratif materyallerin koronal bölgedeki kavite duvarlarına bağlanma özelliğini olumsuz etkilememeli
- Raf ömrü uzun olmalı ve saklama kolaylığı olmalı
- Kokusu ve tadı kabul edilebilir olmalı
- Düşük maliyetli olmalı

Günümüzde endodonti pratiğinde yaygın olarak kullanılan irrigasyon solüsyonları aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir [123];

1- Kimyasal ajanlar;

- Doku çözücü ajanlar : Sodyum hipoklorit (NaOCl)
- Antibakteriyel ajanlar : Bakteriostatik etkililer; Klorheksidin, bazı antibiyotikler
: Bakteriosit etkililer; NaOCl, bazı antibiyotikler
- Şelasyon ajanları : Zayıf; etidironik asit
: Güçlü; EDTA (etilen diamin tetra asetik asit)
- Kombine ajanlar (doku çözücü ve antibakteriyel etkili)

: MTAD (Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN)
(%3 doksisisiklin, %4,25 sitrik asit ve %0,5
Tween 80 deterjan karışım)

: QMix (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK)
(EDTA, Klorheksidin ve deterjan karışımı)

: SmearClear (Sybron Endo, CA)

: Tetraclean (OLF Muggiō, Italy)

2- Doğal ajanlar;

- Antibakteriyel ajanlar: yeşil çay, trifala

Çalışmamızda kullanılan yıkama solüsyonları aşağıdakilerdir;

- Serum fizyolojik
- EDTA
- NaOCl

2.3.1.1 Serum fizyolojik (SF)

Serum fizyolojik tıp biliminde kullanılan serum türlerinden biri olup, %0,9 NaCl izotonik bir eriyiktir. Endodontide irrigasyon solüsyonu olarak mekanik şekillendirme sırasında oluşan debris kök kanal sisteminden uzaklaştırmaya yaramaktadır [124].

Endodontide kullanılan diğer irrigasyon solüsyonları ile kıyaslandığında daha az doku hasarına neden olmaktadır [125]. Ancak NaOCl ve klorheksidin ile karşılaştırıldığında antibakteriyel etkinliği oldukça düşüktür ve nekrotik doku çözücü özelliği yoktur [126-128]. Kök kanal sistemini temizleme ve şekillendirme sırasında meydana gelen smear tabakasını uzaklaştırma etkinliği de yok denecek kadar azdır [129-132]. Ayrıca %0,9 NaCl solüsyonu açılmış kaplardan birkaç defa kullanıldığında kontaminasyon riski taşımaktadır [122].

2.3.1.2 Sodyum Hipoklorit (NaOCl)

Sodyum hipoklorit ilk olarak Coolidge tarafından 1919'da kök kanal yıkama solüsyonu olarak tanımlanmıştır [133]. Ağartma maddesi olarak bilinen sodyum hipoklorit, geniş spektrumlu olması, mikroorganizmalar üzerindeki non-spesifik

öldürücü etkisi ve yüksek nekrotik doku çözücü özelliği ile endodonti pratiğinde en çok kullanılan irrigasyon solüsyonudur [121]. Havadan ve ışıktan kolayca etkilenmesi, pH'nın kolay değişmesi, inorganik ve organik kontaminanlara karşı stabil olmaması, toksik olması, hoş olmayan kokusu, metalleri korozyona uğratması ve substantive etkiye sahip olmaması dışında ideal bir irrigasyon solüsyonunun birçok özelliğine sahiptir [134-136].

NaOCl solüsyonu dinamik bir dengeye sahiptir. Organik madde üzerindeki etkisini açıklayan üç kimyasal reaksiyonu vardır. İlk reaksiyon, çözünme kabiliyetinden sorumludur ve buna sabunlaşma reaksiyonu denir; burada, NaOCl, yağ asitlerini indirgeyen organik bir çözücü gibi davranır ve onları yağ asidi tuzlarına (sabun) ve gliserole (alkol) dönüştürür. Bir diğer reaksiyon, NaOCl'in amino asidi nötralize ettiği, su ve tuz ürettiği nötralizasyondur. Üçüncü tepkime klorun ve amino gruplarının kloraminler oluşturdukları kloraminasyon reaksiyonudur. Meydana gelen kloraminler hücrel metabolizmaya oksidasyon ile müdahale ederek etki göstermektedir. Ayrıca NaOCl kuvvetli bir bazdır (pH > 11). Yüksek pH'ı ile de sitoplazmik membran bütünlüğünü bozmaktadır [137].

NaOCl endodontik solüsyon olarak % 0,5 - % 6 arası değişen konsantrasyonlarda kullanılmaktadır. Irrigasyon etkinliğini en üst seviyeye çıkarmak için sürekli taze solüsyon kullanılması ve ajitasyon veya sık sık devamlı irrigasyon ile aktive edilmesi gerekmektedir. Doku çözme hızı, taze solüsyon kullanılması ve irrigasyonun aktive edilmesi ile artmaktadır [138, 139]. Farklı konsantrasyonlarda NaOCl etkinliğini karşılaştıran önceki çalışmalar çelişkili sonuçlar bildirirken, yeni çalışmalar yüksek konsantrasyonlu sodyum hipoklorit solüsyonunun, % 1 ve % 2'lik solüsyonlardan daha üstün etkinlik gösterdiğini doğrulamıştır [140, 141].

NaOCl'in antibakteriyel etkinliği, solüsyonun konsantrasyonuna, sıcaklığına ve kök kanalındaki miktarına ve temas süresine bağlıdır. Zou ve ark. üç değişkenin (konsantrasyon, sıcaklık ve süre) NaOCl'nin dentin tübüllerine penetrasyonu üzerinde etkiye sahip olduğunu göstermiştir; ancak, etki tek başına herhangi bir faktör için çok belirgin bulunmamıştır. Oda sıcaklığında 2 dakika sonra % 1, % 2, % 4 ve % 6'lık solüsyonların penetrasyon derinliği sırasıyla 77, 96, 105 ve 123 µm olarak tespit edilmiştir. En yüksek değerler (291 ve 300 µm), % 6 NaOCl ile 37 ° C'de ve 45 ° C'de 20 dakika süreyle tedavi edilen gruplarda bulunmuştur [13].

NaOCl, güçlü antibiyofilm aktivitesine ve organik dokuları çözme özelliğine sahiptir. Clegg ve ark., NaOCl'nin biyofilmler üzerindeki etkisini incelediği çalışmada % 6 NaOCl solüsyonunun hem fiziksel olarak yapay biyofilmi uzaklaştırabilen hem de bakterileri öldürebilen tek ajan olduğunu tespit etmiştir [142]. Benzer şekilde Giardino ve ark.; %5.25'lik NaOCl ve MTAD'nin biyofilmdeki *E.faecalis*'e karşı etkinliğini değerlendirmiş, %5.25'lik NaOCl'nin biyofilm bütünlüğü bozan ve kaldıran tek solüsyon olduğunu rapor etmiştir [143]. Başka bir çalışmada %1'lik ve %6'lık NaOCl'nin biyofilmdeki *E. faecalis*'e karşı etkisinin klorheksidin ve MTAD'dan üstün olduğu belirtilmiştir [144]. Ancak, toksisitesi yüksektir, alerjik reaksiyonlara neden olmaktadır ve dentin tübül penetrasyon derinliği az olduğundan, 500µm'den daha derine penetre olabilen *E. faecalis*'e karşı etkinliği sınırlıdır [14, 145]. Ayrıca *E. faecalis* gibi inatçı mikroorganizmalar NaOCl'nin düşük konsantrasyonlarına dirençlidirler [122]. Wilson ve ark. %2'lik konsantrasyonda dahi NaOCl'in biyofilm yapısı içine tamamen difüze olamadığı, dolayısıyla subantimikrobiyal konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu destekleyebildiğini göstermişlerdir [146].

2.3.1.3 Etilen diamin tetra asetik asit (EDTA)

Endodontik tedavi sırasında kemomekanik şekillendirmenin başarılı bir şekilde yapılabilmesi için hem organik hem de inorganik yapıları çözen solüsyonların kullanılması gerekmektedir. EDTA endodontide sık kullanılan şelasyon ajanıdır. Dış hekimliğinde dar ve kalsifiye kök kanallarının temizlenmesi ve şekillendirilmesinde yardımcı olarak ilk kez 1957'de Nygaard – Østby tarafından kullanılmıştır [147]. Günümüzde kullanılan EDTA esas olarak etilen diam (1,2-diaminoethan), formaldehit (metanal) ve sodyum siyanür'den sentezlenmektedir [147, 148].

EDTA, formülü $[(CH_2N(CH_2CO_2H)_2)_2]$ olan bir karboksilik asittir. Şelasyon ajanı olarak en önemli özelliği Ca^{+2} ve Fe^{+3} gibi katyonik iyonları bağlayabilmesidir. Kök kanallarına uygulandığında dentinde bulunan kalsiyum iyonlarıyla reaksiyona girer ve oluşan kalsiyum şelatları çözünebilir hale geçer [149]. Protogerou ve ark. EDTA'nın tek başına irrigasyon solüsyonu olarak kullanıldığında sadece inorganik dokuyu çözdüğünü ancak dentin kanalları içinde kalan organik dokuya etki etmediğini bulmuştur [149]. Organik çözücülüğü yüksek olan NaOCl ile birlikte

kullanıldığında smear ve debrisin etkili bir şekilde kaldırıldığı gösterilmiştir [150]. Smear tabakasının uzaklaştırılması kanal tedavisinin önemli bir aşamasıdır. Bu sayede antibakteriyel irrigasyon solüsyonları ve medikamentler dentin tübüleri içine penetre olmuş bakterilere etki edebilmektedir. Bunun yanı sıra kanal patlarının dentin tübüleri içine penetre olmasını sağlayarak daha sıkı bir kanal dolumu yapılmasını mümkün kılmaktadır [151].

EDTA'nın dentine etkisi, EDTA çözeltisinin konsantrasyonuna ve dentine temas ettiği süreye bağlıdır. %17'lik EDTA solüsyonunun dentinin inorganik yapısına etki ederek smear tabakasını etkili bir şekilde uzaklaştırabildiği görülmüştür [152, 153]. Teixeira ve ark. yaptıkları bir çalışmada smear tabakasını uzaklaştırmak için 1, 3 ve 5 dakika boyunca EDTA ile irrigasyon yapmış ve üç grup arasında herhangi bir fark bulmamıştır [154]. Crumpton ve ark. 1 dakika 1ml %17 EDTA ile yapılan final irrigasyonun smear tabakasını uzaklaştırmada etkili olduğunu bulmuştur [155].

EDTA'nın antibakteriyel etkinliği yoktur veya çok azdır. Bazı çalışmalar antifungal etkili olduğunu göstermiştir [156, 157]. Bunun yanı sıra gram negatif bakterilerin hücre duvarındaki katyonlara bağlanarak hücre yapısını bozabilir ancak aynı etkiyi gram pozitif bakterilere karşı gösteremezler. Biyofilm üzerindeki etkisini ise daha çok biyofilm bütünlüğünü bozarak göstermektedir [158]. Gulabivala ve ark. EDTA'nın hem kök yüzeyindeki biyofilm tabakasının uzaklaştırılmasında hem de biyofilm içerisinde birbirine tutunmuş bakterilerin biyofilm tabakasından ayrılmasında etkili olabileceğini göstermiştir [159, 160]. EDTA solüsyonunun bu özelliği, ardından kullanılan antiseptiklerin bakterilerle doğrudan temasını sağlamaktadır [161].

Birçok çalışmada EDTA *E. faecalis*'e karşı belirgin bir antibakteriyel etki göstermemiştir [162, 163]. Zhang ve ark. EDTA, klorheksidin, cetrimide, MTAD ve QMix solüsyonlarının *E. faecalis* biyofilme etkisini incelemiş ve EDTA'nın etkinliğini diğer dört gruptan daha zayıf bulmuşlardır [164].

EDTA ve NaOCl etkileşimi

EDTA ve %5'lik NaOCl'in sırayla kombine kullanılması NaOCl'in tek başına kullanılmasına göre daha büyük bir antimikrobiyal etkiye sahip olduğu gösterilmiştir [43]. NaOCl ve EDTA+NaOCl ile irrigasyonu takiben kanal duvarları SEM ile incelenmiş ve debrisin uzaklaştırılmasında EDTA'yı takiben NaOCl ile irrigasyonun, sadece NaOCl ile gerçekleştirilmiş olan irrigasyona oranla daha etkin olduğu

bildirilmiştir [165]. Ancak EDTA ile irrigasyonu takiben NaOCl uygulaması kök kanal dentin dokusunda belirgin bir erozyona neden olmaktadır [166]. Bunun yanı sıra NaOCl ve EDTA beraber kullanıldığı zaman EDTA'nın dekalsifiye edici özelliği değişmezken NaOCl'in klor miktarında bir azalma olmaktadır. Sonuç olarak da NaOCl doku çözücü özelliğini kaybetmektedir [167].

Bu durum NaOCl ve EDTA kombine kullanımına alternatif olarak lazer sistemlerinin kullanımını gündeme getirmektedir.

2.3.2 Lazer

Lazer kelime olarak, radyasyonun uyarılmış salınımı ile güçlendirilmiş ışık anlamına gelir ve 'Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation (LASER)' sözcüklerinin baş harflerinden oluşmaktadır [168].

1960 yılında Theodore Harold Maiman, yakut kristalinden ilk lazer cihazını geliştirmiştir [169]. Bu bir katı madde lazer olup sonraları gaz lazeri, yarı iletken madde lazeri gibi değişik tipleri geliştirilmiştir. İlk Uranyum lazeri International Business Machines (IBM) laboratuvarları tarafından Kasım 1960 yılında, ilk helyum-neon Lazer 1961 yılında Bell laboratuvarlarında, ilk yarı iletken Lazer 1962 yılında General Electric Laboratuvarlarında, ilk neodymium-doped yttrium aluminium garnet (Nd:YAG) ve karbondioksit (CO₂) Lazer yine Bell laboratuvarlarında geliştirilmiştir. Her durumda, Lazer'in ismi aktif ortamın içeriğine göre adlandırılmıştır [170].

Lazerin temeli atom veya molekül enerji düzeyleri arasındaki elektron geçişlerine dayanır ve özelliklerinin tam olarak algılanabilmesi için öncelikle atom ve ışığın temel özelliklerinin bilinmesi gerekmektedir [171, 172].

Atomun yapısı en basit haliyle ortada bir çekirdek ve etrafında belirli yörüngeleri takip eden elektron bulutu şeklindedir. Atom uyarıldığında düşük enerji yörüngelerindeki elektronlar aldıkları enerji ile çekirdekten uzaktaki yüksek enerjili yörüngelerine yerleşirler. Uyarılmış bu elektronlar kararlılık hali olan düşük enerjili yörüngelerine geri dönmek isterler ve kendiliğinden kararlılık haline geçerken önceden absorbe ettikleri fazla enerjiyi ışık partikülü olan foton şeklinde dışarıya yayarlar [173].

Işığın temel birimi veya kuantumu 'Foton'dur. Işık bir cisimle karşılaştığında emilebilir ya da yönü değişebilir; yansiyabilir, saçılabilir. Eğer bir foton emilirse

enerjisi kaybolmaz, bunun yerine absorbe eden atom veya molekülün enerji düzeyini artırır. Bu durum lazer fiziği ve lazer-doku etkileşiminin merkezidir [172].

Dalga yapısındaki ışığın üç tane tipik özelliği vardır [174];

- Dalga boyu; birbirini izleyen iki ışık dalgasının iki tepe noktası arasındaki yatay mesafedir. “ λ ” ile gösterilir ve birimi nanometre(*nm*)’dir.
- Frekans; bir saniyede dalganın yaptığı salınım sayısıdır ve dalga boyu ile ters orantılıdır, Hertz (*hz*) birimi ile ifade edilir.
- Genlik; ışık dalgasındaki enerjiyle doğru orantılıdır dalganın başladığı en alt nokta ile yükseldiği son nokta arasındaki mesafedir. Amplitut olarak adlandırılır. Amplitut genişliği enerji miktarının fazlalığını gösterir. Lazerlerde enerji birimi olarak joule (J) kullanılır.

Dokuya iletilen güç ise watt birimi (W) ile gösterilir ve enerji ile frekansın çarpımı ile hesaplanmaktadır.

Lazer ışığı normal ışıktan çeşitli özellikleri ile ayrılır [172]. Bunlar;

- Tek renkli (monokromatik) olması
- Doğrusal (collimated) olması
- Işığı oluşturan fotonların aynı fazda olmasıdır (koherens).

Lazer ışığını bu özellikleri ile üretebilmek için özel ışık kaynaklarına ihtiyaç vardır.

Lazer ışık kaynağını oluşturan yapılar aşağıdaki gibidir [168];

1. Aktif ortam veya ana ortam: Katı, sıvı ve gaz maddelerden oluşabilir. Bu bölümde bir dış enerji kaynağından gelen etki ile bünyesindeki atomların elektronlarını daha yüksek bir enerji seviyesine uyarabilecek kabiliyette moleküller kullanılır.
2. Enerji kaynağı veya uyarma mekanizması: Enerji sağlar ve enerjiyi aktif ortama ulaştırır.
3. Tamamen yansıtıcı ayna (%100)
4. Kısmi yansıtıcı ayna (%90-%99)
5. İki ayna arasındaki optik kavite
6. Lens
7. İletici bölümler

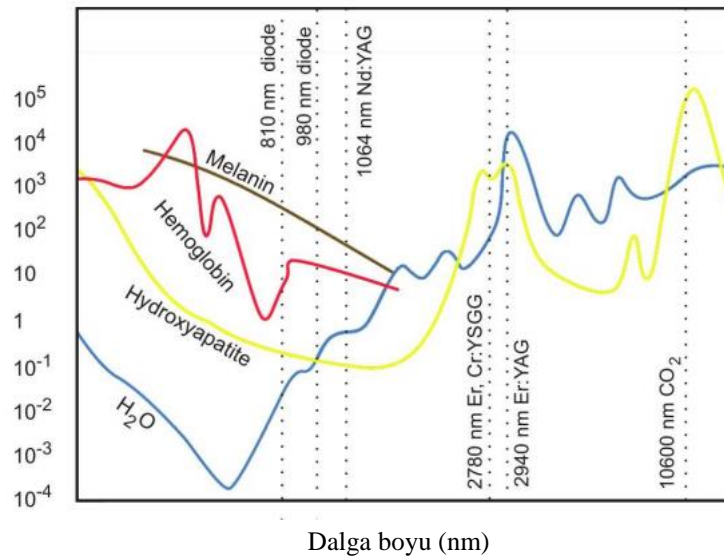
Aktif maddenin uyarılması sonucu oluşan fotonlar bir tanesi tam yansıtıcı diğeri

seçici yansıtıcı özelliğe sahip aynalar ile paralel hale getirilerek sistem dışına ışık enerjisi halinde gönderilir. Bu şekilde monokromatik özellik sağlanır. Daha sonra oluşan ışık lensler yardımıyla odaklanarak bir iletici kullanılarak istenilen dokuya iletilir [168].

Lazerin biyolojik dokular üzerindeki etkinliğinin bağlı olduğu faktörler aşağıdaki gibidir [175]:

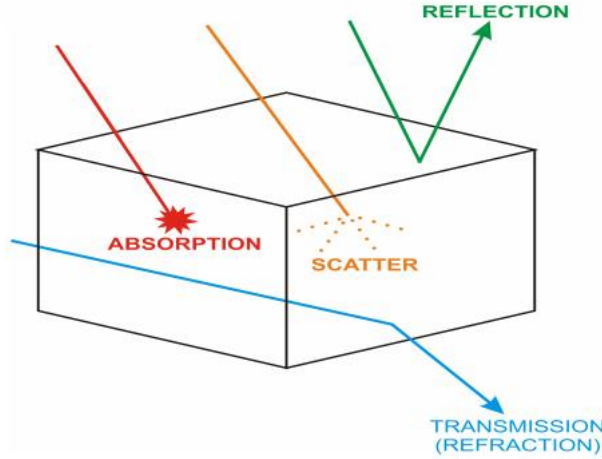
- Biyolojik dokunun özellikleri
 1. Lazer dalga boyuna karşılık gelen emilim katsayısı (**Şekil: 2.1**)
 2. Isı iletim katsayısı
 3. Kan dolaşımı
 4. Mineral ve su oranları
 5. Yoğunluğu
- Lazerin özellikleri
 1. Dalga boyu
 2. Enerji veya güç yoğunluğu (cm^2 de Watt güç/atım başı enerji)
 3. Işınlanma süresi ve atım uzunluğu
 4. Uygulanma metodu (kontakt/non-kontakt, fokus/non-fokus ve hızlı hareketler/bir nokta)
 5. Çalışma modu CW (kesik atımlı veya devamlı)
 6. Frekansı

Absorbsiyon katsayısı (cm^{-1})



Şekil 2.1: Bazı moleküllerin çeşitli dalga boylarına

göre absorpsiyon katsayıları [176]



Şekil 2.2: Lazer ışığı - doku etkileşimleri [176]

Lazer ışınlarının doku ile temas etmesi sonucu; dört farklı durum meydana gelebilir [177] (**Şekil 2.2**);

1. Saçılma (scattering): Hedef dokuda saçılır ve beklenen biyolojik etki azalır. Kısa dalga boyları daha geniş yayılırken, uzun dalga boyları daha derine penetre olabilir.
2. Geçme (transmission): Hedef dokunun içerisinde hiçbir etkide bulunmadan geçer. Bu etkileşim lazerlerin dalga boyu ile doğrudan bağlantılıdır. Uzun dalga boylu lazerler doku tarafından emilirlerken kısa dalga boylu lazer ışınları oldukça yüksek geçiş özelliğine sahiptirler.
3. Yansıma (reflection): Hedef dokuda hiçbir etki göstermeden yansır. Yansıma sonucu istenmeyen dokularda lazer ışığının etkileri ortaya çıkabilir bu durum lazer güvenliği açısından önem taşımaktadır.

Lazer ışınlarının doku tarafından absorpsiyonu önemlidir ve lazer enerjisinin yararlı etkisidir. Lazer enerjisi absorbe edildikçe ısı artışı olmaktadır. Lazer enerjisinin temel etkisi foto-termaldir yani ışık enerjisinin ısıya dönüşümüdür. Bu etkisin yanı sıra lazer ışını foto-kimyasal foto-mekanik ve fotoelektrik etki göstererek de işlev görmektedir [178].

- Foto-kimyasal etki: Fotodinamik terapi (PDT) ve kompozit rezinlerin

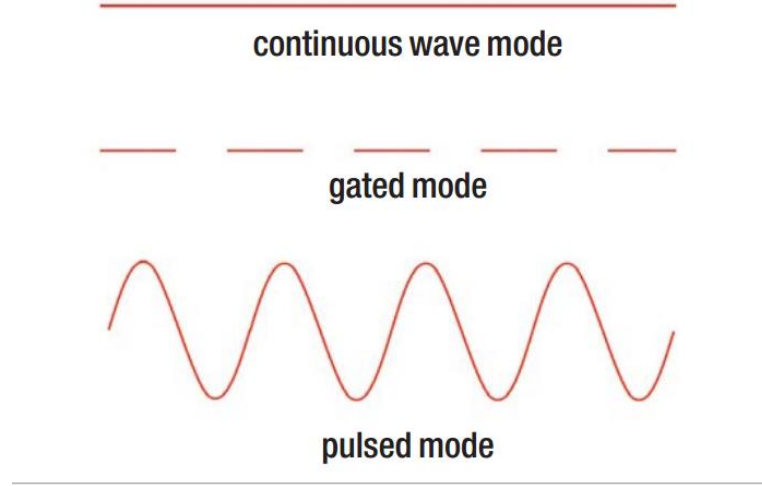
polimerizasyonunda foto-kimyasal etkileşimden yararlanılabilir.

- Foto-termal etki: Buharlaştırma ile dokuların uzaklaştırılması, yüzey sıcaklığının artması ile yara dezenfeksiyonu ve kanama kontrolü, koter ile dokuların uzaklaştırılması foto-termal etkileşime örnektir
- Foto-mekanik ve foto-elektriksel etki: Termal olmayan etkilerdir. Işık uygulanan yüzeyde şok dalgalarıyla moleküller ve atomik bağlar arası ilişkiyi keserek mikro bir tahribat meydana gelmektedir. Diş sert dokularından parçacıklar halinde madde kopararak kavite açma bu etkiye örnek gösterilebilir [178].

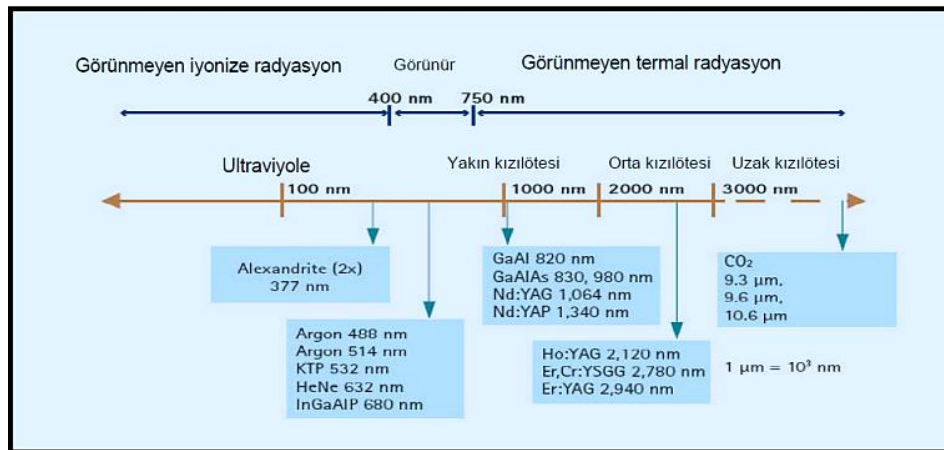
Lazerler, lazer aktif maddesine, dalga boyuna, dağıtım sistemine, lazer ışınlarının hareketine, dokular tarafından emilimine ve klinik uygulamalara göre sınıflandırılmaktadır [172, 173].

1. Aktif maddesine göre;
 - Katı madde (granit, ruby, Nd: YAG)
 - Gaz madde (argon, CO₂)
 - Yarı iletken madde (diode lazer: gallium arsenide)
 - Boya tanecikleri (dye lazer)
2. Dalga boyuna göre
 - Ultraviyole (140-400 nm)
 - Görünür (400-700 nm)
 - Kızıl ötesi (infrared) (700 nm ve üzeri)
3. Lazer ışının hareketine göre (**Şekil 2.3**)
 - Devamlı (continuous) ışın verenler
 - Atımlı (pulse) ışın verenler
 - Dalga akım olarak ışın verenler
4. Işınların enerjisine göre
 - Yumuşak
 - Orta
 - Sert
5. Klinik kullanıma göre
 - Yumuşak doku lazerleri
 - Sert doku lazerleri

Elektromanyetik spektrumunda 300 nm altındaki kısa dalga boyları ‘iyonize radyasyon’ olarak tanımlanır (şekil 2.4). Daha yüksek foton enerjisi derin biyolojik dokulara penetre olabilir. 300 nm’den büyük dalga boyları iyonize olmaz, dokuda uyarılmayı sağlar. Tüm dental lazer cihazlarının dalga boyları 500 nm ila 10.600 nm arasında bulunur [172].



Şekil 2.3: Lazer ışının farklı yayılma şekilleri [179]



Şekil 2.4: Elektromanyetik spektrumda LAZER dalga boyları [172]

Lazer	Diş hekimliğinde kullanım alanı	Dalga boyu
Neodymium lazer (Nd:YAG lazer)	Cerrahi, endodonti, periodontoloji	1064 nm
Erbium:YAG lazer (Er:YAG lazer), erbium, and chromium:YSGG lazer (Er, CR:YSGG lazer)	Cerrahi, endodonti, kavite preperasyonu	2940 nm, 2780 nm
Diyot lazer	Cerrahi, endodonti, periodontoloji	810-980 nm
CO ₂ lazer	Cerrahi	10600 nm

Tablo 2.1: Diş hekimliğinde en sık kullanılan lazerler [180]

Yukardaki tabloda belirtildiği gibi diyot, Nd:YAG ve Er:YAG lazerler endodontide kullanılan lazer türleridir (**Tablo: 2.1**). Bu çalışmada ise 810 nm dalga boyuna sahip diyot lazer kullanılmıştır ve *E. faecalis* biyofilm üzerindeki etkinliği incelenmiştir.

2.3.2.1 Diyet lazer

Diyot lazerler aktif maddeleri yarı iletken lazerlerdir. Yarı geçirgen kristallerin alüminyum, indiyum, galyum ve arsenid gibi elementlerin kombinasyonundan elde edilirler. Alüminyum-galyum-arsenik (AlGaAs) içeren diyotlar 810 nm; İndiyum-galyum-arsenik (InGaAs) içerenleri 980 nm dalga başlangıcındadır (**Şekil:2.4**). Lazer enerjisini fiber optik sistemlerle devamlı veya yönlendirilmiş atımlar şeklinde yayabilmektedir [172]. Ancak atımlı olarak kullanıldığı zaman çıkış güçlerinin yarısını kaybetmektedirler [181].

Diyot lazer ışınları hemoglobin ve diğer pigment dokularda iyi absorbe olurken su ve diş sert dokuları tarafından az miktarda absorbe olabilmektedir. Bu nedenle

yumuşak doku cerrahisinde sıklıkla tercih edilmektedir. Cerrahi sırasında kontakt ya da non-kontakt olarak kullanımı mümkündür [182]. Portatif cihazlar olan diyot lazerler, düşük doz lazer tedavisinde biyostimülasyon ve ağrı kontrolü sağlamak amacıyla kullanılmaktadır. Kullanımı kolay ve etkindir [172].

Diyot lazerlerin yumuşak doku cerrahisi, periodontal cep ve peri-implantitis tedavisi gibi işlemlerin yanı sıra kök kanal dezenfeksiyonu, lazer destekli diş beyazlatma gibi diş sert dokularını içeren spesifik uygulama alanları da mevcuttur [183-192].

810 nm Diyot lazerin kök kanal dezenfeksiyonundaki etkinliği

1980'li yılların sonlarında oftalmoloji ve genel cerrahi alanlarındaki başarılı uygulamalar diyot lazeri bir süre sadece yumuşak doku uygulamaları ile sınırlandırmıştır [193, 194]. Moritz ve ark.'ın *in-vitro* araştırması yakın kızıl ötesi ışın yayan lazer sistemlerinin kök kanallarında kullanımını başlatmıştır [116].

Dentin absorpsiyon katsayısı, 810 nm dalga boyu için düşüktür, bu nedenle dağılım emilimine göre baskındır. Bu durum, fotonların ışınlama yüzeyinden çok daha uzakta emilmesine yol açmaktadır [195].

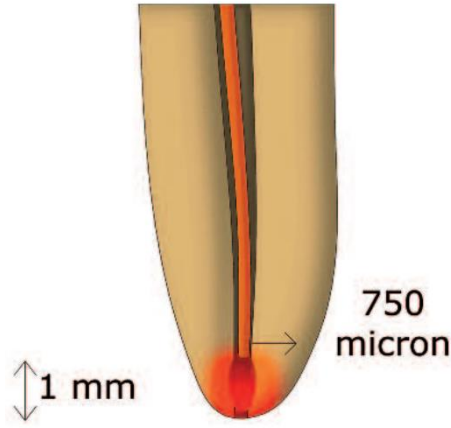
Yakın kızıl ötesi ışın yayan Nd:YAG ve diyot lazerler dezenfeksiyon kabiliyetleri açısından lazer destekli endodontik tedavide ilk kullanılan lazerlerdir [191, 196]. Bu tip lazerlerin antibakteriyel etkinliği iki olası mekanizma ile açıklanmaktadır. Birincisi; lazer ışının bakterinin bağlandığı substrat, bu dentin olabilir, tarafından absorbe olduğu ve substratta ortaya çıkan ısının da mikroorganizmanın ölümüne yol açacak yükseklikte lokal bir ısı artışına neden olması şeklindedir. İkinci mekanizma ise lazer ışınının bakteri tarafından absorbe edildiği ve bakteri hücrelerinde direkt hasar meydana getirmesi olarak açıklanmaktadır [15].

Son yıllarda diyot lazerin antimikrobiyal etkinliği ve kök kanallarında kullanıma uygun esnek fiber uçları endodontik tedavide kullanımını yaygınlaştırmıştır. İnce çaplı fiber uçlar (200-320 µm) lazer ışığının kök kanalı boyunca iletimini sağlamaktadır.

Gutknecht ve ark. *E. faecalis* ile enfekte edilmiş sığır dişleri ile yaptıkları çalışmada diyot lazerin antibakteriyel etkinliğini araştırmışlar ve 3 W gücünde diyot lazer ile 500 µm kalınlığındaki dentin yüzeyine uyguladıklarında, %74 oranında bakteri eliminasyonu sağladıklarını belirtmişlerdir. Her ne kadar lazer ışının etkisi dentin

kalınlığına bağılı olsa da diyot lazerin bakteri eliminasyonunda başarı ile kullanılabileceğini savunmuşlardır. [115].

Schoop ve ark.'nın Nd:YAG, Er:YAG, Er:YGSS ve 810 nm diyot lazer sistemlerinin *E. faecalis* ve *E. coli* antibakteriyel etkinliğini incelemiştir. Tüm lazer sistemleri 1 W gücünde kullanıldığında mikroorganizmalar üzerine çok az bir antibakteriyel etkinliklerinin olduğunu, 1,5 W olarak kullanılması durumunda ise *E. coli* üzerine etkili olmalarına rağmen, *E. faecalis* üzerine yalnızca Diyot ve Er:YAG lazerlerin etkili olduğunu bulmuşlardır. *E. faecalis* sayılarında belirgin bir azalma sağladığını tespit etmişlerdir [191] (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: 810 nm diyot lazer, fiber uç apikalden 1mm geride ve ışının dentin tübülündeki penetrasyon derinliği 750µm [191, 197]

Mehrvarzfar ve ark., yaptıkları bir *in vitro* çalışmada; *E. faecalis* ile enfekte kök kanallarında diyot lazerin % 2,5 NaOCl, % 2 klorheksidin ve MTAD'nin antibakteriyel etkinliğine katkısını incelemiştir. 810 nm diyot lazer ile MTAD'nin kombine kullanıldığı dişlerde bakterilerin tamamen elimine edildiği tespit edilmiştir [198].

Beer ve ark. lazeri "endodonti için modern son teknoloji cihazlar" olarak tanımlamışlardır ve yaptıkları bir *in vitro* çalışmada 810 nm diyot lazerle % 98.8 oranında bir bakteri azalması elde etmişlerdir [199].

Bu çalışmada 810 nm lazer'in *E. faecalis* biyofilmi üzerindeki etkinliği altın standart olarak kabul edilen NaOCl irrigasyon solüsyonu ile karşılaştırıldı. Böylece kök kanal dezenfeksiyonunda alternatif bir yöntem olarak öne sürülen lazer sistemlerinden 810 nm lazerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliği değerlendirildi.

3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 2016/89 numaralı kararı ile bu çalışmanın etik açıdan bir sakınca oluşturmadığına karar verilmiştir.

Bu tez çalışması Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı ve Kayseri Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezinde yapılmıştır. Çalışmamızda, 810 nm diyot lazer kullanımının ve NaOCl irrigasyonunun, üç haftalık *E. faecalis* biyofilm üzerindeki etkinliği *in vitro* olarak incelenip karşılaştırılmıştır.

3.1 Örneklerin Hazırlanması

Periodontal hastalık, ortodontik tedavi, protetik tedavi ve tedavisi mümkün olmayan diş çürükleri nedeniyle çekim endikasyonu konulan dişlerin toplanabilmesi için hastalara araştırma hakkında bilgi verildi ve aydınlatılmış onam formları imzalatıldı.

Çalışmada kök oluşumunu tamamlamış, kalsifikasyon ve rezorbsiyonu olmayan, kök ve kron boylarının benzer olduğu, kanal açısı Schneider' in sınıflamasına göre düz olan (0-10°), 52 adet tek köklü diş kullanıldı [200].

Kriterlere uygunluğun kontrolü için tüm dişlerden bukkal ve aproksimal doğrultulardan dijital radyografiler (Scanora, Soredex, Orion Corporation, Helsinki, Finlandiya) alındı ve uygun dişler çalışma zamanına kadar oda sıcaklığında %0,9'luk NaCl solüsyonunda saklandı. Dişlerin üzerindeki eklentiler uzaklaştırıldıktan sonra kuron kısımları su soğutması altında elmas fissür frez (Dentsply / Maillefer, Tulsa, OK, ABD) yardımıyla, kök boyları 14 mm olacak şekilde uzaklaştırıldı.

10 numaralı K-tipi kanal eğesi (Dentsply, Maillefer, Ballaigues, İsviçre) apikalden görünene kadar ilerletildi ve gözden kaybolana kadar yavaşça geri çekildi. Eğenin stoperi düzleştirilen kök yüzeyine oturtuldu ve stoperin alt kenarı ile eğenin uç kısmı arasındaki mesafe ölçüldü. Çalışma boyu, bu mesafeden 1mm kısa olarak kayıt edildi.

Kök kanallarının mekanik şekillendirmesi belirlenen çalışma uzunluğunda, apikal genişlik 40 numara olacak şekilde, 55 numaraya kadar geleneksel step-back tekniği ile yapıldı. Mekanik şekillendirme esnasında her alet değişiminde yıkama solüsyonu olarak 1 ml %5,25'lik NaOCl (Cerkamed, Pawłowski, Polonya) solüsyonu kullanıldı. Kemomekanik şekillendirme sonrası smear tabakasını uzaklaştırmak için 5 ml %17 EDTA (MD-Cleanser™, Meta Biomed Co. Ltd., Cheongju City, Chungbuk, Güney Kore) ile irrigasyon yapıldı. Tüm kök kanalları en son 5 ml serum fizyolojik solüsyonu ile yıkanıp paper pointler (Meta Dental Co. Ltd., Güney Kore) ile kurulandı. Daha sonra köklerin apikalleri kompozit rezin ile kapatılıp, dış yüzeylerine 3 kat tırnak cilası sürüldü (**Şekil 3.1**).



Şekil 3.1: Şekillendirme işlemi tamamlanan ve apikalleri kompozit rezin ile kapatılan dişler

Ardından her bir diş 1.5 ml'lik tüplere yerleştirilerek 121°C'de 15 dakika otoklav ile steril edildi. Deneyin kontaminasyon kontrolü için dört adet diş (negatif kontrol), steril mikrosantrifüj tüplerine alındı ve tüpler 1 ml steril Triptik Soy Agar (TSB, OXOID L td., Basingstoke, İngiltere) besiyeri ile dolduruldu. 37°C'de % 5 CO₂'li inkübatörde gerçekleştirilen üç haftalık inkübasyon süresince her 48 saatte bir tüp içerisindeki besiyerinin tamamı alındı ve % 5 koyun kanlı agara (SALUBRIS AŞ, Türkiye) süspansiyonun ekimi yapıldı ve alınan besiyerinin yerine steril TSB

eklendi. Kontrol amaçlı ekimin yapıldığı besiyerlerinin benzer koşullarda inkübasyonunun ardından üreme olmadığı gösterildi ve deneyin sterilitesi doğrulandı.

3.2 Kök kanallarının *E. faecalis* ile enfekte dılması

E. faecalis ATCC 29212 suşunun -80°C’de bulunan stoğundan % 5 koyun kanlı agara pasaj alındı ve elde edilen taze kültürden koloniler alınarak TSB içerisinde, 0,5 MacFarland bulanıklığına eş değer ($1,5 \times 10^8$ kob (koloni oluşturan birim)/ml) bakteri içeren süspansiyon hazırlandı. Hazırlanan bu süspansiyonlardan 1’er ml alınarak, içerisinde steril dişlerin bulunduğu mikrosantrifüj tüplerine hava kabarcığı oluşumunu engellemeye dikkat edecek şekilde eklendi (Şekil 3.2). 4 adet diş negatif kontrol amaçlı ayırıldı. Kanallarda biyofilm oluşumunu sağlamak için inokülasyonun gerçekleştirildiği dişler %5 CO₂’li inkübatörde 37°C’de 21 gün süreyle inkübe edildi ve her 48 saatte bir aynı miktarda bakteri içeren süspansiyonla tekrar inokülasyon gerçekleştirildi.



Şekil.3.2: Bakteri süspansiyonu eklenmiş mikrosantrifüj tüp içindeki dişler

Dişlerde oluşturulan bakteri kültürünün saflığının kontrol edilmesi için ise her inokülasyon gününde bir önceki inokülasyon sıvıları toplandı, % 5 koyun kanlı agara seri dilüsyon yöntemiyle ekim yapıldı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Kültürün saflığını kontrol amaçlı yapılan ekimler

Uygun sıcaklık ve sürede inkübasyonun ardından, tek tip koloni varlığı ile makroskobik olarak, gram boyama ile gram pozitif kokların gözlenmesi ile de mikroskobik olarak kültürün saflığı incelendi. Ayrıca tek tip kolonilerden hazırlanan örnekler ile Vitek MS (bioMérieux Vitek, St. Louis Mo. ABD) cihazı kullanılarak bakteriyel tanımlama işlemleri gerçekleştirildi (**Şekil 3.4**). Tüm bu analizler sonucunda dış kök kanallarında oluşturulan biyofilmin tek tip bakteri içerdiği kanıtlandı.



Şekil 3.4: Vitek cihazı

3.3 Deney ve kontrol gruplarının oluşturulması

Bakteri kontaminasyonu tamamlanmış 48 adet diş aşağıdaki şekilde 4 adet deney grubuna ayrıldı.

Grup 1: (n:12) %17 EDTA + 1W 810 nm Diode lazer + salin

Grup 2: (n:12) %17 EDTA + 1,5 W 810 nm Diode lazer + salin

Grup 3: (n:12) %17 EDTA + %5,25 NaOCl + salin

Grup 4: (n: 12) 5 ml serum fizyolojik

3.3.1 Tedavi öncesi kök kanallarından örnek alınması

21 günlük bakteri inokülasyon sürecinin ardından kök kanallarından tedavi öncesi örnekler alındı. Örnek alma işleminde 40 numara H tipi eğe ve kağıt kon kullanıldı. Kök kanallarındaki planktonik bakterileri uzaklaştırmak için 5ml serum fizyolojik ile irrigasyon yapıldı, ardından 40 numara H tipi eğe ile 10 sn süre ile mezial, distal, bukkal ve lingual yüzeylerde kazıma işlemi yapıldıktan sonra kanal içine yerleştirilen kağıt kon 30 sn bekletildi. H tipi eğe ve kağıt kon, 1 ml PBS solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpleri içerisine yerleştirildi (**Şekil 3.13**). Alınan örneklerdeki biyofilm tabakası içerisinde bulunan bakteri hücrelerinin dağıtılması için, önce 5 dakika sonikasyon işlemi uygulandı (Bandelin, SONOPLUS) ardından 2 dakika boyunca vortekslendi (**Şekil 3.5, Şekil 3.5a**).

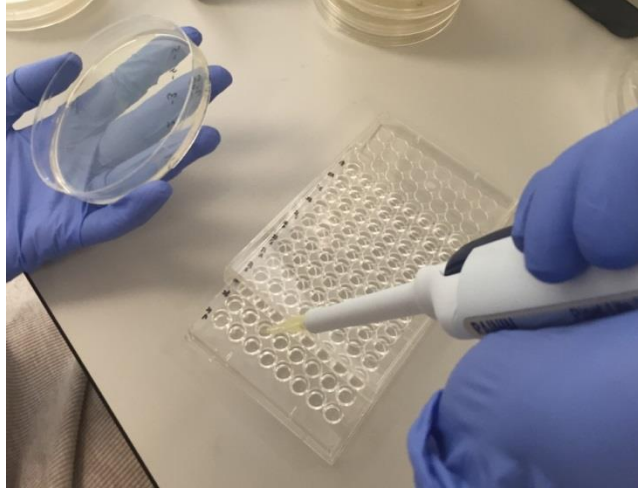


Şekil 3.5: Sonikasyon cihazı



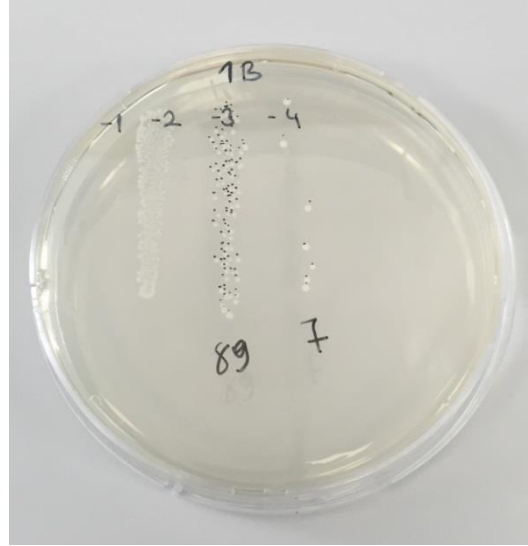
Şekil 3.5a: Vorteks işlemi

Bu işlemlerin ardından bakteri sayısının tespit edilmesi amacıyla örneklerden dilüsyonsuz ve 10^{-8} dilüsyon elde edebilecek kadar gerçekleştirilen 10 kat dilüsyonların her birinden 20'şer μl TSA da yayılarak ekim yapıldı (**Şekil 3.6**).



Şekil 3.6: Farklı dilüsyonların hazırlanması

Dişler % 5 CO_2 'li inkübatörde 37°C 'de bir gece inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayıldı ve dilüsyon faktörleri hesaba katılarak ml'de bulunan bakteri sayıları belirlendi. Her bir örnek için birbirini takip eden ve kabul edilebilir sayıda koloni içeren iki dilüsyonun sayımları dikkate alınıp bu sayımların ortalamaları kaydedildi (**Şekil 3.6**, **Şekil 3.7**).



Şekil 3.7: Birinci grup, birinci diştten alınan örneğin tedavi öncesi koloni sayımı

3.3.2 Deney gruplarına uygulanan tedavi protokolleri

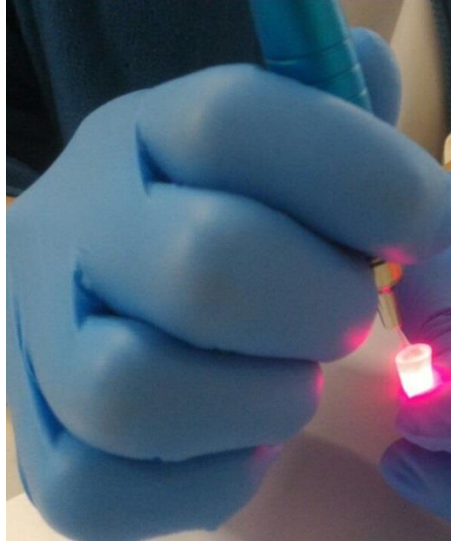
Tedavi öncesi örnekler alındıktan sonra, tüm kanallar 1dk boyunca 5 ml %17 EDTA solüsyonu ile yıkandıktan sonra deney gruplarına uygulanan tedavi protokolleri aşağıdaki gibidir;

Grup 1 (810 nm, 1 W): Kök kanalları steril paper pointler ile kurutulduktan sonra güç parametresi 1W olarak ayarlanan 810 nm diyot lazerin 200µm fiber ucu apikalden 1mm geride yerleştirilerek apikalden koronole doğru dairesel hareketlerle sürekli modda 7 sn (kök kanal boyunun yarısı kadar süre) boyunca uygulandı. Bu döngü 3 defa 20'şer sn ara verilerek uygulandı. Lazer uygulamasından sonra 5 ml serum fizyolojik ile son irrigasyon yapıldı (**Şekil 3.9**).

Grup 2 (810 nm, 1,5 W): Kök kanalları steril paper pointler ile kurutulduktan sonra 810nm diyot lazer 1,5 W güç ile 200µm fiber uç apikalden 1mm geride kullanılarak apikalden koronole doğru dairesel hareketlerle sürekli modda 7 sn (kök kanal boyunun yarısı kadar süre) boyunca uygulandı. Bu döngü 3 defa 20'şer sn. ara verilerek uygulandı. Lazer uygulamasından sonra 5ml serum fizyolojik ile son irrigasyon yapıldı (**Şekil 3.10**).

Grup 3 (NaOCl): 1dk. 5 ml %5,25 NaOCl ile irrigasyon yapıldıktan sonra en son 5 ml serum fizyolojik ile irrigasyon yapıldı (**Şekil 3.11**).

Grup 4 (Pozitif kontrol, SF): 5 ml SF ile irrigasyon yapıldı (**Şekil:3.12**)



Şekil 3.8: Fiber uç ile apikalden koronale doğru dairesel hareketlerle lazer uygulaması



Şekil 3.9

Grup 1: 1W, 810 nm diyot lazer



Şekil 3.10

Grup 2: 1,5 W, 810 nm diyot lazer



Şekil 3.11

Grup 3: 5 ml %5,25 NaOCl ile 1dk irrigasyon

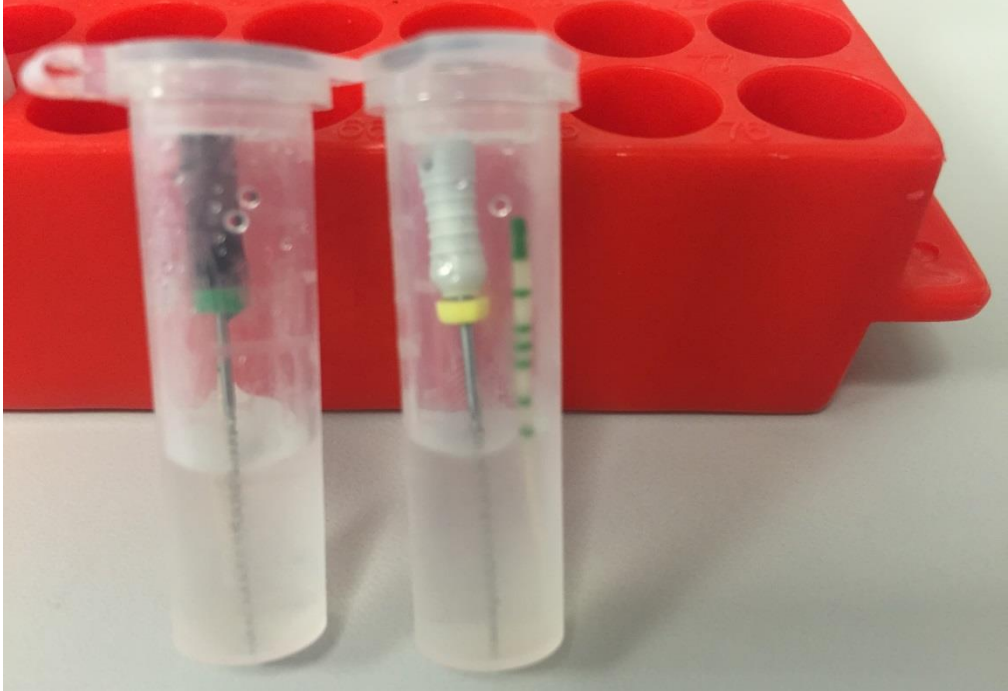


Şekil 3.12

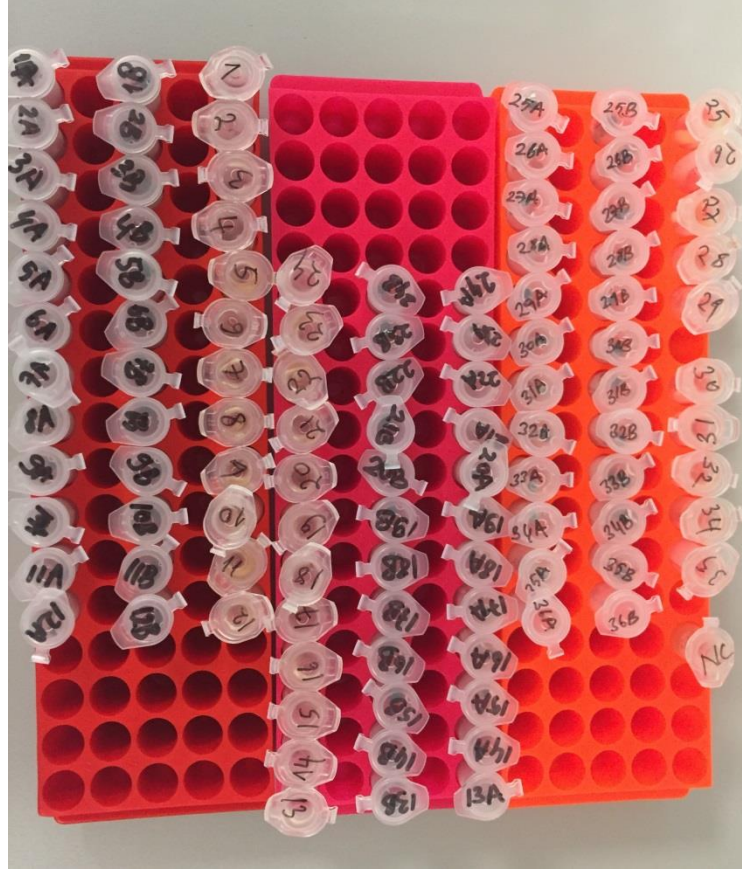
Grup 4: 5 ml serum fizyolojik ile irrigasyon

3.3.3 Tedavi sonrası örneklerin alınması

Tedavi sonrası tüm dişlerden steril 45 numaralı H tipi eğe yardımı ve kağıt kon ile örnek alındı. 45 numara H tipi eğe ile 10 sn boyunca dişin dört yüzünde yapılan kazıma işlemi sonrası kanal içinde kağıt kon 30 sn bekletildi. 45 numara H tipi eğe ve kağıt kon 1 ml PBS solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı (**Şekil 3.13 ve 3.13a**). Ardından biyofilm tabakası içerisinde bulunan bakteri hücrelerinin dağıtılması için öncelikle sonikasyon işlemi uygulandı ve ardından 2 dakika boyunca vortekslendi. Bu işlemlerin ardından bakteri sayısının tespit edilmesi amacıyla örneklerden dilüsyonsuz ve 10^{-8} dilüsyon elde edebilecek kadar gerçekleştirilen 10 kat dilüsyonların her birinden 20'şer µl TSA besiyerine ekim yapıldı. Dişler % 5 CO₂'li inkübatörde 37°C'de bir gece inkübasyonun ardından oluşan koloniler sayıldı ve dilüsyon faktörleri hesaba katılarak ml'de bulunan bakteri sayıları belirlendi. Tedavi öncesinde alınan örneklerdeki gibi her bir örnek için birbirini takip eden ve kabul edilebilir sayıda koloni içeren iki dilüsyonun sayımları dikkate alındı ve bu sayımların ortalamaları kaydedildi.



Şekil 3.13: Tedavi öncesi ve sonrası örneklerin hazırlanması



Şekil 3.13a: *E. faecalis* inokülasyonları yapılmış farklı tedavi grupları

3.4 SEM için Örneklerin Hazırlanması ve İncelenmesi

Çalışmamızda negatif kontrol grubundaki dişler ve SF grubundaki 4 adet diş SEM incelenmesinin yapılması için Erciyes Üniversitesi Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne gönderildi.

Örnekler %10 tamponlu formalinde saklandı ve SEM görüntülerinin elde edilebilmesi için hazırlandı.

Kök yüzeylerine uzunlamasına bir elmas fissür frez (Dentsply / Maillefer, Tulsa, OK, ABD) yardımı ile oluklar açıldı. Ardından tek tek steril gazlı bezin üzerine yerleştirilerek, açılan oluklar rehber oluşturacak şekilde siman spatülü yardımıyla ikiye ayrıldı. Örnekler, %25, %50, %75, %95 şeklinde derecelendirilmiş saf alkol solüsyon serisinin her birinde 1 saat bekletilerek dehidrate edildi ve daha sonra kurumaya bırakıldı. Bir vakum altında iletken altın-palladyum alaşımı ile kaplandıktan sonra SEM ile incelendi.

3.5 Verilerin Toplanması ve İstatistiksel Değerlendirme

Çalışmada tedavi öncesi ve sonrası bakteri koloni sayımı yapıldıktan sonra elde edilen veriler ile her bir diş için koloni sayısındaki yüzde değişimi (RCC%) aşağıdaki formül ile hesaplanmıştır. İstatistiksel analiz bu yüzde değişim değerleri kullanılarak yapılmıştır.

$$\text{Bakteri yüzde değişimi} = \frac{\text{tedavi öncesi koloni sayısı} - \text{tedavi sonrası koloni sayısı}}{\text{tedavi öncesi koloni sayısı(CFU)}} \times 100$$

Çalışmamızda elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analiz için IBM SPSS Statistics 22 (IBM SPSS, Türkiye) programı kullanılmıştır. Çalışma verileri değerlendirilirken parametrelerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirilmiş ve parametrelerin normal dağılım göstermediği saptanmıştır. Parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden olan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanılmıştır. Parametrelerin grup içi karşılaştırmalarında ise Wilcoxon işaret testi kullanılmıştır. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirilmiştir.

4. BULGULAR

Bu araştırmada *E. faecalis* ile enfekte edilen kök kanallarına farklı parametrelerde 810 nm diyot lazer uygulaması ile elde edilen bakteri sayısındaki azalma, geleneksel NaOCl (%5,25) irrigasyonu ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

Tablo 4.1: Grupların tedavi öncesi ve tedavi sonrası bakteri sayısı değerlendirilmesi

	Tedavi ncesi	Tedavi Sonrası	² p
	Ort±SS (medyan)	Ort±SS (medyan)	
Grup 1(1W)	365291,67±220647,03 (347500)	146186,25±152821,11 (117500)	0,012*
Grup 2(1,5W)	136916,67±77117,63 (121750)	63375±46780,01 (55750)	0,012*
Grup 3(NaOCl)	449291,67±793855,88 (129250)	1903,33±3459,55 (0)	0,002*
Grup 4(SF)	108525±70450,58 (103500)	106625±98932,3 (87500)	0,386
¹ p	0,017*	0,000*	

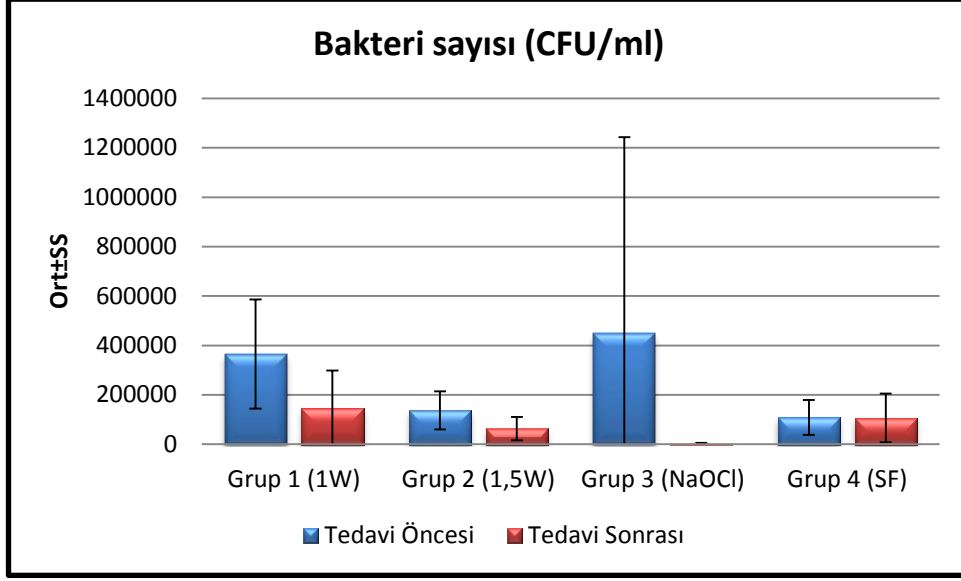
¹Kruskal Wallis Test² Wilcoxon Sign Test* p<0.05

Grup 1’de; tedavi öncesi bakteri sayısına göre tedavi sonrasında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.012; p<0.05) (**Tablo 4.1**).

Grup 2’de; tedavi öncesi bakteri sayısına göre tedavi sonrasında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.012; p<0.05) (**Tablo 4.1**).

Grup 3’te; tedavi öncesi bakteri sayısına göre tedavi sonrasında görülen düşüş istatistiksel olarak anlamlıdır (p:0.002; p<0.05) (**Tablo 4.1**).

Grup 4’te; tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayısında istatistiksel olarak anlamlı bir değişim görülmemiştir (p:0.386; p>0.05) (**Tablo 4.1**).



Şekil 4.1: Tüm gruplardaki tedavi öncesi-sonrası bakteri sayıları

Gruplar arasında tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayılarında görülen yüzde düşüş miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır. ($p:0.000$; $p<0.05$). Anlamlılığın hangi gruptan kaynaklandığının tespiti için yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda;

Grup 3'te görülen yüzde düşüş miktarı, Grup 1 ($p:0.000$), Grup 2 ($p:0.000$) ve Grup 4'ten ($p:0.000$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

Grup 2'de görülen yüzde düşüş miktarı, Grup 4'den ($p:0.012$) istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulunmuştur ($p<0.05$).

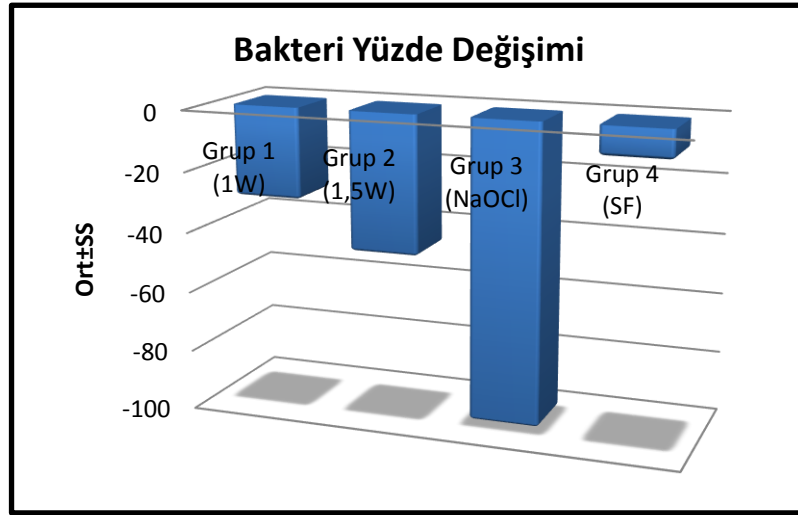
Grup 1 ve Grup 2 arasında tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayılarında görülen yüzde düşüş miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Grup 1 ve Grup 4 arasında tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayılarında görülen yüzde düşüş miktarları açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$) (**Tablo 4.2a**).

Tablo 4.2: Gruplar arası tedavi öncesine göre tedavi sonrası bakteri sayılarında görülen yüzde değişimin değerlendirilmesi

	Bakteri Yüzde Değişimi (RCC%)
	Ort±SS (medyan)
Grup 1(1W diyot lazer)	-30,28±89,52 (-68,6)
Grup 2 (1,5W diyot lazer)	-45,99±50,85 (-72,5)
Grup 3 (%5,25 NaOCl)	-98,9±1,9 (-100)
Grup 4 (SF)	-9,55±29,85 (-11,3)
P	0,000*

Kruskal Wallis Test p<0.05*



Şekil 4.2 Tedavi sonrası bakteri yüzde değişimi

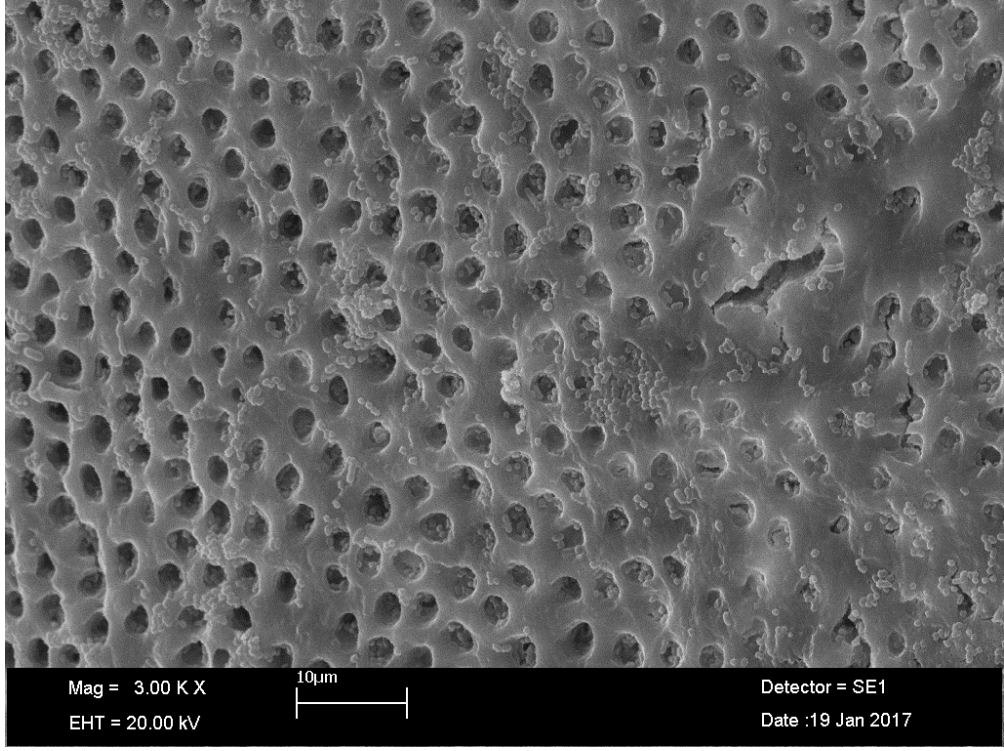
Tablo 4.2a: Post hoc değerlendirme

	Bakteri Yüzde Değişimi (RCC%)
	p
Grup 1 (1W) - Grup 2 (1,5W)	0,564
Grup 1 (1W) - Grup 3 (NaOCl)	0,000*
Grup 1 (1W) - Grup 4 (SF)	0,086
Grup 2 (1,5W) - Grup 3 (NaOCl)	0,000*
Grup 2 (1,5W) - Grup 4 (SF)	0,012*
Grup 3 (NaOCl) - Grup 4 (SF)	0,000*

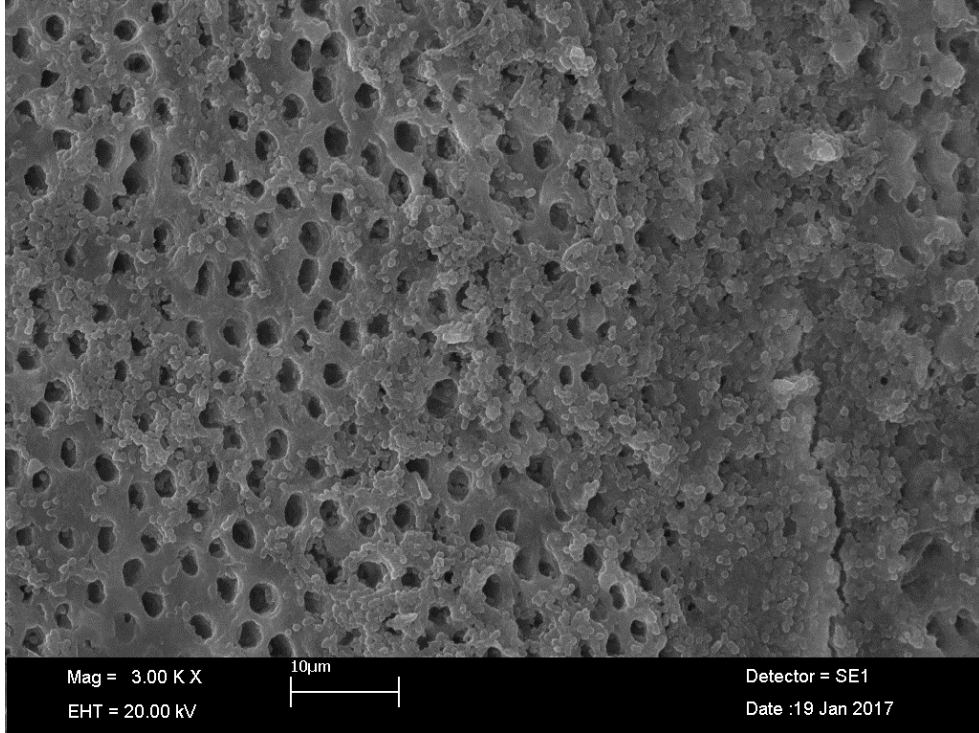
Mann Whitney U Test

** p<0.05*

Bakteri koloni oluşumunu gormek amacıyla SF grubundan alınan SEM goruntuleri
(Şekil 4.3; 4.3a)

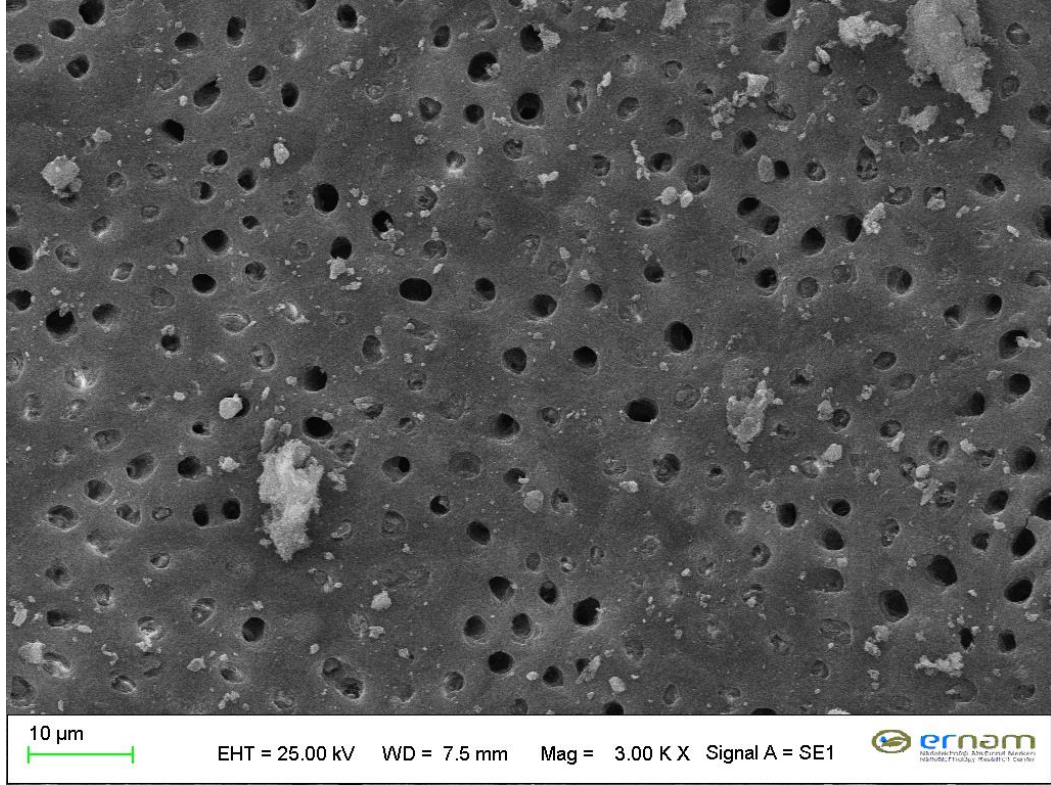


Şekil 4.3: SF grubu dişlerden alınan SEM goruntusu

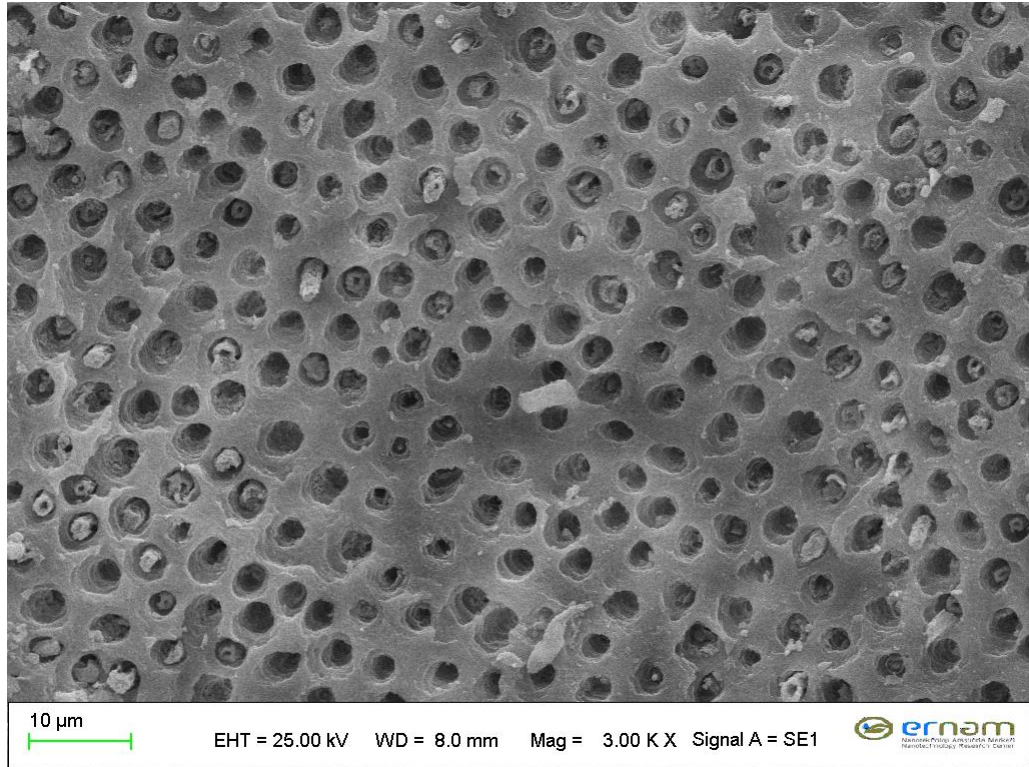


Şekil 4.3a: SF grubu dişlerden alınan SEM goruntusu

Tüm deney gruplarında birer adet bulunan negatif kontrol grubundaki dişlerden alınan SEM görüntüleri (Şekil 4.4; 4.4a).



Şekil 4.4: Negatif grup dişlerden alınan SEM görüntüsü



Şekil 4.4a: Negatif grup dişlerden alınan SEM görüntüsü

5.TARTIŞMA

Kök kanal tedavisi, pulpa dokusunun yer aldığı boşluktaki nekrotik ve enfekte dokunun uzaklaştırılması ve kök kanal sisteminin biyouyumlu bir materyal ile sızdırmaz bir şekilde doldurulması işlemlerinden oluşmaktadır. Başarılı bir tedavi, kök kanal sisteminin etkili bir şekilde dezenfeksiyonuna ve yeniden enfeksiyonuna yol açabilecek durumların önlenmesine bağlıdır [43, 201].

Kök kanallarının şekillendirilmesi sırasında yıkama solüsyonlarının kullanılması hem bakteriyel eliminasyonun sağlanması hem de organik dokuların çözünmesi için gerekli olan vazgeçilmez bir işlemdir [2]. Ancak kök kanal sisteminin kompleks anatomisi kök kanal sisteminin tam temizliğini ve dezenfeksiyonunu engellemektedir [125].

Günümüzde kök kanallarının tam dezenfeksiyonunu sağlayan, ideal özelliklere sahip yeni solüsyonlar ve teknikler araştırılmaktadır. Henüz tüm mikroorganizmalara etkili ve kök kanalını tümüyle dezenfekte edebilen ve ideal özelliklere sahip bir ajan veya yöntem bulunmamış olsa da son yıllarda üzerinde çok durulan kök kanal dezenfeksiyon yöntemlerinden bir tanesi de lazerlerdir. Lazerin diş hekimliğinde kullanımından bu yana kök kanallarındaki antimikrobiyal potansiyelini araştırmak için yapılmış birçok çalışmaya göre lazer ışığı kök kanalında bakterisidal bir etki göstermektedir [4, 189, 191, 202-204].

1990'lı yılların ortasında diş hekimliğinde kullanılmaya başlanan diyot lazer, birçok lazer tipleri arasında yüksek dentin tübül penetrasyonu ve antibakteriyel etkinliğinin yanı sıra kullanım kolaylığı, ufak boyutta taşınabilir olması ve uygun fiyatı nedeniyle tercih edilmektedir [115, 116, 180]. Diyot lazerin endodontide kullanımından bu yana antibakteriyel etkinliğini değerlendiren birçok çalışma yapılmıştır. Bazı çalışmalar, diyot lazerlerinin *E. faecalis*'i tamamen ortadan kaldıramadığını belirtirken bazı çalışmalar ise bakterilerin tamamen ortadan kaldırılmasının ancak dişlerin kök yüzeyinde yüksek sıcaklık üretmesine rağmen daha yüksek güçte

uygulandığında elde edildiğini göstermiştir [115, 191, 202]. Son dönemde Saydjari ve ark. Nd:Yag lazer, 810nm diyot ve 980 nm diyot lazerlerin enfekte kök kanallarındaki etkinliği ile ilgili yaptıkları derlemede, 810 nm diyot lazerler ile ilgili literatürde birçok çalışma olmasına rağmen parametrelerin tam olarak karşılaştırılabilir olmadığını ileri sürmüştür [180]. Çalışmamızda bu anlamda güvenilir ve karşılaştırılabilir parametreler kullanarak 810 nm lazerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini *in vitro* olarak değerlendirmek amaçlandı.

Mikrobiyolojik *in vitro* çalışmalarda çekilmiş sığır dişleri veya insan dişleri kullanılabilir [132, 202, 205]. Sığır dişinde dentin tübüllerinin yoğunluğu ve çapı insan dişininkinden farklıdır. Perez ve ark. ve Haapsalo ve Orstavik bakteri dentin tübül penetrasyonunu incelemek için sığır dişlerini kullanmışlar ve sığır dişlerinde dentin tübüllerinin çapının 4-7 µm, insan dişlerinde ise bu çapın 3-4 µm arasında değiştiğini belirtmişlerdir [14, 206]. Mikrobiyolojik çalışmalarda sığır dişi kullanmak gerçeği yansıtmayabileceği için halen en çok insan dişi tercih edilmektedir [207, 208]. Bu nedenle çalışmamızda insan dişi kullanılması tercih edilmiştir.

Çalışmamızda çürük, kök rezorpsiyonu, kalsifikasyon, çatlak-kırık içermeyen tek köklü ve kanallı insan dişleri kullanılmıştır. Diyot lazerin fiber optik ucunun kök kanalı içine erişimini ve uygulama sırasında duvarlar etrafında gezinmesini klinik olarak taklit etmesi açısından dentin blok hazırlama yöntemi yerine diş modeli tercih edilmiştir [162]. Dişler kök uzunlukları 14 mm olacak şekilde su soğutması altında elmas frez yardımıyla kesilerek kanal boyları standart hale getirilmiştir [199, 209, 210]. Çalışma boyu 13mm kabul edilen dişler evrensel olarak kabul edilen paslanmaz çelik el aletleri kullanılarak step-back tekniği ile ISO #40 olacak şekilde şekillendirilmiş ve kemomekanik şekillendirme sırasında %5,25 NaOCl ile irrigasyon yapılmıştır.

Kök kanallarının şekillendirmesi sırasında oluşan, yapısında kalsifiye doku partikülleri ve organik materyallerin yanı sıra enfekte kanallarda mikroorganizma ve mikroorganizma antijenlerini de barındıran smear tabakası kök kanal tedavisinde başarı şansını düşüren önemli bir faktördür ve kök kanal sisteminden uzaklaştırılmalıdır [150, 211]. Smear tabakasının kaldırılması için sıklıkla EDTA solüsyonundan yararlanılmaktadır. EDTA smear tabakasının inorganik kısmı üzerinde etkilidir. NaOCl irrigasyonu sonrası smear tabakasını uzaklaştırmak için

kullanılmaktadır [212, 213]. Çalışmamızda şekillendirme sonrasında %17 lik EDTA irrigasyonu ile smear tabakası uzaklaştırılıp inkübasyon süresince *E. faecalis*'in dentin tübül penetrasyonunu arttırmak amaçlanmıştır.

Çalışmada şekillendirme sonrası dişler *E. faecalis* ile enfekte edilmeden önce köklerinin dış yüzeyleri dentin tübüllerini tıkamak ve oluşabilecek herhangi bir sızıntıyı önlemek amacıyla 2 kat tırnak cilası kaplanmış, kök ucu da akışkan kompozit rezin ile kapatılmıştır. Kullanılan tırnak cilasının içerisindeki çözücülerin bir miktar antibakteriyel etkiye sahip olabileceği belirtilmiş fakat yapılan kontrol deneylerinde bu etkinin önemsiz olduğu gösterilmiştir [14].

Mikrobiyolojik çalışmalarda dişlerin sterilizasyonu etilen oksit gazı, hidrojen peroksit gaz plazma, kuru sıcak hava veya otoklav ile yapılabilmektedir [191, 199, 209, 210, 214]. Bizim çalışmamızda sterilizasyon yeteneği kanıtlanmış bir yöntem olan otoklav tercih edilmiş ve dişler 2 mL'lik mikro tüplere aktarıldıktan sonra ve 121 °C'de 15 dakika otoklavda steril edilmiştir.

E. faecalis, kök kanal tedavisinde kullanılan antibakteriyel ajanlara en fazla direnç gösteren mikroorganizmalardan birisidir. Sekonder enfeksiyonlarda primer enfeksiyonlara göre daha sık tespit edilmektedir. Biyofilm oluşturma yeteneği ile vücut savunmasından; fagositoz ve antikorlardan, ve antibakteriyel ajanlardan kendisini koruyup dirençli enfeksiyonlara neden olmaktadır [83, 88-90, 105, 215-217]. Bütün bu sebeplerden dolayı diğer birçok çalışmada olduğu gibi bizim çalışmamızda da kök kanalları *E. faecalis* ATCC 29212 suşu ile enfekte edilmiştir [10, 85, 87, 162, 199, 210, 218-220].

İnkübasyon süresi biyofilm gelişimi için önemli bir faktördür. Çalışmalarda bu konu ile ilgili farklı süreler önerilmektedir. Beer ve ark. çalışmalarında inkübasyon süresini 2 saat, Siqueira ve Meire 24 saat, Eldeniz ve ark 48 saat, Beltes ve ark. 72 saat, Bago ve ark 7 gün, Pedulla ve ark. 15 gün, Sahar-Helft, Cretella, Asnaashari ve Al Shahrani 21 gün, Neelakantan ve Afkhami 4 hafta olarak bildirmişlerdir [10, 86, 199, 209, 218-226]. İnkübasyonun birinci saatinde, bakteriler çoğunlukla planktoniktir. Sonraki iki hafta içerisinde gelişen biyofilm bakterileri %1 NaOCl, %2 klorheksidin ve %2 / %4 iyodin solüsyonlarına karşı duyarlıdır, ancak 3 hafta sonra, aynı ajanlara karşı direnç kazanmaktadırlar [227]. Buna benzer bir dizi laboratuvar çalışması, kök kanal tedavisinde kullanılan antimikrobiyal ajanların, *E. faecalis*

biyofilmlerinin farklı büyüme evrelerindeki ve planktonik kültürdeki etkinliğini değerlendirmiştir [228-231]. Önceki çalışmaların çoğunda sadece genç biyofilmler kullanılmış ve bu nedenle laboratuvarında elde edilen iyi sonuçlar klinik durumu yansıtmayabilmektedir [160, 232, 233]. Bu durum göz önüne alınarak çalışmamızda inkübasyon süresi 21 gün olarak belirlenmiş ve 3 haftalık yaşlı biyofilm elde edilmesi hedeflenmiştir.

Deneyin herhangi bir aşamasında kontaminasyon olup olmadığını belirlemek amacıyla 4 adet diş negatif kontrol grubu olarak ayrılmıştır. Tüm negatif kontrol gruplarından negatif kültür elde edilmiş ve negatif kontrol grubundaki dişlerden alınan SEM görüntüleri de bu sonucu destekler nitelikte bulunmuştur. Bu sayede deneyin tüm aşamalarının kontaminasyon açısından tamamen güvenilir olduğunun doğrulanması sağlanmıştır. Ayrıca SF grubundaki dişlerden de SEM görüntüleri alınarak bakteri kolonizasyonunu ve biyofilm oluşumunun doğrulanması amaçlanmıştır.

SF solüsyonunun doku çözücü etkisinin olmaması, smear tabakasını uzaklaştıramaması ve antibakteriyel etkinliğinin yok denecek kadar az olması nedeniyle çalışmamızda pozitif kontrol olarak belirlenmiştir [126-132].

Enfekte ve nekrotik doku artıklarını kök kanal sisteminden uzaklaştırmak ve etkili bir kök kanal dezenfeksiyonu sağlamak için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır [234, 235]. Mekanik şekillendirme sırasında NaOCl ile irrigasyon yaygın olarak kabul gören geleneksel bir yöntemdir [236]. Ancak NaOCl solüsyonu sitotoksiktir ve antibakteriyel etkinliğini artırmak için yüksek konsantrasyonlarda kullanıldığında sitotoksik yan etkileri artmakta ve dentinin mekanik özelliklerini negatif yönde etkilemektedir [145, 237]. Tadı ve kokusunun kötü olması, el aletlerinde korozyona neden olması, etki süresinin uzun olması, periradiküler dokulara taşıdığına irritasyona yol açabilmesi diğer olumsuz özellikleridir. Kök kanal tedavisinde NaOCl'in %0,5 ve %6 arasında değişen konsantrasyonları kullanılmaktadır [238]. Dunavant ve ark. *E. faecalis* biyofilmi üzerine, % 1 veya % 6 NaOCl ile %2 klorheksidin, Smear Clear ve MTAD'nin etkinliklerini karşılaştırdıkları çalışmalarında her iki konsantrasyondaki NaOCl solüsyonlarını diğer solüsyonlardan daha etkili bulmuşken biyofilmi kaldırabilen tek ajanın %6 NaOCl olduğunu belirtmişlerdir [228]. Clegg ve ark. farklı konsantrasyonlardaki NaOCl'in bakteri biyofilmi üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada aynı şekilde etkili tek ajanın

%6'lık NaOCl olduğunu belirtmiştir [142]. *E. faecalis* gibi inatçı mikroorganizmalar NaOCl'nin düşük konsantrasyonlarına direnç göstermektedir [122]. %2'lik konsantrasyonda NaOCl'in biyofilm yapısı içine tamamen difüze olamadığı ve subantimikrobiyal konsantrasyonlarda biyofilm oluşumunu destekleyebildiğini gösterilmiştir [146, 239]. Dolayısıyla çalışmamızda yüksek bir konsantrasyon olmasına rağmen NaOCl'nin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği Grup 3'te %5,25'lik NaOCl solüsyonu kullanılması tercih edilmiştir [142-144].

EDTA ile NaOCl solüsyonlarının beraber kullanımı, NaOCl solüsyonunun doku çözücü özelliğini azaltmakta ve de dentinin mekanik özelliklerini olumsuz etkilemektedir [166, 167]. Ancak Neelakantan ve ark. üç farklı irrigasyon protokolünün (NaOCl+Etidronik Asit, NaOCl+EDTA, NaOCl+EDTA+NaOCl, SF) diyet lazer, Nd:Yag lazer ve ultrasonik aktivasyon sonrasındaki antibiyofilm etkinliğini incelemişlerdir ve sürekli şelasyon kullanımının antibakteriyel etkinliği önemli derecede arttırdığını göstermişlerdir. Bu durumu, NaOCl'nin, EDTA irrigasyonu ile bütünlüğü bozulan bakteri biyofilm matrisine ve dentin tübüllerine daha iyi nüfuz etmesi ve bakteriler ile direkt temasının artması ile açıklamışlardır [86]. Diyet lazerin uygulanmasından önce smear tabakasını kaldırma işlemi, lazer ışınının optik fiberler gibi davranan dentin tübüllerine daha derin nüfuz etmesine izin vererek çevresel dentin boyunca daha iyi lazer yayılımı sağlamaktadır [191]. Mehrvarzfar ve ark. kök kanallarının çeşitli irrigasyon solüsyonları ile yıkanmasından sonra diyet lazerin kullanımının antibakteriyel etkinlik üzerindeki artı etkisini inceledikleri çalışmada, içinde sitrik asit içeren ve smear tabakasını uzaklaştırmada etkili olan BioPure MTAD ile irrigasyon sonrası diyet lazer uygulamasının *E. faecalis* üzerinde antibakteriyel etkinliği arttırdığını belirtmiştir [198, 240]. Bu nedenle çalışmamızda tedavi öncesi örneklerin alımı sırasında oluşan smear tabakası 1 dk boyunca 5 ml %17 EDTA solüsyonu kullanılarak uzaklaştırılmış ve böylece hem diyet lazerin hem de NaOCl'nin biyofilm üzerindeki etkinliğini arttırmak amaçlanmıştır [86, 198, 240].

Lazerin antibakteriyel etkinliğinin incelendiği çalışmamızda grup 1 ve grup 2'de 810 nm diyet lazer farklı güç düzeylerinde (1 W ve 1,5 W) uygulanmıştır. Üretici firmanın önerisi üzerine grup 1'de diyet lazer (810 nm) sürekli modda 1 W güç ile 3 defa kök boyunun yarısı süre boyunca spiral hareketlerle apikalden koronole doğru

uygulanmıştır. Gutknecht ve ark., Schoop ve ark. ve 810 nm diyot lazerin 1,5 W güç ile kök kanallarında kullanımının güvenli olduğunu belirttikleri çalışmalar referans alınarak grup 2’de 1,5 W güç ile kullanılmıştır [180, 191, 199, 205].

Lazer enerjisinin su ile yüzeyde emilimini önlemek için lazer uygulamasından önce kök kanalları kurutulmuş ve 200 µm fiber optik ucu apikalden koronole doğru dairesel hareketlerle uygulanmıştır [241]. Üç defa tekrar edilen bu prosedürde her uygulamadan sonra 20’şer sn ara verilerek, özellikle ince dentin kalınlığından dolayı kök ucunda ısı artışına bağlı oluşabilecek negatif etkiyi önlemek hedeflenmiştir [242, 243].

Çalışmada kök kanallarına antibakteriyel tedavi yöntemlerinin uygulanmasından önce ve sonra mikroorganizma sayısındaki farklılığın belirlenmesi için farklı dilüsyonlardan yapılan ekimler sonucunda oluşan koloniler sayılmıştır. Kök kanallarına *E. faecalis* ekiminden sonra, 4 deney grubuna ait her bir dişten antibakteriyel tedavi protokollerinin uygulanmasından önce ve sonra alınan örnekler ile tedavi sonrası koloni sayısındaki azalma yüzde olarak hesaplanmıştır. Her bir diş tedavi öncesi ve sonrası ölçümleri ile tek tek değerlendirerek standardizasyonun sağlanması amaçlanmıştır.

Afkhami ve ark. ve Mehrvarzfar ve ark. yaptıkları çalışmalarda öncesi ve sonrası örnek alımında kanal eğelerinden yararlanmışlardır [198, 209]. Bu çalışmada tedavi öncesi örnek alımında, planktonik bakterileri uzaklaştırmak için tüm kanallar 5 ml steril SF solüsyonu ile yıkandıktan sonra 40 numaralı H tipi eğeden yararlanılmıştır. Tedavi sonrası için ise apikal bölgede sıkışıp kazıma ile apikalden de örnek alınmasını sağlayan bir boy büyük olan 45 numaralı H tipi eğe kullanılmıştır. Birçok çalışmada örnek alımında sadece kağıt konlar kullanılmıştır [8, 223, 224]. Ancak kağıt kon ile sadece planktonik bakteriler toplanılabileceği için bu çalışmada kazıma işlemi ile kök duvarlarına yapışmış biyofilm tabakasından örnek almak hedeflenmiştir [244]. Ayrıca örnek alırken gates glidden gibi yüksek devirli döner aletlerin kullanımını ısı oluşturması nedeniyle tercih edilmemiştir. Eğeler ve 30 sn kök kanalında bekletilen steril paper pointler yardımı ile kök kanalından toplanan numuneler 1ml PBS solüsyonu içeren mikrosantrifüj tüplerine aktarılmıştır. Numunelerdeki biyofilm içindeki bakterileri seruma aktarmada sonikasyon ve vorteksin beraber kullanımı daha etkili bulunduğundan 5 dk sonikasyon ve 2 dk vorteks işlemi uygulanmıştır [245-247].

Gutknecht ve ark. 2000 yılında 810 nm diyot lazerin antibakteriyel etkinliğini inceledikleri çalışmada *E. faecalis*'in % 73,96'sını elimine edebildiğini ve antibakteriyel etkinliğinin umut vaat ettiğini belirtmişlerdir [115]. Bu çalışmada ise diyot lazer ile *E. faecalis* koloni sayısında en fazla %45 oranında bir azalma tespit edilmiştir. İki araştırma arasındaki farkın metodolojideki farklılıklar ile açıklanabilir. İnsan dişi kullanılan bu çalışmada lazer 1,5 W güç ile 3 defa 20 sn aralıklarla 7'şer sn. uygulanmıştır. Gutknecht ve ark. ise dentin tübül çapı insan dişine göre daha geniş olan sığır dişlerini kullanmışlar ve lazeri uzunlamasına kesitler aldıkları dentin dilimleri üzerinde klinik kullanımı taklit etmek için 5° derece açı ile devamlı modda 30 sn uygulamışlardır. Geniş çaplı dentin tübülleri içinde daha etkin yayılan lazer ışınının 30 sn. boyunca devamlı uygulanması diş yüzeyinde daha çok sıcaklık artışına neden olarak antibakteriyel etkinliği arttırmış olabilir.

Schoop ve ark. *E. faecalis* ve *E. coli* üzerinde Nd:YAG, Er:YAG ve Diyot lazer cihazlarının antibakteriyel etkinliğini araştırdıkları çalışmalarında bu cihazların 1 W gücünde kullanıldığında mikroorganizmalar üzerine çok az bir antibakteriyel etkinliklerinin olduğunu, 1,5 W olarak kullanılması durumunda ise *E. coli* üzerine etkili olmalarına rağmen, *E. faecalis* üzerine yalnızca Diyot ve Er:YAG lazerlerin etkili olduğunu bulmuşlardır. Ancak 810 nm diyot lazerin 1W güç ile uygulanan deney grubunda hiçbir dişte *E. faecalis* eliminasyonu sağlanamamışken, 1,5 W güç ile uygulandığında 20 örnekten sadece birinde *E. faecalis* eliminasyonu sağlanabildiği belirtilmiştir [191]. Bu çalışmada da Grup 2 (1,5 W) 'deki *E. faecalis* yüzde düşüş miktarı Grup SF (pozitif kontrol)'den istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunurken, Grup 1 (1 W) ve Grup 4 (SF) arasından anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Beer ve ark.'nın yaptıkları çalışmada 810 ve 940 nm diyot lazerin *E. coli* ve *E. faecalis*'e karşı antibakteriyel etkinliği incelemiş ve 810 nm diyot lazerin *E. faecalis* ile enfekte dişlerde %98,66 oranında azalma gösterdiğini belirtmişlerdir [199]. Beer ve ark.'nın çalışmasında inkübasyon süresinin 2 saat gibi biyofilm oluşumu için yetersiz bir süre olması ve kemomekanik şekillendirme sonrası bakterilerin dentin tübülüne penetrasyonunu sağlayan smear tabakasının uzaklaştırılmaması ile açıklanabilir.

Afkhami ve ark. yaptıkları çalışmada 810 nm diyot lazerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmasa da %2,25 NaOCl solüsyonunun etkinliğinden daha yüksek bulmuştur ve sonucun gereç ve yöntem olarak farklı olsa da Gutknecht ve ark.'nın çalışması ile tutarlı olduğunu belirtmişlerdir [115, 209]. Afkhami ve ark.'nın çalışması ile birçok yönden benzer yönetime sahip olan çalışmamızda sonuçların farklılığının; %5,25'lik NaOCl solüsyonunu kullanmamıza ve diyot lazerin uygulanma süresindeki farklılığa bağlı olabileceğini düşünmekteyiz. Çalışmamızda diyot lazer Grup 1'de firmanın önerisi ile 1 W güç ile 3 defa 7 sn, toplam 21 sn uygulanmıştır. Afkhami ve ark. ise 1 W güç ile 4 defa 10 sn toplam 40 sn uygulamışlardır. Bu çalışmadan 2 kat daha uzun süre diyot lazeri uygulanmış olması antibakteriyel etkinliği arttırmış olabilir.

Beltes ve ark. yakın kızıl ötesi (810 nm) diyot lazerin *E. faecalis* ile enfekte dişlerdeki antibakteriyel etkinliğini inceledikleri araştırmada, bu çalışma ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Benzer yöntem ve parametreler ile tedavi uygulanan diyot lazer grubu *E. faecalis*'in en az elimine edilebildiği deney grubu olmuştur [219].

Cretella ve ark. diyot lazerin *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğini inceledikleri çalışmada NaOCl ile irrigasyondan sonra diyot lazer uygulamasının NaOCl'nin antibakteriyel etkinliğini arttırmadığını göstermişlerdir. Ayrıca sadece diyot lazer uygulanan grupta da *E. faecalis* sayısında anlamlı bir azalma olmadığını belirtmişlerdir [224]. Sonuçlar bizim çalışmamız ile benzerlik göstermektedir. Ancak Cretella ve ark. bizim çalışmamızdan farklı olarak diyot lazeri 2,5 W ve toplam 90 sn uygulamış olmalarına rağmen *E. faecalis* sayısında anlamlı azalma sağlayamamışlardır. Bu durum lazer enerjisinin bir kısmının nemli kanal içinde su tarafından emilmiş olmasına bağlı olabileceğini düşünmekteyiz.

Bu çalışmanın deney gruplarının hiçbirinde *E. faecalis* tümüyle elimine edilememiş ve diyot lazerin antibakteriyel etkinliği NaOCl'den daha az bulunmuştur. Ancak Gutknecht ve ark. belirttiği gibi lazer gücündeki artış antibakteriyel etkinliği arttırmıştır [115].

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Farklı parametrelerde 810 nm lazer'in *E. faecalis* üzerindeki antibakteriyel etkinliğinin incelendiği bu tez çalışmasının sınırları dahilinde;

- Hiçbir deney grubunda *E. faecalis* 'in yüzde yüz eliminasyonu sağlanamamıştır.
- *E. faecalis* koloni sayısındaki yüzdesel düşüş en fazla %5,25 NaOCl irrigasyonu ile sağlanmıştır.
- Lazer gruplarında *E. faecalis* koloni sayısındaki yüzdesel düşüşteki anlamlı fark, diyot lazerin güç parametresindeki artışın lazerin antibakteriyel etkinliği üzerinde pozitif etkisi olduğu sonucunu göstermiştir.
- Serum fizyolojik irrigasyonu ile *E. faecalis* koloni sayısında %9 oranında bir azalma irrigasyonun mekanik etkisini göstermiştir.

7. ÖZGEÇMİŞ

18 Ekim 1985 tarihinde Antakya'da doğdu. İlköğrenimini Ali Sayar İlköğretim Okulu, orta ve lise öğrenimini Nevzat Şahin Anadolu Lisesinde tamamladı. 2003 yılında girmeye hak kazandığı Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesinden 2009 yılında mezun oldu. 2014 yılında Bezmialem Vakıf Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde Endodonti Anabilim dalında uzmanlık eğitimine başladı.

8. KAYNAKLAR

1. Bystrom, A. and Sundqvist G., *Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy*. Scandinavian Journal Dental Research, 1981. **89**(4): p. 321-8.
2. Alaçam T., A.M., Tınaz C., *ENDODONTİ*. 2012, ANKARA: OZYURT MATBAACILIK.
3. Kakehashi, S., Stanley, H.R. and Fitzgerald, R.J. *The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulps in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology 1965. **20**: p. 340-9.
4. Franzen, R., et al., *Bactericidal effect of a Nd: YAG laser on Enterococcus faecalis at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 μ m*. Lasers in Medical Science, 2011. **26**(1): p. 95-101.
5. Sjögren, U., et al., *Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. International Endodontic Journal 30, 297–306. International Endodontic Journal, 1998. **31**: p. 148-149.
6. Socransky, S., et al., *The microbiota of the gingival crevice area of man—I: Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms*. Archives of Oral Biology, 1963. **8**(3): p. 275-280.
7. Siqueira, J.F., *Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2002. **94**(3): p. 281-293.
8. Kuştarci, A., et al., *Bactericidal effect of KTP laser irradiation against Enterococcus faecalis compared with gaseous ozone: an ex vivo study*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2009. **107**(5): p. e73-e79.
9. Kishen, A., George, S. and Kumar, R. *Enterococcus faecalis- mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro*. Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2006. **77**(2): p. 406-415.
10. Bago, I., et al., *Antimicrobial efficacy of a high- power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment*. International Endodontic Journal, 2013. **46**(4): p. 339-347.

11. Young, G., Parashos, P., and Messer, H., *The principles of techniques for cleaning root canals*. Australian Dental Journal, 2007. **52**(s1).
12. Lim, Z., et al., *Light activated disinfection: an alternative endodontic disinfection strategy*. Australian Dental Journal, 2009. **54**(2): p. 108-114.
13. Zou, L., et al., *Penetration of sodium hypochlorite into dentin*. Journal of Endodontics, 2010. **36**(5): p. 793-796.
14. Haapasalo, M. and Ørstavik, D., *In vitro infection and of dentinal tubules*. Journal of Dental Research, 1987. **66**(8): p. 1375-1379.
15. Pirnat, S., Lukac, M., and Ihan, A., *Study of the direct bactericidal effect of Nd: YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria*. Lasers in Medical Science, 2011. **26**(6): p. 755-761.
16. Schilder, H., *Cleaning and shaping the root canal*. Dental Clinics North America, 1974. **18**: p. 269-296.
17. George, S., Kishen, A., and Song P., *The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by Enterococcus faecalis*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(12): p. 867-872.
18. Sundqvist, G., et al., *Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 1998. **85**(1): p. 86-93.
19. Siqueira, J. and Lopes, H., *Bacteria on the apical root surfaces of untreated teeth with periradicular lesions: a scanning electron microscopy study*. International Endodontic Journal, 2001. **34**(3): p. 216-220.
20. Siqueira, J.F. and Sen, B.H., *Fungi in endodontic infections*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2004. **97**(5): p. 632-641.
21. Slots, J., Sabeti, M., and Simon, J.H., *Herpesviruses in periapical pathosis: an etiopathogenic relationship?* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **96**(3): p. 327-331.
22. Vianna, M., et al., *Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections*. Journal of Clinical Microbiology, 2006. **44**(4): p. 1274-1282.
23. Hargreaves, K.M. and Berman L.H., *Cohen's pathways of the pulp*. 2015: Elsevier Health Sciences.
24. Nair, P., *Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response*. Periodontology 2000, 1997. **13**(1): p. 121-148.
25. Aas, J.A., et al., *Defining the normal bacterial flora of the oral cavity*. Journal of Clinical Microbiology, 2005. **43**(11): p. 5721-5732.

26. Nash, A.A., Mims, C.A, and Stephen J., *Mims' pathogenesis of infectious disease*. 2000: Academic Press.
27. Smith, A., Jackson, M. and Bagg, J. *The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity*. Journal of Medical Microbiology, 2001. **50**(11): p. 940-946.
28. Sundqvist, G., *Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1994. **78**(4): p. 522-530.
29. Siqueira Jr, J. and Rôças I, *Diversity of endodontic microbiota revisited*. Journal of Dental Research, 2009. **88**(11): p. 969-981.
30. Sakamoto, M., et al., *Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures*. Oral microbiology and Immunology, 2007. **22**(1): p. 19-23.
31. Siqueira, J.F., et al., *Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2007. **104**(1): p. 122-130.
32. Sundqvist, G., *Bacteriological studies of necrotic dental pulps*. 1976: Universito of Umea, Sweden.
33. Vianna, M., et al., *In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue*. International Endodontic Journal, 2006. **39**(6): p. 484-492.
34. Munson, M., et al., *Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections*. Journal of Dental Research, 2002. **81**(11): p. 761-766.
35. Rôças, I. and Siqueira, J., *Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis*. Journal of Clinical Microbiology, 2008. **46**(11): p. 3599-3606.
36. Siqueira, J. and Rôças, I., *Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2—redefining the endodontic microbiota*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(7): p. 488-498.
37. Siqueira, J., Rôças, I, and Rosado A., *Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach*. Oral Microbiology and Immunology, 2004. **19**(6): p. 363-370.
38. Sakamoto, M., et al., *Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections*. Molecular Oral Microbiology, 2006. **21**(2): p. 112-122.
39. Saito, D., et al., *Identification of bacteria in endodontic infections by sequence analysis of 16S rDNA clone libraries*. Journal of Medical Microbiology, 2006. **55**(1): p. 101-107.

40. Vianna, M., et al., *Microarrays complement culture methods for identification of bacteria in endodontic infections*. *Molecular Oral Microbiology*, 2005. **20**(4): p. 253-258.
41. Siqueira, J.F. and RÃÃ I.N, *Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis*. *Journal of Oral Microbiology*, 2009. **1**.
42. Sjögren, U., et al., *Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis*. *International Endodontic Journal*, 1997. **30**(5): p. 297-306.
43. Byström, A. and Sunqvist G., *The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy*. *International Endodontic Journal*, 1985. **18**(1): p. 35-40.
44. Siqueira, J.F., Paiva S.S, and Rôças I.N, *Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol*. *Journal of Endodontics*, 2007. **33**(5): p. 541-547.
45. Siqueira, J.F., Magalhães K.M, and Rôças I.N, *Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing*. *Journal of Endodontics*, 2007. **33**(6): p. 667-672.
46. Peters, L., et al., *Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions*. *International Endodontic Journal*, 2002. **35**(1): p. 13-21.
47. Chavez De Paz Villanueva, L., *On bacteria Persisting Root Canal Treatment. Identification and potential mechanisms of resistance to antimicrobial measures*. 2005: Göteborg University.
48. Chu, F.C., et al., *Identification of cultivable microorganisms from root canals with apical periodontitis following two-visit endodontic treatment with antibiotics/steroid or calcium hydroxide dressings*. *Journal of Endodontics*, 2006. **32**(1): p. 17-23.
49. de Paz, L.C., et al., *Streptococci from root canals in teeth with apical periodontitis receiving endodontic treatment*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2005. **100**(2): p. 232-241.
50. Chavez De Paz, L., et al., *Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment*. *International Endodontic Journal*, 2003. **36**(7): p. 500-508.
51. Chavez de Paz, L., Molander A., and Dahlén, G., *Gram- positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment*. *International endodontic journal*, 2004. **37**(9): p. 579-587.
52. Gomes, B., Lilley J., and Drucker, D., *Variations in the susceptibilities of*

components of the endodontic microflora to biomechanical procedures. International Endodontic Journal, 1996. **29**(4): p. 235-241.

53. Peciuliene, V., et al., *Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis.* International Endodontic Journal, 2001. **34**(6): p. 429-434.
54. Siqueira, J.F., Guimarães-Pinto T., and Rôças I.N, *Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals.* Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 800-805.
55. Tang, G., Samaranayake L., and Yip H.K, *Molecular evaluation of residual endodontic microorganisms after instrumentation, irrigation and medication with either calcium hydroxide or Septomixine.* Oral Diseases, 2004. **10**(6): p. 389-397.
56. Siqueira, J.F. and Rôças, I.N, *Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2004. **97**(1): p. 85-94.
57. Rôças, I.N. and Siqueira, J.F, *Characterization of microbiota of root canal-treated teeth with posttreatment disease.* Journal of Clinical Microbiology, 2012. **50**(5): p. 1721-1724.
58. Rôças, I.N., et al., *Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population.* Journal of Endodontics, 2004. **30**(7): p. 504-508.
59. Rôças, I.N., Siqueira, J.F, and Santos, K.R, *Association of Enterococcus faecalis with different forms of periradicular diseases.* Journal of Endodontics, 2004. **30**(5): p. 315-320.
60. Sedgley, C., et al., *Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of Enterococcus faecalis in root canals.* Journal of Endodontics, 2006. **32**(3): p. 173-177.
61. Foschi, F., et al., *Detection of bacteria in endodontic samples by polymerase chain reaction assays and association with defined clinical signs in Italian patients.* Oral microbiology and Immunology, 2005. **20**(5): p. 289-295.
62. Williams, J.M., et al., *Detection and quantitation of E. faecalis by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment.* Journal of endodontics, 2006. **32**(8): p. 715-721.
63. Fouad, A.F., et al., *Molecular detection of Enterococcus species in root canals of therapy-resistant endodontic infections.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2005. **99**(1): p. 112-118.
64. Gomes, B.P., et al., *Microbial analysis of canals of root-filled teeth with*

- periapical lesions using polymerase chain reaction*. Journal of Endodontics, 2008. **34**(5): p. 537-540.
65. Watnick, P. and Kolter, R., *Biofilm, city of microbes*. Journal of Bacteriology, 2000. **182**(10): p. 2675-2679.
 66. Costerton, J.W., Geesey, G., and Cheng K., *How bacteria stick*. Scientific American, 1978. **238**(1): p. 86-95.
 67. Vuong, C. and Otto M., *Staphylococcus epidermidis infections*. Microbes and Infection, 2002. **4**(4): p. 481-489.
 68. Post, J.C., et al., *The role of biofilms in otolaryngologic infections*. Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck surgery, 2004. **12**(3): p. 185-190.
 69. Sundqvist, G. and Figdor D., *Life as an endodontic pathogen*. Endodontic Topics, 2003. **6**(1): p. 3-28.
 70. Baumgartner, J.C., et al., *Microbiology of endodontic disease*. Ingle's Endodontics, 2008. **6**: p. 221-222.
 71. Grenier, D. and Mayrand D., *Nutritional relationships between oral bacteria*. Infection and Immunity, 1986. **53**(3): p. 616-620.
 72. Nair, P.R., *Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions*. Journal of Endodontics, 1987. **13**(1): p. 29-39.
 73. Ricucci, D., et al., *Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients*. Journal of Endodontics, 2009. **35**(4): p. 493-502.
 74. Siqueira, J.F., Rôças, I.N, and Lopes, H.P, *Patterns of microbial colonization in primary root canal infections*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2002. **93**(2): p. 174-178.
 75. Molven, O., Olsen, I. and Kerekes, K. *Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions*. Dental Traumatology, 1991. **7**(5): p. 226-229.
 76. Carr, G.B., et al., *Ultrastructural examination of failed molar retreatment with secondary apical periodontitis: an examination of endodontic biofilms in an endodontic retreatment failure*. Journal of Endodontics, 2009. **35**(9): p. 1303-1309.
 77. Schaudinn, C., et al., *Imaging of endodontic biofilms by combined microscopy (FISH/cLSM-SEM)*. Journal of Microscopy, 2009. **235**(2): p. 124-127.
 78. Sen, B., Piskin, B. and Demirci, T. *Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM*. Dental Traumatology, 1995. **11**(1): p. 6-9.

79. Ricucci, D. and Siqueira, J.F *Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings.* Journal of Endodontics, 2010. **36**(8): p. 1277-1288.
80. Flemming, H.-C. and Wingender, J. *The biofilm matrix.* Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(9): p. 623-633.
81. Leriche, V., Sibille, P. and Carpentier, B. *Use of an enzyme-linked lectinsorbent assay to monitor the shift in polysaccharide composition in bacterial biofilms.* Applied and Environmental Microbiology, 2000. **66**(5): p. 1851-1856.
82. Abdallah, M., et al., *Effect of growth temperature, surface type and incubation time on the resistance of Staphylococcus aureus biofilms to disinfectants.* Applied Microbiology and Biotechnology, 2014. **98**(6): p. 2597-2607.
83. Shrestha, A., et al., *Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity.* Journal of Endodontics, 2010. **36**(6): p. 1030-1035.
84. Stojicic, S., et al., *Ex vivo killing of Enterococcus faecalis and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection.* International Endodontic Journal, 2013. **46**(7): p. 649-659.
85. Siddiqui, S.H., K.H. Awan, and F. Javed, *Bactericidal efficacy of photodynamic therapy against Enterococcus faecalis in infected root canals: a systematic literature review.* Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2013. **10**(4): p. 632-643.
86. Neelakantan, P., et al., *Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro.* International Endodontic Journal, 2015. **48**(6): p. 602-610.
87. Du, T., et al., *Effect of long-term exposure to endodontic disinfecting solutions on young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals.* Journal of Endodontics, 2014. **40**(4): p. 509-514.
88. Zhang, C., J. Du, and Z. Peng, *Correlation between Enterococcus faecalis and persistent intraradicular infection compared with primary intraradicular infection: a systematic review.* Journal of Endodontics, 2015. **41**(8): p. 1207-1213.
89. Duggan, J.M. and Sedgley, C.M *Biofilm formation of oral and endodontic Enterococcus faecalis.* Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 815-818.
90. Al-Ahmad, A., et al., *Endodontic and salivary isolates of Enterococcus faecalis integrate into biofilm from human salivary bacteria cultivated in vitro.* Journal of Endodontics, 2009. **35**(7): p. 986-991.
91. Jones, R.N., et al., *Nosocomial enterococcal blood stream infections in the SCOPE program: antimicrobial resistance, species occurrence, molecular*

- testing results, and laboratory testing accuracy.* Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 1997. **29**(2): p. 95-102.
92. Ruoff, K.L., et al., *Species identities of enterococci isolated from clinical specimens.* Journal of Clinical Microbiology, 1990. **28**(3): p. 435-437.
 93. Sahm, D. *Antimicrobial resistance among enterococci: a view from US clinical laboratories. First International ASM Conference on Enterococci, Banff, Canada.* 2000.
 94. Gilmore, M.S., *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.* 2002: Zondervan.
 95. Hartke, A., et al., *Survival of Enterococcus faecalis in an oligotrophic microcosm: changes in morphology, development of general stress resistance, and analysis of protein synthesis.* Applied and Environmental Microbiology, 1998. **64**(11): p. 4238-4245.
 96. Tendolkar, P., Baghdayan, A. and Shankar, N. *Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century.* Cellular and Molecular Life Sciences CMLS, 2003. **60**(12): p. 2622-2636.
 97. Engström, B., *The significance of enterococci in root canal treatment.* Odontologisk Revy, 1964. **15**(2): p. 87.
 98. Möller, A., *Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies.* Odontologisk Tidskrift, 1966. **74**(5): p. Suppl: 1.
 99. Molander, A., et al., *Microbiological status of root- filled teeth with apical periodontitis.* International Endodontic Journal, 1998. **31**(1): p. 1-7.
 100. Peciuliene, V., et al., *Isolation of Enterococcus faecalis in previously root-filled canals in a Lithuanian population.* Journal of Endodontics, 2000. **26**(10): p. 593-595.
 101. Hancock, H., et al., *Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2001. **91**(5): p. 579-586.
 102. Pinheiro, E., et al., *Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions.* International Endodontic Journal, 2003. **36**(1): p. 1-11.
 103. Sedgley, C., Lennan, S. and Clewell, D. *Prevalence, phenotype and genotype of oral enterococci.* Oral microbiology and Immunology, 2004. **19**(2): p. 95-101.
 104. Anderson, A.C., et al., *Enterococcus faecalis from Food, clinical specimens, and oral sites: prevalence of virulence factors in association with biofilm formation.* Frontiers in Microbiology, 2015. **6**.
 105. Sedgley, C., et al., *Virulence, phenotype and genotype characteristics of*

- endodontic Enterococcus spp.* Molecular Oral Microbiology, 2005. **20**(1): p. 10-19.
106. Love, R., *Enterococcus faecalis—a mechanism for its role in endodontic failure.* International Endodontic Journal, 2001. **34**(5): p. 399-405.
 107. Ramamurthy, N.S., et al., *Inhibition of alveolar bone loss by matrix metalloproteinase inhibitors in experimental periodontal disease.* Journal of Periodontal Research, 2002. **37**(1): p. 1-7.
 108. Wang, L., et al., *Relationship of biofilm formation and gelE gene expression in Enterococcus faecalis recovered from root canals in patients requiring endodontic retreatment.* Journal of Endodontics, 2011. **37**(5): p. 631-636.
 109. Zoletti, G.O., et al., *Characterization of virulence factors and clonal diversity of Enterococcus faecalis isolates from treated dental root canals.* Research in Microbiology, 2011. **162**(2): p. 151-158.
 110. Distel, J.W., Hatton, J.F. and Gillespie, M.J. *Biofilm formation in medicated root canals.* Journal of Endodontics, 2002. **28**(10): p. 689-693.
 111. Peters, O., et al., *Three-dimensional analysis of root canal geometry by high-resolution computed tomography.* Journal of Dental Research, 2000. **79**(6): p. 1405-1409.
 112. Siqueira, J.F. and Rôças, I.N *Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures.* Journal of Endodontics, 2008. **34**(11): p. 1291-1301. e3.
 113. Siqueira, J.F., et al., *Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals.* Journal of Endodontics, 2002. **28**(3): p. 181-184.
 114. Estrela, C., et al., *Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals.* International Endodontic Journal, 2007. **40**(2): p. 85-93.
 115. GUTKNECHT, N., et al., *Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin.* Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 2000. **18**(2): p. 57-60.
 116. Moritz, A., et al., *In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations.* Quintessence International, 1997. **28**(3).
 117. Dalton, B.C., et al., *Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation.* Journal of Endodontics, 1998. **24**(11): p. 763-767.
 118. Wu, M., Sluis, L. and Wesselink, P. *The capability of two hand instrumentation techniques to remove the inner layer of dentine in oval canals.* International Endodontic Journal, 2003. **36**(3): p. 218-224.

119. Violich, D. and Chandler, N. *The smear layer in endodontics—a review*. International Endodontic Journal, 2010. **43**(1): p. 2-15.
120. Van der Sluis, L., et al., *Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature*. International Endodontic Journal, 2007. **40**(6): p. 415-426.
121. Zehnder, M., *Root canal irrigants*. Journal of Endodontics, 2006. **32**(5): p. 389-398.
122. Haapasalo, M., et al., *Irrigation in endodontics*. Dental Clinics of North America, 2010. **54**(2): p. 291-312.
123. Kandaswamy, D. and Venkateshbabu, N. *Root canal irrigants*. Journal of Conservative Dentistry, 2010. **13**(4): p. 256.
124. Ingle, J.I. and Zeldow, B.J *An evaluation of mechanical instrumentation and the negative culture in endodontic therapy*. The Journal of the American Dental Association, 1958. **57**(4): p. 471-476.
125. Chow, T., *Mechanical effectiveness of root canal irrigation*. Journal of Endodontics, 1983. **9**(11): p. 475-479.
126. Jeansonne, M.J. and White, R.R *A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants*. Journal of Endodontics, 1994. **20**(6): p. 276-278.
127. Zamany, A., Safavi, K. and Spångberg, L.S. *The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2003. **96**(5): p. 578-581.
128. Naenni, N., Thoma, K. and Zehnder, M. *Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants*. Journal of Endodontics, 2004. **30**(11): p. 785-787.
129. McComb, D. and Smith, D.C *A preliminary scanning electron microscopic study of root canals after endodontic procedures*. Journal of Endodontics, 1975. **1**(7): p. 238-242.
130. Yang, S.-E., et al., *Effect of smear layer and chlorhexidine treatment on the adhesion of Enterococcus faecalis to bovine dentin*. Journal of Endodontics, 2006. **32**(7): p. 663-667.
131. Carvalho, A.S., et al., *Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study*. Journal of Endodontics, 2008. **34**(11): p. 1396-1400.
132. Gurbuz, T., et al., *Evaluation of root canal dentin after Nd: YAG laser irradiation and treatment with five different irrigation solutions: a preliminary study*. Journal of Endodontics, 2008. **34**(3): p. 318-321.
133. Coolidge, E.D., *The diagnosis and treatment of conditions resulting from*

- diseased dental pulps*. The Journal of the National Dental Association, 1919. **6**(4): p. 337-349.
134. Hoffman, P., Death, J. and Coates, D. *The stability of sodium hypochlorite solutions*. 1981, Disinfectants: their use and evaluation of effectiveness. London: Academic Press.
 135. Russell, A.D., *Factors influencing the efficacy of antimicrobial agents*. Principles and practice of disinfection, preservation and sterilization. Blackwell, London, 2008: p. 98-127.
 136. Gomes, B., et al., *In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of Enterococcus faecalis*. International Endodontic Journal, 2001. **34**(6): p. 424-428.
 137. Estrela, C., et al., *Mechanism of action of sodium hypochlorite*. Brazilian Dental Journal, 2002. **13**(2): p. 113-117.
 138. Klyn, S.L., Kirkpatrick, T.C and Rutledge, R.E *In Vitro Comparisons of Debris Removal of the EndoActivator TM System, the F File TM, Ultrasonic Irrigation, and NaOCl Irrigation Alone after Hand-rotary Instrumentation in Human Mandibular Molars*. Journal of endodontics, 2010. **36**(8): p. 1367-1371.
 139. Johnson, M., et al., *Canal and isthmus debridement efficacy using a sonic irrigation technique in a closed-canal system*. Journal of Endodontics, 2012. **38**(9): p. 1265-1268.
 140. Ma, J., et al., *A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy*. Journal of Endodontics, 2011. **37**(10): p. 1380-1385.
 141. Wang, Z., Shen, Y. and Haapasalo, M. *Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old Enterococcus faecalis biofilms in dentin canals*. Journal of Endodontics, 2012. **38**(10): p. 1376-1379.
 142. Clegg, M., et al., *The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro*. Journal of Endodontics, 2006. **32**(5): p. 434-437.
 143. Giardino, L., et al., *Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against Enterococcus faecalis biofilm*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 852-855.
 144. Özok, A.R., et al., *Comparison of growth and susceptibility to sodium hypochlorite of mono- and dual-species biofilms of Fusobacterium nucleatum and Peptostreptococcus (micromonas) micros*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 819-822.
 145. Pashley, E., et al., *Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue*. Journal of Endodontics, 1985. **11**(12): p. 525-528.

146. Wilson, C., et al., *Clonal diversity in biofilm formation by Enterococcus faecalis in response to environmental stress associated with endodontic irrigants and medicaments*. International Endodontic Journal, 2015. **48**(3): p. 210-219.
147. Hülsmann, M., Heckendorff, M. and Lennon, A. *Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use*. International Endodontic Journal, 2003. **36**(12): p. 810-830.
148. Spencer, N.C., et al., *Comparative stabilizing effects of some anticoagulants on fasting blood glucose of diabetics and non-diabetics, determined by spectrophotometry (glucose oxidase)*. Asian Journal of Medical Sciences, 2011. **3**(6): p. 234-236.
149. Protogerou, E., et al., *Effectiveness of a Canal Brush on Removing Smear Layer: A Scanning Electron Microscopic Study*. Brazilian Dental Journal, 2013. **24**(6): p. 580-584.
150. Yamada, R.S., et al., *A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions: Part 3*. Journal of Endodontics, 1983. **9**(4): p. 137-142.
151. De-Deus, G., et al., *Interfacial adaptation of the Epiphany self-adhesive sealer to root dentin*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2011. **111**(3): p. 381-386.
152. Haapasalo, M., et al., *Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions*. Endodontic Topics, 2005. **10**(1): p. 77-102.
153. Cunningham, W.T. and Balekjian, A.Y. *Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1980. **49**(2): p. 175-177.
154. Teixeira, C., Felipe, M. and Felipe, W. *The effect of application time of EDTA and NaOCl on intracanal smear layer removal: an SEM analysis*. International Endodontic Journal, 2005. **38**(5): p. 285-290.
155. Crumpton, B.J., Goodell, G.G. and McClanahan, S.B. *Effects on smear layer and debris removal with varying volumes of 17% REDTA after rotary instrumentation*. Journal of Endodontics, 2005. **31**(7): p. 536-538.
156. Sen, B.H., Akdeniz, B.G. and Denizci, A.A. *The effect of ethylenediamine-tetraacetic acid on Candida albicans*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2000. **90**(5): p. 651-655.
157. Ates, M., Akdeniz, B.A. and Sen, B.H. *The effect of calcium chelating or binding agents on Candida albicans*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2005. **100**(5): p. 626-630.
158. Russell, A.D., *Principles of antimicrobial activity*. Disinfection, sterilization and preservation, 1991: p. 29-58.

159. Gulabivala, K., et al., *Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces*. Endodontic Topics, 2005. **10**(1): p. 103-122.
160. Bryce, G., et al., *Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single-and dual-species biofilms*. Journal of Endodontics, 2009. **35**(9): p. 1243-1248.
161. de Paz, L.E.C., Bergenholtz, G. and Svensäter, G. *The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria*. Journal of Endodontics, 2010. **36**(1): p. 70-77.
162. Baca, P., et al., *Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on Enterococcus faecalis biofilm in dentin*. Journal of Endodontics, 2011. **37**(3): p. 363-366.
163. Ferrer-Luque, C.M., et al., *Antimicrobial activity of maleic acid and combinations of cetrimide with chelating agents against Enterococcus faecalis biofilm*. Journal of Endodontics, 2010. **36**(10): p. 1673-1675.
164. Zhang, R., et al., *Antibacterial and residual antimicrobial activities against Enterococcus faecalis biofilm: A comparison between EDTA, chlorhexidine, cetrimide, MTAD and QMix*. Scientific Reports, 2015. **5**: p. 12944.
165. Wadhawan, R., et al., *Innovative Drug Discovery*.
166. Qian, W., Shen, Y. and Haapasalo, M. *Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion*. Journal of Endodontics, 2011. **37**(10): p. 1437-1441.
167. Grawehr, M., et al., *Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions*. International Endodontic Journal, 2003. **36**(6): p. 411-415.
168. Midda, M. and Renton-Harper, P. *Lasers in dentistry*. British Dental Journal, 1991. **170**(9): p. 343-346.
169. Maiman, T.H., *Stimulated optical radiation in ruby*. 1960.
170. Parker, S., *Verifiable CPD paper: introduction, history of lasers and laser light production*. British Dental Journal, 2007. **202**(1): p. 21-31.
171. Baxter, G., *Therapeutic lasers. Theory and praxis*. Churchill Livingstone, 1994.
172. Coluzzi, D.J., *Fundamentals of dental lasers: science and instruments*. Dental Clinics of North America, 2004. **48**(4): p. 751-770.
173. Coluzzi, D.J., *An overview of laser wavelengths used in dentistry*. Dental Clinics of North America, 2000. **44**(4): p. 753-765.
174. Coluzzi, D.J., *An overview of lasers in dentistry*. Alpha Omegan, 2008. **101**(3): p. 125.

175. Wigdor, H., et al., *The effect of lasers on dental hard tissues*. The Journal of the American Dental Association, 1993. **124**(2): p. 65-70.
176. Pirnat, S., *Versatility of an 810 nm diode laser in dentistry: An overview*. Journal Laser Health Academy, 2007. **4**: p. 1-9.
177. Dederich, D.N., *Laser/tissue interaction: what happens to laser light when it strikes tissue?* The Journal of the American Dental Association, 1993. **124**(2): p. 57-61.
178. Pick, R. and Powell, G. *Laser in dentistry. Soft-tissue procedures*. Dental Clinics of North America, 1993. **37**(2): p. 281-296.
179. Olivi, A.P.G., *Laser in endodontics (Part I)*. Roots, 2011. **2**: p. 6-9.
180. Saydjari, Y., Kuypers, T. and Gutknecht, N. *Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd: YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals—A Literature Overview*. BioMed Research International, 2016. **2016**.
181. Glinkowski, W. and Pokora, L. *Lasers in therapy*. Lasers Instruments-Laser Technique Centre, Warszawa, 1993.
182. Moritz, A., et al., *Oral laser application*. 2006: Quintessence Chicago, Ill.
183. Goharkhay, K., et al., *Effects on oral soft tissue produced by a diode laser in vitro*. Lasers in surgery and medicine, 1999. **25**(5): p. 401-406.
184. Crippa, R. and Calcagnile, F. *The Use of Laser Technology for Submandibular Calculosis: A Case Report*. Journal of Oral Laser Applications, 2003. **3**(3).
185. Stübinger, S., et al., *Soft tissue surgery with the diode laser--theoretical and clinical aspects*. Schweizer Monatsschrift für Zahnmedizin= Revue mensuelle suisse d'odonto-stomatologie= Rivista mensile svizzera di odontologia e stomatologia, 2005. **116**(8): p. 812-820.
186. Moritz, A., et al., *Treatment of periodontal pockets with a diode laser*. Lasers in Surgery and Medicine, 1998. **22**(5): p. 302-311.
187. Kreisler, M., Al Haj, H. and d'Hoedt, B. *Clinical efficacy of semiconductor laser application as an adjunct to conventional scaling and root planing*. Lasers in Surgery and Medicine, 2005. **37**(5): p. 350-355.
188. Maiorana, C., Salina, S. and Santoro, F. *Treatment of Periimplantitis with Diode Laser: A Clinical Report*. Journal of Oral Laser Applications, 2002. **2**(2).
189. Moritz, A., et al., *Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations*. Lasers in Surgery and Medicine, 1997. **21**(3): p. 221-226.

190. Gutknecht, N., et al., *A Clinical Comparison of the Bactericidal Effect of the Diode Laser and 5% Sodium Hypochlorite in Necrotic Root Canals*. Journal of Oral Laser Applications, 2002. **2**(3).
191. Schoop, U., et al., *Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin*. Lasers in Surgery and Medicine, 2004. **35**(2): p. 111-116.
192. Sulieman, M., Rees, J. and Addy, M. *Surface and pulp chamber temperature rises during tooth bleaching using a diode laser: a study in vitro*. British Dental Journal, 2006. **200**(11): p. 631-634.
193. Puliafito, C.A., et al., *Semiconductor laser endophotocoagulation of the retina*. Archives of Ophthalmology, 1987. **105**(3): p. 424-427.
194. Cuschieri, A., *Minimal access surgery and the future of interventional laparoscopy*. The American journal of surgery, 1991. **161**(3): p. 404-407.
195. Niemz, M.H., *Laser-tissue interactions: fundamentals and applications*. 2013: Springer Science & Business Media.
196. Wang, Q.-q., Zhang, C-f and Yin, X-z. *Evaluation of the bactericidal effect of Er, Cr: YSGG, and Nd: YAG lasers in experimentally infected root canals*. Journal of Endodontics, 2007. **33**(7): p. 830-832.
197. Olivi, A.P.G., *Laser in endodontics (Part II)*. Roots, 2011. **2**: p. 6-12.
198. Mehrvarzfar, P., et al., *Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against Enterococcus faecalis contaminating root canals: an in vitro study*. Journal of Oral Science, 2011. **53**(3): p. 355-360.
199. Beer, F., et al., *Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—an in vitro study*. Lasers in Medical Science, 2012. **27**(2): p. 361-364.
200. Schneider, S.W., *A comparison of canal preparations in straight and curved root canals*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, 1971. **32**(2): p. 271-275.
201. De Rossi, A., et al., *Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2005. **99**(5): p. 628-636.
202. Gutknecht, N., et al., *Bactericidal effect of a 980-nm diode laser in the root canal wall dentin of bovine teeth*. Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 2004. **22**(1): p. 9-13.
203. Moritz, A., et al., *Nd: YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbiological examinations*. The Journal of the American Dental Association, 1997. **128**(11): p. 1525-1530.

204. Yasuda, Y., et al., *Bactericidal effect of Nd: YAG and Er: YAG lasers in experimentally infected curved root canals*. Photomedicine and Laser Surgery, 2010. **28**(S2): p. S-75-S-78.
205. Gutknecht, N., et al., *Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment*. Lasers in Medical Science, 2005. **20**(2): p. 99-103.
206. Perez, F., et al., *Migration of a Streptococcus sanguis strain through the root dentinal tubules*. Journal of Endodontics, 1993. **19**(6): p. 297-301.
207. Safavi, K.E., Spngberg, L.S. and Langeland, K. *Root canal dentinal tubule disinfection*. Journal of Endodontics, 1990. **16**(5): p. 207-210.
208. Love, R., *The effect of tissue molecules on bacterial invasion of dentine*. Molecular Oral Microbiology, 2002. **17**(1): p. 32-37.
209. Afkhami, F., S. Akbari, and N. Chiniforush, *Enterococcus faecalis elimination in root canals using silver nanoparticles, photodynamic therapy, diode laser, or laser-activated nanoparticles: an in vitro study*. Journal of Endodontics, 2017. **43**(2): p. 279-282.
210. Balić, M., et al., *The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic-activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal E. faecalis biofilm*. Lasers in Medical Science, 2016. **31**(2): p. 335-342.
211. Baumgartner, J.C. and Mader, C.L. *A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens*. Journal of Endodontics, 1987. **13**(4): p. 147-157.
212. Goldman, M., et al., *The efficacy of several endodontic irrigating solutions: a scanning electron microscopic study: part 2*. Journal of Endodontics, 1982. **8**(11): p. 487-492.
213. Haapasalo, M., Qian, W. and Shen, Y. *Irrigation: beyond the smear layer*. Endodontic Topics, 2012. **27**(1): p. 35-53.
214. Spoleti, P., Siragusa, M. and Spoleti, M.J. *Bacteriological evaluation of passive ultrasonic activation*. Journal of Endodontics, 2003. **29**(1): p. 12-14.
215. Pan, J., et al., *Cold plasma therapy of a tooth root canal infected with Enterococcus faecalis biofilms in vitro*. Journal of Endodontics, 2013. **39**(1): p. 105-110.
216. Ran, S., et al., *Assessment of dentinal tubule invasion capacity of Enterococcus faecalis under stress conditions ex vivo*. International Endodontic Journal, 2015. **48**(4): p. 362-372.
217. Appelbe, O. and Sedgley, C. *Effects of prolonged exposure to alkaline pH on Enterococcus faecalis survival and specific gene transcripts*. Molecular Oral Microbiology, 2007. **22**(3): p. 169-174.

218. Asnaashari, M., Ebad, L.T. and Shojaeian, S. *Comparison of Antibacterial Effects of 810 and 980-nanometer Diode Lasers on Enterococcus Faecalis in the Root Canal System-An in vitro study*. Laser therapy, 2016. **25**(3): p. 209-214.
219. Beltes, C., et al., *Antimicrobial photodynamic therapy using Indocyanine green and near-infrared diode laser in reducing Enterococcus faecalis*. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2017. **17**: p. 5-8.
220. Eldeniz, A., et al., *Bactericidal efficacy of Er, Cr: YSGG laser irradiation against Enterococcus faecalis compared with NaOCl irrigation: an ex vivo pilot study*. International Endodontic Journal, 2007. **40**(2): p. 112-119.
221. Siqueira, J., et al., *Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of Enterococcus faecalis from the root canal, in vitro*. International endodontic journal, 1997. **30**(4): p. 279-282.
222. Meire, M., et al., *Effectiveness of different laser systems to kill Enterococcus faecalis in aqueous suspension and in an infected tooth model*. International Endodontic Journal, 2009. **42**(4): p. 351-359.
223. Pedulla, E., et al., *Decontamination efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming (PIPS) of irrigants using low-energy laser settings: an ex vivo study*. International Endodontic Journal, 2012. **45**(9): p. 865-870.
224. Cretella, G., et al., *The Effect of Diode Laser on Planktonic Enterococcus faecalis in Infected Root Canals in an Ex Vivo Model*. Photomedicine and Laser Surgery, 2017. **35**(4): p. 190-194.
225. Al Shahrani, M., et al., *Enhanced removal of Enterococcus faecalis biofilms in the root canal using sodium hypochlorite plus photon-induced photoacoustic streaming: an in vitro study*. Photomedicine and Laser Surgery, 2014. **32**(5): p. 260-266.
226. Sahar-Helft, S., et al., *Effect of Er: YAG laser-activated irrigation solution on Enterococcus faecalis biofilm in an ex-vivo root canal model*. Photomedicine and Laser Surgery, 2013. **31**(7): p. 334-341.
227. Stojicic, S., Y. Shen, and M. Haapasalo, *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*. Journal of Endodontics, 2013. **39**(4): p. 473-477.
228. Dunavant, T.R., et al., *Comparative evaluation of endodontic irrigants against Enterococcus faecalis biofilms*. Journal of Endodontics, 2006. **32**(6): p. 527-531.
229. Arias-Moliz, M.T., et al., *Eradication of Enterococcus faecalis biofilms by cetrimide and chlorhexidine*. Journal of Endodontics, 2010. **36**(1): p. 87-90.
230. Stuart, C.H., et al., *Enterococcus faecalis: its role in root canal treatment*

- failure and current concepts in retreatment.* Journal of Endodontics, 2006. **32**(2): p. 93-98.
231. Portenier, I., et al., *The susceptibility of starved, stationary phase, and growing cells of Enterococcus faecalis to endodontic medicaments.* Journal of Endodontics, 2005. **31**(5): p. 380-386.
232. Arias-Moliz, M.T., et al., *Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants.* Journal of Endodontics, 2009. **35**(5): p. 711-714.
233. Chai, W.L., et al., *Susceptibility of Enterococcus faecalis biofilm to antibiotics and calcium hydroxide.* Journal of Oral Science, 2007. **49**(2): p. 161-166.
234. Estrela, C., et al., *Efficacy of sodium hypochlorite and chlorhexidine against Enterococcus faecalis: a systematic review.* Journal of Applied Oral Science, 2008. **16**(6): p. 364-368.
235. Eldeniz, A.U., Guneser, M.B. and Akbulut, M.B. *Comparative antifungal efficacy of light-activated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants.* Lasers in Medical Science, 2015. **30**(2): p. 669-675.
236. Carson, K.R., Goodell, G.G and McClanahan, S.B. *Comparison of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens.* Journal of Endodontics, 2005. **31**(6): p. 471-473.
237. Pascon, F.M., et al., *Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review.* Journal of Dentistry, 2009. **37**(12): p. 903-908.
238. Basrani, B. and M. Haapasalo, *Update on endodontic irrigating solutions.* Endodontic Topics, 2012. **27**(1): p. 74-102.
239. Waal, S., et al., *Diffusion of antimicrobials in multispecies biofilms evaluated in a new biofilm model.* International Endodontic Journal, 2017. **50**(4): p. 367-376.
240. de Souza, E.B., et al., *High-power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin.* Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology, 2008. **106**(1): p. e68-e72.
241. Asnaashari, M., et al., *Comparison of the Antibacterial Effect of 810 nm Diode Laser and Photodynamic Therapy in Reducing the Microbial Flora of Root Canal in Endodontic Retreatment in Patients With Periradicular Lesions.* Journal of Lasers in Medical Sciences, 2016. **7**(2): p. 99-104.
242. da Costa Ribeiro, A., et al., *Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies.* Journal of Endodontics, 2007. **33**(3): p. 252-255.
243. Gutknecht, N., et al., *Long-term clinical evaluation of endodontically treated teeth by Nd: YAG lasers.* Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery,

1996. **14**(1): p. 7-11.
244. Fouad, A.F., *Endodontic Microbiology and Pathobiology: Current State of Knowledge*. Dental clinics of North America, 2017. **61**(1): p. 1-15.
245. Kobayashi, H., et al., *Improved detection of biofilm-formative bacteria by vortexing and sonication: a pilot study*. Clinical Orthopaedics and Related Research, 2009. **467**(5): p. 1360-1364.
246. Ozdemir, H.O., et al., *Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on Enterococcus faecalis biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study*. Journal of Endodontics, 2010. **36**(5): p. 842-846.
247. Trampuz, A., et al., *Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection*. New England Journal of Medicine, 2007. **357**(7): p. 654-663.