



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ER,CR:YSGG LAZER İLE AKTİVE EDİLMİŞ/EDİLMEMİŞ
FARKLI İRRİGASYON SOLÜSYONLARININ DAİMİ DİŞ KÖK
KANALLARINDA *ENTEROCOCCUS FAECALIS* ÜZERİNE
ETKİNLİĞİNİN *IN-VITRO* İNCELENMESİ.**

GÜLŞAH BALAN

DOKTORA TEZİ

PEDODONTİ ANABİLİM DALI

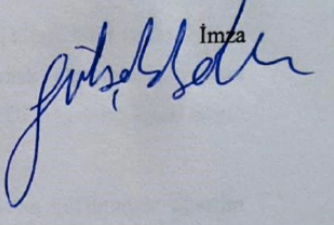
PROF. DR. SERAP H. AKYÜZ

2020 – İSTANBUL

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışması ile elde edilmemiş bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

Gülşah BALAN
İmza



TEŞEKKÜR

Pedodonti eğitimimde öğrenmenin yeri ve zamanı olmadığını bize her fırsatta gösteren ve çalışkanlığıyla örnek aldığımız Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı Başkanı Sayın **Prof Dr. Betül KARGÜL**'e,

Doktora eğitimim boyunca tüm tecrübelerini benimle paylaşan, tez çalışmamın gerçekleşmesine olanak sağlayan, her aşamasında mutlaka zaman ayırıp ilgisini, desteğini ve sevgisini hissettiren, akademik çalışma disiplini ve ilkelerini öğreten ve her zaman kendisini örnek alacağım Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi değerli danışman hocam Sayın **Prof. Dr. Serap AKYÜZ**'e,

Pedodonti eğitimimde katkısı olan akademik disiplin, klinik bilgi ve tavsiyeleri ile bize yol göstermeye çalışan ve çalışkanlığıyla örnek aldığımız Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Prof Dr. Ali R. MENTEŞ**'e,

Tecrübeleri ile pedodonti alanında yolumuzu aydınlatan bölümümüz öğretim üyeleri **Doç. Dr. Sertaç PEKER, Doç. Dr. Eda HAZNEDAROĞLU, Doç. Dr. Başak DURMUŞ, Doç. Dr. Figen EREN GİRAY, Dr. Öğr. Üyesi Işıl Özgül KALYONCU, Dr. Öğr. Üyesi M. Ahu DURHAN ve Dr. Öğr. Üyesi Ecem AKBEYAZ ŞİVET**'e,

Doktora eğitim hayatımda farklı görüşlerin değerini öğreten ve mesleğine duyduğu saygı ile işlerinde hataya yer vermeyen Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Temel Bilimler Anabilim Dalı öğretim üyesi Sayın **Prof. Dr. Ayşen YARAT**'a,

Tezimin bugünlere gelmesinde değerli bilimsel katkıları nedeniyle İstanbul Kent Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı başkanı Sayın Prof. Dr. **Elif SEPET**'e,

Başkanı olduğu Yeditepe Üniversitesi Biyosidal AR-GE laboratuvarında çalışmama izin vererek tezimin gerçekleşmesine olanak sağlayan değerli bilim insanı Sayın **Prof.Dr. Fikrettin ŞAHİN**'e,

Yeditepe Üniversitesi Biyosidal laboratuvarlarında görev alan Sayın **Okan Demir**'e ve her soruma içtenlikle cevap veren değerli insan Sayın **Uzman Sadık KALAYCI**'ya,

Tezimin Medipol Üniversitesi REMER AR-GE laboratuvarında gerçekleşen aşamasının sorunsuz gerçekleşmesini sağlayan Sayın **Dr. Mehmet Şerif Aydın**'a,

Tez çalışmamın istatistiksel değerlendirmelerinde beni sıkılmadan dinleyen ve bilgisini esirgemeyen değerli insan Sayın **Özlem Köksal**'a,

Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda aldığımız eğitim sürecinde güleryüzlerini ve arkadaşlıklarını güzel anılar olarak hatırlayacağım Betül Şen Yavuz, Duygu Yaşar, Elif Ece Kalaoğlu, Belgin Yazıcı, Nil Ceren Mungan, Elif Kanberoğlu, Zerina Durmişi, Menna Darwesh, Mazen Nizar Khlef, Louay Akkash, Nawzat Housseini, Rehab Tahsen, Hande Ilgın, Gözde Karaman, Ayşenur Parlakyıldız, Ecem İpek, Irmak Beştaş, Gözde Akın, Sevda Yetkin, Selçuk Mert Özçelik, Aydan Bozkurt, Bahar Aksan, Kübra Güleç, Raghda Gadaou ve ismini sayamadığım diğer tüm asistan arkadaşlarıma,

Ve her zaman yanımda olan bir teşekkürle sığdıramayacağım destekleri için **SEVGİLİ AİLEM**'e en içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından SAG-C-DRP-241018-0573 koda sahip 6017 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

BEYAN	
TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	iii
SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
RESİM LİSTESİ.....	xi
TABLO LİSTESİ.....	xiii
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	6
4.1. Biyofilm.....	6
4.2. Kök Kanal Sisteminin Enfeksiyonu ve Etiyolojisi.....	7
4.3. Kök Kanal Tedavisinde Final İrrigasyonun Önemi.....	8
4.4. İrrigasyon Solüsyonları ve Özellikleri.....	10
4.4.1. Sodyum hipoklorit.....	10
4.4.2. Klorheksidin	14
4.4.3. Etilen diamin tetraasetik asit.....	15
4.4.4. Fosfat tamponlu salin.....	16
4.4.5. Deney solüsyonları.....	16
4.4.5.1. Sodyum pentaborat pentahidrat.....	17
4.4.5.2. Döteryumu azaltılmış su.....	19
4.5. İrrigasyonda Karşılaşılan Problemler.....	20
4.6. Kök Kanal İrrigasyonunda Güncel Yöntemler.....	22
4.6.1. Manuel irrigasyon sistemleri.....	22
4.6.1.1. Geleneksel şırınga irrigasyonu	22
4.6.1.2. Negatif basınçlı irrigasyon sistemleri.....	23
4.6.2. Solüsyon Aktivasyon Yöntemleri.....	24
4.6.2.1. Isıtma.....	24
4.6.2.2. Mekanik dinamik aktivasyon.....	25
4.6.2.3. Sonik ve ultrasonik aktivasyon.....	25
4.6.2.4. Multisonik aktivasyon.....	27

4.6.2.5.	Lazer destekli kök kanal tedavisi.....	27
4.6.2.5.1.	Kök kanal tedavisinde erbium lazerler.....	28
4.6.2.5.2.	Lazer aktivasyonu ile irrigasyon.....	29
4.7.	Biyofilm Analiz Yöntemleri.....	30
4.7.1.	Fiziksel Metod: Kalınlık Ağırlık Alan ve Yoğunluk Ölçümleri.....	30
4.7.2.	Kolorimetrik Teknikler.....	31
4.7.3.	Biyokimyasal Metod: Biyokütle ve Ekstraselüler Matriks.....	32
4.7.4.	Moleküler Biyolojik Metod.....	32
4.7.5.	Mikrobiyolojik Kültür Oluşturma.....	33
4.7.6.	İleri Teknikler.....	34
4.8.	Mikroskopik Görüntüleme Yöntemleri.....	35
4.8.1.	Işık Mikroskop.....	35
4.8.2.	Taramalı Elektron Mikroskop	35
4.8.3.	Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	36
4.8.4.	Epiflorens Mikroskop.....	37
4.8.5.	Fluoresan In-Situ Hibridizasyon.....	37
4.9.	Morfolojik Görüntüleme Yöntemlerinde Floresan Maddeler.....	38
5.	GEREÇ VE YÖNTEM.....	41
5.1.	Etik Onay.....	41
5.2.	Örneklerin Toplanması.....	41
5.3.	Çekilmiş Dişlerin <i>E. Faecalis</i> ile Kontamine Edilmek Üzere Hazırlanması.....	41
5.4.	<i>Enterococcus faecalis</i> ' in Çoğaltılması ve Dişlere İnokülasyonu	42
5.5.	Kullanılan İrrigasyon Solüsyonları.....	43
5.6.	Deney Grupları.....	44
5.7.	İrrigasyon Öncesi Dişlerin Kontamine Olduğunun Gösterilmesi.....	44
5.8.	Dezenfeksiyon Aşaması	45
5.9.	Mikrobiyolojik Değerlendirme.....	46
5.9.1.	Mikrodilüsyon Testi.....	46
5.9.2.	Mikroskopik Görüntüleme ve Analiz.....	47
5.10.	İstatistik.....	50
6.	BULGULAR.....	51
6.1.	Mikrodilüsyon Testi Bulguları.....	51

6.1.1. Geleneksel şırınga irrigasyon metodu uygulanan solüsyonların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi.....	51
6.1.2. Lazer aktivasyon metodu uygulanan solüsyonların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi.....	51
6.1.3. Geleneksel ve lazer aktivasyon metodu uygulanmış solüsyonların karşılaştırılması ile antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesi.....	52
6.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop Görüntüleri ve Analiz Bulguları.....	54
6.2.1. Konfokal lazer taramalı mikroskop ile taranan örneklerin görüntüleri	54
6.2.2. Konfokal lazer taramalı mikroskop analiz bulguları.....	63
6.2.2.1. Geleneksel metod solüsyonlarının bölgelere göre değerlendirilmesi	65
6.2.2.2. Lazer aktivasyon metodu solüsyonlarının bölgelere göre değerlendirilmesi.....	66
6.2.2.3. Metodlar arasında karşılaştırılarak solüsyonların bölgelere göre değerlendirilmesi.....	67
7. TARTIŞMA.....	69
7.1. Gereç ve Yönteme Ait Tartışma.....	69
7.1.1. İrrigasyon solüsyonlarına ait tartışma.....	71
7.1.2. İrrigasyon metodlarına ait tartışma.....	75
7.1.3. İrrigasyon metodlarının uygulama tekniğine ait tartışma.....	78
7.1.4. Deney gruplarına ait tartışma.....	79
7.1.5. Mikrobiyolojik analiz ve değerlendirme yöntemine ait tartışma.....	80
7.2. Mikrodilüsyon Testi Bulgularına Ait Tartışma.....	84
7.3. Mikroskopik Analiz Bulgularına Ait Tartışma.....	88
8. SONUÇLAR.....	93
8.1. Mikrodilüsyon Testi Sonuçları.....	93
8.2. Mikroskopik Görüntü Analiz Sonuçları.....	93
9. KAYNAKLAR.....	95
10. EKLER.....	126
ETİK KURUL ONAYI.....	126
11. ÖZGEÇMİŞ.....	127

SİMGE VE KISALTMALAR LİSTESİ

AFM	<i>Atomic force microscope</i> (Atomik kuvvet mikroskopisi)
ATP	Adenozin trifosfat
CFU	<i>Colony-forming units</i> (Koloni oluşturan üniteler)
CO ₂	Karbon dioksit
CHX	Klorheksidin
CLSM	<i>Confocal laser scanning microscope</i> (Konfokal lazer taramalı mikroskop)
DDW	<i>Deuterium depleted water</i> (Döteryumu azaltılmış su)
D	Döteryum
DNA	Deoksiribonükleik asit
dk	Dakika
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked immunosorbent assay</i> (Elisa testi)
Er:YAG	<i>Erbium-doped yttrium aluminium garnet</i> (Erbiyum yüklü itriyum aliminyum garnet kristali)
Er,Cr:YSGG	<i>Erbium, chromium-doped yttrium scandium gallium garnet</i> (Erbiyum ve kromyum yüklü itriyum skandiyum galyum garnet kristali)
EPS	Ekstraselüler polisakkarit
FISH	Floresan <i>in-situ</i> hibridizasyon
FTIR	<i>Fourier transform infrared spektrofotometre</i> (Fourier dönüşümü kızılötesi spektrofotometre)
G	<i>Gauge</i> (Açıklık ölçüsü)
g	Gram
GW	GentleWave®
Hz	<i>Hertz</i> (frekans)
HOCl	Hipokloröz asit
HCl	Hipoklorik asit
ISO	<i>International organization for standardization</i> (Uluslararası

	standardizasyon örgütü)
kHz	Kilohertz
kPa	Kilopaskal
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mL	Mililitre
mg	Miligram
mJ	MiliJoule
m	Metre
Mpa	Megapaskal
MIR	<i>Mid-Infra-Red</i> (Orta Kızıl Ötesi)
N	Newton
N/m ²	Newton/metrekare
Na	Sodyum
NaOCl	Sodyum hipoklorit
NaCl	Sodyum klorür
NaB	Sodyum pentaborat pentahidrat
NaB ₅ O ₈ .5H ₂ O	Sodyum pentaborat pentahidrat
Ni-Ti	Nikel-Titanyum
NIR	<i>near infra-red</i> (yakın-kızılötesi)
nm	Nanometre
NMR	Nükleer manyetik rezonans
OCl ⁻	Hipoklorit iyonu
PAD	<i>Photo-active disinfection</i> (Foto-aktif dezenfeksiyon)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polimeraz zincir reaksiyonu)
PIPS	<i>Photon initiated photoacoustic streaming</i>
RFT	<i>Radial firing tip</i> (Çevresel ışıma ucu)
px	Piksel
PUI	Pasif ultrasonik irrigasyon
ppm	<i>Parts per million</i> (milyonda bir partikül)
SEM	<i>Scanning electron microscope</i> (Taramalı elektron mikroskobu)
eSEM	<i>Enviromental scanning electron microscope</i>

TEM	Transmisyon elektron mikroskobu
sn	Saniye
W	Watt
μ sn	Mikrosaniye
μ M	Mikromolar
μ m	Mikrometre
%	yüzde



ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. Deney grupları, uygulanan irrigasyon metodları ve irrigasyon solüsyonları

Şekil 2. Tüm grupların *E. faecalis* sağ kalım oranı dağılımının grafiksel gösterimi

Şekil 3. G ve LA metodları uygulanan solüsyon temas sonrası dentin tübüllerinde bölgesel olarak saptanan ölü bakteri oranı (%) ortalama ve standart sapma olarak dağılımın grafiksel gösterimi



RESİM LİSTESİ

Resim 1. Dişlerin deney öncesi hazırlık işlemleri; a. toplanan dişlerin temizlenmesi, b. yan olukların açılması, c. kök kanal şekillendirilmesi ardından d. apikal kapama ve tırnak cilası sürülmesi

Resim 2. Dişlerin otoklavda sterilizasyonu

Resim 3. Kök kanallarına **a.** *E. faecalis* ekimi ve **b.** örneklerin bekletildiği inkübasyon fırını

Resim 4. Dezenfeksiyon öncesi enfekte dişlerden steril kağıt konlarla örnek alınması

Resim 5. G metodu için kullanılan solüsyonun endodontik iğne ile kanal içine uygulaması

Resim 6. LA metodunda RFT5 fiber ucun kanal içine solüsyon ile birlikte uygulaması

Resim 7. Dezenfeksiyon sonrası kök kanal duvarından H tipi eğe ile dentin talaşı kazıma ve örnek alma

Resim 8. Carl Zeiss konfokal lazer taramalı mikroskop (LSM 800; Oberkochen, Almanya)

Resim 9. Dişlerin keski yardımıyla ikiye ayrılması

Resim 10. İkiye ayrılan bir dişin kanal içi görüntüsü ve kuronal, orta ve apikal bölgelerin ayırım şeması

Resim 11. Tüm gruplar arasında en çok bakteri yoğunluğu olan Salin-G grubu örneklerinde; (a) kuronalde %9, (b) orta bölge ve (c) apikalde %8 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi

Resim 12. G metodu içinde en az ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu bulunan NaOCl-G örneklerinde; (a) kuronalde % 2, (b) orta bölgede % 3 ve (c) apikalde % 2 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi

Resim 13. NaB-G örneklerinde; (a) kuronalde % 4, (b) orta bölgede %4,5 ve (c) apikalde %3 oranlarında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi

Resim 14. DDW-G grubu örneklerinde; (a) kuronalde ve (b) orta bölgede %5 ve (c) apikalde %4 oranında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi. Bu oranlar NaB-G grubu ile benzerlik gösterdi

Resim 15. Salin-LA örneklerinde; (a) kuronalde %1, (b) orta bölgede %2 ve (c) apikalde %1 oranlarında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi

Resim 16. Tüm gruplar arasında en az bakteri yoğunluğu olan NaOCl-LA örneklerinde; (a) kuronalde %1, (b) orta bölge ve (c) apikalde %0,6 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi

Resim 17. NaB-LA örneklerinde; (a) kuronalde %3, (b) orta bölge ve (c) apikalde %2 ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi

Resim 18. DDW-LA grubu örneklerinde; (a) Kuronalde %3, (b) orta bölge ve (c). apikalde %2 ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi. Bu oranlar NaB-LA grubu ile benzerlik gösterdi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. G metodu uygulaması ile kullanılan irrigantların etkisi sonucunda elde edilen *E. faecalis* sağ kalım oranları ve anlamlılık

Tablo 2. LA metodu uygulaması ile kullanılan irrigantların etkisi sonucunda elde edilen *E. faecalis* sağ kalım oranları ve anlamlılık

Tablo 3. *E. faecalis* sağ kalım oranlarının metodlara göre karşılaştırılması ve anlamlılık

Tablo 4. Tüm gruplar arasında *E. faecalis* sağ kalım oranları arasında istatistiksel anlamlılık

Tablo 5. İrrigasyon sonrası dentin tübüllerinde saptanan bölgesel ölü bakteri oranları

Tablo 6. Metod, solüsyon ve bölge değişkenlerin etkileşimi ve anlamlılık değerleri

Tablo 7. G Metodu içinde alt gruplar arasındaki bölgesel anlamlılık değerleri

Tablo 8. LA Metodu içinde alt gruplar arasındaki bölgesel anlamlılık değerleri

Tablo 9. Solüsyonların G ile LA metodlar arasında bölgesel anlamlılık değerleri

1. ÖZET

Er,Cr:YSGG lazer ile aktive edilmiş/edilmemiş farklı irrigasyon solüsyonlarının daimi diş kök kanallarında *Enterococcus faecalis* üzerine etkinliğinin *in-vitro* incelenmesi.

Öğrenci: Gülşah Balan

Danışman: Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Bölüm: Pedodonti A.D.

Amaç: Bu *in-vitro* çalışmanın amacı, farklı irrigasyon solüsyonlarının antibakteriyel özelliklerinin değerlendirilmesi ve geleneksel şırınga ile lazer aktivasyon metodlarının irrigantlar üzerinde etkinliğinin incelenmesidir. **Gereç ve Yöntem:** 54 insan dişine endodontik şekillendirme yapıldı ve kök kanalına *Enterococcus faecalis* ekildi. Biyofilm oluşturma amacıyla 28 gün beklendi. Enfekte dişler, geleneksel şırınga (G) ve Er,Cr:YSGG lazer aktivasyon (LA) metodlarını uygulamak üzere rastgele iki ana gruba ayrıldı. Bu iki ana grup kendi içinde, fosfat tamponlu salin (Salin), %5 sodyum hipoklorit (NaOCl), %3 sodyum pentaborat pentahidrat (NaB) ve 25 ppm döteryumlu su (DDW) kullanmak üzere dört alt gruba ayrıldı. İrrigasyondan sonra, mikrobiyolojik testi ile sağ kalan bakteri sayısı belirlendi. Dişler kuronal, orta ve apikal bölgelerden konfokal lazer tarama mikroskobu ile tarandı ve dentin tubülleri bakteri tespiti için görüntülendi. Veriler ANOVA ve postHoc testleri ile istatistiksel olarak değerlendirildi ($p<0.05$). **Bulgular:** G metodu ve LA irrigasyonu solüsyonların antibakteriyel etkinliği üzerinde fark yaratmadı ($p>0,05$). Dentin tubüllerindeki bakteri yoğunluğu LA gruplarında, özellikle orta bölgede daha az bulundu ($p<0,001$). Antibakteriyel etkinliği en yüksek bulunan NaOCl'i sırasıyla NaB, DDW ve Salin takip etti. **Sonuç:** Lazer aktivasyon, solüsyonların antibakteriyel etkinliği üzerinde fark yaratmadı, ancak dentin tubüllerindeki bakterilerin uzaklaştırılmasında etkili oldu. NaB'ın, NaOCl'e benzer antibakteriyel etkinliği bulundu ve ileri araştırmalarla desteklenmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: Döteryumu azaltılmış su, *Enterococcus faecalis*, Erbium lazer aktivasyonu, sodyum petraborat-pentahidrat, sodyum hipoklorit

2. SUMMARY

Evaluation of different irrigation solutions on *Enterococcus faecalis* with and without laser-activated irrigation: an *in-vitro* study.

Student : Gülşah BALAN

Supervisor : Prof. Dr. Serap AKYÜZ

Department: Pedodontics

Objective: The aim of this in-vitro study is to evaluate the antibacterial properties of different solutions and to examine the effectiveness of conventional syringe and laser activation methods on irrigants. **Materials and Methods:** Endodontic preparation was performed on 54 human teeth and *Enterococcus faecalis* was inoculated in the root canal. 28 days were waited for biofilm formation. Infected teeth were randomly divided into two main groups to apply conventional syringe (G) and Er,Cr: YSGG laser activation (LA). In both groups, the teeth were divided into phosphate buffered saline (Saline), 5% sodium hypochloride (NaOCl), 3% sodiumpentaboratepentahydrate (NaB) and 25 ppm deuterium depleted water (DDW) as four subgroups. After irrigation, surviving bacteria were determined by microbiological test. Bacteria in the dentine tubules were imaged from the coronal, middle and apical regions by confocal laser scanning microscopy. Data were evaluated statistically with ANOVA and postHoc tests ($p < 0.05$). **Results:** It was observed that LA irrigation did not make any difference on the antibacterial efficacy of the solutions compared to the G method ($p > 0.05$). Regardless of the solution, LA method was observed to be able to remove bacteria from the dentin tubules more effectively than G irrigation ($p < 0.001$). The most effective antibacterial solution was NaOCl, and NaB, DDW and Saline were found from highest to lowest, respectively. **Sum:** Laser activation was not superior to syringe irrigation, but it was more effective in removing bacteria from the dentin tubules. NaB has antibacterial activity similar to NaOCl and should be supported by further research.

Key words: deuterium-depleted water, *Enterococcus faecalis*, Erbium laser activation, sodium pentaborate-pentahydrate, sodium hypochlorite

3. GİRİŞ ve AMAÇ

Kök kanal sisteminde dentin duvarlarındaki artıkların temizlenmesi ve mikroorganizmaların ortamdaki uzaklaştırılması ile periradiküler yapıların ikincil enfeksiyonu önlenir (Sundqvist ve ark., 1998). *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), sıklıkla kronik periapikal patoloji gösteren dişlerin kök kanallarından izole edilir (Molander ve ark., 1998). *E. faecalis* hücrelerinin, diğer bakterilerin desteği olmadan tek bir organizma olarak kök kanalında hayatta kalma yeteneği vardır. Ayrıca, dentin tubülleri içinde canlı olarak bulunan bu mikroorganizma kan ile temas ettiğinde dentin kollajenine yapışabilir (Love, 2001). *E. faecalis*, endodontik enfeksiyon durumunda kolaylıkla fazla miktarda izole edildiğinden, antimikrobiyal bileşiklere karşı oldukça dirençlidir. Ayrıca, bu bakteri türü laboratuvarında kolaylıkla üretilbildiğinden *in-vitro* araştırmalar için uygundur.

İrigasyon, kemomekanik hazırlığın önemli bir parçasıdır ve kök kanalından nekrotik doku, dentin talaşı gibi maddelerin çıkarılmasını sağlarken bakteriyel eliminasyonu da kolaylaştırır. Ek olarak, dezenfeksiyon amacıyla yapılan irigasyon işleminde solüsyonların antimikrobiyal etkinliğe sahip olması istenir. Sodyum hipoklorit (NaOCl), yaygın kullanılan ve geniş spektrumlu güçlü bir antimikrobiyaldir ve %0,5 ile %6 arasında değişen konsantrasyonda kullanılır (Haapasalo ve ark., 2005). NaOCl, düşük konsantrasyonlarda bile sitotoksik olması ve yanlışlıkla periapikal alana veya maksiller sinüs gibi komşu yapılara temas etmesi sonucu doku hasarına neden olabilir (Pashley ve ark., 1985; Hülsmann ve Hahn, 2000).

Süt dişlerinin ve genç daimi dişlerin irigasyon sırasında oluşabilecek bu tür kazalar çocuklarda kooperasyonun bozulmasına ve tedavinin yarım kalmasına neden olur. Daha da önemlisi, kök kanal gelişimi henüz tamamlanmamış genç dişlerin irigasyonu için seçilen solüsyonun olumsuz özellikleri tedavinin başarısını etkileyebilir. Bu nedenle, NaOCl'e alternatif olarak düşük toksisitede ve antimikrobiyal etkinliği olan irigasyon solüsyonları araştırılmaktadır.

Bor içeren maddeler birçok bakteri için bakteriyostatik ve hafif

antiseptiktir (Bailey ve ark., 1980). Sodyum pentaborat pentahidrat (NaB), 5 mol su içeren bazik yapıda bir rafine bor bileşimidir. Bu bileşiğin %3'lük formu, iyileştirici ve antimikrobial etkisinden faydalanarak ülkemizde üretilen bir yara bakım jeli içerisinde güvenle kullanılmaktadır (Dogan ve ark., 2014). Literatür taraması sonucunda hiçbir dental çalışmanın NaB'ı kanal içi dezenfeksiyon amacıyla kullanmadığı saptandı. Bu yüzden, antimikrobiyal özelliklere sahip NaB'ın %3'lük formu final irrigasyon solüsyonu olarak çalışmamıza dahil edildi.

Döteryum azaltılmış su (DDW), döterum konsantrasyonu doğal sulardaki 150 ppm'den daha düşük olan hafif sudur. Döteryum konsantrasyonu az olan suyu kullanmanın canlı organizmalar da zararlı etkisi olmadığı ve hastalıklı hücrelerde ise nekroz yada apaptoza neden olduğu bildirilmiştir (Basov ve ark., 2019). Oksidatif stresin fazla olduğu kanser hücrelerinde oksidatif hasara karşı koruyucu olduğu ileri sürülür (Rasooli ve ark., 2016). İnsanda, DDW'nin dokuya teması gerçekleştiğinde tolere edilebilir bir orandır ve hücrelerde hasar oluşturmaz (Cong ve ark., 2010). 25 ppm'lik DDW, kök kanal tedavilerinde irrigasyon solüsyonu olarak kullanılmasının yararlı etkileri olacağı düşüncesiyle çalışmamıza dahil edildi.

Final irrigasyon tekniği, geleneksel endodontik şırınga ve iğnesi ile uygulanan ve kişiye bağlı bir protokoldür. Şırınga, sıvı dinamiğini arttıramaz ve iğnenin apikal açıklığa 2 mm yakınlıkta kullanılması nedeniyle havayı bu alanda kilitleyip solüsyonun ileri gitmesine engel olur (de Gregorio ve ark., 2009). Kök kanal sisteminin daha iyi temizlenebilmesi için kullanılan irrigantların etkinliğini en üst düzeye çıkarmak gerekir (Wright ve Walsh, 2017). Bu olumsuzlukları aşmak için irrigasyon solüsyonlarının aktivasyonu önerilir ve bu yönde farklı aktivasyon teknikleri geliştirilmiştir. Sıvı dinamiğini değiştiren ajitasyon yöntemlerindeki amaç solüsyonun reaksiyon kinetiğini artırarak her bölgeye ulaşmasını sağlamaktır (Plotino ve ark., 2007).

Dental lazerler ile aktivasyon bu metodlardan biridir ve orta kıızılötesi (MIR; mid-infra red) dalga boyunda ışıma yapan dental lazer sistemleri, Erbiyum lazerler, tercih edilir. Lazer ile aktive edilen solüsyonun kanal içinde ulaşılması zor bölgelerde

kuvvetli akustik darbeler yaratarak biofilmin fiziksel olarak uzaklaştırılmasını sağlar (de Groot ve ark., 2009). Yapılan araştırmalar, şekillendirme prosedürleri sırasında endodontik aletlerin ulaşamadığı bölgelerin, istmusların ve dentin tübüllerinin temizlenmesine olanak sağladığını göstermiştir (George ve ark., 2008). Erbium lazerlerin oluşturduğu kavitasyon etki sonucunda oluşan şok dalgaları solüsyonların ajitasyonu ile bakteri eliminasyonda şırınga yöntemi ya da pasif ultrasonik irigasyondan daha etkili bulunmuştur (De Moor ve ark., 2010). Çalışmamızdaki deney solüsyonlarının etkinliğini değiştireceği düşüncesiyle Erbiyum ailesinden erbiyum, kromyum yüklü itriyum skandiyum galyum garnet kristalli dental lazer (Er,Cr:YSGG) araştırmaya katıldı.

Kök kanal irigasyonu tekniklerinin ana kanaldaki bakteri sayısının azaltılması üzerindeki etkinliği çok defa mikrobiyolojik testler kullanılarak araştırılır. Güncel çalışmalar ayrıca konfokal lazer tarama mikroskobu kullanarak dentin tübüllerinde kalan canlı/ölü bakteri yoğunluğunu görüntülemenin mümkün olduğunu göstermektedir (Yang ve ark., 2016; Azim ve ark., 2016). Çalışmamızda kullanılacak solüsyonların antibakteriyel özelliklerini değerlendirmede mikrobiyolojik kültür testi kullanıldı ve metodların dentin tübülleri içindeki etkinliğini değerlendirmede mikroskopik görüntüleme yapıldı.

Günümüzde, NaB'ın ve DDW'un antimikrobiyal özelliklerini ve dentin tübüllerine penetrasyon kabiliyetini değerlendiren bir çalışma literatürde yoktur. Bu *in vitro* çalışmanın amacı, (1) final irigasyon solüsyonu olarak kullanılacak %3'lük NaB'ın ve 25 ppm'lik DDW'yun *E. faecalis* üzerine antibakteriyel kabiliyetini %5'lik NaOCl ile karşılaştırarak değerlendirmek ve (2) geleneksel irigasyon ile Er,Cr:YSGG lazer aktivasyonun deney solüsyonları üzerine oluşturacağı farklılığı incelemektir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. Biyofilm

Biyofilm, bir yüzeye sıkıca tutunmuş ve kendi ürettiği hücre dışı polimerik maddeler matriksine (ekstraselüler polisakkarit; EPS) gömülmüş hücrelerle karakterize, çok hücreli mikrobiyal topluluk olarak tanımlanır (Donlan ve Costerton, 2002; Costerton, 2007). Bakteriyel biyofilmlerde, hücreler çoğalır, birikir ve EPS matriksine gömülerek su kanalları ile ayrılan mikrokoloniler oluşturur (Costerton ve ark., 1999; Stoodley ve ark., 2002; Socransky ve Haffajee, 2002). EPS hücrelerin yüzeylere yapışmasına aracılık eder; topluluk üyeleri için temel besin maddelerini hapseder ve birikmesine neden olur biyofilm hücrelerinin yakınlaşmasına neden olur genetik değişimler ve patojenik sinerjizm gibi hücreler arası etkileşimleri destekler ayrıca fagositoz ve antimikrobiyal ajanlara karşı koruma sağlar (Flemming ve Wingender, 2010).

Ağız boşluğunda gelişen apikal periodontit, çürük, diş eti iltihabı ve marjinal periodontitis biyofilm ile ilişkili hastalıklardır. Kök kanal sistemini enfeksiyonları, sıklıkla dentindeki derin çürüklerin ya da dişin krununda meydana gelen kırıklar nedeni ile oluşan patolojilerin pulpa odasına kadar ulaşması sonucu meydana gelmektedir (Cameron, 1976; Langeland, 1987). Nekrotik pulpa dokusununa sahip dişlerin savunma sisteminin olmaması, özellikle düşük oksijenli ortamda yaşayabilen fırsatçı mikroorganizmaların kök kanal sisteminde toplanmasına neden olur (Nair ve ark., 2005). Enfekte kök kanallarında biyofilm benzeri yapıların ortaya çıkmasına ilişkin ilk raporun Nair'den olduğu iddia edilmektedir (Nair, 1987). Bu yapılar “dentin duvarının yüzeyinde ince veya kalın tabakalı bakteriyel plaklar oluşturarak bakteriyel birikim” olarak tanımlanır (Kreth ve Herzberg, 2015).

Ana kök kanalına ek olarak, bakteriyel biyofilmler kök kanal sisteminin apikal bölgesi, lateral kanallar ve istmuslar dahil anatomik varyasyonlarında da bulunduğu belirtilir (Nair ve ark., 2005; Ricucci ve Siqueira, 2008). Bu mikrobiyal topluluklar, organik pulpa dokusunun artıkları ya da periodonsiyumdan gelen eksudayla

yaşamlarını sürdürebilirler (Sundqvist ve ark., 1998). Nekrotik ya da önceden yapılan kök kanal tedavisinin başarısız olduğu dişlerde mikroorganizmalar, periapikal doku sıvılarının rahatlıkla ulaşabildiği kanalın apikal üçlüsünde daha fazla bulunmaktadır (Nair ve ark., 2005). Ayrıca, kök kanal boşluğunda bulunan mikroorganizmalar açık dentin tübülleri aracılığıyla derin dentin bölgelerini istila edebilir (Shovelton ve ark., 1964). Apikal kök yüzeye yapışan biyofilm (ekstraradiküler biyofilm) ikincil enfeksiyon oluşan daha önce tedavi edilen dişlerde de tanımlanır (Ferreira ve ark., 2004; Ricucci ve ark., 2005).

Apikal periodontitisin biyofilm ile ilişkili bir hastalık olarak tanınmasının önemli klinik sonuçları vardır, çünkü biyofilm birkaç antimikrobiyal ajana karşı dirençli olabilir ve ortadan kaldırılması için özel stratejiler gerekir (Kishen, 2010; Stojicic ve ark., 2013). Kök kanalındaki mikroorganizmalar biyofilm oluşturdıklarında patojenitesi artar, sonuç olarak EPS matriks yapısı ile korunur. Kimyasal ajanlar mikroorganizmaları etkilemeden önce EPS matriks yapısı üzerinde etkili olmalıdır. Bu matriksin bozulması antimikrobiyal etkiyi artıracaktır. İrrigasyon sırasında üst tabakaların veya EPS matriksinin bozulması veya kayma gerilimi biyofilm üzerindeki tahribat etkisi kullanılan ajanların kimyasal etkisini artırabilir (He ve ark., 2013). Biyofilmdeki hücrelerin antimikrobiyallere maruz kalma derecesi, biyofilmin kalınlığı, antimikrobiyallerin konsantrasyonu ve matrikse nüfuz etme kabiliyeti dahil olmak üzere birçok faktöre bağlı olacaktır (de Paz ve ark., 2015).

4.2. Kök Kanal Sisteminin Enfeksiyonu ve Etiyolojisi

Birincil kök kanal enfeksiyonları, zorunlu anaerob mikroorganizmaların hakim olduğu polimikrobiyal bir enfeksiyondur. Kemomekanik enstrümantasyon ve medikasyon sonucunda zorunlu anaerobik mikroorganizmalar kolaylıkla kök kanal sisteminden uzaklaştırılabilirken, *Streptokok*, *Enterekok* ve *Laktobasil* gibi fakültatif anaerob bakteriler yaşamaya devam edebilmektedir (Sundqvist, 1994). Endodontik hastalıkların etiyolojisinde en büyük role sahip mikroorganizmaların bakteriler olduğu bilinse de güncel araştırmalarda; mantar, arke ve virus gibi patojenlerin de apikal periodontitise neden olabileceği keşfedilmiştir (Siqueira Jr ve Rôças, 2009).

Birincil enfeksiyonların aksine, *E. faecalis* sıklıkla kronik periapikal patoloji gösteren dişlerin kök kanallarından izole edilen bir mikroorganizmadır (Molander ve ark., 1998; George ve ark., 2005). Ayrıca, endodontik biyofilm model sistemlerinde en sık kullanılan test organizmasıdır. Bu tür, kalıcı apikal patoza sahip kök kanalı ile tedavi edilen dişlerden sıklıkla izole edilmiş olup bazı çalışmalarda % 90'dan fazla yaygınlık bildirilmiştir (Molander ve ark., 1998; Pinheiro ve ark., 2003). *E. faecalis*'in bazik ortam (Flahaut ve ark., 1997) ve uzun süren açlık (Hartke ve ark., 2002) gibi koşullara karşı koyduğu gösterilmiştir. Kök kanalında canlı kalabilen *E. faecalis* dentin tübülleri içinde 1000 µm'ye kadar ilerleyebilir (Love, 2001; Kirsch ve ark., 2017). Dentin tübülllerine derinlemesine nüfuz etme ve kök kanal duvarında, hatta kalsiyum hidroksit ile ilaçlananlarda bile biyofilm üretme yeteneğine sahip olduğu bildirilmiştir (Distel ve ark., 2002). Türlerin olumsuz çevre koşullarında hayatta kalmasına izin veren özellikleri ve epidemiyolojik çalışmaların önerdiği tedavi sonrası hastalık ilişkisi nedeniyle *E. faecalis* uzun zamandır endodontide önemli bir patojen olarak kabul edilmektedir (de Paz ve ark., 2015).

4.3. Kök Kanal Tedavisinde Final İrrigasyonun Önemi

Kök kanal tedavisinin ana amacı kök kanalına antimikrobiyal maddelerin uygulanabilmesi için mekanik olarak kanalların şekillendirilmesidir. Ayrıca iyi şekillendirilmiş bir kök kanal sistemi düzgün, sıkı ve sızdırmaz bir kanal dolgusunun yapılmasına olanak sağlayarak mikroorganizmaların kanallarda yeniden kolonize olmasını engeller (Hülsmann ve ark., 2005). Tedavi sırasında, kanal duvarlarında mikroorganizma, kan hücresi, artık dentin ya da pulpa dokusu gibi organik ve inorganik materyallerden meydana gelen ince bir smear tabaka oluşmaktadır.

Smear tabakası, aletin kanal duvarlarına temas ettiği her yerde oluşan, dentin tübüllerinde 40 µm derinliğe kadar penetre olabilen, 1-2 µm kalınlığında düzensiz ve yumuşak yapıda bir tabakadır. Bakteriler oluşan bu smear tabakasının içine penetre olabilir ve kanal duvarlarına yapışık biyofilm gelişebilir (Şen ve ark., 1995). Ayrıca smear tabakası, günümüzde kullanılan kanal dolgu patlarının dentin duvarına sıkı bir

şekilde adapte olmasını engeller ve mikrosızıntıya neden olarak ikincil enfeksiyon riski oluşturur. Bu nedenlerden dolayı, başarılı bir kök kanal tedavisi yapmak için smear tabakasının uzaklaştırılmasının gerekli olduğu genel olarak kabul görmektedir (Violich ve Chandler, 2010).

Smear tabakasının, mikroorganizmaların, mikrobiyal toksinlerin, nekrotik ya da vital pulpa dokusu artıklarının kök kanal sisteminden uzaklaştırılmasındaki etkinlik endodontik tedavinin başarısını belirler (Basmadjian-Charles ve ark., 2002). Kök kanallarının karmaşık anatomik yapısı eğeleme ile tamamen temizlenmesini ve şekillendirilmesini güçleştirir (Solovyeva ve Dummer, 2000). Özellikle günümüzde kullanılan nikel-titanyum (Ni-Ti) döner aletler kök kanal sistemindeki apikal delta ve istmus gibi alanlara dokunmadan sadece kanalın merkezinde hareket etmektedir (Gu ve ark., 2009). Ni-Ti eğeleme sistemleri veya geleneksel paslanmaz çelik el eğelerinin kanal duvarlarına %50'den az oranda temas ettiği bildirilmiştir (Peters ve ark., 2001).

Üç boyutlu kök kanal sisteminin kompleks yapısı ideal bir tedavi yapılmasını zorlaştırır ve ulaşılamayan bölgeler her zaman yeni bir enfeksiyon riski taşır. Özellikle, *E. faecalis* gibi hücrelerin temizlenmesi için irrigasyon solüsyonlarının ulaşılamayan bölgelere nüfus etmesi istenir. Bu nedenle eğeleme sırasında ve sonrasında kanal boşluğunun kimyasal bir yıkama solüsyonuyla etkin bir şekilde yıkanması gerekmektedir. Kök kanal sisteminin final irrigasyonu başarılı bir endodontik tedavinin önemli bir parçasıdır (Sundqvist ve ark., 1998). Final irrigasyon, mekanik eğeleme ile temas etmeyen alanları, istmuslar, lateral kanallar ve apikal uçlar gibi düzensiz yapıların bulunduğu kök kanal sistemini arındırmanın tek yoludur (Gulabivala ve ark., 2005; Siqueira ve ark., 2019). Kullanılan solüsyona göre değişebilen eğe ve dentin arasındaki sürtünmeyi azaltması, kesme etkinliğini arttırması, dokuyu çözmesi, eğeyi ve dişi soğutması gibi solüsyonların birkaç önemli işlevi vardır. Bununla birlikte, kalıntıların uzaklaştırılması ve solüsyonun da antimikrobiyal/antibiyofilm özellikte olması dezenfeksiyon sağlaması açısından istenir.

4.4. İrrigasyon Solüsyonları ve Özellikleri

İdeal irrigasyon solüsyonunda aranan özellikler (Zehnder, 2006; Haapasalo ve ark., 2014a):

1. Bakteri, virüs ve mayalara karşı geniş antimikrobiyal etkisinin olması,
2. Biyofilmlerde organize edilen anaerobik ve fakültatif mikroorganizmalara karşı yüksek etkinliğe sahip olması,
3. Diş dokusuna zarar vermeden nekrotik doku kalıntılarını, organik ve inorganik atıkları uzaklaştırabilmesi,
4. Kanal içi tüm çeperlere ulaşabilme yeteneği; ıslatabilme ve lubrikasyon yeteneğinin olması,
5. Hayati dokularla temas ettiğinde kostik, sitotoksik yada alerjik olmaması istenir.

İrrigasyon solüsyonlarının etkinliği sadece solüsyonun kimyasal özelliklerine değil, aynı zamanda kullanılan solüsyon miktarı, ısısı, solüsyonun dentin yüzeyi ile temas süresi ve kök kanal sistemine iletimi için kullanılan tekniğe de bağlıdır.

Aşağıda, endodontide ve pedodontide en çok kullanılan kök kanal tedavisi irrigasyon solüsyonlarından sodyum hipoklorit, klorheksidin, etilen diamin tetraasetik asit ve yardımcı solüsyon olarak fosfat ile tamponlanmış salinden bahsedilmiştir.

4.4.1. Sodyum hipoklorit

Geniş spektrumlu antimikrobiyal, mükemmel doku çözücü ve proteolitik bir ajan olan sodyum hipoklorit (NaOCl), 1920'li yıllardan itibaren endodontide en yaygın kullanılan yıkama solüsyonu olmuştur. Ayrıca ucuz, kolay bulunabilir ve uzun raf ömrüne sahiptir. NaOCl solüsyonu hem oksitleyici hem de hidrolize edici bir ajan olmakla beraber, güçlü bir alkali ve hipertonic yapıya sahiptir (Basrani ve ark., 2015). NaOCl, smear tabakasının organik bileşenlerini ve pulpa dokusunu çözme kapasitesi ile biofilm ve mikroorganizmalara karşı benzersiz bir antimikrobiyal ajan olduğunu kanıtlar (Sirtes ve ark., 2005; McDonnell ve Russell, 1999). NaOCl'in etki mekanizması genel olarak şöyle açıklanır;

- Sabunlaşma reaksiyonu; yağları yağ asidi (sabun) ve gliserole (alkol) dönüştürerek yağ çözücü

işlevi görür.

- Nötrleştirme reaksiyonu; hidroksil iyonları ile su ve tuz oluşturarak aminoasitleri nötrleştirir.
- Hipokloröz asit oluşumu; suda çözünen klor, organik maddeler ile temas edince hipokloröz asit (HOCl) oluşturur. Bir oksitleyici olarak işlev gören hipokloröz asit zayıf bir asittir. NaOCl, suda Na^+ ve hipoklorit (OCl^-) iyonları oluşur. Ortam asidik ve nötral ise HOCl asidi, $\text{pH} \geq 9$ olduğu zaman ise OCl^- olarak bulunur (McDonnell ve ark., 1999). Hipokloröz asit, hipoklorit iyonundan daha fazla antibakteriyel etkiye sahiptir. Hipokloröz asit ve hipoklorit iyonları, antimikrobiyal etki oluşturarak aminoasitlerin parçalanmasına ve hidrolize olmasına yol açar (Basrani ve Malkhassian, 2015).
- Çözücü etki; NaOCl, organik dokularla temas ettiği zaman çözücü görevi yaparak kloramin açığa çıkarır. Kloroaminler, mikroorganizmaların hücre metabolizmasını kesintiye uğratar. Klor ise güçlü bir oksidandır ve temel bakteriyel enzimleri geri dönüşümsüz bir şekilde okside ederek inhibe eder.
- Yüksek pH; NaOCl güçlü bir bazik yapıya sahiptir ve yüksek pH ($\text{pH} > 11$) mikroorganizmaların enzimlerini geri dönüşümsüz olarak inhibe eder, hücre metabolizmasında biyosentetik değişiklik yapar ve fosfolipidleri bozarak sitoplazmik membranın bütünlüğünü kesintiye uğratar (Estrela ve ark., 2002).

Kök kanalı irrigasyonunda da aynı mekanizma ile pulpa dokusu, biyofilm veya organik içerik ile reaksiyona giren NaOCl'in çözücü etkisi görülür. Bu durum proteinde bozulma, sıcaklığın yükselmesi ve pH'ta değişiklikler oluşturur (Macedo ve ark., 2010). Kök kanalında bulunan organik artıkları kaldırma yeteneğine sahiptir. Ancak, smear tabakayı oluşturan inorganik talaşlar bir çelatör veya bir asit gibi dekalsifiye edici ajanlar tarafından kaldırılabilir. Bu sebeple, kök kanal tedavisinde antimikrobiyal aktivitenin artırılması ve smear tabakanın etkili bir şekilde kaldırılması için, NaOCl ve farklı demineralize edici materyallerin kombine kullanımı önerilmektedir (Carvalho ve ark., 2008).

Sodyum hipoklorit, *in-vitro* organik doku ile temas ettiğinde % 0.1'den daha düşük konsantrasyonlarda bile son derece etkili olduğu gösterilmiştir (Pashley ve ark.,

1985; Barnhart ve ark., 2005). Ayrıca, NaOCl'in %1-2 'den yüksek konsantrasyonları daha iyi bir etkiye sahiptir (Zehnder ve ark., 2002). Kullanılacak NaOCl konsantrasyonunun seçiminde dikkat edilecek husus doku hasarı oluşturmada temizleme verimliliğinin sağlanmasıdır (Spencer ve ark., 2007). Biyofilm modellerini kullanan çalışmalarda, NaOCl çözeltisinin konsantrasyonunun arttırılmasının artan bir antibiyofilm etkisi gösterdiği belirtilmesine rağmen (del Carpio-Perochena ve ark., 2011; Retamozo ve ark., 2010), klinik uygulamalarda % 0.5 ila % 6 arasındaki konsantrasyonlarda kullanılır. Bununla birlikte, optimal klinik konsantrasyon halen tartışma konusudur (Zehnder, 2006). Kök kanal tedavisi boyunca %1'lik NaOCl solüsyonunun kullanılması, bütün pulpa dokusunun çözülerek uzaklaştırılması için yeterli bulunmuştur (Sirtes ve ark., 2005).

Etkili bir dezenfeksiyon için kullanılan NaOCl'in hacmi de konsantrasyonu kadar önemlidir. Kanalin fazla miktarda NaOCl solüsyonuyla sık sık yıkanması düşük konsantrasyonda kullanılmasını telafi edebilir. NaOCl'in bileşenleri dokularla temas ettiği zaman etkisini çok hızlı yitirdiği için kök kanal sistemi sürekli taze NaOCl solüsyonuyla yıkanmalıdır (Basrani ve Malkhassian, 2015). Kök kanallarının eğilenmesi ve yıkanmasından sonra kalan temizlenemeyen alanlar, kullanılan NaOCl solüsyonunun konsantrasyonuna değil bu bölgelere fiziksel olarak ulaşamamasından kaynaklı olabilir (Zehnder, 2006). Kanal tedavisi sırasında açılan pulpa odası taze NaOCl solüsyonu için rezervuar olarak kullanılmalıdır. Kök kanallarının mekanik şekillendirilmesi tamamlanmalı ve yıkama protokolüne her bir kanal içerisindeki taze NaOCl aktivasyonu ile devam edilmelidir (Gulabivala ve ark., 2010).

NaOCl'in, bakterileri öldürebilmesi için ne kadar süreye ihtiyaç olduğu literatürde henüz kesinlik kazanmamıştır. %0,5'lik NaOCl solüsyonu bakterileri 30 dakika içinde öldürürken, daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılan NaOCl'in ise 30 saniye içinde öldürdüğü bildirilmiştir. % 1 ve% 2,5'lik bir NaOCl çözeltisi, 30 dakika sonra neredeyse 5 dakikalık bir % 5,25 NaOCl çözeltisi kadar etkili bulunmuştur (del Carpio-Perochena ve ark., 2011; Retamozo ve ark., 2010). Fakat uygulandığı ortamda bulunan organik madde, inflamatuvar eksuda, doku artıkları ve mikrobiyal biyo-kütlenin NaOCl'i tüketerek etkisini zayıflattığı unutulmamalıdır (Basrani ve

Malkhassian, 2015). NaOCl'in çözücü ve antibakteriyel kapasitesinden sorumlu olan klor iyonu stabil değildir ve dokuların çözünmesi sırasında 2 dakika içinde hızlı bir şekilde ortamda tükenmektedir (Mohammadi ve Abbott, 2009). Ni-Ti'lu döner aletlerle yapılan kök kanal eğeleme işlemi, kanalların şekillendirilmesi için gerekli olan süreyi kısaltmıştır. Ancak, belli konsatrasyondaki NaOCl solüsyonunun kanal içerisinde ne kadar kalması gerektiği henüz yanıtlanamayan bir konudur (Zehnder, 2006).

NaOCl'in etkinliğini arttırmanın diğer bir yolu da pH'ını düşürmek olabilir. Ayrıca, tamponlanmış NaOCl solüsyonunun hayati öneme sahip dokulara karşı toksisitesi daha azdır. Fakat, bikarbonatla tamponlanmış olan NaOCl solüsyonunun antimikrobiyal etkinliğinin tamponlanmamış solüsyona kıyasla biraz daha yüksek ya da aynı olduğu bildirilmiştir (Cotter ve ark., 1985). Bu nedenle NaOCl solüsyonu, endodontide sıklıkla tamponsuz olarak pH:11' de kullanılmakta ve kostik potansiyeli pH tarafından değil, içerdiği klor miktarı tarafından belirlenmektedir (Zehnder ve ark., 2002).

NaOCl'in dentin tübüllerine penetrasyon derinliği 77 ile 300 µm arasında değişmekle beraber bu değerler NaOCl'in konsatrasyonuna, sıcaklığına ve uygulama süresine bağlı olarak değişkenlik gösterebilir (Zou ve ark., 2010). Ayrıca, tüm bu çalışmalarda biyofilmin NaOCl ile doğrudan temas halinde olduğunu düşünürsek kök kanal sisteminin morfolojisi nedeniyle doğrudan temas sağlanamayan ve ulaşılamayan bölgelerde etkisi zor olacaktır (van der Sluis ve ark., 2015). NaOCl solüsyonu geniş antimikrobiyal aktivite gibi pek çok olumlu özelliklere sahip olmasına rağmen, smear tabakasının uzaklaştırılamaması, yüzey geriliminin düşük, koroziv ve toksik olması gibi bazı olumsuz özelliklere de sahiptir (Basrani ve Malkhassian, 2015). Bazı durumlarda da hipokloritin dikey kök kırığı riskini artıp arttırmadığı sorusunu gündeme getirmektedir (Haapasalo ve ark., 2014a; Sim ve ark., 2001). NaOCl'in hoş olmayan tadı, toksisitesi ve sadece organik materyali çözdüğü için smear tabakasını kendi kendine kaldıramaması zayıf yönleridir. Ana solüsyon olarak kullanılan NaOCl ideal koşulları tam olarak sağlamadığı için başka ajanlar araştırılmaktadır.

4.4.2. Klorheksidin

Klorheksidin (CHX), geniş bir antimikrobiyal etkiye sahiptir ve diş hekimliğinde çoğunlukla %0,2 'lik bir konsantrasyonda bakteriyel plak kontrolü için yaygın olarak kullanılmaktadır (Mohammadi ve Abbott, 2009). CHX, %0.2 ila %2 arasındaki konsantrasyonlarda, iyi antimikrobiyal aktivitesi nedeniyle diş hekimliğinde kavite dezenfeksiyonda da yaygın olarak kullanılmaktadır (Russell ve Day, 1993). Hücre zarlarında veya sert dokuların organik bileşenine negatif yüklü moleküllere afinite gösteren pozitif yüklü hidrofobik bir moleküldür (Carrilho ve ark., 2010).

Klorheksidin mikroorganizmaların dış hücre duvarı katmanlarına nüfuz eder ve sitoplazmik membrana saldırır (Russell ve Day, 1993; Shaker ve ark., 1988). Mikrobiyal hücrelerin hücre içi organellerini pıhtılaştırma yeteneğine sahiptir (McDonnell ve Russell, 1999). Hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere ve mayalara karşı etkilidir, ancak mikobakteriler ve bakteriyel sporlar ise CHX'e dirençlidir (Shaker ve ark., 1988). CHX, endodontide irrigasyon çözeltisi ve intrakanal ilaç olarak oldukça popüler olmuştur. CHX, antimikrobiyal özellikleri, etkinliği ve nispeten düşük toksisitesi nedeniyle diş hekimliğinde uzun süredir kullanılan bir irigant solüsyondur (Haapasalo ve ark., 2005).

Klorheksidin, sodyum hipoklorit gibi kötü kokmaz. Doza bağlı bir sitotoksik etki gösterir, ancak, yanlışlıkla periapikal bölgeye taşığında periodontal dokuda yaralanmalara neden olmaz (Jeanson ve White, 1994). Final durulama olarak NaOCl gibi dentin erozyonuna neden olmaz ve bu nedenle % 2 'lik oranı antibakteriyel etki için iyi bir seçim olabilir (Zamany ve ark., 2003). CHX sert dokuya bağlanır ve kullanımının bir nedeni olan antimikrobiyal etki uzun süre kalır. Ancak, organik dokuları çözme kapasitesine sahip değildir (Naenni ve ark., 2004). Planktonik bakterileri NaOCl'den çok daha yavaş öldürür; biyofilm bakterilerine karşı etkisi %1 ve %2 NaOCl'e eşit veya daha düşüktür ve %5 veya 6 NaOCl 'den çok daha zayıftır (Ma ve ark., 2011; Wang ve ark., 2012). CHX'in aktivitesi pH bağımlıdır ve organik madde varlığında büyük ölçüde azalır (Russell ve Day, 1993).

Klorheksidinin planktonik mikroorganizmaların öldürülmesinde çok etkili olmasına rağmen, biyofilmi bozan güçlü bir ilaç olmadığı görülmektedir (Bryce ve ark., 2009). Normalde, CHX'in biyofilm içine nüfuz edebildiği antimikrobiyal etki ancak biyofilm bozulması belirtileri olmadan görülür (Shen ve ark., 2011; de Paz ve ark., 2010). Ağızdaki biyofilm kontrolünde CHX kullanımının ve fonksiyonunun kullanımından ve kök kanalındaki olası fonksiyondan tamamen farklı olduğu göz önünde bulundurulmalıdır. Dahası, CHX'in pulpa dokusunu yada organik dokuyu çözdüğünü destekleyen herhangi bir veri yoktur.

4.4.3. Etilen diamin tetraasetik asit

Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA), en yaygın olarak % 17'lik nötrleştirilmiş (di-sodyum EDTA, pH 7) bir çözelti olarak kullanılır. Güçlü olmayan antibakteriyel etkisini bakteriyel yüzey proteinlerini hücre zarından gelen metal iyonlarıyla birleştirerek gösterir. Çünkü, EPS genel olarak anyonik, negatif yüklü doğası nedeniyle pozitif yüklü, çok değerlikli iyonlarla, örneğin Ca^{2+} veya Mg^{2+} ile etkileşir. Böylece EPS'nin yapısı güçlenir. Kalsiyum, kök kanalı ve ağız ortamında bulunur ve bu nedenle EPS'ye bağlanabilir. Sonuç olarak, çelatörler katyonik bağları kırarak EPS'nin bozulmasına yardımcı olabilir (van der Waal ve van der Sluis, 2012).

Literatürde EDTA'nın biyofilm kütlelerini azaltabileceği bildirilmiştir (Turakhia ve Characklis, 1989). Ek olarak, biyofilmin viskozitesinde bir azalma tarif edilmiştir (Chen ve Stewart, 2002). Ayrıca EDTA ile 24 saatlik tedaviden sonra *in-vivo* üretilen biyofilmin tamamen yok edilmesi gözlenmiştir (Kite ve ark., 2004). Uygulama süresi uzadıkça, ilk temastan itibaren başlamasına rağmen çelat etkisi daha iyi olur. Daha yüksek bir konsantrasyon daha yüksek çelasyon etkinliği ile sonuçlanır ve EDTA konsantrasyonu arttığında biyofilm oluşumu azalır (Ramage ve ark., 2007).

Endodonti literatüründe çelatörlerin biyofilm üzerindeki biyofilm bozulması veya antimikrobiyal etkisi üzerinde biraz zıt sonuçlar göstermektedir, ancak NaOCl'den her zaman daha az etkili bulunmuştur (Ordinola-Zapata ve ark., 2012). Bu nedenle, kök kanal sisteminde asıl kullanılma amacı dental inorganik bileşenlerle

çelasyon yapması nedeniyle smear tabakasını uzaklaştırmaktır. Bu amaçla, NaOCl solüsyonundan ve mekanik eylemeden sonra 2 ila 3 dakika boyunca kullanılır. Smear tabakasının EDTA ile uzaklaştırılması, lokal olarak kullanılan dezenfekte edici ajanların daha derin dentin katmanlarındaki antibakteriyel etkisini artırır (Haapasalo ve Orstavik, 1987). Özellikle, kök kanal tedavisi boyunca NaOCl ile kombine kullanımı önerilir çünkü NaOCl ile sinerjistik bir etkisi olduğu bildirilmiştir (Özdemir ve ark., 2010). Fakat, NaOCl ve EDTA'nın birlikte kullanımı, NaOCl'nin serbest klor oranını düşürerek NaOCl'nin organik doku çözme kapasitesini ve antimikrobiyal özelliğini zayıflatmaktadır (Zehnder, 2006).

4.4.4. Fosfat tamponlu salin

Endodontide kullanılan diğer irrigasyon solüsyonları arasında steril su, fizyolojik tuzlu su ve fosfat ile tamponlanmış salin bulunmaktadır. Bunlar tek başlarına kullanıldıklarında antibakteriyel aktiviteye sahip değildir ve ayrıca dokuyu çözmezler. Bu nedenle rutin vakalarda kanal irrigasyonunda kullanılmaları için iyi bir neden yoktur. Steril sular, diğer etkin solüsyonların birbirleri ile etkileşime girmelerini engellemek için ara sıvılar olarak endodontide yer bulmuştur (Carvalho ve ark., 2008). Ek olarak, su ve tuzlu su çözeltileri kullanılırken içinde bulundukları kapların kapaklarının birden fazla açılıp kapanması ile kontaminasyon riski taşırlar.

4.4.5. Deney Solüsyonları

Ana solüsyon olarak kullanılan NaOCl'in ideal koşulları tam olarak sağlamadığı görüşü nedeniyle düşük toksisite ve yüksek verimlilikte uygun bir irrigasyon ajanı bulma yönünde araştırmalar devam etmektedir. Antimikrobiyal özelliklere sahip olmanın yanı sıra canlı doku ile temasında faydalı etkiler görebileceğimiz bir irrigant arayışı nedeniyle deney solüsyonlarımız toksik olmayan çözeltilerden seçilmiştir.

4.4.5.1. Sodyum pentaborat pentahidrat

Bor (B), doğada serbest halde bulunmayan çok küçük bir elementtir (Nielsen,

1988). Havada, toprakta ve sulara toplam 250'den fazla bor bileşiğinin mevcut olduğu belirtilmektedir. Bir borat iyonu oluşturmak için bir hidroksil iyonu kabul ederek Lewis asidi olarak işlev gören çok zayıf bir monobazik asittir (Görgülü ve Arslan, 2003) Oksijene ilgisinin fazla olması nedeniyle borat olarak adlandırılan bor oksit (B_2O_3) ve borik asit (H_3BO_3) gibi çok çeşitli bor-oksijen bileşikleri oluşturur (Zuhal, 2013).

Bor elementi hakkında sayısız araştırma yapılmış ve insan sağlığı üzerine olumlu etkileri bildirilmiştir. B bileşikleri ve bunların tuzları çeşitli uygulamalarda tampon maddesi olarak işlev gördüğünü ve organik moleküller ile karmaşık bir yapı oluşturma eğiliminde oldukları için hücre canlılığındaki artışın nedeni olabileceği bildirmiştir (Aydın ve ark., 2019). Pizzorno ve ark. 2015'te yayınladığı bir derlemeye göre bor elementi;

- (1) kemiğin büyümesi ve bakımı için gereklidir;
- (2) yara iyileşmesini büyük ölçüde iyileştirir;
- (3) vücudun östrojen, testosteron ve D vitamini kullanımını faydalı bir şekilde etkiler;
- (4) magnezyum emilimini artırır;
- (5) enflamasyon reaksiyon düzeylerini azaltır;
- (6) antioksidan enzim seviyesini yükseltir;
- (7) pestisit kaynaklı oksidatif strese ve ağır metal toksisitesine karşı koruma sağlar;
- (8) yaşlılar için beyin elektriksel aktivitesini, bilişsel performansını ve kısa süreli belleği geliştirir;
- (9) anahtar biyomoleküllerin oluşumunu ve aktivitesini etkiler;
- (10) bir dizi kanserde önleyici ve terapötik etkiler göstermiştir ve
- (11) geleneksel kemoterapötik ajanların yan etkilerini iyileştirmeye yardımcı olabilir (Pizzorno ve ark., 2015).

Bor (B), birçok canlı için eser mikro-element olmasına karşın borik asidin birçok bakteride bakteriyostatik ve hafif antiseptik etkileri vardır (Bailey ve ark., 1980). *Streptomyces* suşundan elde edilen boromisin antibiyotikler, gram-pozitif bakterilere, mantarlara ve protozoalara karşı etkili bulunmuştur (Jacobs ve ark., 2011; Bonilla ve ark., 1990). Borun, mikroorganizmaların “çoğunluk algılama” (quorum sensing) için

gereken bir sinyal molekülünün önemli parçalarından biri olduğu ileri sürülmüştür (Chen ve ark., 2002b). Bor bileşiklerini içeren antipatojenik ilaçlar organizmaların virülans faktörlerinin ekspresyonunu yöneten temel düzenleyici sistemlerini, diğer bir deyişle çoğunluk algılama (quorum sensing) işleyişini hedefler (Dembitsky ve ark., 2010).

Bor elementinin antimikrobiyal ve/veya antibiyotik ilaçların içinde kullanımı devamlı ilgi görmektedir (Yang ve ark., 2018). Bor içerikli ürünler diş hekimliğinde de önemli bir yer almaya başlamıştır. Dental uygulamalarda borik asit, bir solüsyon halinde periodontal cep içi dezenfeksiyon amacıyla kullanılmıştır (Luan ve ark., 2008; Sağlam ve ark., 2013; Kanoriya ve ark., 2018; Tasneem ve ark., 2019). Bazı endodontik çalışmalar ise borik asitin kök kanalından smear tabakası uzaklaştırma etkinliğini araştırmıştır (Culhaoglu ve ark., 2017; Turk ve ark., 2015). Bor katkılı biyocam nanopartiküller diş doku mühendisliği uygulamaları için biyomateryal olarak önerilmiştir (Rad ve ark., 2018).

Bazik yapıda ve 5 mol su içeren sodyum pentaborat pentahidrat (NaB ; $\text{NaB}_5\text{O}_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) endüstriyel sağlık alanında araştırmaları devam eden bor bileşiklerinden biridir (Briggs, 2001). Demirci ve ark., NaB 'ın dental kompozit materyaline dahil ederek insan dişi pulp kök hücrelerinin (hDPSC'ler) artmış osteojenik ve odontojenik farklılaşması ile birlikte *S. mutans* 'a karşı antibakteriyel etkisini bildirmiştir (Demirci ve ark., 2015). Aynı araştırmacı, borik asit ve sodyum tetraboratın bakteri, maya ve mantarlara karşı belirgin antimikrobiyal etkiler göstermesinin yanı sıra çoğalma, göç, yaşamsal büyüme faktörü ve dermal hücrelerin gen ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ortaya çıkarmıştır (Demirci ve ark., 2016).

Sodyum pentaborat pentahidrat, antimikrobiyal özelliğinin yanı sıra temas ettiği dokuda toksik etkiler oluşturmeyen bir bor bileşiğidir. Bu çalışmada, %3'lük NaB 'ın kök kanal sisteminde irrigasyon ajanı olarak *E. faecalis*'e karşı test edilmesinin literatüre katkısı olacağını düşünüyoruz.

4.4.5.2. Döteryumu azaltılmış su

Döteryum (D), hidrojenin radyoaktif olmayan tek kararlı izotopudur. Döteryum, termodinamik ve kinetik özellikleri bakımından hidrojeninden farklılık gösterir (Urey, Brickwedde, ve Murphy, 1932). Kütle farklılığı iki izotopun fiziksel ve kimyasal davranışlarında farklılığa yol açar. Bir molekülde, hidrojen yerine döteryum geçmesi o molekülün kimyasal ve fiziksel yapısını değiştirir. Kimyasal bağın koparılması zorlaşır ve kimyasal reaksiyonlar önemli ölçüde yavaşlar (Mosin ve Ignatov, 2015).

Suyun yapısında bulunan hidrojen elementinin doğada üç izotopu bulunur. Bu üç izotop da oksijenle birleşir ve farklı sular oluşturur. Protium (H) ihtiva eden normal su (H_2O); döteryum (D) ihtiva eden ağır su (D_2O) ve trityum (T) içeren 'trityum suyu' (T_2O) dur. Ayrıca, yapısında bu izotoplardan ikisinin de bulunduran karışık sular da (HDO , HTO veya DTO) oluşabilir. Doğal içme sularında döteryum/hidrojen (D/H) oranı 1/6600 olup yaklaşık 150 ppm'dir. Güvenilir ve kaliteli içme suyu hücrel metabolizmayı her zaman iyi yönde etkiler (Yarat ve ark., 2019).

Döteryumu azaltılmış su diğer adıyla hafif su için bu oran 150 ppm'den düşüktür. Ağır suda ise bu oran 150 ppm'den daha yüksektir. Ağır su yüzdeleri yüksek olan sularda canlılar yaşayamazlar ya da yaşamakta çok zorluk çekerler. Örneğin, gelişmiş bitki ve hatta en basit hayvanların döterumu yüksek olan sularda hayatta kalmadığı, buna karşılık, bakteri, yosun, maya ve küf gibi organizmalar ve diğer bazı ökaryotik tek hücreli organizmaların hücrel bileşenlerinden dolayı hayatta kalabildiği bilinmektedir (Katz ve Crespi, 1966; Flaumenhaft ve ark., 1965; Unno ve ark., 1988). Balık ve kurbağa yavruları döteryum konsantrasyonu düşük olan sularda yaşadığı bildirilmektedir. Doğal içme sularının döteryum konsantrasyonu coğrafi farklılıklara göre bölgeden bölgeye değişmektedir. Döteryumun, insanlarda, hayvanlarda ve bitkilerde hücrenin normal büyümesi için gerekli olduğu ileri sürülmektedir. Döteryum konsantrasyonundaki hafif bir artış büyümeyi uyarmaktadır (Xie ve Zubarev, 2014).

Döteryum konsantrasyonu az olan suyun kullanımı tek hücreli ve çok hücreli organizmaların ömrünü uzattığı, sağlıklı hücreler üzerinde hiçbir zararlı etkisi olmadığı, nekroz veya apoptoz yolu ile hasarlı hücrelerin ölümüne neden olduğu belirtilmektedir (Mosin ve Ignatov, 2016). İlk olarak 1993 yılında Somlyai ve ark. tarafından döteryum konsantrasyonu az olan içme sularının canlı organizmayı etkilediğinden bahsedilmiştir (Somlyai ve ark., 1993).

Döteryumun, hücresel aktivite ve hücre büyümesine olan etkisi araştırılmış, hücre siklüsü sırasında D/H oranının değiştiği saptanmıştır. Canlı sistemlerde döteryum konsantrasyonu değişince, membranda H^+ transport sistemlerinden biri aktive olur. Hücre içinde, H^+ iyonları konsantrasyonu ve dolayısıyla pH değişir. İntrasellüler boşlukta D/H oranındaki artışın bir sinyal oluşturduğu ve hücrenin metabolik aktivitesinin değişmesine neden olduğu düşünülmektedir (Opitz ve ark., 2019).

Döteryumu azaltılmış su tüketiminin hücresel solunumu düzenlediği, hücresel enerjiyi arttırdığı, antioksidan aktiviteye, hipoglisemik ve antitümör etkiye sahip olduğu, zihinsel fonksiyonlar, radyoprotektif etki, detoksifikasyon ve immün sistem üzerine olumlu etkisi olduğu ileri sürülmektedir (Haulica ve ark., 1998; Kovács ve ark., 2011; Ávila ve ark., 2012; Gyöngyi ve ark., 2013; Mladin ve ark., 2014; Soleyman-Jahi ve ark., 2014; Lisitsyn ve ark., 2014; Strekalova ve ark., 2015; Boros ve ark., 2016; Dzhimak ve ark., 2015).

Döteryumu azaltılmış suyun tek hücreli organizma olan *E. faecalis* üzerindeki etkisi daha önce test edilmediği için bu çalışmanın literatüre katkısı olacağını düşünüyoruz.

4.5. İrrigasyonda Karşılaşılan Problemler

Endodontik tedavinin en zor aşaması ulaşılamayan bölgelerin temizliğidir. Bilinen en eski yöntem manuel şırınga irrigasyonudur ve pozitif basınçlı yıkama olarak tanımlanır. Endodontik iğnelerinin çapı 0.42 mm - 27G veya 0.31 mm - 30G

ölçüsündedir. Pozitif basınçlı sulama sistemlerinde, yıkama iğne ucunun 1–1,5 mm ötesiyle sınırlıdır ve etki edecek türbülans için yüksek bir akış hızına ihtiyaç vardır (Gao ve ark., 2009; Boutsoukis ve ark., 2010). Ek olarak, iğne ucunun uygulanabilirliği dar kök kanallarının apikal üçte birinde sınırlı kalmaması için apikal alan en az ISO 35-40 boyutuna kadar genişletilir (Huang ve ark., 2008; Usman ve ark., 2004). Ancak, diş kökü periodontal ligament ve kemik ile çevrilidir ve bu nedenle kanal kapalı uçlu bir sistemdir (Tay ve ark., 2010). İrrigasyon aşamasında kapalı uçlu kök kanalına bir iğnenin sokulmasıyla hava sıkışmanın bir sonucu olarak sıvının altında kalır ve kilit etkisi yaratır (de Gregorio ve ark., 2009). Solüsyonun kanal ucuna kadar ulaşmasına mani olur. Oysa, kullanılan solüsyonun en iyi performansı için kanal duvarına doğrudan ve tamamen temas etmelidir (Zehnder, 2006).

Apikal sonda veya ulaşılabilen bölgelerde daha iyi sonuçlar elde etmek için irrigasyon tekniğinin geliştirilmesi gerekmektedir. Dikkat edilmesi gereken başka bir husus apikal bölgeye yakın temasta kullanılan ajanların periradiküler dokulara kaçmasını önlemek ve güvenle kullanmak dikkat gerektirir (Park ve ark., 2013). Apikal son, güvenlik ve etkinlik arasındaki denge özellikle bu alanda önemli olduğundan irrigasyon için özel bir zorluk oluşturmaktadır.

Kök kanal sisteminin temizliğini doğrudan etkileyen bir diğer faktör, sıvıların kanal duvarları üzerindeki kayma gerilimi adı verilen mekanik etkisidir (van der Sluis, 2015). Kanal yüzeyine temas eden solüsyonların akış kuvvetini etkileyen faktörler arasında kök kanalın geometrisi, çapı ve apikal genişliği yer alır. Yeteri kadar genişletilmiş kök kanalında kayma gerilimi isteniyorsa solüsyonların antibakteriyel özelliklerinin yanında akışkan olmaları da iyi bir irrigasyon için aranan özelliklerdendir (Chen ve ark., 2014).

Bir diğer faktör solüsyonun temas süresidir. En çok kullanılan %1'lik NaOCl solüsyonunun en az 30 dk sürekli yenilenerek tatbik edilmesi gerektiği ileri sürülmüştür (Dioguardi ve ark., 2018). Oysa klinik şartlar ele alındığında tedavi süresinin kısa tutulması hasta konforu için önemlidir. Bir irrigant ajanın etkinliğinden daha fazla ve kısa sürede faydalanmak için geliştirilen sıvı akışı formülleri ile kimyasal

veya mekanik özelliklerini birleştirerek farklı irrigasyon sistemleri ve farklı ajanlar araştırılmaktadır.

4.6. Kök Kanal İrrigasyonunda Güncel Yöntemler

Teknik olarak solüsyonların manuel şırınga iğnesi ile uygulamada sınırlı kalması nedeniyle etkinliklerini arttırmak için farklı yöntemler denenmektedir. Ajanların etkinliği, kimyasal özellikleri dışında aynı zamanda konsantrasyonu, miktarı, ısı, dentin yüzeyi ile temas süresi ve kök kanal sistemine iletimi için kullanılan tekniğe de bağlıdır. Kullanılan teknik, solüsyonun reaksiyon kinetiğini arttırmalı, apikal son veya dentin tübüllerine penetrasyonunu sağlamalıdır.

Geleneksel endodontik şırınga ve iğnesi (pozitif basınç) veya apikal negatif basınçlı irrigasyon mevcut endodontik irrigasyon metodları arasında güncelliğini korumaktadır. Şırınga irrigasyonu aktivasyon sağlamaktan çok sıvının kök kanalına iletilmesini sağlarken ajanın dağılımını arttırmak ve aktive etmek için pek çok yöntem sayılabilir. El eğeleri, güta perka konileri, plastik aletler gibi mekanik uygulamanın yanı sıra sonik ve ultrasonik cihazlar, dental lazerler ile aktivasyon dahil olmak üzere farklı ajitasyon teknikleri araştırılmış ve geliştirilmiştir (Haapasalo ve ark., 2014b; Gu ve ark., 2009).

4.6.1. Manuel irrigasyon sistemleri

4.6.1.1. Geleneksel şırınga irrigasyonu

Şırınga irrigasyonu hem genel diş hekimleri hem de endodontistler arasında en yaygın kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir. En pratik uygulamadır ve solüsyon çalışma uzunluğuna yakın yerleştirilen bir iğne ile kök kanal sistemine iletilir (van der Sluis ve ark., 2015). Bu yöntem kök kanalının apikal üçte birinde pozitif basınç oluşturmaya nedeniyle pozitif basınçlı yıkama olarak tanımlanmaktadır (van der Sluis ve ark., 2015). Geniş kullanımına rağmen, ana kök kanalının ötesindeki alanları temizleyemez ve ulaşamaz olduğu düşünülmektedir (Jiang ve ark., 2012). Apikal

kanalın sulanması, etkinlik ve güvenlik arasında hassas bir denge oluşturmak gerektirdiği için bu alanda çok kritik ve kullanıcı-bağımlı adımlar gerçekleştirilmelidir. Örneğin, iğne ucu çalışma uzunluğuna yakın çalışılmalı ve akış hızı yeterli olmalıdır (Sedgley ve ark., 2005). Akış hızı ortalama 0,2 mL/sn olarak hesaplanmış ve kesme stresi yaklaşık 500 N/m² olduğu bildirilmiştir (Boutsioukis ve ark., 2010). Pratikte kullanıcıya bağlı adımlara özen gösterilmesine rağmen pozitif apikal basınç artabilir ve apikal foramen yoluyla solüsyonun periapikal dokuya taşma riski doğurabilir (Hülsmann ve Hahn, 2000).

4.6.1.2. Negatif basınçlı irrigasyon sistemleri

Solüsyonun kök kanalının tamamına iletilmesi ve iyi bir akışının elde edilmesi, ajanın aynı anda serbest bırakılması ve uzaklaştırılması için apikal negatif basınç sistemleri getirilmiştir. Bu teknikte amaç, apikal son ve erişilemeyen alanlarda solüsyonun güvenli bir şekilde iletilmesini, taze ve sürekli olarak akışını sağlamaktır (Schoeffel, 2008). Negatif basınçlı sulama sistemleri, bir kanaldan tahriş edici aspirasyon ile oluşturulan, kök kanalının orta kısmına veya çalışma boyuna yakın bir akışa dayanır. Doğru kullanım için kanalların çalışma boyunda ve minimum 350 µm genişliğe sahip olmasını gerektirir. Taze ajan, pulpa odasında daha büyük bir iğne ile iletilir, bu nedenle sıvının basınçlı boşaltılması ve sonuç olarak apikal foramenden taşma riski yoktur (Mitchell ve ark. 2010, 2011).

Literatürde farklı negatif basınç sistemleri tanımlanmıştır (Fukumoto ve ark., 2006), ancak bilgilerin çoğu EndoVac sisteminde yayınlandığından bu isimle tanımlanır. EndoVac (EV; SybronEndo, Orange, CA), apikal kanalın güvenli bir şekilde yıkanmasını sağlamak için negatif basınç kullanır. Bu sistemler, koronal ve orta kısımlar için bir makrokanül ve apikal kısım için diş ünitesi ile entegre edilmiş aspirasyon sistemine bağlı bir mikrokanül içerir (Nielsen ve Baumgartner, 2007).

EndoVac mikro-kanülünden (30G) mümkün olan maksimum akış hızı ve dolayısıyla temizleme etkinliği, ünit sistemin aspirasyon basıncı ile belirlenir; ideal koşullarda 25,4 kPa'lık bir aspirasyon basıncı için maksimum akış hızı 0.05 mL/sn'dir

(Brunson ve ark. 2010). Bu düşük hız nedeniyle, negatif basınç sistemleri laminar akış sunmaktadır (Chen ve ark. 2014). İşlem sırasında, şırıngaya bağlı bir uç solüsyonu pulpa odasına verirken kanala yerleştirilen ve aspiratöre bağlı diğer kanül sistemi aspirasyon deliklerinden tahliye eder. Bazı çalışmalar, pozitif basınçlı sulama ile karşılaştırıldığında EndoVac sistemi apikal sonda gelişmiş temizlik ve antimikrobiyal etki göstermiştir (Nielsen ve Baumgartner, 2007; Schoeffel, 2008; Malentacca ve ark., 2012).

Bu sistem, güvenli ve düşük taşma riski ile apikal sonda sürekli ve taze solüsyon akışı sağlamakla birlikte solüsyon üzerinde herhangi bir aktivasyon etkisi yoktur.

4.6.2. Solüsyon Aktivasyon Yöntemleri

Kök kanal irrigasyon aşamasında uygulanan aktivasyon yöntemleri solüsyonun ulaşılmayan bölgelere temasını sağlamak ve hava kilidi etkisinin oluşmasını önlemek için düşünülmüştür. Aktivasyon, irrigasyon işleminde sıvı dinamiğini arttıracak kuvvetten faydalanmayı amaçlar. Akışı hızlanan sıvının kayma gerilimi artarak solüsyonların etkinliğini artırılır. Ancak, hiçbir yöntem kullanılan ajanın fiziksel yada kimyasal özelliklerini değiştirmez (Wright ve Walsh, 2017).

4.6.2.1. Isıtma

Solüsyonun ısıtılması, özellikle NaOCl etkisini arttırmak için en yaygın yöntemdir. Bu işlem kanalların içindeki kök kanal sisteminin dışında şırıngaların ısıtılması veya ultrasonik uçların kullanılmasıyla gerçekleştirilebilir. Düşük konsantrasyonlu NaOCl solüsyonunun sıcaklığı yükseltilerek de etkinliğini artırılabilir. Düşük konsantrasyonlu ısıtılmış sodyum hipoklorit solüsyonunun doku çözücü ve antimikrobiyal özelliği, ısıtılmamış yüksek konsantrasyonlu sodyum hipoklorit solüsyonuna göre hem daha fazla etkili hem de daha az toksiktir (Abou-Rass ve Oglesby, 1981).

50C°– 60C° gibi yüksek sıcaklıkta NaOCl'in reaksiyon kinetiğinin artarak

antibakteriyel etkisinin ve organik kalıntıları çözme yeteneğinin geliştiği ileri sürülür. Aynı zamanda, 45°C'de %1'lik NaOCl ve 20°C'de kullanılan %5,25'lik konsantrasyonun insan pulpa dokusunu çözme kapasitesi benzer bulunmuştur (Sirtes ve ark., 2005).

4.6.2.2. Mekanik dinamik aktivasyon

Tüm mekanik aktivasyon tekniklerinden en basit olanı solüsyonun hareketlendirilmesi başka bir deyişle çalkalama metodudur. Bu efekti elde etmenin en kolay yolu ise kök kanal içindeki endodontik eğeyi, gütaı yada endodontik olarak hazırlanmış bir fırçayı dikey ve pasif olarak hareket ettirmektir. Solüsyonun ulaşılabilen bölgelere iletilmesi ve hava kabarcıklarının varlığını azaltmaya yardımcı olur (Vera ve ark., 2012). Bu ajitasyon tekniğı daha çok kanal duvarındaki smear tabakasını kaldırmaya yöneliktir (Zmener ve ark., 2009).

Manuel dinamik aktivasyonda irrigantın aktivasyonu sağlamak için sıkı bir şekilde oturan güta perka konisi kök kanalının içinde hareket ettirilir. Apikale doğru hareket ettikçe, koni ve kök kanal duvarı arasındaki boşluktaki sıvıyı koronal ve apikal olarak yer değiştirmeye zorlar (Bronnec ve ark., 2010). Kök kanal geometrisi düzensizdir. Sadece düz olmayan duvarlar değil, aynı zamanda sıvının itilebileceğı yan kanallar, oval uzantılar ve istmuslar da düzensizdir. Bu tekniğın kanal sistemindeki düzensizliklerdeki debrisin temizlenmesini artırabileceğı öne sürülmektedir. Yine de bu yöntemle oluşturulan solüsyonun ana kanaldaki hızı 1 N/m² kadar yavaştır (Jiang ve ark., 2012).

4.6.2.3. Sonik ve ultrasonik aktivasyon

Diğer aktivasyon yöntemlerinden farklı olarak sonik ve ultrasonik cihazların aktivasyonu cihaz ucundaki iğnenin belirli bir frakansta hareket etmesi ve temas ettikleri sıvının moleküllerinde pozitif ve negatif basınç kabarcıkları oluşturmalarıdır. Kavitasyon adı verilen bu kabarcıklar, sıvıda bir buhar veya bir boşluk oluşumu olarak tanımlanır. Fizikte bu oluşuma 'Musa Etkisi' denir (Kitazawa ve ark., 2001). Kararsız

hale gelen kabarcıklar daha sonra çökerler ve vakum dekompresyonuna benzer bir patlamaya neden olurlar. Bu kabarcıkların oluşumu ve çökmesi sonucu sıvıda darbe etkisi yaratır (Tomita ve Shima, 1986).

Endodontide ultrasonik cihazların kullanımı ilk defa 1976 yılında ortaya atılmıştır (Martin, 1976). İrrigasyon solüsyonu kök kanal sisteminde iken aynı zamanda ultrasonik iğnenin aktivasyonu ile temizlik sağlanır (Jiang ve ark., 2012). Ultrasonik ünite de kullanılan frekans aralığı 25 ila 40 kHz arasındadır. Sonik aktivasyon, ultrasonik sistemden farklıdır çünkü daha düşük bir frekansta (1-6 kHz) çalışır ve plastik uçlar kullanılır (Ahmad ve ark., 1987). Bu nedenle debrisin giderilmesinde genellikle ultrasonik sistemlerden daha az etkili olduğu belirtilir (Sabins ve ark., 2003).

Sonik ve ultrasonik olarak salınım yapan eğelerin kavitasyon oluşturan paternleri çok belirgindir. Sonik salınım sadece bir düğüme ve bir karşı düğüme sahiptir (Jiang ve ark., 2010). Ultrasonik ise yaklaşık 5 mm aralıklı altı düğüm ve bir karşı düğüme sahiptir. Ultrasonik olarak salınan aletler, sonik sistemlerin aksine akustik akış üretebilir. Salınım için kullanılan uçlar, irrigant maddenin kök kanal sistemi boyunca iletimini ve ayrıca tazelenmesini/karıştırılmasını artıran mikro akış üreten bir mikser görevi görür. Sıvı akışını büyük ölçüde artınca hem çözücü hem de antibakteriyel kapasiteleri ve organik ve inorganik çöküntülerin kök kanal duvarlarından uzaklaştırılma etkisini artırır (Plotino ve ark., 2007).

Yakın zamanda tanıtılan ve bir poliamid uca sahip Eddy (VDW, Münih, Almanya), kök kanalı solüsyonlarını aktive etmek için 5.100–6.200 Hz'de bir hava-sonik ölçekleyici tarafından aktive edilir. Akustik ve hidrodinamik aktivasyonun akustik akıma ve kavitasyona neden olduğunu ve kök kanalının etkili bir şekilde temizlenmesine neden olduğunu iddia edilir. Ancak, yapılan bir çalışmada kavitasyon eşiğinin altına düşecek kadar yavaş hareket eden sonik salınımlı Eddy ucu çevresinde kavitasyon meydana gelmediği ileri sürülmüştür (Swimberghe ve ark., 2019). Öte yandan, kök kanalı şekillendirme sırasında ve son irrigasyonda ultrasonik kullanımı endodontik dezenfeksiyon sağlanması için gerekli bir adım olarak görülür.

Son yirmi yılda, hangi aktivasyon tekniğinin en etkili olduğu konusunda bir miktar tartışma vardır. Bazı araştırmacılar, sonik olarak aktive edilmiş sulama işleminin ultrasonik olarak aktive edilmiş karşılığından daha az etkili olduğunu bulurken, bazıları iki yöntemin karşılaştırılabilir sonuçlar elde edilmiştir (Jensen ve ark., 1999; Sabins ve ark., 2003; Martin, 1976).

4.6.2.4 Multisonik aktivasyon

Multisonik sistem olarak öne sürülen Gentlewave® (GW) (Sonendo, Laguna Hills, CA, ABD) sistemi, geniş bir ses dalgası yelpazesi de dahil olmak üzere farklı fizyokimyasal mekanizmaların üretilmesiyle kök kanalını temizlemeyi amaçlamaktadır. Pulpa boşluğunun içine yerleştirilen GW piyasemenin ucu multisonik dalgalar üretir ve sıvı ajan ile etkileşerek hidrodinamik kavitasyona neden olan bir kuvvet yaratır. Kavitasyon bulutu içinde mikro kabarcıkların sürekli oluşumu, akışkanın içinden tüm kanala ilerleyen geniş bantta akustik bir alan üretir. Solüsyon akışı devamlı sağlanırken, fazla sıvı cihazdaki aspiratör ile aynı anda, kök kanal sistemi içinde negatif basınç oluşturularak dışarı çıkarılır. GW Sisteminin ultrasonik cihazlara ve manuel iğne irrigasyonuna göre daha hızlı doku çözünmesi sağladığı öne sürülmüştür. Üretici, GW sisteminin etkili bir şekilde çalışması için kanalların ISO 15 nolu kanal eğesinin ötesinde genişletilmesinin gerekmediğini ileri sürmektedir (Haapasalo ve ark., 2016). Ancak, NaOCl dahil olmak üzere enerji verilen solüsyon kullanıldığı için periapikal ekstrüzyon riski olduğu belirtilir (Charara ve ark., 2016).

4.6.2.5. Lazer destekli kök kanal tedavisi

Lazer destekli diş hekimliği uygulamaları, 1960'ta Maiman'ın lazeri diş dokusunda denemesi ile başlamıştır (Maiman, 1960). Bu tarihten günümüze kadar dental lazer uygulamaları bilgisi pek çok gelişme ve ilerleme kaydetmiştir. Diş hekimliğinin neredeyse her alanında bir kullanım amacı bulan lazer radyasyonu, endodontide kanal içi artıkları uzaklaştırma yada antimikrobiyal özellikleri sebebiyle kullanılır. Dental lazerler kök kanal sisteminde genellikle üç farklı teknik ile uygulanır.

- Foto-dinamik dezenfeksiyon yada foto-aktif dezenfeksiyon olarak adlandırılan birinci yöntem, yakın-kızılötesi (NIR; near infra-red) lazer dalga boylarına afinitesi en yüksek ve antimikrobial etkiye sahip bir ajan/boya kullanılır. Kanal girişinde tutulan lazer uç, tüm çepere yayılan ışığa duyarlı ajanı aktive eder ve singlet-oksijen ($^1O_2$) üretimi gerçekleşir. Meydana gelen antibakteriyel molekül ile dezenfeksiyon sağlanır.
- İkinci olarak, dental lazer kök kanal tedavisi şekillendirilmiş ve son irrigasyonu yapılmış dişe uygulanır. Kök kanal içine yerleştirilen 150-200 μm 'lik fiber optik uç apikalden kuranale doğru dairesel hareketlendirilir ve lazer radyasyonu dentin duvarına direkt aktarılır. Bu foto-termal etki için dentin dokuda etkileşime girmeyen derine nüfus edebilecek görünür ışığa yakın NIR lazer dalga boyları tercih edilir.
- Üçüncü yöntemde lazer radyasyonu irrigasyon aşamasında uygulanır. Irrigasyon solüsyonunun etkinliğini arttırmak için su absorpsiyon katsayısı en yüksek orta-kızılötesi (mid infra-red; MIR) lazerler kullanılır (Hale ve Querry, 1973). Elektromanyetik spektrumda orta infrared alanda bulunan Erbiyum lazer ailesinden erbiyum, kromiyum: itriyum skandiyum galyum garnet (Er,Cr:YSGG-2790 nm) veya erbiyum: itriyum alüminyum garnet (Er:YAG - 2940 nm) lazer dalga boylarına sahip cihazlar tercih edilir (Meire ve ark., 2014; de Groot ve ark., 2009; Blanken ve Verdaasdonk, 2007). 2940 nm'de suyun emilimi en çok ve 2780 nm'de (% 55-60 daha az) su tarafından biraz daha az absorbe edildiği bildirilmiştir (Stock ve ark., 1997). Ancak, Er:YAG ve Er,Cr:YSGG lazerler etkinlikleri karşılaştırıldığında birbirlerine üstünlükleri yoktur (De Moor ve ark., 2010).

4.6.2.5.1. Kök kanal tedavisinde erbiyum lazerler

Sudaki afinitesi ve su aracılı mikropatlamalar ile doku uzaklaştırma mekanizması Erbiyum lazer dalga boylarını diş hekimliğinde ön plana çıkardı. Su aracılı ablasyon dokuda termal hasar oluşmasını ve morfolojik değişimlerin oluşmasını engellediği pek çok çalışmada kanıtlandı. Endodontide bu özelliklerin kök kanal duvarlarında hasar oluşturmada direkt patojenler üzerinde etkisi araştırıldı ancak enerjinin homojen olarak yayılmadığı belirtildi. 2007 yılında, Er,Cr:YSGG lazer ile yapılan bir çalışma sıvı içinde lazer etkileşimli kavitasyon baloncuklarını görüntüledi (Blanken ve Verdaasdonk, 2007). Bu tarihten sonra kök kanal içerisinde solüsyonun lazer etkileşimli kavitasyon üzerinde duruldu ve solüsyonların 'lazer aktivasyonu' (LA) olarak tanımlandı (Blanken ve ark., 2009; De Moor ve ark., 2009; Matsumoto ve ark., 2011).

4.6.2.5.2. Lazer aktivasyonu ile irrigasyon

Kök kanal irrigasyonu yaparken uygulanan lazer radyasyonu kanal içindeki sıvıda çok kısa bir zaman dilimi içinde genişleyen ve patlayan kabarcıklar, kavitasyonlar oluşturur (Blanken ve ark., 2009; Matsumoto ve ark., 2011). van Leeuwen ve ark., Er,Cr:YSGG ile 130-140 μ sn'deki lazer etkileşimli kavitasyonu “mikrosaniyedeki Musa etkisi” olarak adlandırmıştır (van Leeuwen ve ark., 1991). Sıvı dinamiğini etkileyen kavitasyon oluşumu şok dalgaları yaratır (Esenaliev ve ark., 1993). Eşlik eden ikincil kavitasyon kabarcıkları ile birlikte daha da güçlü darbeler yaratarak kanal çeperine yapışan tabakanın veya biofilmin fiziksel olarak uzaklaştırılması sağlanır (de Groot ve ark., 2009). Sonik veya ultrasonik cihazlardaki kavitasyondan farklı olarak burada 1 sn'den çok daha kısa zamanda meydana gelen foto-akustik darbeler sıvı dinamiğini arttırmaktadır. Sıvının akış hızının artması ve oluşan ikincil kavitasyonlar ile çepere yapışık debris uzaklaştırılırken bakteri eliminasyonu da sağlanmış olur.

Yapılan araştırmalar, şekillendirme prosedürleri sırasında endodontik aletlerin ulaşamadığı bölgelerin, istmusların ve dentin tübüllerinin temizlenmesine olanak sağladığını ileri sürer (George ve ark., 2008). Ayrıca, LA yönteminin hava kilidi etkisini tamamen ortadan kalkacağı ve sıkışmış havayı sıvının kök kanalında apikale hareket etmesini sağlayarak giderilir. Bu işlem, iki faz olarak değişebilen hava (sıkıştırılabilir sıvı) ve solüsyon (sıkıştırılamaz sıvı) varlığını içerir. Ancak, hapsolmuş havanın hava kolonundan (apikal bölge) çıkarıldığı gerçek mekanizma tam olarak açıklanamaz (Peeters ve Gutknecht, 2014).

Kullanılan lazerin dalga boyundaki farklılıklar, güç ayarları, fiber uç şekli veya boyut değişkenliği nedeniyle sabit bir çalışma protokolü belirlenmemiştir. Erbiyum ailesine ait cihazlarda farklı endodontik uçlar farklı tekniklerde kullanılmaktadır. 200-300 μ m çapındaki optik uçların apikalden koronale doğru dairesel hareketle çalıştırılması veya düz sonlu 400 μ m çaptaki daha kalın ve kısa uçların kanal içinde aşağı/yukarı hareket ettirilmesi gibi farklı teknikler önerilir (Olivi ve De Moor, 2016). Bu cihazlarının yüksek enerjisi solüsyonun apikalden çıkışına neden olabilecek bir risk olarak görülmektedir (Peeters ve De Moor, 2015; George ve Walsh, 2008). Bu yüzden

fiber uçların kanal girişinde kalması ve apikal bölgeden uzak tutulduğu teknikler tavsiye edilir (George ve Walsh, 2008; Peeters ve Suardita, 2011). Buna ek olarak, lazer radyasyonu sadece fiber uç doğrultusunda ve tüm kanal çeperine ulaşmasını sağlayacak bir sistemin olmaması kompleks yapıdaki kök kanal sistemi için bir dezavantajdır. LA irrigasyonun başarılı olduğunu bildiren çalışmalara rağmen lazer etkileşimli aktivasyonun üstünlüğü konusunda araştırmalar devam etmektedir.

Çalışmamızda, yeni kullanacağımız solüsyonların Er,Cr:YSGG ile etkileşiminin antibakteriyel etkinliklerini, özellikle dentin tubüllerinde oluşturabileceği değişikliği değerlendirmek istedik. Bu amaçla, (1) biyofilm analiz yöntemlerinden mikrobiyolojik kültür oluşturma ve (2) mikroskobik yöntemlerden konfokal lazer taramalı mikroskop kullanılmasını uygun bulduk. Aşağıda bu analiz yöntemlerine kısaca değinilmiştir.

4.7. Biyofilm Analiz Yöntemleri

Biyofilm analizleri (1) mikroorganizmanın sayısı ve tipi, (2) yerleşik mikrobiyal popülasyonun canlılığını (ölü/canlı hücreler), (3) yaş, (4) kalınlığı (tek katmanlı veya çok katmanlı), (5) biyofilmlerin yapısı (homojen, düzensiz, yoğun, gözenekli) ve (6) biyofilmlerin yüzey topografyası (tepe noktaları ve vadileri) gibi özellikleri karakterize etmek için kullanılır. Örnek olarak, bakteriyel hücreler ile bakteriyel hücre ve substrat arasındaki etkileşim kuvvetlerini incelemek için atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) gibi özel yöntemler de uygulanmıştır (Postollec ve ark., 2006).

Güncel uygulamalar; (1) fiziksel yöntemler, (2) kolorimetrik teknikler, (3) biyokimyasal yöntemler, (4) moleküler yöntemler, (5) mikrobiyolojik kültür yöntemi ve (6) mikroskopi gibi farklı teknikler biyofilm analizlerinde kullanılmaktadır (Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.7.1. Fiziksel Metod: Kalınlık Ağırlık Alan ve Yoğunluk Ölçümleri

Biyofilm kalınlığı, alanı, ağırlığı (ıslak ve kuru) ve yoğunluk tahminleri gibi fiziksel parametreler biyofilm büyümesini ölçmek için kullanılır. Işık mikroskopisi ile

kalınlık ölçümü genellikle ince biyofilmlerde etkilidir; ancak kalın biyofilmlerle çalışmayabilir.

Bu yöntemde biyofilm, ince kontrol üzerinde kalibrasyon ölçekleri olan bir mikroskop sahnesi üzerine yerleştirilir. Amaç biyofilm yüzeyi odaklanana ve mikroskopun ince ayar kadranı ayarı kaydedilene kadar düşürülür. İnce ayar ayarındaki fark kalınlığı hesaplamak için kullanılabilir.

Biyofilm ıslak ağırlığı, özellikle daralanmış yüzeylerde biyokütlenin yararlı bir ölçümüdür. Bu çok basit ve hızlı bir prosedürdür. Substrat biyofilm büyümesinden önce tartılır ve daha sonra kuru biyofilm ağırlığını kaydetmek için tekrar tartılır. Bu durumda biyofilm büyümesi sırasında hiçbir substrat çözünürlüğünün meydana gelmediği varsayılır. Aynı biyofilm numunesi üzerinde hem ıslak hem de kuru ağırlık ölçümleri ölçüldüyse, yaklaşık yoğunluk belirlenebilir. Karşılaştırmalı amaçlar için, film yoğunluğu ve ağırlık gibi fiziksel parametreler, substratın birim alanı başına hesaplanabilir (Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.7.2. Kolorimetrik Teknikler

Kolorimetrik analiz, biyofilm biyokütlesini belirlemek için bakteriyel hücreler tarafından boya alım prensiplerini uygulayan yarı kantitatif bir yöntemdir. Bu tahlilde, bakteriyel biyofilm bir boya (örn., Kristal viyole) ile boyandıktan sonra, bilinen miktarda alkol veya bir yüzey aktif madde (sodyum dodesil sülfat) kullanılarak bozulur ve elüte edilen boyanın yoğunluğu bir spektrofotometre kullanılarak ölçülür. Bu biyofilm bakterilerinin hızlı bir şekilde ölçülmesini sağlayan kolay bir testtir. Öte yandan, bu testin yorumlanması zor olabilir, çünkü ölçülen optik yoğunluk bakteri sayısının bir göstergesidir ve biyofilm yapısında EPS'nin gerçek bir göstergesi değildir. Test genellikle güçlü biyofilm üreticileri olan suşlar için iyi çalışır, ancak zayıf biyofilm üreticilerini biyofilm negatif suşlardan ayırmak için çok yararlı olmayabilirler (McBain, 2009; Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.7.3. Biyokimyasal Metod: Biyokütle ve Ekstraselüler Matriks

Mikrobiyal biyokütle, belirli bir alandaki toplam mikrop sayısını belirtir. (1) mikrobiyal biyokütlenin ölçümleri hızlı bir yöntem olarak kabul edilir ve tüm biyofilmin ıslak veya kuru ağırlığının ölçümlerini, (2) hücre içeriğinin ölçümlerini (3) hücresel aktivitelerin veya canlı hücrelerin ölçümlerini içerir. Adenosin trifosfat (ATP) biyoluminesans bakteri popülasyonunun metabolik aktivitesini belirlemek için yaygın olarak kullanılmaktadır.

Bu teknik, bir lusiferin-lusiferaz reaksiyonu ile belirlenen ATP'yi serbest bırakmak için bir hücre lizis adımı gerektirir (de Beer ve ark. 1994). Bununla birlikte, lizis oranının ve ATP içeriğinin mikroorganizmaya bağlı olarak değiştiğine dikkat edilmelidir. Bu nedenle, ATP tahlili, başlangıçtaki mikrobiyal hücre sayısı ile ilişkilendirilemez. Biyoluminesans için genler içeren genetiği değiştirilmiş suşlar da geliştirilmiştir ve bazı *in vitro* analizler için uygulanmıştır (McAllister ve ark., 1994). Tüm bu yöntemler avantaj ve dezavantajlar sunar. Mikroskopi tabanlı teknikler dışında, diğer yöntemlerin çoğu, kısa bir süre içinde önemli bir sayıya çarpma kabiliyetine sahip optimum sayıda canlı hücre gerektirir. Biyofilm tahlillerinde yaşayabilir bakterilerin tespiti için hızlı biyokimyasal yöntemler daha rutin olarak uygulanmadan önce daha fazla araştırmaya ihtiyaç vardır (Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.7.4. Moleküler Biyolojik Metod

Moleküler biyolojik teknikler biyofilm bakteri hakkında genetik bilgi sağlar: Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzime bağlı immünosorban analizi (ELISA). PCR, kısa DNA dizilerinin üstel amplifikasyonuna izin veren bir yöntemdir. ELISA, bir numunede ilgili antijenlerin veya antikörlerin varlığını tespit etmek için kullanılan çok hassas bir yöntemdir. ELISA, standart eğrilerle birlikte kullanıldığında kantitatif değerlendirme için kullanılabilir.

Mikroarray analizi ve tanımlanmış düzenleyici mutantların kullanımı

biyofilmleri incelemek için önemli araçlar olmuştur (Lee ve ark. 1990; Bauer-Kreisel ve ark. 1996). Ek olarak, daha az patojenik organizmalarda bakteriyel virülans faktörlerinin klonlanması ve ekspresyonu, bakterilerin biyofilm aracılı enfeksiyonlarda rolünü değerlendirmek için önemli bir araçtır. Bakteriyel aderans ve biyofilm oluşumunun moleküler bazlı analizleri yapıldığında, bakterilerin çoğunlukla ideal laboratuvar koşulları altında yetiştirildiği anlaşılmaktadır. Bu durumlar klinik olarak gerçekçi bir durum olmayabilir. Bu tür deneyler deney grupları arasında nispi bir karşılaştırma için kullanılabilmesine rağmen, laboratuvarlar ve *in vivo* durumlar arasında bir eşitsizlik durumu vardır (Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.7.5. Mikrobiyolojik Kültür Oluşturma

Koloni oluşturan birimlerin (colony-forming units; CFU) numaralandırılması, biyofilm bakterilerinin ölçümü için kolay bir yöntemdir. CFU ölçümü, bir örnekteki bir biyofilm içinde bulunan canlı hücre sayısını belirlemek için kullanılan plaka sayma ile canlı bakteri miktarı hakkında bilgi sağlar. Ancak dentin içindeki bakterilerin mekansal dağılımı hakkında net bilgi vermezler.

Bununla birlikte, CFU bazlı yöntem sadece kolonileri oluşturmak için yeterli bir oranda hücre bölünmesini başlatabilen bakterileri tespit edebilir ve bunların büyüme gereksinimleri kullanılan kültür ortamı tarafından desteklenir. Seyreltme yöntemleri, en düşük konsantrasyon değerlerinin belirlenmesi için en uygun yöntemlerdir, çünkü test edilen anti-mikrobiyal ajanın agar veya broth besi ortamında makro-dilüsyon veya mikro-dilüsyon ile minimum konsantrasyonunu tahmin etme imkanı sunar. Bakteri ve mantarlara karşı *in vitro* antimikrobiyal aktiviteyi kantitatif olarak ölçmek için broth veya agar seyreltme yöntemi kullanılabilir (Balouiri ve ark., 2016).

Tekniğin birkaç adımı vardır ve doğru sonuçlar elde etmek için hepsi dikkatli bir şekilde yapılmalıdır. Aseptik teknik, numunenin kontaminasyonunu önlemeyi amaçlayan bir prosedürler topluluğuna verilen terimdir. Çeşitli protokoller, sonikasyon veya santrifüjleme işlemi ile biyofilm bakterilerinin substrattan çıkarılmasını önerir ve CFU miktarını belirlemek için süpernatant kullanılır. Canlı

mikropların tekrar üremesi bu deneylerde önemli bir adımdır ve bakteriler substrattan uzaklaştırılmada kullanılan prosedürlere duyarlı olabilir.

Endodontik patojenlerin incelenmesinde sıklıkla kullanılan kültür yöntemi, uygun çevre şartlarını sağlayarak mikroorganizmaların laboratuvar ortamında çoğaltılması tekniğidir. Kültür işlemleri için hastadan alınan örnekler uygun koşullarda laboratuvara ulaştırılır. Mikroorganizmaları üretmek için gerekli koşullar, canlı (bir konakta veya hücre kültürü) veya yapay ortamlarla sağlanabilir. Bakteriyel ve fungal patojenlerin mikrobiyolojik tanısı için çoğunlukla yapay ortamlar kullanılmaktadır. Mikroorganizmaların bu yapay ortamlarda yaşayabilmeleri için besin, ısı, nem, tuz konsantrasyonu, atmosfer, pH gibi uygun fizikokimyasal şartların sağlanması gerekmektedir (Slots, 1986).

4.7.6. İleri Teknikler

Bakteriyel hücreler ile bakteriyel hücre ve substrat arasındaki etkileşim kuvvetlerini incelemek için atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) uygulanmıştır (Postollec ve ark., 2006). Bakteri-substrat etkileşimini belirlemek ve AFM'yi kullanmak için bakteriyel hücre veya substrat partikülü bir AFM ucuna bağlanır ve etkileşim kuvvetleri incelenir. Kısaca, AFM ucu substrata yaklaştıkça ve etkileşen iki cisim arasındaki boşluk nanometre aralığına yaklaştıkça, geliştirilen etkileşen kuvvetler AFM ucu tarafından kaydedilir. AFM kuvvet eğrileri, bakteri ve substrat arasındaki etkileşimdeki yapışma olaylarını ve etkileşim kuvvetlerini tahmin etmek için kullanılabilir (Gaboriaud ve Dufrene, 2007).

Fourier dönüşümü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi biyofilm yapılarının kimyasal bileşimini karakterize etmek için kullanılır. Bir FTIR spektroskopik analizinde, kızılötesi radyasyon bir test numunesi ile etkileşime girer. Bu etkileşim sırasında, bazı kızılötesi radyasyon örnek tarafından emilir. Elde edilen spektrum, numunenin moleküler parmak izi olan moleküler seviye Emilimini/iletimini temsil eder. FTIR spektroskopisi, bir biyofilm yapısı üzerindeki kimyasal bileşenlerin kalitatif ve kantitatif analizleri için kullanılabilir (Kishen ve ark., 2006). Benzer

şekilde, katı hal nükleer manyetik rezonans (NMR) gibi biyofiziksel teknikler, bir biyofilm yapısının kimyasal bileşenlerini incelemek için güçlü bir analitik araçtır. NMR spektroskopisi planktonik hücreler, yapışık bakteri hücreleri ve *in situ* biyofilm bakterilerinde metabolik bilgi elde etmek için kullanılır (Majors ve ark., 2005; Kishen ve Haasapalo, 2015).

4.8. Mikroskopik Görüntüleme Yöntemleri

4.8.1. Işık Mikroskop

Işık mikroskopisi, biyofilmlerin doğrudan *in vitro* numunelerde veya *in vivo* histopatolojik kesitlerde incelenmesinde kullanılan temel tekniktir. Nispeten ucuz, hızlı ve kolay ulaşılabilir bir yöntemdir. Bakterilerin substratlara yapışmasını, biyofilmlerin yapısını ve biyofilm yapısında bakterilerin dağılımını/tipini/canlılığını değerlendirmek için farklı mikroskopik yöntemler kullanılmıştır. Mikroskopik bir yöntemde, bakteriyel biyofilm floresan (örneğin propidiyum iyodür) veya floresan olmayan (ör. safranin) uygun bir boya ile boyanır. Çoğu yüksek çözünürlüklü ışık mikroskobu, bir substrat yüzeyinde bakteri hücrelerinin sayılmasını sağlar. Biyofilm, EPS'deki asidik mukopolisakkaritleri ve glikosaminoglikanları boyayan bir ftalosiyanın boyası olan Alcian Blue ile boyanabilir. Lekeli kısımlar mavi yada mavimsi yeşil renkte görünecektir.

Bakteriyel hücreler, plazmid kodlu yeşil floresan protein kullanılarak floresan problemleri kullanılmadan floresan mikroskopları altında görüntülenebilir. Bu hücrelerin yaşayabilirliği ise transforme edilmiş hücrelerin membran geçirimsiz floresan boya ile boyanmasıyla belirlenebilir (Takeuchi ve Frank, 2001).

4.8.2. Taramalı Elektron Mikroskop

Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve transmisyon elektron mikroskobu uzun yıllardır biyofilm analizinde etkili birer yöntemdir. Biyofilmlerin morfolojik ve yapısal karakterizasyonu için kullanılmıştır (Yavari, 2010). Bu tekniklerin en büyük

dezavantajı, fiksasyon, dehidrasyon, dondurarak kurutma veya kritik nokta kurutma ve püskürtme gibi kapsamlı numune hazırlama adımlarına ihtiyaç duyar. Bu adımlar orijinal biyofilm morfolojisini derinden etkileyebilir.

Çevresel SEM (eSEM), geleneksel SEM'e güçlü bir alternatifi temsil eden nispeten yeni bir tekniktir, çünkü biyolojik örneklerin orijinal hidratlı koşullarında nispeten yüksek çözünürlükte görüntülenmesine izin verir. Geleneksel yüksek vakumlu SEM ile eSEM görüntüleri karşılaştırılırken, mikrobiyal biyofilm mimarisinde yapısal değişiklikler, özellikle de genel bir matris hacmi kaybı görülür.

Kısacası, eSEM, önemli ölçüde EPS bileşenini koruyarak yüksek oranda hidratlanmış bakteriyel biyofilmleri tespit etmek için etkili bir tekniktir. Aksine, geleneksel yüksek vakumlu SEM, hücresel bileşenlerin ayrıntılı incelenmesine izin verir ve üç boyutlu içi boş yapıların saptanmasını destekler, ancak hücreleri çevreleyen büyük hacimli EPS matrisinden oluşan gerçek biyofilm mimarisini gösteremez. Geleneksel SEM ve eSEM tekniklerinin birlikte kullanılması bu nedenle farklı biyofilm bileşenleri, bakteri hücreleri ve hücre dışı matrisler hakkında tamamlayıcı bilgi sağlayabilir (Sutton ve ark., 1994).

4.8.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop

Konfokal lazer taramalı mikroskobu (confocal laser scanning microscope; CLSM), ışık kaynağı olarak bir lazer ışığı ve görüntü işlemeye yardımcı olan bir elektronik sistem içeren optik bir mikroskoptur. Numunenin kalınlığı boyunca farklı optik alanlardan gelen ışığın neden olduğu paraziti ortadan kaldırarak ve tek bir düzleme (konfokal) odaklanarak yüksek çözünürlüklü ve son derece ince optik görüntü bölümleri elde eder.

Konfokal lazer taramalı mikroskop şu şekilde çalışır: Numune üzerine gelen ışık küçük bir delik veya yuvadan (iğne deliği) geçer ve yüksek sayısal açıklık hedefinin görüntü düzlemine odaklanır, böylece hedefin odak düzlemine yerleştirilen nokta tarafından yansıtılan ışık geri döner ve bir iğne deliği tarafından herhangi bir kayıp

olmadan yeniden odaklanır ve iletilir. Odaklanmayan bölgelerden etkilenmeden yüksek kontrastlı bir görüntü ve odak düzlemi üzerindeki bir noktanın tanımlanması elde edilir. Elde edilen görüntüler dijital olduğundan, optik mikroskop için farklı büyütme elde edilebilir (García-Herraiz ve ark., 2012). Ayrıca, elde edilen dijital görüntüler ise yapılan araştırmada kullanılan flüoresan boya veya kullanılan deney materyali gibi değişkenlere bağlı olarak bir yazılım programı aracılığı ile analiz edilir (Schindelin ve ark., 2012).

Konfokal lazer taramalı mikroskop özellikle önemli bir biyofilm analiz tekniğidir. 50 µm ila 200 µm kalınlığında biyofilm yapılarını görüntülemeyi başarır. Ayrıca, epifloresans, SEM ve TEM gibi daha önceki mikroskopik tekniklerin sergilediği bazı teknik sorunların üstesinden gelmiştir. Moleküler mikrobiyolojik tekniklerdeki gelişmelerle birlikte CLSM biyofilmleri incelemek için önemli bir araç haline gelmiştir. Belirli bakteri suşlarının yeşil floresan protein etiketlenmesi ile biyofilm oluşumunu incelemek, hücrelerin kalınlığını ve dağılımını belirlemek için kullanılabilir. Ayrıca, bu floresan görüntüleme tekniği ile floresin kullanılarak biyofilmin pH gradyanları ölçülebilir (García-Herraiz ve ark., 2012).

4.8.4. Epifloresans Mikroskop

Epifloresans mikroskop, bakteriyel biyofilmin mikro yapısını incelemek için kullanılır. Biyomalzeme yüzeylerinde büyütülen biyofilmler genellikle bir floresan boya ile boyanır ve epifloresans mikroskop altında izlenir. Epifloresans mikroskopi, canlı hücreleri, hücre düzenlemesini, mikrokoli oluşumu, biyofilm pH'ı ve biyofilm yapısında kimyasalların dağılımını belirlemek için kullanılır (Wolfaardt ve ark., 1993).

4.8.5. Floresan In-Situ Hibridizasyon

Floresan *in-situ* hibridizasyon (FISH), karmaşık bir mikrobik topluluk içindeki hedef mikropoların spesifik ve hassas tanımlanması için tanınan bir araçtır. FISH tekniği, bakterilerde hedefe özgü 16S rRNA dizileri için kullanılır. Biyofilmlerde gram-pozitif ve gram-negatif bakterilerin mekansal dağılımının eşzamanlı olarak

değerlendirilmesi için uygulanır. Biyofilmlerde FISH etiketli hücrelerin görüntülenmesi floresan mikroskopisi ve CLSM ile birlikte gerçekleştirilebilir. Bununla birlikte, biyofilm analizinde CLSM tercih edilir, çünkü hücrelerin üç boyutlu noninvaziv bir görselleştirilmesine ve olgun biyofilmlerin yapılarını bozmadan hesaplamalı olarak yeniden oluşturulmasına izin verir (Mattila-Sandholm ve ark., 1992).

4.9. Morfolojik Görüntüleme Yöntemlerinde Floresan Maddeler

Floresan boyalar ışık mikroskobu ya da CLSM gibi görüntüleme yöntemlerinde tercih edilir. Canlı hücre hedefleme florofor içeren boyalar tercihen aşağıdaki göstergelerin birinden veya bunların bir kombinasyonundan seçilebilir: DAPI, EBFP, Hoechst 33258 boya, 7-hidroksi-4-metilkumarin, Kinin Sülfat, 4-metilumbelliferon, 5-FAM, Kalsein, DiO, Floresan, FLUO-3, FLUO-4, EGFP, GFP, Oregon Yeşil 514, Rhodamine Green, SYBR Gold, SYBR Green, SYTO 9, SYTOX Green, YFP, LIVE / DEAD BacLight, Alexa Fluor 555, Cy3, Ethidium Bromür, Ethidium Homodimer-1, Propidyum İyodür, Resorufin, RFP, Rhod-2, Rhodamine Red, SYTOX Orange, TAMRA, Texas Red, TRITC, Allophycocyanin, Cy5, DRAQ5, SYTOX Red, Indocyanine green, sodyum fluorescein, karbxyfluorescein, metilen mavisi veya ProSense 750 (Share, 2013).

Floresan boyaların CLSM ile kombinasyon halinde kullanımı biyofilm analizi için rutin bir uygulama haline gelmiştir. LIVE/DEAD bakteriyel canlılık kiti (Molecular Probes, Eugene, OR), iki bileşenli boyaları (SYTO 9 ve propidyum iyodür) üreticinin talimatlarına göre biyofilm bakterilerinin boyanması için 1: 1 karışımda kullanılır. Ölü hücreler kırmızı ışık yayarken canlı hücreler yeşil ışık yayarlar (George ve ark., 2008a).

Hoechst boyası ve propidyum iyodür floresan maddelerin kullanılmasıyla yapılan başka bir boyama şekli de hücre kültürü çalışmalarında, canlı hücre ile ölü hücrenin ayırımına olanak tanıyan bir yöntemdir. Bu floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla da nükleusu görünür hale

gelebilir.

Canlı ve ölü hücre ayırımı yapabilmek için, Hoechst boyası gibi canlı veya ölü tüm hücreleri boyayabilen propidyum iyodür gibi sadece ölü hücreleri boyayabilen bir başka boya beraber kullanılır. Bu boyama yöntemindeki prensip, canlılığın belirleyicisi, hücre zarının intakt olup olmadığıdır. Zarı intakt olan yani canlı hücreler propidiyum iyodür gibi sadece membran bütünlüğü bozulmuş (ölü) hücreleri boyayan bir boya ile boyanmazlarken, Hoechst boyası gibi ölü veya canlı tüm hücrelere girebilen boyalar ise ortamdaki tüm hücreleri boyayarak ölü veya canlı hücre ayırımına olanak sağlarlar. Bu şekilde boyanan hücreler bir floresan mikroskopu ile tanınabilirler. Bu yöntemle hücrelerin ölü ya da canlı olduğu anlaşılabilir ama ölü hücrelerin apoptozisle veya nekrozisle ölüp ölmediklerinin ayırımı nükleus morfolojisine bakılarak yapılır.

Hücrelerin apoptozisle veya nekrozla ölüp ölmediğinin ayırımı aşağıdaki kriterlere göre yapılır:

- Nekrozla ölen hücreler: Ölü oldukları belirlenen yani hem propidyum iyodür hem de Hoechst boyası ile boyanan hücrelerin nükleuslarında apoptotik değişiklikler görülmez. Nükleus paterninde büyük değişiklik yoktur. Nükleusun başlangıçta daha küçük olduğu gözlenebilir ama ileri evrelerde normale göre biraz daha büyümüş görülebilir. Boya yoğunluğu başlangıçta daha fazla olabilir ancak ileri evrelerde yoğunluk apoptotik hücrelere göre daha az bulunabilir.
- Apoptozisle ölen hücreler: Apoptotik hücrelerde hücre zarı eğer sekonder nekrozis gelişmemişse intakt olduğundan propidiyum iyodür ile boyanmaz ama Hoechst boyası ile boyanır. Yani propidyum iyodür negatif ve Hoechst boyası pozitif boyanırlar. Fakat apoptozise özgü nükleus morfolojisi bu hücrelerde tanı koydurucudur. Nükleus fragmentasyonu en önemli bulgudur.
- Normal (canlı) hücreler: Propidyum iyodür ile boyanmazken, Hoechst boyası ile

boyanırlar ve nukleus normaldir (Ulukaya ve ark., 2011)



5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Etik Onay

Bu tez çalışması girişimsel olmayan *in-vitro* bir araştırma olup Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna 25.05.2018 tarihli ve 2018-209 protokol numarası ile karar verilmiştir (Ek 1).

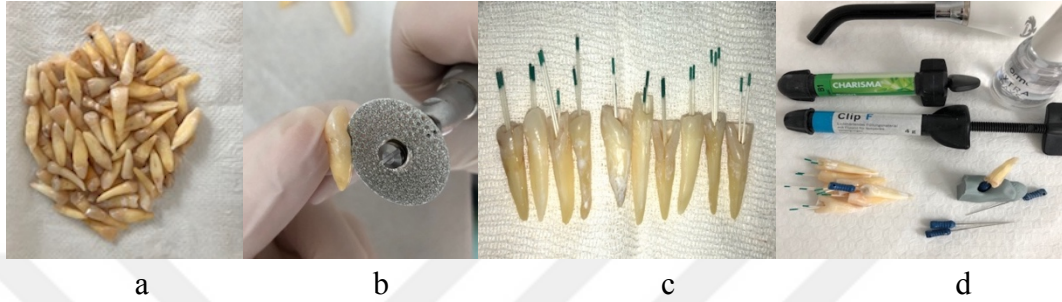
5.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışmada Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Ağız Diş Çene Cerrahisi ve Periodontoloji Anabilim Dalında daha önceden ortodontik/periodontal açıdan çekim endikasyonu ilgili bölümler tarafından konulmuş çürüksüz ve dolgu yapılmamış 54 adet tek köklü daimi insan dişi kullanıldı (Resim 1a).

5.3. Çekilmiş Dişlerin *E. Faecalis* ile Kontamine Edilmek Üzere Hazırlanması

Her diş üzerindeki dokular temizlendikten sonra % 0,1'lik timolde bekletildi. Yeterli örnek sayısına ulaşıldıktan sonra dişlerin hazırlanmasına başlandı. Öncelikle, mikroskopik görüntülemeye kolayca ikiye bölünebilmesi için separe disk yardımıyla bukko-lingual yüzeylerinde rehber oluklar oluşturuldu (Resim 1b). Daha sonra deney öncesi hazırlık için dişlerde endodontik şekillendirme yapıldı. Giriş kavitesi elmas frezle açılan dişlerin kök kanal uzunluğu ISO 10 K tipi eğe (Dentsply Maillefer, New York, USA) ile apikalden 1mm kısa olarak belirlendi. Apikal stop en az ISO 30/0.04 K tipi kanal eğesi (Mtwo Sistem, VDW, Dentsply, New York, USA) genişliğinde döner aletlerle şekillendirildi. Her eğeleme arasında yan-açık uçlu iğne (NaviTip 31G/27 mm, Ultradent, New York, USA) ve 5 ml'lik şırıngalar kullanarak % 5'lik NaOCl ile irrigate edildi. Smear tabakası birikimini önlemek için 10 mL %17'lik EDTA (Denta Flux, Madrid, İspanya) ve ardından 10 ml %0,9 NaCl ile durulandı ve kurutuldu (Resim 1c).

Apikal açıklık kompozit dolgu maddesi (Charisma Smart, Heraus Kulzer, Almanya) kullanılarak ve giriş kavitesi geçici dolgu (Clip F, Voco, Almanya) maddesi ile kapatıldı. Dişlerin dış yüzeyi en az iki kat tırnak cılası (Flormar, Türkiye) ile kaplandı (**Resim 1d**).



Resim 1. Dişlerin deney öncesi hazırlık işlemleri; a. toplanan dişlerin temizlenmesi, b. yan olukların açılması, c. kök kanal şekillendirilmesi ardından d. apikal kapama ve tırnak cılası sürülmesi

Dişler, eppendorf tüpleri içine konularak otoklavda 15 dakika 121 C°'de steril edildi. Otoklavdan çıkarılan ve ağzı kapalı olan eppendorf tüpleri soğuması için oda sıcaklığında bir süre bekletildi ve sonrasında buz dolabında +4 C°'de deneyin yapılacağı güne kadar muhafaza edildi (**Resim 2**).



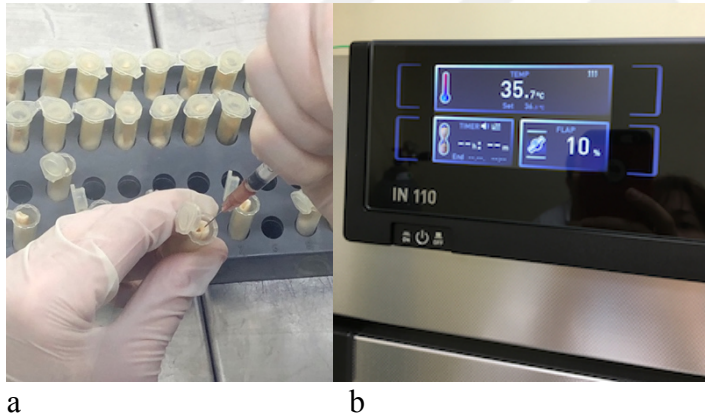
Resim 2. Dişlerin otoklavda sterilizasyonu

5.4. *Enterococcus faecalis*' in Çoğaltılması ve Dişlere İnokülasyonu

Araştırmamızın bu bölümü Yeditepe Üniversitesi Kozmetik ve Biyosidal AR-

GE laboratuvarı biriminde gerçekleştirildi. Biofilm oluşturmak için *E. faecalis* ATCC 29212 bakteri suşu kullanıldı. *E. faecalis* beyin kalp infüzyon agarda (Brain Heart Infusion Agar; BHI) 37°C’de 24 saat inkübe edildi ve sonra 50 mL triptik soya broth besiyeri yerine (Tryptic Soy Broth; TSB) ekildi.

İnkübasyon süresinin sonunda kanal içine ekim yapabilmek için sıvı kültür yoğunluğu izotonik serum ile karşılaştırıldı. Yoğunluk **McFarland** dansitometre ile **1.0-0.5 McFarland standardı** kullanıldı ve koloni oluşturan birimler (CFU) mL’de 1.5×10^8 olarak belirlendi. Enfekte süspansiyon, steril insülin enjektörleri ile kanalı tamamen dolduracak kadar dişlerin içine enjekte edildi (**Resim 3a**). Dişler, kök kanal duvarında ve dentin tübüllerinin içine bakterilerin kolonizasyonunu sağlamak için 28 gün boyunca 37°C’de %100 nemli ortamda %5’lik CO₂ içeren aerobik koşullarda saklandı (**Resim 3b**). Süspansiyon her 3 günde bir tazelenildi.



Resim 3. Kök kanallarına **a.** *E. faecalis* ekimi ve **b.** örneklerin bekletildiği inkübasyon fırını

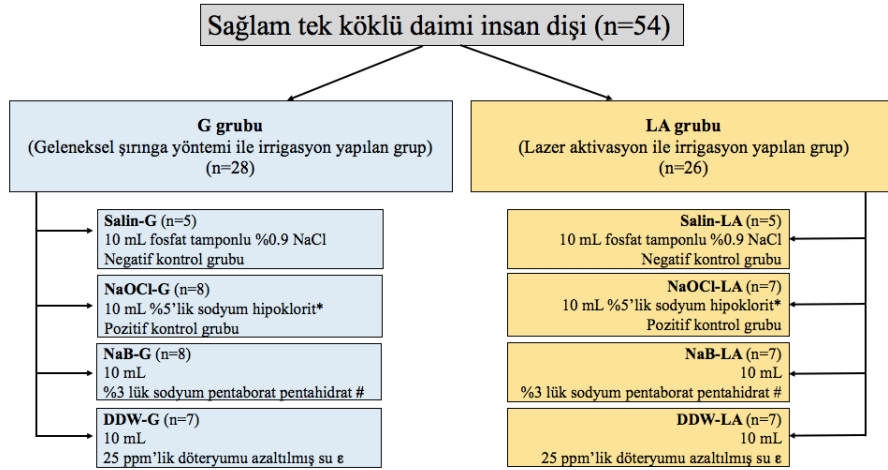
5.5. Kullanılan İrrigasyon Solüsyonları

Bu çalışmada kullanılan solüsyonlar;

- %5’lik sodyum hipoklorit (Endosolve-HP, Imicryl, Türkiye)
- %3’lük sodyum pentaborat pentahidrat (Yeditepe Üniversitesi Biyosidal AR-GE, İstanbul, Türkiye)
- 25 ppm’lik döteryumu azaltılmış su (Qlarivia, Mecro Sistem, Romanya)
- Fosfat ile tamponlanmış steril salin (%0.9 NaCl) (Yeditepe Üniversitesi Biyosidal AR-GE,

5.6. Deney Grupları

İrrigasyon metodlarının etkinliğini ve irrigasyon solüsyonlarının antibakteriyel özelliğini değerlendirmek için öncelikle Geleneksel şırınga (G) yöntemi ile irrigasyon yapılacak grup ve Lazer aktivasyonu (LA) ile irrigasyon yapılacak grup olmak üzere iki ana deney grubu oluşturuldu. Bu her iki grupta kendi içinde kullanılacak irrigasyon çözeltilerine göre PBS, NaOCl, NaB ve DDW olmak üzere dört alt deney grubuna ayrıldı (Şekil 1).



Şekil 1. Deney grupları, uygulanan irrigasyon metodları ve irrigasyon solüsyonları

*Endosolve-HP, Imicryl, Türkiye) %5'lik sodyum hipoklorit, #Yeditepe Üniversitesi Biyosidal AR-GE, Türkiye; ε Qlarivia, Mecro Sistem, Romanya

5.7. İrrigasyon Öncesi Dişlerin Kontamine Olduğunun Gösterilmesi

Yirmi sekiz gün sonunda mikrobiyolojik değerlendirme için mikrodilüsyon testi ile kontaminasyon tespiti yapıldı. Kök kanalı duvarına yapışmayan bakterilerin eliminasyonu için enjektör ile fazla sıvı aspire edildi. Kanalda bekletilen 3 adet ISO 25 steril kağıt konlarla (Protaper Wave One, Dentsply, New York, USA) her örnekten numuneler toplandı (Pinheiro ve ark., 2018) (Resim 4). Numuneler 10 sn vortekslenip, 10 kez seyreltildi. Süspansiyondan 0,1 mL'lik kısım alınarak TSB'de 37 °C'de 24 saat

inkübe edildi. 24 saat sonunda bakteri oluşturan koloni sayımı yapıldı ve mL'de CFU değeri kaydedildi.



Resim 4. Dezenfeksiyon öncesi enfekte dişlerden steril kağıt konularla örnek alınması

5.8. Dezenfeksiyon Aşaması

Enterococcus faecalis suşu ile enfekte diş örneklerinin irrigasyon aşamasında, G grupları için 10 mL'lik şırınga ve endodontik iğne ucu (NaviTip 31G/27 mm, Ultradent, New York, USA) kullanıldı.

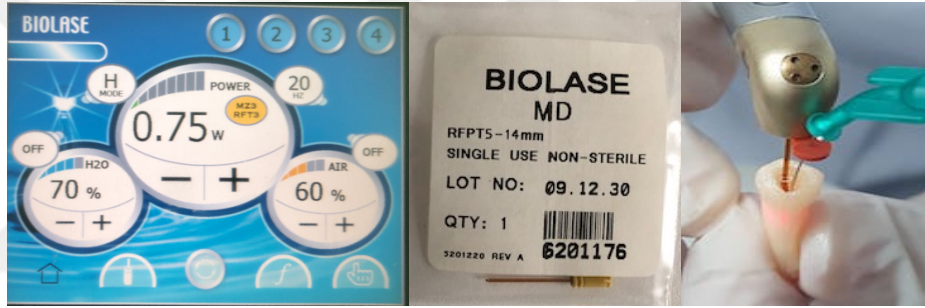
- Geleneksel Şırınga Metodu (**G**): İrrigasyonda 10 mL'lik şırınga endodontik iğne ucu kanalda pasif olarak ve apikale 2 mm uzakta kalacak şekilde yerleştirildi. Her diş örneği için 10 mL deney solüsyonu kullanıldı ve sıvının fazlası aspire edildi. Deney solüsyonu artığı kalmaması için son olarak 10 mL steril serum fizyolojik ile durulandı ve fazla sıvı enjektörle aspire edildi (**Resim 5**).



Resim 5. G metodu için kullanılan solüsyonun endodontik iğne ile kanal içine uygulaması

Bu aşamada, LA grupları için Marmara Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Pedodonti Anabilim Dalı'nda bulunan 2780 nm dalga boyuna sahip Er,Cr:YSGG dental lazer cihazı (Waterlase MD, Biolase, USA), Biolase Gold başlık ve RFT5 (Radial firing tip 5; 500µm çap ve 14 mm uzunluk) optik uç kullanıldı.

- Lazer Aktivasyon Metodu (**LA**): RFT5 optik uç kanal girişinde 2mm aşağı/yukarı hareket edebilecek şekilde yerleştirildi. Solüsyonlar, 0.75W, 20 Hz, pulse atım süresi 140µs ve pik gücü 268 W (yoğunluk; 18,75 W/m²) oluşturacak lazer radyasyonu ile aktive edildi. Her diş örneği için 10 mL deney solüsyonu ile yıkama ve lazer atımı (10sn x6) eş zamanlı olarak yapıldı. İşlem bitince sıvının fazlası ve deney solüsyonu artığı kalmaması için son olarak 10 mL steril serum fizyolojik ile durulandı ve fazla sıvı enjektörle aspire edildi (**Resim 6**).



Resim 6. LA metodunda RFT5 fiber ucun kanal içine solüsyon ile birlikte uygulaması

5.9. Mikrobiyolojik Değerlendirme

İrrigasyon sonrası antibakteriyel etkinliğin değerlendirmesinde ilk olarak mikrodilüsyon testi yapıldı. İkinci olarak mikroskopik görüntüleme ile canlı/ölü bakteri analizi yapıldı.

5.9.1. Mikrodilüsyon testi

Araştırmamızın bu bölümü Yeditepe Üniversitesi Kozmetik ve Biyosidal AR-GE laboratuvarına ait mikrobiyoloji alanında gerçekleştirildi.

Her diş kök kanalı irrigasyondan sonra steril kağıt konlar ile kurutuldu. Ardından steril ISO 25 Henstrom tipi eğe ile kazıyarak kanal duvarından dentin talaşı örnekleri toplandı. Örnekler TSB içeren eppendorf tüplere yerleştirildi. Numuneler 10 sn vortekslenip, 10 kez seyreltilerek 0,1 mL’lik süspansiyonlar triptik soy agara inoküle edildi. 37 C’de 24 saat inkübasyondan sonra plaka sayımı yapıldı. Tespit edilen CFU/mL değerleri solüsyon temas sonrası veri olarak kaydedildi (**Resim 7**).



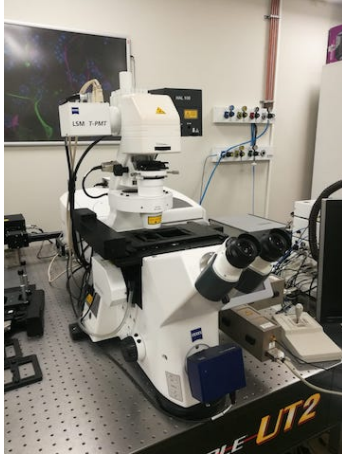
Resim 7. Dezenfeksiyon sonrası kök kanal duvarından H tipi eğe ile dentin talaşı kazıma ve örnek alma

Sağ Kalım Oranı (%): CFU/mL olarak bulunan veriler kullanılarak bakterilerin sağ kalım oranları aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı (Susila ve ark., 2016).

$$\text{Canlı bakteri yüzdesi (\%)} = (\text{CFU/mL}_{\text{Temas sonrası}} \times 100) / \text{CFU/mL}_{\text{Temas ncesi}}$$

5.9.2. Mikroskopik Görüntüleme ve Analiz

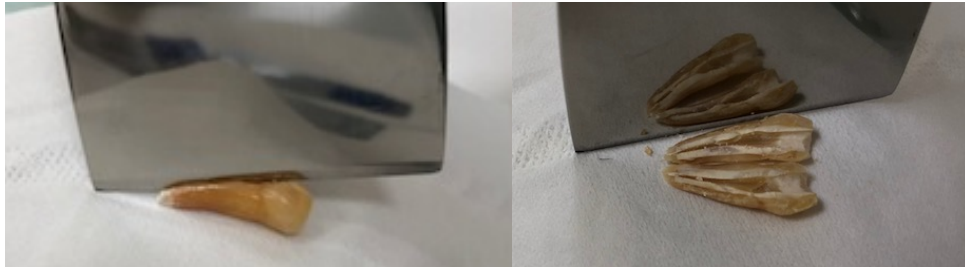
Araştırmamızın bu bölümü Medipol Üniversitesi REMER AR-GE laboratuvarında (Regenerative and Restorative Medicine Research; REMER) gerçekleşti. Görüntülemede Carl Zeiss (LSM 800; Oberkochen, Almanya) marka CLSM kullanıldı (**Resim 8**).



Resim 8. Carl Zeiss konfokal lazer taramalı mikroskop (LSM 800; Oberkochen, Almanya)

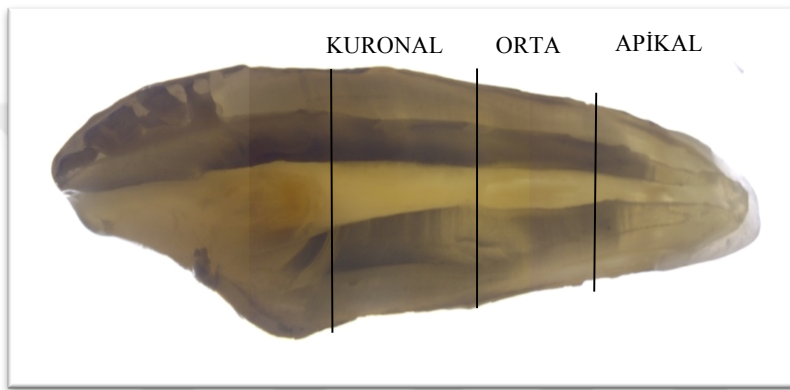
Canlı bakterileri etiketlemek için Hoechst 33342 (λ_{ex} 340 nm; λ_{em} 510 nm) (ThermoFisher Scientific, H3570) kullanılarak ölü bakterilerin etiketlenmesi için propidiyum iyodür (ThermoFisher Scientific, P3566) (λ_{ex} 530 nm; λ_{em} 620 nm) florosan boyaları kullanıldı.

Geleneksel şırınga irrigasyon metodu yapılan dişlerden Salin-G grubundan 2, NaOCl-G grubundan 3, NaB-G grubundan 3 ve DDW-G grubundan 3 diş rastgele seçildi. Lazer ile aktivasyon yöntemi dişlerinden Salin-LA grubunda 2, NaOCl-LA grubundan 3, NaB-LA grubundan 3 ve DDW-LA grubundan 3 diş rastgele seçildi. Taş zemin üzerine yerleştirilen dişler steril bir taş havan eli ve steril bir bıçak kullanılarak medial ve distal iki parçaya ayrıldı. Yarımlardan biri görüntüleme için seçildi (**Resim 9**).



Resim 9. Dişlerin keski yardımıyla ikiye ayrılması

Mikroskopik değerlendirme için uygulanacak bakteri canlı/ölü testi literatürdeki yöntem modifiye edilerek yapıldı (Mah ve ark., 2003). Yarım diş örnekleri Hoechst 33342 (5µM) ve propidium iyodür (20mM) ile 1:1 oranında hazırlanan solüsyonda (total 2 mL) 30 dk oda sıcaklığında bekletildi. İnkübasyon sonrasında numuneler 2 defa distile su ile yıkandı, kesit düzlemi görüntülenecek şekilde petri (ThermoFisher Scientific, 150682) tabanına yerleştirilerek kuronal, orta ve apikal bölgeler CLSM ile tarandı (**Resim 10**).



Resim 10. İkiye ayrılan bir dişin kanal içi görüntüsü ve kuronal, orta ve apikal bölgelerin ayırım şeması

Mikroskopik görüntülemelerde; Hoechst 33342 için 405 nm dalga boyu lazer ile uyarım yapılarak 410-540 nm aralığındaki emisyon sinyali, propidium iodide için ise 546 nm dalga boyu lazer ile uyarım yapılarak 580-700 nm aralığındaki emisyon sinyali görüntülenmiştir. Farklı zamanlarda yapılan görüntülemeler arası değişiklikleri ortadan kaldırmak amacıyla tüm örneklerde aynı görüntüleme parametreleri (lazer gücü, tarayıcı hızı, tarama yönü, tarama sayısı, dijital gain, çözünürlük) kullanıldı. Örneklerdeki kesit ve analiz yüzeylerinin standardizasyonunu sağlamak amacıyla kesit yüzeyine paralel olacak şekilde z düzleminde 1 µm aralıklarla optik kesitler (z-stack) (x, y: 1024x1024 px) alınarak incelemeler yapıldı. Kanal içinden kök yüzeyine doğru x, y: 500x500 µm derinlikte ve kırık yüzeyden itibaren (z düzleminde) 30 µm derinliğe kadar tarama yapıldı.

Tüm örnekler Plan-Apochromat 10x/0.45NA objektif ile görüntülendi. Kesit

yüzeyinin pürüzlülüğüne bağlı olarak numuneler arasında farklılık göstermekle birlikte kök kanalından itibaren kök dış duvarına doğru dentin tübüllerinin uzunlamasına bütünlüğünü sağlayacak sayıda optik kesit alınarak maksimum ışıma yoğunluğu (maximum intensity projection) yöntemiyle birleştirildi ve görüntüler elde edildi.

5.7. İstatistik

Verilerinin analizinde istatistikî yöntem olarak; tanımlayıcı analizler (ortalama, standart sapma, %95 güven aralıkları) kullanıldı. Veriler arası farklılıklar, tek yönlü (ANOVA) ve iki yönlü varyans analizi (M-ANOVA), PostHoc Bonferroni testi ve korelasyon analizinde pearson katsayısı kullanıldı. Kolmogorov–Smirnov analizi ile verilerin normal dağılıma uygunluğu araştırıldı. Gruplar arasındaki istatistiksel farklılık $p<0.05$ olarak alındı. Verilerin analizinde, PSPP 1.2.0 (GNU Public License, Free Software Foundation Inc.) ve Microsoft Excel bilgisayar programları kullanıldı.

6. BULGULAR

6.1 Mikrodilüsyon Bulguları

6.1.1. Geleneksel şırınga irrigasyon metodu uygulanan solüsyonların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi

Tablo 1’de uygulanan irrigasyon çözeltileri ile elde edilen sağ kalım % oranları görülmektedir. NaOCl ile temas sonrasında % sağ kalım sonuçları çok düşük idi. Hemen hemen hiç sağ kalan hücre bulunmamaktaydı. G metodu grup içi farklılıkları istatistiksel olarak anlamlıydı. Sadece, NaOCl-G ile NaB-G arasındaki farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,1$), diğer ikili karşılaştırmalar arası farklılıklar ise istatistiksel olarak anlamlıydı (**Tablo 1**).

Tablo 1. G metodu uygulaması ile kullanılan irrigantların etkisi sonucunda elde edilen *E. faecalis* sağ kalım oranları ve anlamlılık

	Salin-G	NaOCl-G	NaB-G	DDW-G
Ort $\pm$ SS	7,03 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00*	0,85 $\pm$ 0,83*	2,41 $\pm$ 0,93*#♦

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; Ort; Ortalama; SS: Standart sapma; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su. * $p<0.0001$ Salin-G grubuna göre anlamlı olarak farklı; # $p<0.0001$ NaOCl-G grubuna göre anlamlı olarak farklı; ♦ $p<0.001$ NaB-G grubundan anlamlı olarak farklı. (Çoklu karşılaştırma ANOVA; İkili Karşılaştırma – PostHoc: Bonferroni)

6.1.2. Lazer aktivasyon metodu uygulanan solüsyonların antimikrobiyal etkinliğinin değerlendirilmesi

Tablo 2’de LA grubunda, uygulanan irrigasyon çözeltileri ile elde edilen sağ kalım % oranları görülmektedir. LA metodu grup içi arasındaki farklılıkları istatistiksel olarak anlamlıydı. İkili karşılaştırmalarda sadece NaOCl-LA ile DDW-LA arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Diğer ikili karşılaştırmalar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p>0,05$) (**Tablo 2**).

Tablo 2. LA metodu uygulaması ile kullanılan irrigantların etkisi sonucunda elde edilen *E. faecalis* sağ kalım oranları ve anlamlılık

	Saline-LA	NaOCl-LA	NaB-LA	DDW-LA
Ort $\pm$ SS	5,05 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 0,68	7,40 $\pm$ 8,53•

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. LA: Lazer aktivasyon metodu; Ort; Ortalama; SS: Standart sapma; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su, • $p < 0.05$ NaOCl-LA grubuna göre anlamlı olarak farklı; (Çoklu karşılaştırma ANOVA; İkili Karşılaştırma – PostHoc: Bonferroni)

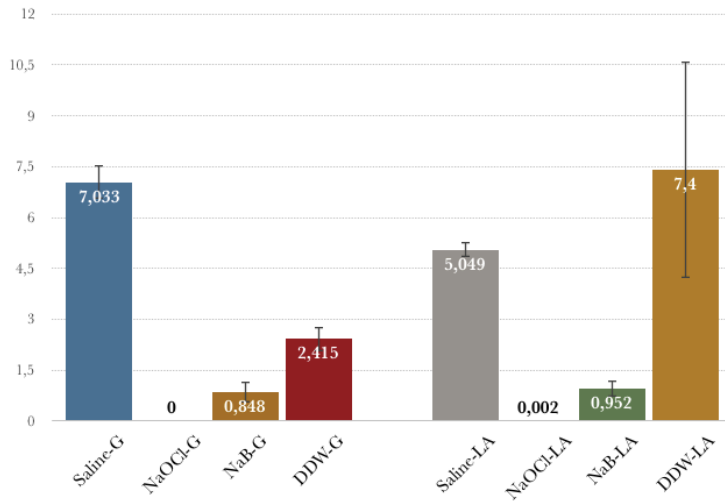
6.1.3. Geleneksel ve lazer aktivasyon metodlarının ve uygulanan irrigasyon solüsyonların karşılaştırılması ve antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesi

G ve LA metodlarında uygulanan solüsyonların temasından sonra sağ kalım oranı (%) verilerinin ortalama ve standart sapma değerleri Tablo 3’de ve Şekil 2de görülmektedir. Metodlar arasındaki farklılık her solüsyonun antimikrobiyal etkinliği açısından değerlendirildi. G ve LA metodları arasında farklılık istatistiksel olarak anlamlı değildi ($p > 0,05$).

Tablo 3. *E. faecalis* sağ kalım oranlarının metodlara göre karşılaştırılması ve anlamlılık

	Saline	NaOCl	NaB	DDW
G	7,03 $\pm$ 1,10	0,00 $\pm$ 0,00	0,85 $\pm$ 0,83	2,41 $\pm$ 0,93
LA	5,05 $\pm$ 0,50	0,00 $\pm$ 0,00	0,96 $\pm$ 0,68	7,40 $\pm$ 8,53
<i>P</i> _{PostHoc Bonferroni}	>0.5	>0.5	>0.5	>0.5

Değerler ortalama $\pm$ standart sapma olarak verilmiştir. G: Geleneksel irrigasyon (5 dk); LA: lazer aktivasyon (1 dk); NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.



Şekil 2. Tüm grupların *E. faecalis* sağ kalım oranı dağılımının grafiksel gösterimi

Tüm alt gruplar arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p_{\text{Anova}} < 0,001$). Arasındaki fark istatistiksel açıdan anlamlı olan ikili karşılaştırmalar, Salin-G ile NaOCl-G, Salin-G ile NaB-G, Salin-G ile NaOCl-LA, NaOCl ile DDW-LA, NaB ile DDW-LA, NaOCl-LA ile DDW-LA, NaB-LA ile DDW-LA'dır ($p < 0,05$) (**Tablo 4**).

Tablo 4. Tüm gruplar arasında *E. faecalis* sağ kalım oranlarının istatistiksel anlamlılığı

	Salin-G	NaOCl-G	NaB-G	DDW-G	Salin-LA	NaOCl-LA	NaB-LA	DDW-LA
Salin-G		,008	,034	,440	1,000	,011	,053	1,000
NaOCl-G			1,000	1,000	,200	1,000	1,000	,001
NaB-G				1,000	,658	1,000	1,000	,006
DDW-G					1,000	1,000	1,000	,134
Salin-LA						,244	,880	1,000
NaOCl-LA							1,000	,002
NaB-LA								,011
DDW-LA								

G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; LA: Lazer aktivasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su. (Çoklu karşılaştırma ANOVA ile yapıldı; İkili Karşılaştırma – PostHoc: Bonferroni)

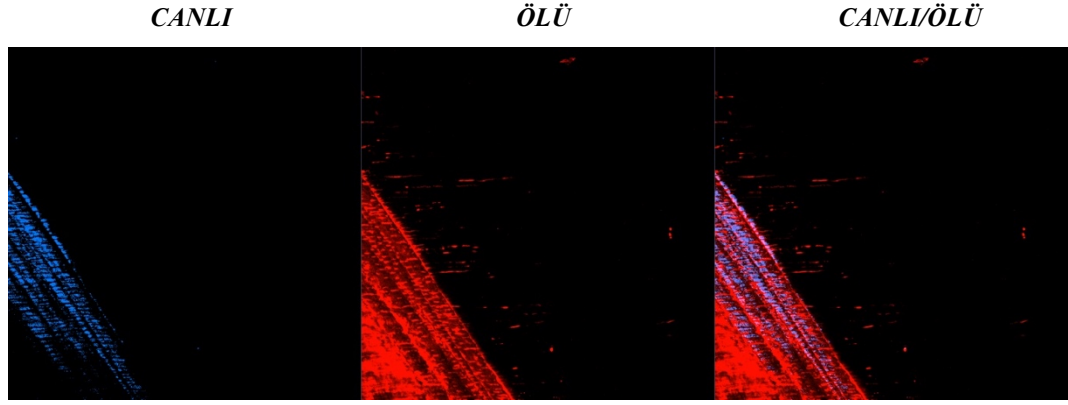
6.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop Görüntüleri ve Analiz Bulguları

Görüntülerde Hoechst 33342 (canlı) ve propidium iodide (ölü) ile boyanan bölgelerin toplam alanları Image J yazılımı (Fiji v.1.44o; WR, USA) (Schindelin ve ark., 2012) kullanılarak ayrı ayrı hesaplandı. Tarama sonucu belirlenen canlı bakteri yoğunluğu çok düşük olduğu için analize katılmadı, ancak görüntülerde canlı boyanan bölgeler de gösterildi.

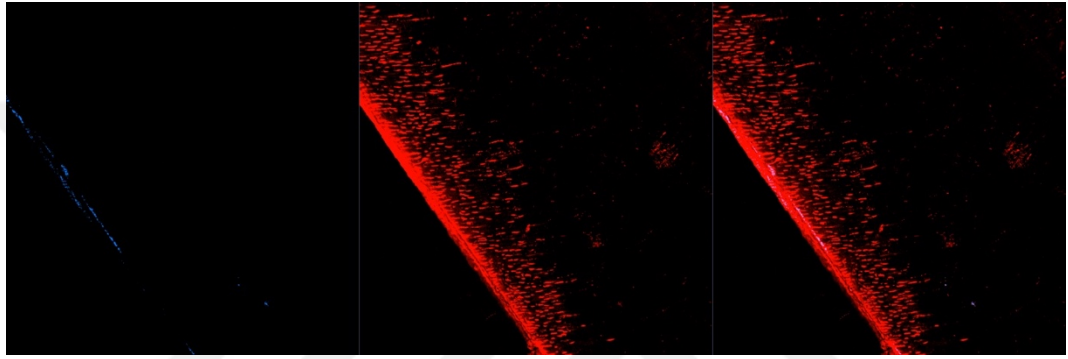
Ölü bakteri miktarı, kırmızı alanların taranan toplam dış alanına oranlanması ile yüzde (%) olarak belirlendi. Oto-floresan ışıma yapan alanlar ve kanal duvarının H tipi eğe ile kazınmasından zarar görmüş olabileceği için bu bölgelerin boyalı kısımları analiz sırasında göz ardı edildi. Tez içerisinde gösterilen resimler iki boyutludur, ancak, analizler üç boyulu (x, y ve z düzleminde) hesaplamalarla yapılmıştır.

6.2.1. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop ile Taranan Örneklerin Görüntüleri

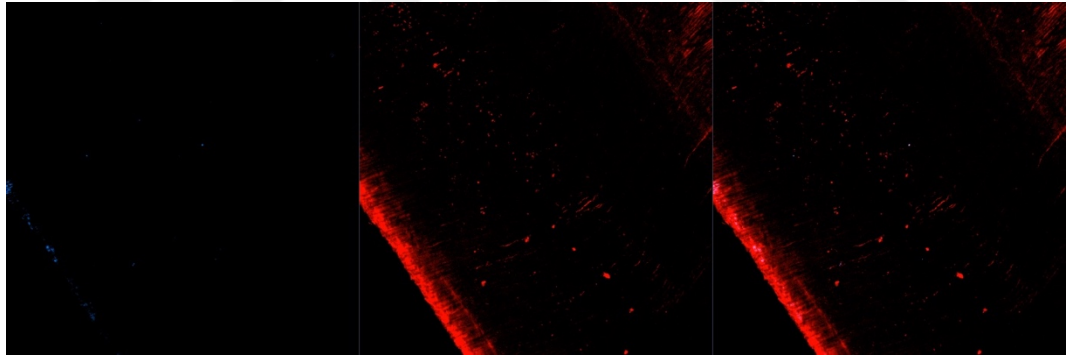
Salin-G (**Resim 11**), NaOCl-G (**Resim 12**), NaB-G (**Resim 13**), DDW-G (**Resim 14**), Salin-LA (**Resim 15**), NaOCl-LA (**Resim 16**), NaB-LA (**Resim 17**) ve DDW-LA (**Resim 18**) gruplarından birer örnek görüntü sırasıyla verilmiştir.



a.Kuronal

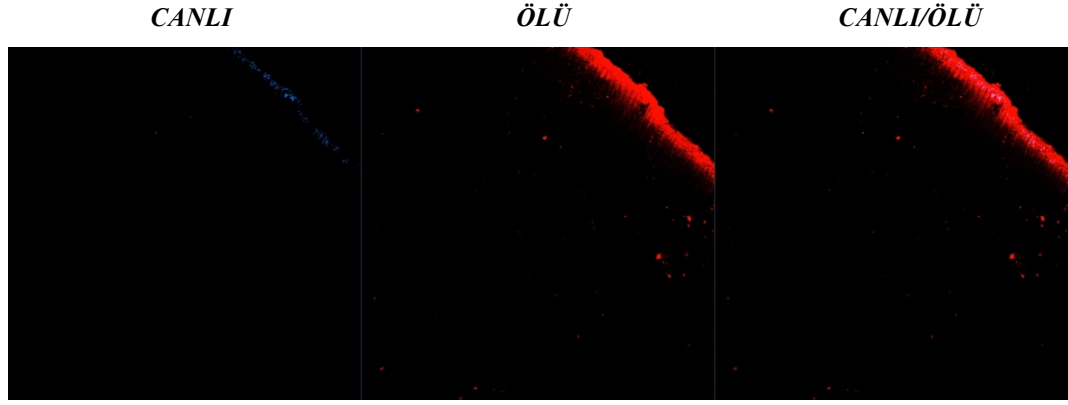


b.Orta

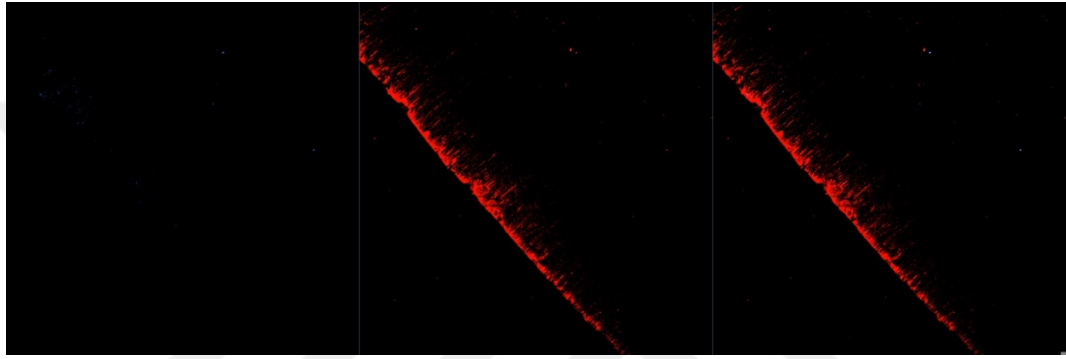


c.Apikal

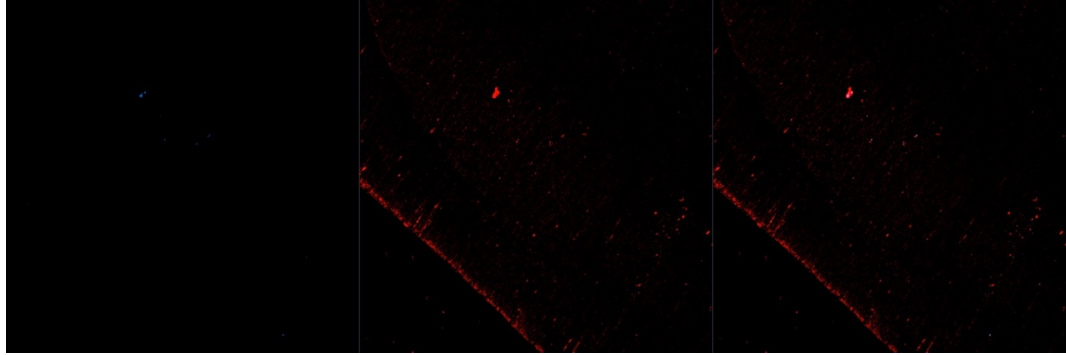
Resim 11. Tüm gruplar arasında en çok bakteri yoğunluğu olan Salin-G grubu örneklerinde; (a) kuronalde %9, (b) orta bölge ve (c) apikalde %8 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi



a.Kuronal

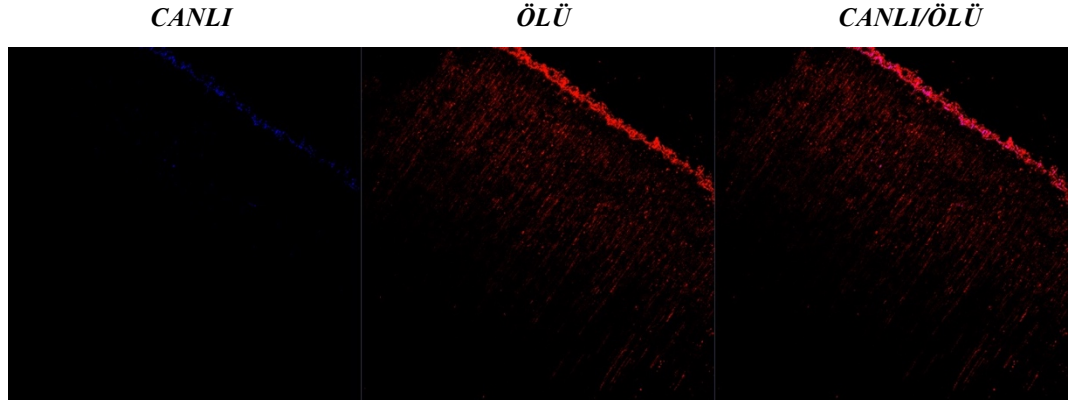


b.Orta

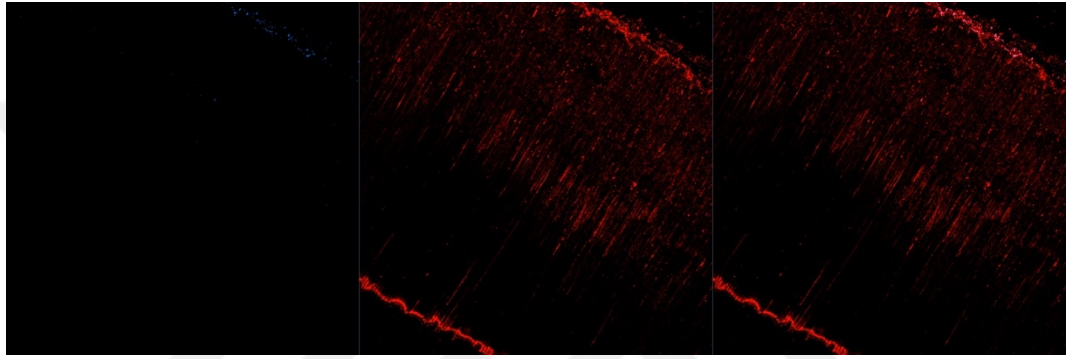


c.Apikal

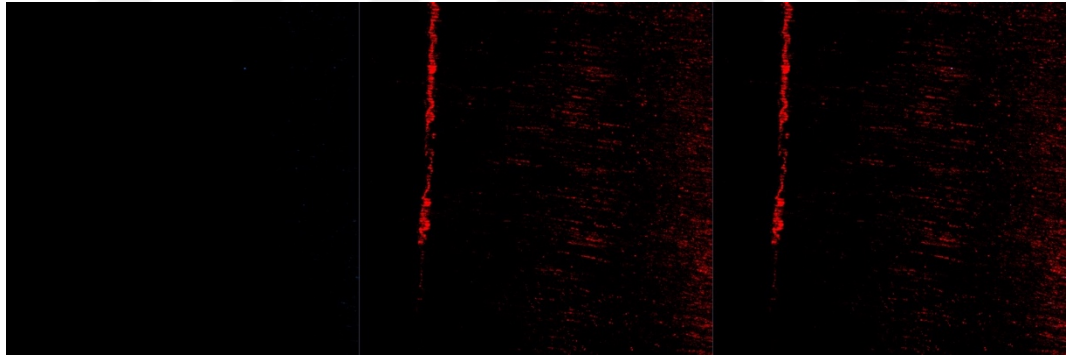
Resim 12. G metodu içinde en az ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu bulunan NaOCl-G örneklerinde; (a) kuronalde % 2, (b) orta bölgede % 3 ve (c) apikalde % 2 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi



a.Kuronal

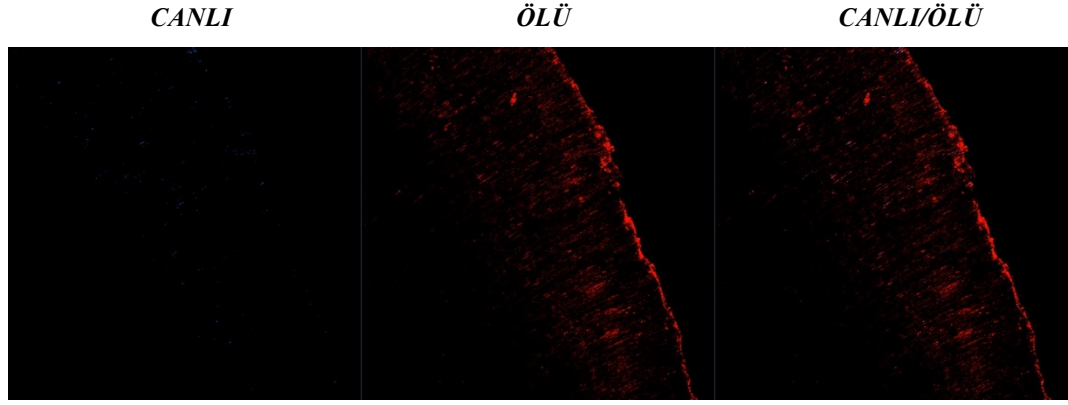


b.Orta

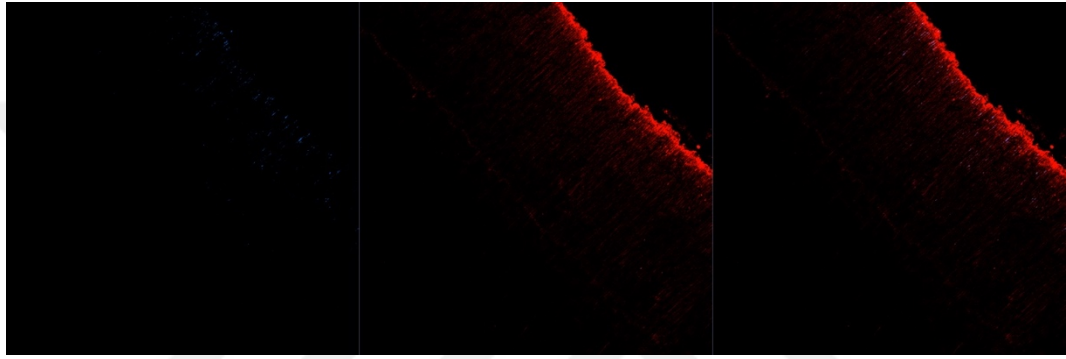


c.Apikal

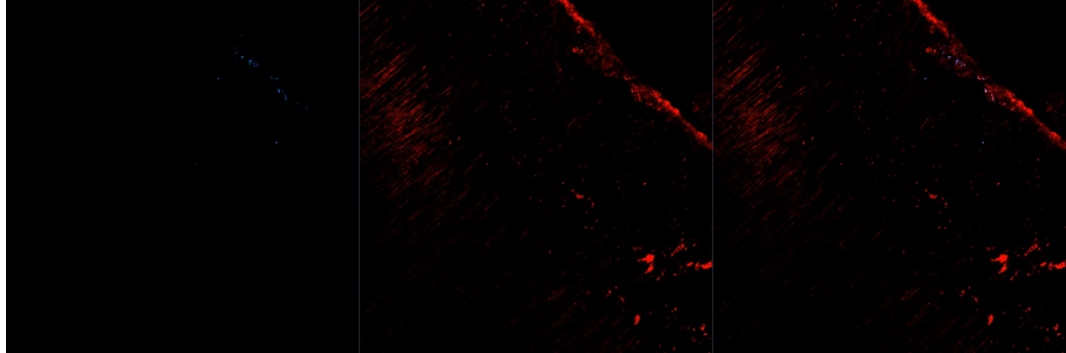
Resim 13. NaB-G örneklerinde; (a) kuronalde % 4, (b) orta bölgede %4,5 ve (c) apikalde %3 oranlarında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi



a.Kuronal

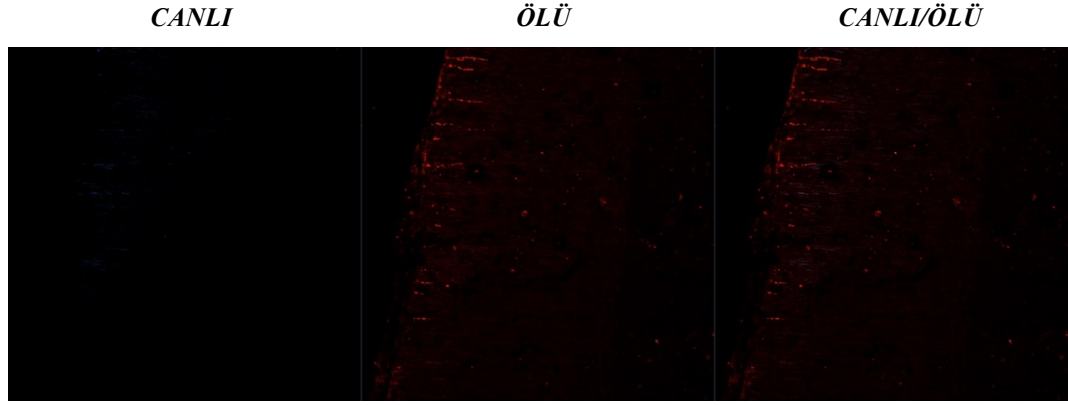


b.Orta

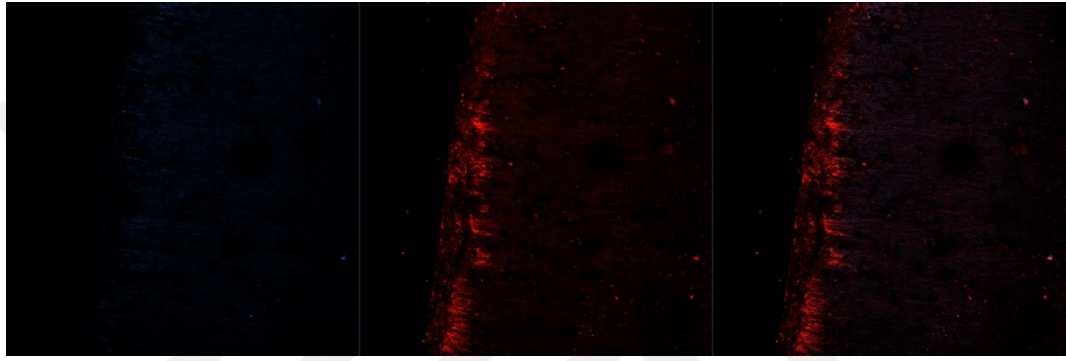


c.Apikal

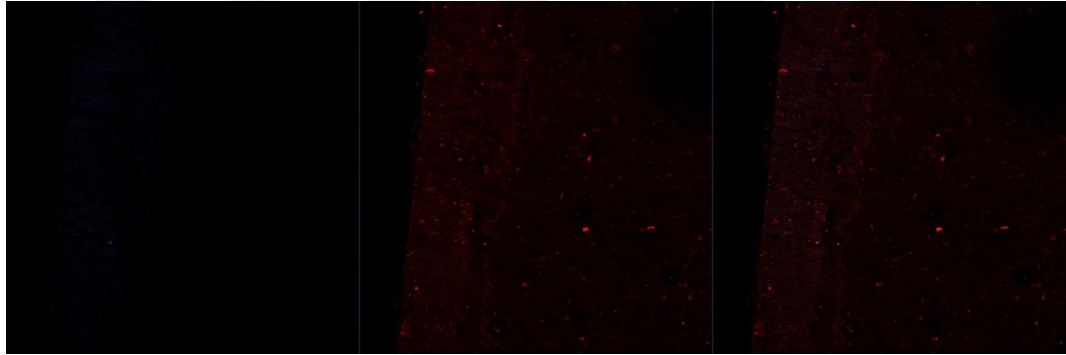
Resim 14. DDW-G grubu örneklerinde; (a) kuronalde ve (b) orta bölgede %5 ve (c) apikalde %4 oranında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi. Bu oranlar NaB-G grubu ile benzerlik gösterdi



a.Kuronal

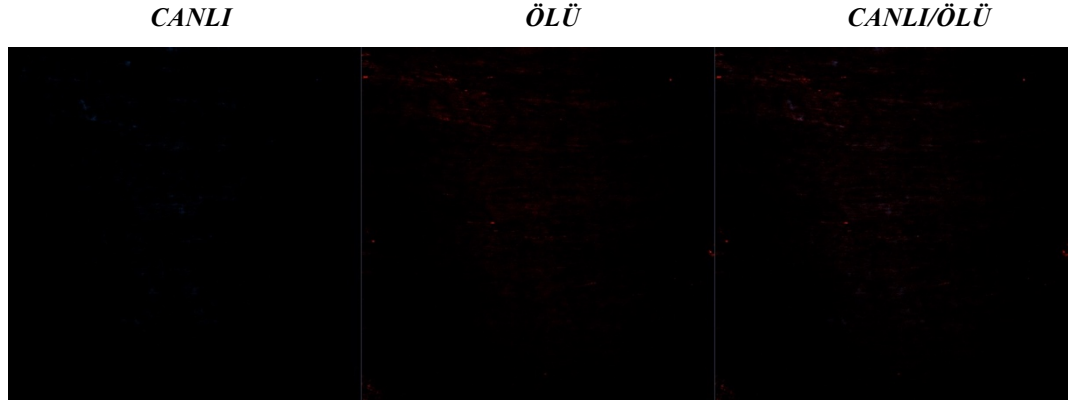


b.Orta

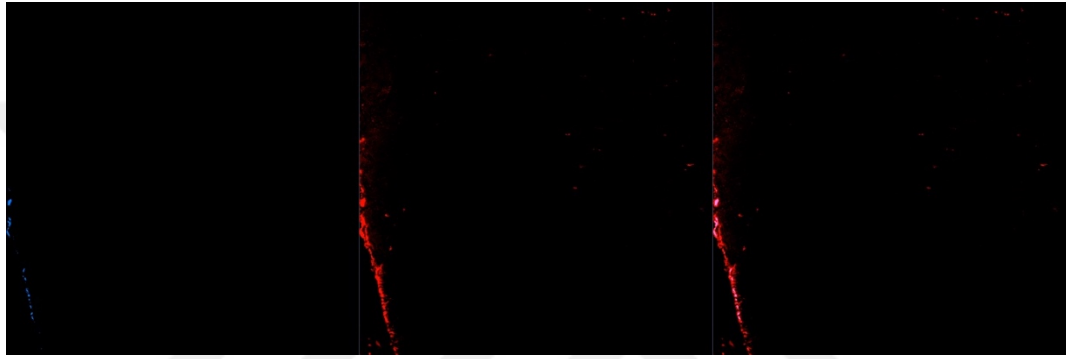


c.Apikal

Resim 15. Salin-LA örneklerinde; (a) kuronalde %1, (b) orta bölgede %2 ve (c) apikalde %1 oranlarında ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi



a.Kuronal

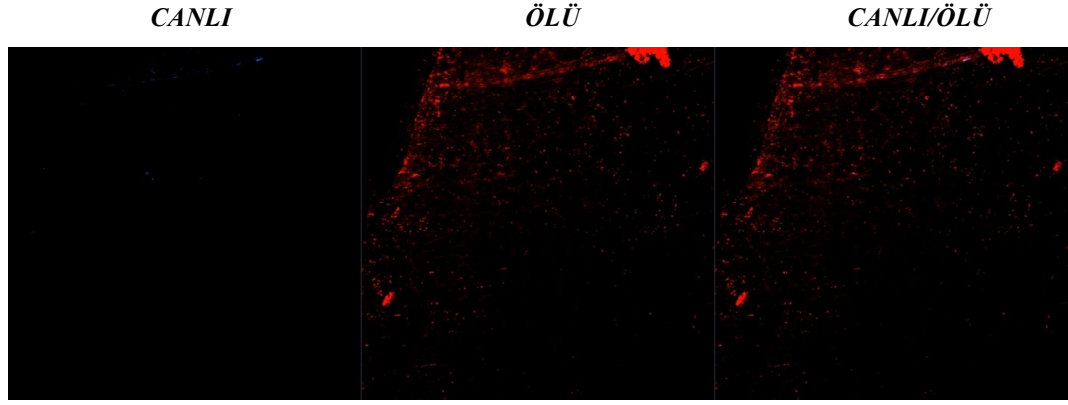


b.Orta

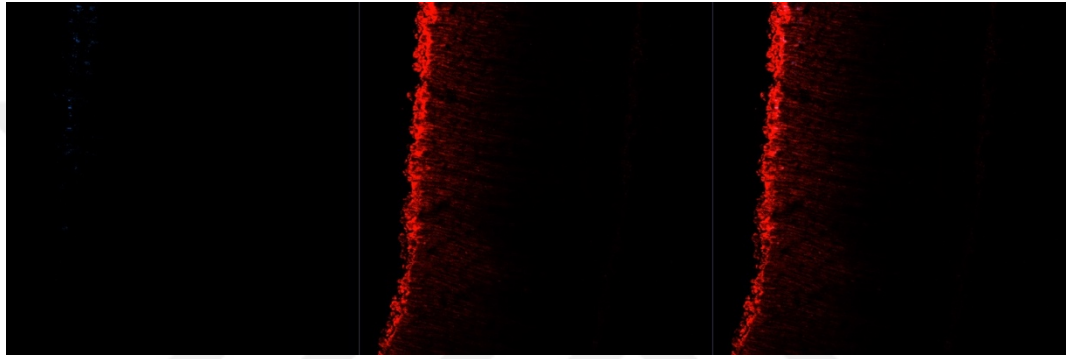


c.Apikal

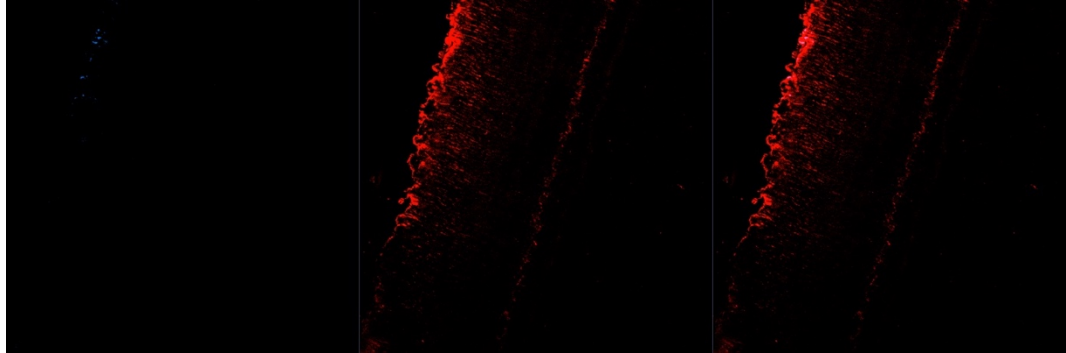
Resim 16. Tüm gruplar arasında en az bakteri yoğunluğu olan NaOCl-LA örneklerinde; (a) kuronalde %1, (b) orta bölge ve (c) apikalde %0,6 ölü bakteri (kırmızı) oranı tespit edildi



a.Kuronal

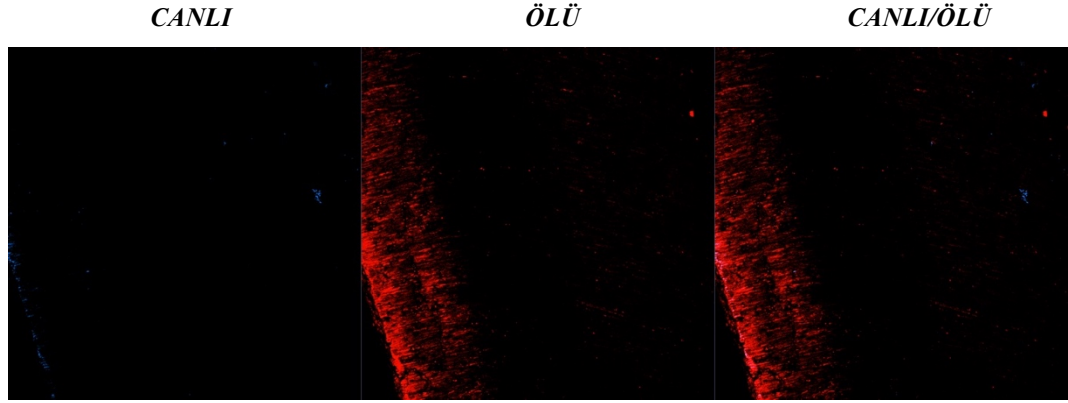


b.Orta

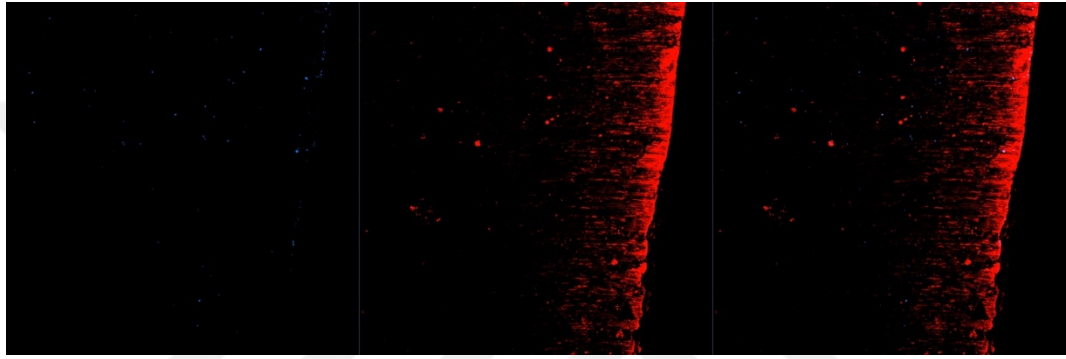


c.Apikal

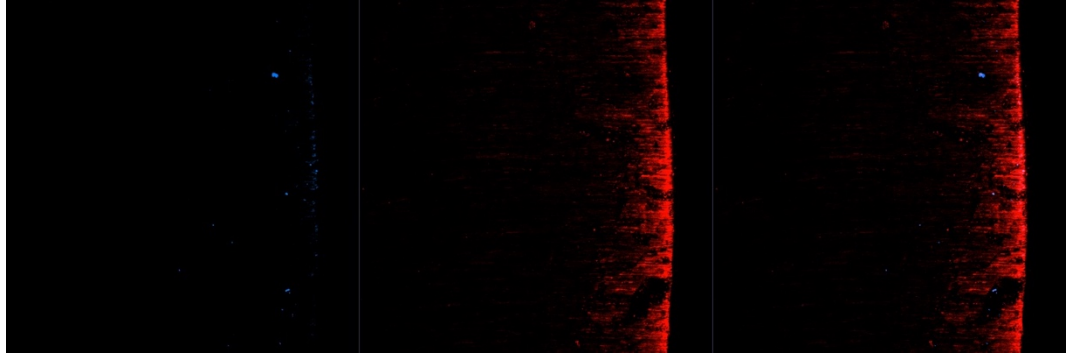
Resim 17. NaB-LA örneklerinde; (a) kuronalde %3, (b) orta bölge ve (c) apikalde %2 ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi.



a.Kuronal



b.Orta



c.Apikal

Resim 18. DDW-LA grubu örneklerinde; (a) Kuronalde %3, (b) orta bölge ve (c). apikalde %2 ölü bakteri (kırmızı) yoğunluğu tespit edildi. Bu oranlar NaB-LA grubu ile benzerlik gösterdi

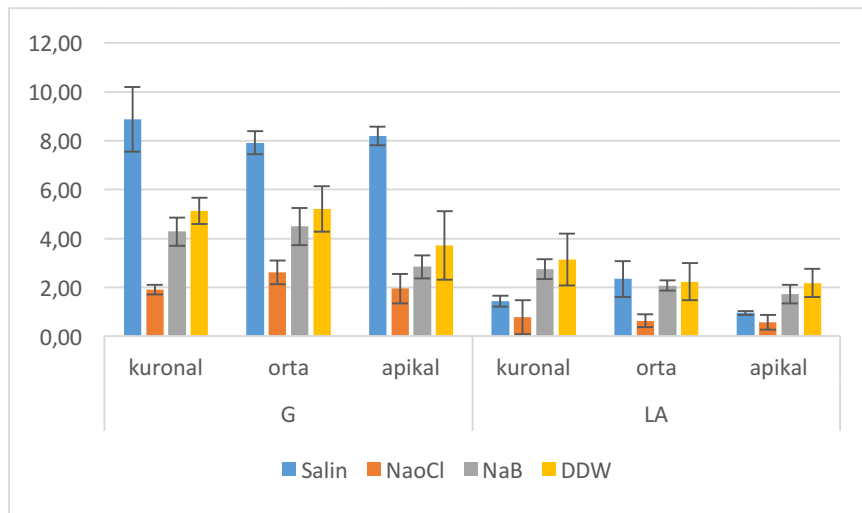
6.2.2. Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop Analiz Bulguları

Araştırmadaki tüm gruplar için sırasıyla kural, orta ve apikal bölgelerde saptanan *E. faecalis* ölü bakteri oranları (%) Tablo 5’de verilmekte ve Şekil 3’te grafiksel olarak gösterilmektedir.

Tablo 5. İrrigasyon sonrası dentin tübüllerinde saptanan bölgesel ölü bakteri oranları

Metod		Salin	NaOCl	NaB	DDW
G	Kural	8,87±1,33	1,91±0,19	4,30±0,60	5,14±0,54
	Orta	7,91±0,47	2,62±0,48	4,50±0,75	5,21±0,92
	Apikal	8,19±0,38	1,95±0,60	2,84±0,48	3,72±1,39
LA	Kural	1,44±0,23	0,78±0,69	2,75±0,40	3,15±1,06
	Orta	2,35±0,73	0,63±0,26	2,08±0,21	2,22±0,76
	Apikal	0,96±0,08	0,57±0,30	1,73±0,38	2,18±0,58

Veriler ortalama ve standart sapma olarak verilmiştir. G: Geleneksel irrigasyon (5 dk); LA: lazer aktivasyon (1 dk); NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.



Şekil 3. G ve LA metodları uygulanan solüsyon temas sonrası dentin tübüllerinde bölgesel olarak saptanan ölü bakteri oranı (%) ortalama ve standart sapma olarak dağılımın grafiksel gösterimi

G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; LA: Lazer aktivasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.

Metodların (G-LA), solüsyonların (Salin, NaOCl, NaB ve DDW) ve bölgelerin (kronal, orta ve apikal) arasındaki etkileşim birlikte incelendiğinde ölü bakteri miktarı arasında istatistiksel fark bulunmadı ($p=0,119$) (**Tablo 6**). Metodlar değerlendirildiğinde; G ve LA arasında dentin tübüllerinden bakteri uzaklaştırma etkisi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Metodlar, bölgeler ile değerlendirildiğinde; her iki metodun da bölgeler üzerinde istatistiksel fark yaratmadığı saptandı ($p=0,559$).

Metodlar, solüsyonlar ile değerlendirildiğinde; G ve LA metodları arasında solüsyonlar üzerindeki etki istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,001$). Solüsyonlar, bölgeler ile değerlendirildiğinde; Solüsyonların bakteri uzaklaştırmada bölgeler üzerinde istatistiksel fark oluşturmadığı saptandı ($p=0,343$) (**Şekil 3**).

Tablo 6. Metod, solüsyon ve bölge değişkenlerin etkileşimi ve anlamlılık değerleri

	P ANOVA
METOD (G-LA)	0,0001
BÖLGE (Kronal-Orta-Apikal)	0,0001
SOLÜSYON (Salin-NaB-NaOCl-DDW)	0,0001
METOD *BÖLGE	0,559
METOD *SOLÜSYON	0,0001
BÖLGE*SOLÜSYON	0,343
METOD *BÖLGE*SOLÜSYON	0,119

G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; LA: Lazer aktivasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.

6.2.2.1. Geleneksel metod içinde solüsyonların bölgelere göre değerlendirilmesi

G metodu içinde bakteri uzaklaştırmada solüsyonları etkileme kabiliyeti kuronal, orta ve apikal bölgelerde detaylı olarak incelendi (**Tablo 7**).

Kuronal bölgede, Salin-G ile NaOCl-G, NaB-G ve DDW-G grupların ölçümleri arasındaki ikili karşılaştırma ve NaOCl-G ile NaB-G ve DDW-G grupların ölçümleri arasındaki ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Orta bölgede, Salin-G ile NaOCl-G, NaB-G ve DDW-G grupların ölçümleri arasındaki ikili karşılaştırma ve NaOCl-G ve DDW-G ölçümlerin arasındaki ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Apikal bölgede, sadece Salin-G ile NaOCl-G, NaB-G ve DDW-G grupların ölçümleri arasındaki ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (**Tablo 7**).

Tablo 7. G Metodu içinde alt gruplar arasındaki bölgesel anlamlılık değerleri

		p (PostHoc: Bonferroni test)		
		G		
		Kuronal	Orta	Apikal
Salin	NaOCl	,000	,001	,001
	NaB	,001	,008	,002
	DDW	,003	,026	,005
NaOCl	Salin	,000	,001	,001
	NaB	,020	,080	,674
	DDW	,004	,018	,188
NaB	Salin	,001	,008	,002
	NaOCl	,020	,080	,674
	DDW	,513	,682	,681
DDW	Salin	,003	,026	,005
	NaOCl	,004	,018	,188
	NaB	,513	,682	,681

G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.

6.2.2.2 Lazer aktivasyon metodu içinde solüsyonların bölgelere göre değerlendirilmesi

LA metodu içinde bakteri uzaklaştırmada solüsyonları etkileme kabiliyetleri kural, orta ve apikal bölgelerde detaylı olarak incelendi (**Tablo 8**).

Kural bölgesinde, NaOCl-LA ile NaB-LA ve DDW-LA grupların ölçümleri arasında ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p=0,017$). Orta bölgede, NaOCl-LA ile Salin-LA, NaB-LA ve DDW-LA arasındaki ölçümlerin ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$). Apikal bölgede, NaOCl-LA ile NaB-LA ve DDW-LA arasındaki ölçümlerin ikili karşılaştırma farkı istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p<0,05$) (**Tablo 8**).

Tablo 8. LA Metodu içinde alt gruplar arasındaki bölgesel anlamlılık değerleri

		p (PostHoc: Bonferroni test)		
		<i>LA</i>		
		Kural	Orta	Apikal
Salin	NaOCl	,768	,027	,728
	NaB	,325	,948	,290
	DDW	,154	,995	,058
NaOCl	Salin	,768	,027	,728
	NaB	,042	,034	,032
	DDW	,017	,021	,005
NaB	Salin	,325	,948	,290
	NaOCl	,042	,034	,032
	DDW	,921	,987	,595
DDW	Salin	,154	,995	,058
	NaOCl	,017	,021	,005
	NaB	,921	,987	,595

LA: Lazer aktivasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su.

6.2.2.3. Metodlar arasında karşılaştırılarak solüsyonların bölgelere göre değerlendirilmesi

G ve LA metodları arasında bakteri uzaklaştırmada solüsyonları etkileme kabiliyetleri kural, orta ve apikal bölgelerde detaylı olarak incelendi ve sonuçları Tablo 9 'de verildi.

Tablo 9. Solüsyonların G ile LA metodlar arasında bölgesel anlamlılık değerleri

Solüsyon	Bölge	G ile LA arasındaki farka ait p
Salin	kural	0,016
	orta	0,019
	apikal	0,018
NaOCl	kural	0,043
	orta	0,001
	apikal	0,009
NaB	kural	0,019
	orta	0,006
	apikal	0,035
DDW	kural	0,044
	orta	0,012
	apikal	0,153

G: Geleneksel şırınga irrigasyon metodu; LA: Lazer aktivasyon metodu; NaOCl: Sodyum hipoklorit; NaB: Sodyum pentaborat pentahidrat; DDW: Döteryumu azaltılmış su. (Çoklu karşılaştırma ANOVA; İkili Karşılaştırma – PostHoc: Bonferroni)

Salin'in bakteri uzaklaştırma kabiliyeti metodlar arasında her bölge için benzer şekilde farklılık gösterdi ($p < 0,05$) (**Tablo 9**).

NaOCl'in bakteri uzaklaştırma kabiliyeti, metodlar arasında her bölge için farklılık gösterdi ve orta bölge verilerinde istatistiksel farklılık daha belirgindi ($p = 0,001$) (**Tablo 9**).

NaB'in bakteri uzaklaştırma başarısı metodlar arasında her bölgeye göre farklılık gösterdi ve orta bölge verileri metodlar arasında istatistiksel farklılık daha belirgindi ($p=0,006$) (**Tablo 9**).

DDW'nin bakteri uzaklaştırma başarısı metodlara göre farklılık gösterdi. Ancak, kuronal ve orta bölgeler için benzer bulunurken apikal bölgede G ile LA metodları arasında istatistiksel fark yaratmadı ($p=0,153$) (**Tablo 9**)



7. TARTIŞMA

7.1. Gereç ve Yönteme Ait Tartışma

Çalışmamız, kök kanal sistemi içinde farklı irrigasyon solüsyonlarının antibakteriyel etkinliğinin değerlendirildiği *in-vitro* bir araştırmadır. Endodontik çalışmalarda herhangi bir ajanın antimikrobiyal özelliklerini değerlendirmek için genellikle biyofilm modelleri kullanılır. Tek tür yada birden fazla mikroorganizma ile multi-biyofilm modelleri üzerinde çalışmalar yapılmaktadır (del Carpio-Perochena ve ark., 2011; Ordinola-Zapata ve ark., 2012; Henninger ve ark., 2019).

En çok tercih edilen mikroorganizmalar laboratuvar ortamında kolay elde edilebilenlerdir. Laboratuvarında bilinen türlerin kullanılmasının avantajı ortaya çıkan biyofilm bileşiminin çok iyi bilinmesidir. Ayrıca, bu sistemler kolay tekrarlanabilir ve manipüle edilebilir. Analiz edilmesi ve yorumlamanın oldukça kolay olmasının yanında bu durum zaman ve maliyet tasarrufu sağlar (Swimberghe ve ark., 2019).

Enterococcus faecalis, endodontik enfeksiyonlardan yaygın olarak izole edilen bir bakteridir (Molander ve ark., 1998; George ve ark., 2005). Susila ve ark., fotodinamik tedavinin etkinliğini değerlendirdikleri bir çalışmada *E. faecalis*'in antimikrobiyal irrigantlara *Streptococcus mutans*'a kıyasla daha dirençli bulmuştur (Susila ve ark., 2016). Diğer mikroorganizmaların desteği olmadan tek tür olarak kök kanalında hayatta kalabilir ve kan ile temasta kollajene yapışma yeteneği vardır (Haapasalo ve Orstavik, 1987; Love, 2001). Dentin tübüllerinde 1200 µm'ye kadar penetre olabildiği bilinmektedir (Vatkar ve ark., 2016).

Hızlı büyüyen ve laboratuvar koşullarında elde edilmesi titizlik gerektirmeyen bir bakteri olması *E. faecalis*'in endodontik biyofilm modellerinde neden sık seçildiğini açıklar (Siren ve ark., 2004).

Bununla birlikte, dentin tübülünde biyofilm oluşturabilmesi konusunda tartışma vardır. Derinlere ilerledikçe adezyon kabiliyetinin azalacağını ve metabolik

faliyetlerinin kaybolacağını bildirilmiştir (Nair ve ark., 2017). *In-vivo* şartlardaki değişken intra-kanal florayı tam olarak temsil edemeyeceği de kabul edilmektedir (Swimberghe ve ark., 2019).

Endodontik enfeksiyonlarda yaygın olarak izole edilen, antimikrobial irrigantlara dirençli, *in-vitro* çalışmalara uygun bir labarotuar türü olan ve literatürde pek çok çalışmada (Nair ve ark., 2017; Betancourt ve ark., 2019; Flach ve ark., 2016; Vatkar, 2016) tercih edilmesi sebebiyle çalışmamızda *E. faecalis* suşunu kullandık.

Bu *in-vitro* araştırmada, *E. faecalis* ile enfekte etmek üzere ortodontik ve periodontal nedenlerle çekilmiş 54 adet tek köklü çürüksüz daimi insan dişi kullanıldı. Toplanan dişler literature uygun şekilde analiz yapılana kadar üzerindeki dokular temizlenip % 0,1'lik timol solüsyonda bekletildi (Kucuk ve Kermeoglu, 2019; Arias-Moliz ve ark., 2015).

Kök kanal sistemi ana kanal başta olmak üzere dar apikal bölgenin, yan kanalların, istmusların, ramifikasyonların, deltaların ve dentin tübüllerinin oluşturduğu üç boyutlu (3D) bir yapıdır. Endodontik tedavide bu yapının mekanik işlemlerle 3D olarak şekillendirilmesi ve temizlenmesi amaçlanır. Şekillendirme kanal boşluğundaki kalıntıların uzaklaştırılmasını kolaylaştırmak ve irrigasyon solüsyonlarının kanal dışına akışını sağlamak için planlanmalıdır. Özellikle koronal bölgedeki kanal girişi açıklığının düzeltilmesi solüsyonun kanal dışına çıkışını kolaylaştırdığı araştırmacılar tarafından kabul edilmiştir (Khademi ve ark., 2006; Haapasalo ve ark., 2005; Pérez-Heredia ve ark., 2006).

Çalışmamızda klinik koşulların sağlanması adına tek köklü insan dişi endodontik şekillendirilmesi yapıldıktan sonra apikal açıklığı gerçek irrigasyon koşullarını sağlaması amacıyla kapatıldı.

İnorganik yapıları ve smear tabakasını uzaklaştırmak için EDTA kullanılması önerilmektedir (Carvalho ve ark., 2008). Mekanik işlemler sırasında oluşan dentin talaşını uzaklaştırmak ve bakterilerin dentin tübüllerine penetrasyonunu

kolaylaştırmak için her örnek %17'lik EDTA ile yıkandı ve ardından 10 mL Salin ile durulandı (Orstavik ve Haapasalo, 1990). Kontaminasyon öncesinde ise otoklavda 121 C°'de 15 dk steril edildi.

Örnekler, *E. faecalis* ile enfekte edildiğinde türün kök kanalında olgunlaşması, kalınlaşması ve biyofilm oluşturmaya beklenir (Neelakantan ve ark., 2015; Christo ve ark., 2016). En az 3 haftalık biyofilm oluştuğunda yüksek bir antimikrobiyal direnç gelişir (Henninger, 2019). Özellikle dentin tübüllerine penetre olabilen patojenlerin ikincil bir enfeksiyon kaynağı söz konusu olduğu için çalışmalar dentin tübülleri üzerine yoğunlaşır.

İrrigasyon ajanının dentin tübüllerine etkisini değerlendirirken dentin bloğu kullanan çalışmalarda bakterinin tübüllere penetrasyonu sağlamak amacıyla deney örnekleri santrifüjden geçirilir (Yang ve ark., 2016; Ma ve ark., 2011).

Christo ve ark., *E. faecalis* ile enfekte ettikleri dişleri santrifüj yapmadan 4 haftalık bir inkübasyon sürecinde bıraktı. Bu şekilde bakterilerin dentin tübül penetrasyonu sağladıklarını SEM ile görüntüledi (Christo ve ark., 2017).

Bu çalışmada, irrigasyon ajanlarının yanı sıra irrigasyon metodları da araştırdığı için klinik şartları sağlaması açısından tek köklü insan dişleri bütün olarak kullanıldı. Kök kanalına ekilen *E. faecalis*'in deney zamanına kadar biyofilm oluşturmaya için 28 gün boyunca olgunlaşması beklendi. Canlılığı korumak için süspansiyon 3 günde bir tazelendi.

7.1.1. İrrigasyon solüsyonlarına ait tartışma

Antimikrobiyal ajanlar kalın biyofilm tabakasını uzaklaştırabildikleri zaman etkili olurlar. Üst tabakadaki hücreler hemen etkilenirken ajanın alt tabakaya nüfus etmesi belli bir konsantrasyona ve temas süresine bağlıdır (Stewart ve Franklin, 2008). Bir ajanın antibakteriyel olduğunu söyleyebilmek için kullanılan mikroorganizmanın tekrar üremesini engelleyecek ölçüde bakterisidal olması beklenir (Kalayci ve ark.,

2014).

Sodyum hipoklorit, endodontide en çok kullanılan ve organik yapıyı çözme özelliği dolayısıyla en etkin antimikrobiyal solüsyondur. %0,5 ila %6 arasındaki konsantrasyonları kök kanal tedavisinde tercih edilir. NaOCl için temas süresi uzadıkça etkinliğin arttığını ancak konsantrasyon arttıkça daha kısa sürede etkili olduğu bildirilmiştir (Iandolo ve ark., 2019; del Carpio-Perochena ve ark., 2011).

Flach ve ark., %2,5'lik NaOCl'i *E. faecalis*'e karşı etkili bulmazken (Flach ve ark., 2016) Wang ve ark., %6'lık konsantrasyon ve uzun temas süresinin 21 günlük *E. faecalis* biyofilmine karşı etkili bulmuştur (Wang ve ark., 2012).

%1 ve %2,5'lik NaOCl'in 30 dk sonra %5,25 NaOCl'in 5 dk'lık etkisine yaklaştığı bildirilmiştir (Retamozo ve ark., 2010). %5,25'lik NaOCl'in 2 dk'da yeterli dezenfeksiyon sağladığı bildirilmiştir (Radcliffe ve ark., 2004).

Bu nedenle çalışmamızda, antimikrobiyal irrigantlara dirençli *E. faecalis* üzerinde etkili olacağı düşünülerek pozitif kontrol grubunu oluşturmak üzere %5 'lik NaOCl kullanıldı.

Sodyum hipoklorit solüsyonu geniş antimikrobiyal aktivite gibi pek çok olumlu özelliklere sahip olmasına rağmen hoş olmayan tadı, smear tabakasının uzaklaştırılamaması, koroziv ve toksik olması gibi bazı olumsuz özelliklere de sahiptir (Basrani ve ark., 2015). Bazı durumlarda da hipokloritin dikey kök kırığı riskini artırıp arttırmadığı sorusunu gündeme gelmektedir (Haapasalo ve ark., 2014a; Sim ve ark., 2001)

İdeal bir endodontik solüsyonda antimikrobiyal etkinliğin yanında organik ve inorganik doku çözücü olması, periapikal dokuya toksik olmaması ve düşük yüzey gerilimi gibi özellikler de istenir (Torabinejad ve ark., 2014).

Kök gelişiminin devam ettiği olgularda ve apikal açıklığın geniş olması

nedeniyle genç daimi dişlerin tedavisi bazı komplikasyonlar açısından dikkat gerektirir (Hülsmann ve Hahn, 2000). Apikal dokunun bölgesel canlılığını koruması rejeneratif kanal tedavisi endikasyonu konulmuş dişler için önemlidir. İrrigantların çevre dokulara tahribat etkisi ve toksisitesi arzu etmediğimiz bir durumdur (Zhu ve ark. 2013).

Bu nedenle deney solüsyonu olarak seçtiğimiz irrigant ajanların doku dostu ve antimikrobiyal özellikte olmasını istedik.

Taşlı ve ark.'nın 2013 yılında yaptığı araştırmada bor bileşiklerinden biri olan sodyum pentaborat pentahidratın (NaB) antimikrobiyal ve odontojenik özelliklerini bildirmiş ve dental rejenerasyon çalışmalarında tercih edilebilecek bir kaynak olduğunu belirtmiştir (Tasli ve ark., 2013). Odontojenik ve antimikrobiyal özellikleri nedeniyle NaB dental araştırmalarda kullanılması önem kazanmış bir bor bileşiğidir.

Yılmaz (2012), borik asit ve sodyum tetraborat kullandıkları bir çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter septicus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* türlerine karşı antimikrobiyal etkinliklerini tespit etmiştir (Yılmaz, 2012).

Demirci ve ark. (2016), borik asit ve sodyum tetraboratın bakteri, maya ve mantarlara karşı belirgin antimikrobiyal etkiler göstermesinin yanı sıra çoğalma, göç, yaşamsal büyüme faktörü ve dermal hücrelerin gen ekspresyon seviyelerini önemli ölçüde arttırdığını ortaya çıkarmıştır (Demirci ve ark., 2016). Ek olarak, borik asitin daha çok antifungal özellik gösterdiği bilinmektedir (De Seta ve ark., 2009).

Doğan ve ark. (2014), %3'lük NaB çözeltisinin bir hidro-jel yara kremi içinde araştırdıkları bir çalışmada, bor ve pluroniklerin bir kombinasyonunun fibroblast göçünü, antioksidan enzim aktivitesini, büyüme faktörü ekspresyon seviyelerini ve akut kutanöz yara iyileşmesini arttırdığını göstermektedir (Dogan ve ark., 2014).

Terapotik amaçla hazırlanan bu yara kreminde 300 mg/mL(%3) NaB, % 0,0005 CHX ve 5 mg/mL poloksimer birlikte kullanıldığında yüksek antiviral etkinlik

bulunmuştur (Sahin ve ark., 2018).

Demirci ve ark. (2015), NaB'ı dental kompozit materyaline dahil ederek insan dişi pulpa kök hücrelerinin (hDPSC'ler) artmış osteojenik ve odontojenik farklılaşması ile birlikte *S. mutans*'lara karşı antibakteriyel etkisini de bildirmiştir (Demirci ve ark., 2015).

İyigündoğdu ve ark. (2017), pamuklu kumaşların %3 NaB ve %0,03 triklosan çözeltisi ile modifikasyonu sonrası antibakteriyel, antikandida, antifungal ve antiviral etkilerini elde etmiştir (Iyigundogdu ve ark., 2017).

Shakouie ve ark. (2016), tetraasetil etilen diamin ile birlikte kullandıkları sodyum perborat ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ajanını *E. faecalis*'e karşı değerlendiren araştırmasında ise %5'lik NaOCl ile benzer antibakteriyel etkinlik saptamıştır (Shakouie ve ark., 2016).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, doku uyumlu ve antimikrobiyal özellikte olduğu belirtilen %3'lük NaB'ı ilk defa kök kanal sisteminde irrigasyon ajanı olarak *E. faecalis*'e karşı denemeyi amaçladık.

Bir diğer deney solüsyonu, 150 ppm'lik doğal suya göre döteryumu az olan 25 ppm'lik döteryumu azaltılmış sudur (DDW). DDW tüketiminin metabolizma üzerinde faydalı olduğu (Mosin ve Ignatov, 2016) sağlıklı hücrelerde ise nekroz veya apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Basov ve ark., 2019). Oksidatif stresin azaltılmasına 30 ve 60 ppm'lik DDW kullanımının faydalı olduğu saptanmıştır (Rasooli ve ark., 2016).

Hücre bölünmesi hücre içi D konsantrasyonuna duyarlıdır ve normal hücre büyümesini başlatmak ve sürdürmek için normal döteryum konsantrasyonu gereklidir, çünkü, 30 ppm gibi düşük döteryum varlığında hücrelerin hayati aktivitesi durur (Somlyai ve ark., 1993).

Laskey ve ark. (2001), hem hayvan hem de bitki hücrelerinde döteryum

konsantrasyonundaki değişiklikleri tespit eden mekanizmaların varlığını ve insan dokusunda düşük döteryumun tolere edilebilir olduğu saptamıştır (Laskey ve ark., 2001).

Xie ve ark. (2014), *Escherichia coli* üzerinde yaptıkları çalışmada ortamdaki döterum oranı değiştğinde bakterinin yaşamsal faaliyetlerinin de etkilendiği belirtilmiştir (Xie ve ark., 2014).

Bu bilgiler, düşük D içeriğinin mikroorganizmalar üzerinde de olumsuz etki yaratabileceğini düşündürmektedir. Bu bilgiler ışığında literatürde ilk defa çalışmamızda, kök kanal sisteminde irrigasyon solüsyonu olarak 25 ppm' lik DDW' *E. faecalis*'e karşı kullanıldı.

7.1.2. İrrigasyon metodlarına ait tartışma

Endodontik çalışmalarda kullanılan ajanların antimikrobiyal etkinlikleri irrigantın kimyasal özellikleri, konsantrasyonu, temas süresi, matrikse nüfus edebilmesi, biyofilmin kalınlığı gibi değişkenlere bağlıdır. (Stojicic ve ark., 2013; de Paz ve ark., 2015; Flach, 2016). Ayrıca, ajan kök kanal sistemi içinde incelendiğinde sıvının akış dinamiği, solüsyon miktarı veya dar kanallarda apikale ulaşabilmesi gibi değişkenler de eklenir (Peeters ve ark., 2014).

Hope ve ark. (2010), farklı irrigasyon tekniklerinin kullanıldığı çalışmalardaki olumsuz sonuçlardan sonra endodontik irrigasyonun başarısızlığından sorumlu olan bakteri hücrelerinin inatçılığından ziyade, köklerin ve aksesuar kanallardaki bakterilere erişememenin daha olası olduğunu belirtmiştir (Hope ve ark., 2010).

Diğer bir deyişle, endodontik ajananın antimikrobiyal etkisi temas süresine bağlı olmakla birlikte temas edebilmesi de önem taşır (Wang ve ark., 2013).

Apikal bölgede hava kilidi etkisi nedeniyle solüsyonun temasının engellenmesi veya sıvı akışının biofilmi uzaklaştırmada yetersiz kalması geleneksel şırınga

irrigasyonunun iyileştirilmesi gereken bir yönüdür. Çünkü, endodontik irrigasyondan beklenen etki biyofilm üzerinde kimyasal ve mekanik stresin kombinasyonudur (van der Sluis, 2015).

Geleneksel şırınga yöntemleri ile karşılaştırıldığında aktivasyon işlemi solüsyonda kayma gerilimi oluşturur. Bu da biyofilmin bozulmasına veya yorgunluğuna neden olur (Flemming ve ark., 2011).

Chen ve ark. (2014), irrigasyon solüsyonlarının dinamiğini inceleyen çalışmada şırınga irrigasyonda ucu-açık ve yan-açık iğne uçları, negatif basınçlı sistem ve pasif ultrasonik irrigasyon metodları arasında karşılaştırdı. Kayma gerilimini açık uçlu şırıngada 185 MPa, yanı açık uçlu şırıngada 425 MPa, EndoVac ile irrigasyonda 45 MPa ve PUI ile irrigasyonda 875 MPa olarak buldu (Chen ve ark., 2014).

Deneyisel modeller hazırlanarak incelenen bu yöntemde ultrasonik aktivasyon sırasındaki bu kayma geriliminin bilgisayar simülasyonu ile 500 N/m² düzeyinde olduğu tahmin edilmiştir (Chen ve ark., 2014). Mekanik aktivasyonda, kayma gerilimi diğer sistemlere göre çok daha düşük olan 1 N/m² civarında görünmektedir.

Agarwal ve ark. (2017), kök kanal irrigasyonunda hava kilidi etkisinin mutlaka oluştuğunu ancak ultrasonik ve mekanik tekniklere göre sonik sistemlerin daha etkili olduğunu bulmuşlardır (Agarwal ve ark., 2017).

Erbiyum lazerler ile 250 mJ'den küçük bir atım enerji ile 20 sn aktive edilen solüsyonun kayma gerilimi 1000 N/m² olarak bildirilmiştir (de Groot ve ark., 2009). Lazer etkileşimli kavitasyon gerçekleştiğinde ulaşılamayan bölgelere de kuvvetli akış sağlandığı öne sürülmektedir (DiVito ve ark., 2012). PUI ise 3000 N/m² olarak bildirilmesine rağmen (Macedo ve ark., 2014b), yapılan araştırmalarda PUI ile karşılaştırıldığında LA yöntemin daha etkili debris uzaklaştırdığı belirtilmiştir (Arslan ve ark., 2014).

Geleneksel şırınga irrigasyonunun iyileştirilmesi gereken bir diğer yönü

solüsyonların dentin tübüllerine penetrasyonunu arttırmak olmalıdır. İrrigantların dentin penetrasyonu 160 µm'den fazla değildir (Safavi ve ark., 1990; Berutti ve ark., 1997; Vatkar ve ark., 2016). *E. faecalis* gibi bir bakterinin 1000 µm kadar derine nüfus edebildiği düşünüldüğünde geleneksel irrigasyon bu açıdan yetersiz kalmaktadır.

LA irrigasyon PUT'a kıyasla solüsyondaki yüzey geriliminin üstesinden geldiğini ve bu özellik sayesinde solüsyonun penetrasyon kabiliyetinin arttığını belirtmektedir (Betancourt ve ark., 2019). Fotoakustik darbe etkisinin jet kavitasyonlar meydana getirerek NaOCl'in daha derin dentin katmanlarına nüfuz etmesini kolaylaştırdığını, böylece normal şırınga ve PU irrigasyona göre üstünlük sağladığı belirtilmiştir (Cheng ve ark., 2017; Peeters ve Suardita, 2011).

LA, diğer bütün aktivasyonlardan farklı olarak antibakteriyel etkisi olduğu bilinen lazer enerjisi kullanılır (Schoop ve ark., 2002). Er,Cr:YSGG lazerin periodontal cepteki tüm bakteri miktarının yanı sıra her patojenin sayısında da güçlü bir azalma bulunmuştur (Gutknecht ve ark., 2015).

Onay ve ark., enfekte olmuş köklerin Er, Cr: YSGG lazerin antifungal değerlendirmesini yapan başka bir araştırma kandida mikroorganizmasının dentin tübülleri içinde azaldığını göstermiştir (Onay ve ark., 2010).

DiVito ve ark., uyarılan lazer radyasyonunun smear tabakasını çıkaracağını, mikrobiyal biyofilmleri bozacağını ve hücre zarlarında morfolojik değişiklikler yaparak etkileyeceğini belirtmiştir (DiVito ve ark., 2012). Ancak, kök kanallarında NaOCl kullanılmasının her zaman bakteri eliminasyonunda etkili olduğunu ve LA yöntemin bu başarıyı arttırmadığı da bildirilmiştir (Pedulla ve ark., 2012).

Bu bilgiler ışığında biz de çalışmamızda geleneksel şırınga yönteminin yanı sıra LA yöntemini kullandık. Çalışmamızda kullanılan solüsyonların antibakteriyel etkinliğinin Er,Cr:YSGG lazer ile etkileşiminin geleneksel şırınga irrigasyonuna kıyasla fark yaratıp yaratmayacağını belirlemeyi amaçladık.

7.1.3. İrrigasyon metodlarının uygulama tekniklerine ait tartışma

Geleneksel şırınga yönteminde kök kanalları irrigasyonu pek çok araştırmacı tarafından aynı teknikte kullanılmıştır. Pozitif basınç oluşturan bu irrigasyonda endodontik iğne kanal çalışma boyundan 2 mm kısa olacak şekilde pasif olarak uygulanır (van der Sluis, 2015). Ancak, kullanılan endodontik iğne ucu yan-açık, ön-açık yada birden çok açıklığı olabilen şekillerde değişkenlik gösterir.

Bu iğne uçlarındaki açıklığın çeşitlilikteki amaç irrigasyon solüsyonunun fazla basıncını önlemek ve apikalden çevre dokulara taşmasını engellemektir. Biz çalışmamızda, iki yan açıklığı olan endodontik iğne ucunu kanalda apekse yakın olacak şekilde kanal içinde pasif olarak kullandık.

Literatürde, LA irrigasyonun ortaya atılmasından itibaren araştırmacıların uygulamalardaki ve cihaza bağlı farklılıklar belli bir çalışma protokolü oluşmasına engel olmuştur. İlk defa 2012 yılında belirli bir protokol sunan 'foton etkileşimli fotoakustik akış' (PIPS; photon induced photoacoustic streaming) fenomeni tanıtılmıştır. Smear tabakasını uzaklaştırmak için kullanılan solüsyonun Er:YAG lazer (Fidelis; Fotona, Ljubljana, Slovenia) ile aktivasyonu sağlanır (DiVito ve ark., 2012).

Bu fenomen için özel olarak tasarlanmış uca doğru konikleşen safir bir uç kullanılır. Uzunluğu 6, 9 ve ya 12 mm olarak değişen, 400 µm çaplı bir optik uç kullanılarak 15 Hz ve 20 mJ'de ablasyon altı enerji verilir. Fiber uç, kanal girişinde sabit tutulur ve sıvıda lazer etkileşimli kavitasyon meydana getirmesi sağlanır. Kullanılması ön görülen her solüsyon için 5 sn aralıklarla ve 30 sn süren devamlı atımlarla bu işlem 3 kez tekrarlanır (DiVito ve ark., 2012).

Peeters ve ark., lazer ile aktive edilen EDTA'nın smear tabakasını ve kalıntılarını kök kanalının en apikal bölgesine kadar etkili bir şekilde çıkardığını gösteren çalışmada fiber uç kanal içi yerine sadece girişte kullanmıştır (Peeters ve ark., 2011). Aynı araştırmacı, Er,Cr:YSGG lazerin 1W- 35 Hz parametrelerini kullanarak yaptıkları çalışmada fiber ucun kökün apikal kısmına yaklaşmasının solüsyonun dışarı

taşma olasılığını arttırdığını bildirmiştir (Peeters ve ark., 2015).

Genellikle, 200-300µm çapındaki optik uçların apikalden koronale doğru dairesel hareketle çalıştırılması, 400µm ve daha kalın uçların kanal girişinde sabit tutulması, veya kanal içinde aşağı/yukarı hareket ettirilmesi gibi farklı teknikler önerilmiştir (Olivi ve De Moor, 2016). Buna ek olarak, fiber uç şekli ve çapı debris uzaklaştırma işlevini etkilemediği ancak atım enerjisi, pulse süresi ve ayrıca optik ucun kanal içinde nerede konumlandığı etkilemektedir (Meire ve ark., 2016).

Henninger ve ark. (2019), Er: YAG lazeri kullanılarak 600 µm'lik uç ile 3x20 sn aktivasyon yapılmış ve NaOCl'in dentin tübüllerine daha derin nüfuz etmesine yol açtığını ve meydana gelen sıvı dinamiklerinin derin kısımlarından bakterilerin eliminasyonunu kolaylaştırdığını bulmuşlardır (Henninger, 2019).

Bu bilgiler ışığında çalışmamızda, Er,Cr:YSGG (Waterlase MD; Biolase Technology, Inc., San Clement, CA, USA) lazer cihazına uyumlu 14 mm uzunluğunda konik sonlanan RFT5 (çap:500 µm) optik uç apikale ulaşmadan kanal girişinde yukarı/aşağı hareketlerle kullanıldı. 2780 nm dalga boyuna sahip lazer cihazı 0.75W, 20 Hz, 140µs parametreler ile 6 kez tekrarlanan ve 10sn süren lazer radyasyonu kanal girişinden tatbik edilen irrigantla eş zamanlı olarak gerçekleştirildi.

7.1.4. Deney gruplarına ait tartışma

Erbium lazer ışımalarının antibakteriyel etkisi olmasına rağmen önemli bir unsur geleneksel irrigasyonda olduğu gibi LA teknikte de antibakteriyel özelliği olan bir solüsyon gerekliliğidir (Christo ve ark., 2016). Örneğin distile su, tuzlu su (NaCl) yada fosfat ile tamponlanmış salin gibi sıvıların antibakteriyel etkinliği yoktur (Vatkar ve ark., 2016). Bunlar tedavilerde yardımcı solüsyon olarak veya çalışmalarda kontrol gruplarını oluştururken değerlendirilen sıvılardır. 30 sn LA uygulanan steril suyun aktive edilmeden uygulanan %5'lik NaOCl' in antibakteriyel etkisinin çok gerisinde kaldığı bildirilmiştir (Pedulla ve ark., 2012).

Sippus ve ark. (2019), salin solüsyonun Er:YAG cihazına ait Preciso uç ile aktive edildiğinde düz kanallardaki apikal bölge için smear tabakasını uzaklaştırmada etkili olmadığını ve kullanılacak solüsyonun amaca uygun seçilmesi gerektiğini bildirmiştir (Sippus ve Gutknecht, 2019). Herhangi bir ajitasyon tekniğinin sıvının kimyasal özelliğini değiştirerek smear uzaklaştırması yada antimikrobiyal etki göstermesi beklenemez. Bu nedenle negatif sonuç alacağımız gruplar için çalışmamızda, fosfat ile tamponlanmış steril salin solüsyonu kullanıldı.

Bakteri üremesinin kesin olarak bilindiği gruplarda örnek sayısı az tutulabilir. Hage ve ark., negatif kontrol grubunda 4 ve her deney grubunda 10 adet olmak üzere 44 adet tek köklü diş kullandı (Hage ve ark., 2019). Erben ve ark., grup başına 10 diş kullanırken tedavi metodu uygulamayacağı negatif kontrol grubunda sadece 2 diş kullandı (Erben ve ark., 2019).

Biz çalışmamızda, negatif kontrol grubu oluştururken G metodu ve LA metodunda 5'er adet diş kullanmayı uygun bulduk. Pozitif kontrol grubumuz ve deney solüsyonları uygulanacak grupları 7'şer adet olacak şekilde hazırladık.

Kullanılması planlanan tüm solüsyonlar yeterli irrigasyonu elde etmek için 10 mL kadar oluşturuldu. Ancak, LA ile solüsyonun uygulanma süresi yaklaşık 1 dk kadar sürerken, geleneksel şırınga ve endodontik iğne metodunda solüsyonun kök kanalına tatbiki 5 dk sürdü.

7.1.4. Mikrobiyolojik analiz ve değerlendirme yöntemine ait tartışma

Bir ekstraktın veya saf bir bileşiğin *in-vitro* antimikrobiyal aktivitesini değerlendirmek veya taramak için çeşitli laboratuvar yöntemleri kullanılır. En bilinen yöntem, disk difüzyonu ve broth/agar seyreltme yapılan mikrobiyolojik kültür oluşturma tekniğidir (Balouiri ve ark., 2016).

Çalışmamızda, deney yapılmadan önce biyofilm oluşturan canlı bakteri varlığını saptamak için enfekte kök kanallarından kağıt konlarla örnek alındı ve broth

mikroseyreltme testinde kullanıldı. Böylece, çalışmamızın solüsyon temas öncesi *E. faecalis* sayısı CFU/mL olarak hesaplandı.

İrrigasyon aşamasının hemen ardından kök kanal duvarından dentin talaşı örnekleri toplanarak broth mikroseyreltme testinde kullanıldı. Çalışmamızın irrigasyon solüsyonları ile temas sonrasında *E. faecalis* değerleri CFU/mL olarak belirlendi. Daha sonra, antimikrobiyal etkinliğin değerlendirilmesinde CFU değerlerin temas öncesi ve sonrası formülasyonu ile sağ kalım oranları yüzde (%) olarak hesaplandı (Susila, 2016; Yang, 2016; Ye ve ark., 2018).

Bakterinin dentin içine nüfuz etme yeteneği, koloni oluşturan birimlerin sayısı, histolojik numunede enfekte olan tübüllerin sayısı veya kök kanal duvarlarında bakteri varlığı ile mikrobiyolojik analizlerle belirlenebilir. Ancak, dentin tübüllerini görüntülemek yada herhangi bir maddenin penetrasyonu değerlendirmek için ışık mikroskobu, stereo mikroskop, SEM veya CLSM tercih edilir.

Işık mikroskobunun en önemli dezavantajı penetre olan yıkama solüsyonunun kök dentininden ayırt edilememesidir (Chandra ve ark., 2012). Öte yandan, histolojik kesitler enfekte dentin içindeki bakterilerin dağılımını gösterir, ancak yaşayabilirlik hakkında bilgi vermez. SEM ile incelenecek sert diş dokusu örneklerinin ise önce dehidrate edilmesi ve sonra yüzeyinin altınla kaplanması gibi dokuya zarar verebilen özel bir takım işlemlerden geçmesi gerekmektedir (Ordinola-Zapata ve ark., 2008; Nair ve ark., 2017). Elektron mikroskopisinin başka bir dezavantajı da büyütme altında inceleme yapıldığı için tek seferde örneğin tamamının incelenemiyor olmasıdır.

Konfokal lazer taramalı mikroskop, yıkama solüsyonlarının kanal duvarlarının çevresi boyunca dentin tübüllerine penetrasyonu ve dağılımı hakkında detaylı bilgi sağlayarak diğer tekniklere göre belirli avantajlar sunar. Ayrıca kalın örneklerin bile farklı optik bölümlerinden görüntü alınmasına ve son görüntüyü elde etmek için yeniden yapılandırılmasına izin verir. Fakat SEM sadece örnekteki tek bir düzlemin görüntülenmesine izin vermektedir (Jardine ve ark., 2016).

Konfokal lazer taramalı mikroskop, 100 µm kalınlığa kadar değişen canlı ve sabit örneklerde ince optik bölümleri görüntülemek için biyolojik ve tıbbi bilimlerde çok çeşitli araştırmalar için paha biçilmez bir araç haline gelmiştir (Claxton ve ark., 2006; Nair ve ark., 2017). CLSM, endodontide dentin tübülleri içerisindeki bakterileri belirlemek, kanal dolgularının duvarlara adaptasyonunu, kanal dolgu patının ve yıkama solüsyonlarının dentin tübüllerine penetrasyonunu tespit etmek için kullanılmaktadır (Ye ve ark., 2018; Hasegawa ve ark., 2019).

Bu farklılıklar değerlendirildiğinde, CLSM mikrobiyal biyofilmlerde canlılık profilini, yüzeyi ve mekansal dağılımı belirlemek için özellikle dentin tübüllerinde canlı ve ölü bakterilerin tanımlanması için uygun bir yöntemdir (Ordinola-Zapata ve ark., 2008; del Carpio-Perochena ve ark., 2011; Ma ve ark., 2011). Biz de çalışmamızda, irrigasyon aşamasından sonra dentin tübüllerindeki bakterilerin varlığını tespit etmek için CLSM kullandık.

Konfokal lazer taramalı mikroskop için numunenin hazırlanması daha az işlem gerekmesine rağmen dentin tübüllerinin görüntülenmesi için dişin kesilmesi şarttır. Irrigasyon ajanını dentin tübüllerinde etkisini değerlendiren bazı araştırmalarda dentin bloğu deneyden önce hazırlanmıştır (Arias-Moliz ve ark., 2015; Verma ve ark., 2015). Dişleri bütün olarak kullanan bazı çalışmalar, deneyden önceden ikiye ayırıp sonra birleştirerek deney yapmıştır (Wong ve Cheung, 2014; Flach ve ark., 2016). Bazı çalışmalar ise deneyden sonra histolojik incelemelerde olduğu gibi örnekleri dekalsifiye etmiştir.

Hasegawa ve ark. (2019), kesim tekniklerini araştıran çalışmasında numunelerini dekalsifiye etmeden ancak dondurarak kesitler almanın avantajlı olduğunu bildirmiştir (Hasegawa, 2019).

Diğer bir yöntem ise örneklerin kırılmasını kolaylaştırmak için deneyden önce bukkal ve lingual doğrultuda yüzeysel ve uzunlamasına oluklar hazırlanmasıdır. Deney aşamasında dişler bütündür ancak daha sonra kırılan parçalar başka hiçbir işlem uygulamadan CLSM tarama için hazır olurlar (Azim ve ark., 2016; Yang ve ark.,

2016).

Çalışmamızda, irrigasyon aşamasında bütün kullanılması gereken dişler deneyden sonra bukkal-lingual doğrultudaki oluklar sayesinde keski ile ikiye ayrıldı. Her gruptan belli sayıda örnekler seçildi ve boyama için ayrıldı. Dentin bloklarının önceden hazırlandığı çalışmalarda ise grup örnekleri çok daha fazla sayıdadır (Azim ve ark., 2016; Yang ve ark., 2016). Biz çalışmamızda deney gruplarından 3'er negatif kontrol gruplarından 2'şer örnek seçtik.

Genelde histoloji çalışmalarında kullanılmasına alışkın olduğumuz floresan boyalar CLSM taramasında da canlı/ölü tespiti için yer almaktadır. Birçok çalışma SYTO 9 ve propidium iyodür karışımını rutin olarak kullanmaktadır. SYTO 9 bozulmamış hücre zarları (canlı bakteriler) floresan yeşili ve propidium iyodürün uygun karışımı hasarlı zarları (ölü bakteriler) olan bakterileri de floresan kırmızısı ile boyarlar. Ancak, farklı incelemelerde kullanılan boyalar da değişebilmektedir.

Nair ve ark. (2017), *E. faecalis*'in metabolik aktivitesini %0,01 akridin turuncu boya kullanarak ve canlılığını ile yapışmasını *in-vitro* tespit etmek için florossein diasetat boya uygulamıştır (Nair ve ark., 2017). Morfolojik görüntüleme yöntemlerinde canlı/ölü hücre değerlendirirken kullanılan bir diğer boya ikilisi Hoechst 33342 ve propidium iyodürdür (Tunç, 2016).

Floresan boyalar DNA'ya bağlanabildiklerinden hücrenin kromatini dolayısıyla nükleusu görünür hale gelebilmektedir. Hoechst 33342, DNA'ya bağlanabilen ve intakt membrandan geçebilen bir boyadır ayrıca canlı veya ölü (apoptotik /nekrotik) hücrelerin çekirdeklerini boyamak için kullanılmaktadır. Propidium iyodür, sadece hasarlı hücre membranlarından geçebilen, geç apoptotik / sekonder nekrotik veya primer nekrotik olan tüm ölü hücreleri boyayabilen floresan nükleik asit boyasıdır (Ulukaya ve ark., 2011).

Çalışmamızda, her diş örneğinin yarısı alınarak Hoechst 33342 ve propidium iyodür ile 15 dk temas ettirildi. Daha sonra kanal içinden kök dış yüzeyine doğru x,y:

500x500µm derinlikte ve kırık yüzeyden itibaren z:30µm derinliğe kadar sırasıyla koronal, orta ve apikal bölgelerden seçilen alanlar tarandı.

Dentin tübüllerinden bakteri uzaklaştırma etkinliği ImageJ programı (Fiji v.1.44o; WR, USA) ile analiz edildi (Schindelin ve ark., 2012). Oto-floresan ışıma yapan alanlar ve dentin talaşı toplarken smear oluşturma ihtimali nedeniyle kanal duvarının boyandığı bölgeler analiz sırasında göz ardı edildi. Çalışmamızda, mikroskopik görüntülerde canlı bakteri yoğunluğu çok düşük bulunması nedeniyle analize dahil edilmedi.

Verma ve ark. (2015), insan süt dişinden elde ettikleri 2 mm kalınlığında dentin bloklarını *E faecalis* ile enfekte edip SYTO 9 ve propidyum iyodür ikilisi ile boyadı ve Image J yazılımı ile analiz etti. Çalışmalarının sonunda kullandıkları ajanların yüksek antimikrobiyal etkisine bağlı olarak görüntülerde sadece ölü hücreleri okuyabildiklerini belirttiler (Verma ve ark., 2015).

Kirsch ve ark. (2017), *E faecalis*' in 28 günlük inkübasyon sürecinden sonra derin dentin tübüllerinde (1002,45 µm) sayısında ve canlılığında azalma olacağını ifade eden bir çalışma bildirdi (Kirsch ve ark., 2017). Çalışmamızda, kullandığımız deney solüsyonları tam olarak antibakteriyel etki göstermemiştir. Analiz sonucunda canlı hücre sayısını az bulunmasının nedenini dentin tübülleri içinde bakterileri canlılığında azalmadan kaynaklandığını düşünmekteyiz.

7.2. Mikrodilüsyon Testi Bulgularına Ait Tartışma

Mikrodilüsyon laboratuvar testi ile elde edilen CFU değerleri çalışmamızın ilk verileri olmuştur. Solüsyon temas öncesi ve temas sonrası sağ kalım oranı yüzde (%) formülüne göre hesaplanarak kaydedilmiştir (Susila ve ark., 2016). Antimikrobiyal etkinliğin bakteri üremesini tamamen etkileyecek kadar yüksek olması aranmaktadır (Kalayci, 2014).

NaOCl, geleneksel şırınga yada LA yöntemlerin ikisinde de %0 sağ kalım oranı

göstererek yüksek antibakteriyel etkinliğini kanıtlamıştır. %5' lik NaOCl' in 5 dk'lık geleneksel irigasyonu ile 1 dk'lık LA yöntem sonrası sağ kalım oranı benzer şekilde düşük bulunmuştur.

Christo ve ark. (2016), Er,Cr:YSGG lazer (RFT3 uç, 140 µsn, 25 mJ, 20 Hz) ile aktive edilen %0,5'lik NaOCl'in antibakteriyel etkisini artırma potansiyelinin sınırlı olduğunu ve %4 gibi yüksek bir konsantrasyonda NaOCl kullanarak geleneksel şırınga ve LA metodları arasında üstünlük bulmadığını bildirdi (Christo ve ark., 2016).

Cheng ve ark. (2017), *E. faecalis*'e karşı 5 mL %5,25'lik NaOCl solüsyonu geleneksel şırınga ve ultrasonik cihaz ile yaklaşık 60 sn süresince uyguladığı çalışmada, 30 sn süren Er:YAG (PIPS, 20mJ, 25 Hz, 50 µsn) ile aktivasyonu karşılaştırdı. Geleneksel metotla % 94, ultrasonik irigasyon sonucu %98,6 ve LA metodu ile %98,8 oranında bakteri eliminasyonu sağlamıştır (Cheng ve ark., 2017). Mevcut bulgular, NaOCl çözeltisinin yüksek konsantrasyonda artmış bir antibiyofilm etkisi öneren literatürlerle uyumlu görünmektedir.

Betancourt ve ark. (2019), diş kök kanalını taklit etmesi için cam pastör pipetleri kullanarak içinde 10 gün inkübe ettikleri *E. faecalis*'e karşı %5 ve %0,5'lik NaOCl konsantrasyonlarını değerlendirdi. %0,5'lik NaOCl'i Er,Cr:YSGG (RFT2 fiber uç, 1W, 10Hz ve 140µsn) lazer ile 60 sn süreyle aktive etti ve %5'lik NaOCl'in geleneksel şırınga irigasyonu yaparak kullandı. Her iki metodu da bakteri eliminasyonunda başarılı buldu. %0,5'lik NaOCl'in LA irigasyonu bakteri eliminasyonunda etkili bulan araştırmacı daha düşük konsantrasyon kullanılırsa periapikal dokularda meydana gelebilecek kazalarda daha az toksik yan etkiler görüleceğini savunmaktadır (Betancourt ve ark., 2019).

Erben ve ark. (2019), Er,Cr:YSGG lazeri (1,25 W, 20 Hz, 60 µsn) hem irigasyon ve (0,25 W, 5 Hz, 60 µsn) hem dezenfeksiyon aşaması olarak *E. faecalis*'e karşı kullandığı çalışmada LA irigasyon için steril su kullanmıştır. Toplamda 16 kez aktive edilmesi ve 5 mL sıvı kullanılması sonucunda sadece % 84,6 oranında bakteri eliminasyonu sağlanmış, diğer bir deyişle % 15,6 oranında sağ kalım bulmuşlardır.

Pozitif kontrol grubu için oluşturdukları ve 3 ml %17'lik EDTA ve 5 ml %5,25'lik NaOCl geleneksel olarak uyguladıklarında ise %99,1 bakteri azalması saptanmıştır (Erben ve ark., 2019).

Fosfatla tamponlanmış salin, steril su gibi doku çözünme özelliği yoktur ve antibakteriyel etki göstermez (Vatkar ve ark., 2016). Ayrıca, diğer solüsyonlarla reaksiyon oluşturmadığı için endodontide yardımcı solüsyon olarak ve iki aktif ajan arasında ara irrigant olarak da kullanılır (Carvalho ve ark., 2008). Salin daha çok araştırmalarda negatif kontrol grubunu oluşturmak üzere tercih edilir.

Dumani ve ark. (2019), *E. faecalis* ile enfekte dişlerde irrigasyon için kalsiyum hipoklorit ($\text{Ca}(\text{OCl})_2$) ile sodyum hipokloriti (NaOCl) kullanarak bakteri eliminasyonunu değerlendirdi. %2,5'lik NaOCl ve %2,5'lik $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ solüsyonları 2 dk süren geleneksel irrigasyon ve Er,Cr:YSGG lazer (12 mm RFT3 uç, 1W, 20Hz, 140 μsn) aktivasyon ile uygulanandı. Distile su hariç hepsi yüksek oranda (%99) antibakteriyel etkinlikte buldu (Dumani ve ark., 2019).

Çalışmamızda, negatif kontrol grubumuzda kullandığımız salin solüsyonunda 5 dk'lık geleneksel irrigasyon sonrası sağ kalımın %7 bulunması ve Er,Cr:YSGG lazer ile (0,75 W, 20 Hz, 140 μsn) 1 dk'lık aktivasyon sonrası sağ kalımın %5 oranında yüksek bulunmasından dolayı normal sudan yada distile sudan farkı olmadığını göstermiştir.

Deney solüsyonlarımızdan biri olan DDW'yun 5 dk'lık geleneksel irrigasyon sonrası sağ kalım %2,4 bulunurken 1 dk'lık LA metodu ile sağ kalım oranı %7 olarak bulunmuştur. DDW'nin bulgularının bakteri üremesini engellemeyecek kadar yüksek bulunması salin solüsyonu gibi etkisiz olduğu şeklinde yorumlanabilir ($p>0.05$). Öte yandan, NaOCl gibi güçlü bir ajandan ve antibakteriyel olduğunu savunduğumuz %3'lük NaB ajanından da etkisiz olduğu bu çalışma ile gösterildi ($p<0,05$). 25 ppm DDW'un hücre yaşam fonksiyonlarını etkileyebilmesine rağmen organik veya inorganik madde üzerinde doku çözücü özellikte olmadığı için etkisiz kaldığı düşünülebilir.

Öte yandan, organizmaları düşük döteryum ortamında canlılık ve metabolizmalarını inceleyen çalışmalar saatler veya günler süren deneyler yaparak adaptasyon sürecini incelemişlerdir (Opitz ve ark., 2019; Cong ve ark., 2010). Bu açıdan bakıldığında 5 dk'nın irrigasyonun için yeterli bir süre olduğunu ancak DDW'yu değerlendirmek için yeterli olmadığını düşünmekteyiz.

Deney solüsyonu olarak çalışmamıza dahil ettiğimiz bazik yapıda bir borat olan sodyum pentaborat pentahidrat (NaB ; $\text{NaB}_5\text{O}_8 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) ajanını %3'lük oranda kullandık. Her iki irrigasyon metodu sonrasında benzer olarak %1'e yakın sağ kalım oranı bulduğumuz ($p>0,05$) ve bakteri üremesi nedeniyle tam bir antibakteriyel etkinlikte olmadığı düşünülebilir. Ek olarak, Er,Cr:YSGG lazer ile (0,75 W, 20 Hz, 140 μsn) 1 dk'lık aktivasyonu %3'lük NaB'ın antimikrobiyal özelliklerini iyileştirmediği şeklinde de yorumlanabilir. Buna rağmen, %0 bakteri üremesi ile tam etkinlik gösteren NaOCl'e kıyasla istatistiksel fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Shakouie ile ark. (2016), tetraasetiletilendiamin ile karıştırarak kullandıkları sodyum perborat ($\text{NaBO}_3 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) ajanını *E. faecalis*'e karşı agar difüzyon testi ile değerlendiren çalışmasında %5'lik NaOCl ile benzer antibakteriyel etkinlikte ve %2,5'lik NaOCl'ten ise daha başarılı bulmuştur (Shakouie ve ark., 2016).

Örneklerimizden dentin talaşı toplayarak mikrodilüsyon testi yaptığımız çalışmamızda, NaOCl daha üstün olmak üzere %3'lük NaB'ın *E. faecalis*'e karşı kısmen başarılı sonuçlar verdiği düşünülebilir. Araştırmamız NaB'ın antibakteriyel özelliğinin endodonti tedavilerinde bir potansiyel olduğunu göstermekle birlikte daha yüksek konsantrasyonlarının araştırılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Çalışmamızın bir diğer değerlendirme konusu olan LA irrigasyon, 2008'de de Groot ve ark. tarafından kök kanalı şeklindeki rezin bloklarda lazer etkileşimli kavitasyon kabarcıklarının görüntülemesinden bu yana araştırması süren bir konudur. Genel olarak subablatif enerji kullanmak gerekliliği, fiber ucun apikalden uzak tutulması ve antibakteriyel özelliklere sahip bir solüsyonun kullanılması gibi ortak görüşler günümüze kadar yapılan araştırmalarla belirlenmiştir. Ancak, erbiyum lazer

ailesi iki dalga boyuna sahip olmasına rağmen üretilen her cihaz için yazılımlar farklılık gösterir. Lazer cihazlarındaki farklılık, fiber uçların çeşitliliği ve kullanım tekniklerindeki farklılıklar gibi nedenlerle çalışmalarda planlanan materyal, metod ve ortaya çıkan sonuçlar dikkatle yorumlanmalıdır.

Çalışmamız benzer olarak, *E. faecalis*'e karşı Er,Cr:YSGG lazer ile (RFT5 uç, 0,75 W, 20 Hz, 140 µsn) 1 dk aktive edilen %5'lik NaOCl'in 5 dk süren geleneksel irrigasyonda da %0 sağ kalım oranı ile başarılı olduğunu ve birbirlerine üstün olmadığını göstermiştir ($p>0,05$).

Hage ve ark. (2019), yeni bir çalışmada sonik aktivasyon (EDDY, VDW, Münih, Almanya), ultrasonik aktivasyon (EndoUltra, MicroMega, Besancon, Fransa) ve PIPS fenomenini karşılaştırdığında CFU verilerinin lazer yönteminde daha düşük olduğunu, ancak, aktivasyon olsun olmasın 3 mL %5,25'lik NaOCl kullanıldığında hiçbir tekniğin tam olarak (%100) bakteri eliminasyonu sağlamadığını bildirdi (Hage ve ark., 2019). Bunun nedeni, solüsyon miktarının düşük olmasından kaynaklanabilir.

Biz çalışmamızda %5 gibi yüksek bir konsantrasyonda NaOCl ve 10 mL kadar yeterli yıkama sağlayacak solüsyon kullandık. Ayrıca, antimikrobiyal etkinliğini NaOCl'e yakın bulduğumuz NaB'nin Er,Cr:YSGG lazer ile (0,75 W, 20 Hz, 140 µsn) 1 dk'lık aktivasyonu (%0,9) ve 5 dk süren geleneksel irrigasyonu (%0,8) benzer ölçüde başarılı olduğu için LA yöntemin solüsyonların etkinliği üzerinde fark yaratmadığı görüşündeyiz ($p>0,05$).

7.3. Mikroskopik Analiz Bulgularına Ait Tartışma

Çalışmamızın ikinci aşamasında CLSM görüntüleme ve analiz incelemesi yapılmıştır. Daha önce anlatıldığı gibi ölü bakteri miktarı, kırmızı alanların taranan toplam diş alanına oranlanması ile yüzde (%) olarak kantitatif verimizi oluşturmaktadır. Veriler özellikle kural, orta ve apikal bölgelerin dentin tübülleri içinde bakteri varlığını değerlendirmek üzere incelenmiştir. Ancak, kültürleme yöntemlerinin sonuçları ile CLSM görüntülerinin birbirini desteklediği gibi düşünülsede sonuçlar

dikkatli değerlendirilmelidir.

Shen ve ark. (2010), CLSM ve mikrodilüsyon yöntemlerini birlikte değerlendiren bir biyofilm çalışmasında, CLSM altında gözlemlenen ve yeşil boyama ile canlı tespit edilen bakterilerin %99' undan fazlasının kültür yöntemi ile büyütülemediğini göstermiştir (Shen ve ark., 2010). Mikroskopik bulgular ile mikrobiyolojik bulgular her zaman örtüşmeyebilir.

Erbiyum lazer dalga boylarının oluşturduğu kavitasyonlar, kök kanalı içinde sıvı dinamiğini geliştirerek foto-akustik darbelere neden olurlar (Blanken ve ark., 2009; Blanken ve ark., 2007; De Moor ve ark., 2009; Matsumoto ve ark., 2011). Bu fotoakustik darbeler, kanal içinden debris uzaklaştırmayı kolaylaştırması veya biyofilm yapısını bozması açısından endodontide faydalı bulunmuştur. LA irrigasyon denen bu işlemin karmaşık kanal yapısından dentin kalıntıları uzaklaştırmada geleneksel şırıngadan 2,6 kat daha etkili olduğu rapor edilmiştir (Yao ve ark., 2017).

Azim ve ark. (2016), dentin tübüllerini inceledikleri çalışmada 50 µm, 100 µm, and 150 µm derinliklerinde bakteri eliminasyonunun sonik uygulamada 50 µm'den sonra gittikçe azaldığını, ancak Er:YAG (PIPS, 20 mJ, 15 Hz, 50 µsn) ile yapılan LA irrigasyonun derinlerde etkili olmaya devam ettiğini bildirmiştir (Azim ve ark., 2016).

Cheng ve ark. (2017), 5 mL %5'lik NaOCl solüsyonu geleneksel şırınga ve ultrasonik cihaz ile yaklaşık 60 sn süresince uyguladığı çalışmada, 30 sn süren Er:YAG (PIPS, 20mJ, 25 Hz, 50 µsn) ile aktivasyonu karşılaştırdı. SEM görüntüleri ile *E. faecalis* biyofilmini uzaklaştırma etkinliğini değerlendirdikleri sonuçlara göre LA metodu bakteri uzaklaştırmada diğerlerine kıyasla çok daha başarılı olmuştur (Cheng ve ark., 2017).

Ordinola-Zapata ve ark. (2014), SEM ile görüntüledikleri kanal çeperinden *E. faecalis* biyofilmini uzaklaştırmak için %6' lık NaOCl'in 1 dk süren Er:YAG (PIPS, 20mJ, 25 Hz, 50 µsn) aktivasyonunu geleneksel şırınga ile irrigasyonunu göre çok daha başarılı bulmuştur (Ordinola-Zapata ve ark., 2014).

Çalışmamızdan farklı olarak bu araştırmalarda 100 µsn'den kısa atım süresi kullanılmış ve daha yüksek pik enerji elde edilmiştir. Waterlase MD (Er,Cr:YSGG) lazer cihazı en düşük 140 µsn atım süresine sahiptir. Bu nedenle, enerji 50 µsn atım süresinin oluşturacağı pik seviyede değildir. Ayrıca, biz çalışmamızda dentin tübüllerini CLSM görüntüleri ile incelerken, bu çalışmalarda kanal duvarlarından biyofilm uzaklaştırma etkinliği SEM ile değerlendirmiştir.

Alamoudi ve ark. (2018), 20 derece eğimli kanalı taklit edecek rezin blok içine %0,3'lük kırmızı fuesin boyanın apikalden uzaklaştırmasında 50 µsn atım süresi olan Waterlase iplus Er,Cr:YSGG lazer cihazı ile 3 sn süren farklı parametrelerde aktive ederek değerlendirmiştir. RFT2 fiber ucu apeksten 4mm uzakta kanal içinde hareketlendirdiği ve aktive (1W, 50 Hz, 20 mJ) ettiği zaman en iyi performansı %80 oranında bulmuştur (Alamoudi ve ark., 2018).

Meire ve ark. (2016), kullanılan fiber uç şekli ve çapı debris uzaklaştırma işlevini etkilemediği, ancak, yüksek enerji, kısa atım süresi, güçlü frekans, radyasyonun yeteri kadar sürmesi ve fiber ucun bölgeye yakınlığı gibi şartların ayrıca etkili olduğunu belirtmektedir (Meire ve ark., 2016).

Çalışmamız, ilk olarak her solüsyon için LA metodunun G irrigasyondan farklı davranarak dentin tübüllerinden daha etkili bakteri uzaklaştırdığını gösterdi ($p<0,001$). Bulgularımız, lazer etkileşimli fotoakustik darbelerinin dentin tübüllerinden bakteri uzaklaştırmayı kolaylaştırdığını düşündürmektedir.

Sahar-Helft ve ark. (2013), %17 EDTA, %2 CHX ve salin solüsyonlarını Er:YAG ile aktive etmiştir. *E faecalis* biyofilmini uzaklaştırma etkinliğinin SEM görüntüleri ile değerlendirdiği bu çalışmada %17'lik EDTA'nın diğerlerine göre başarılı olduğu bulunmuştur. Araştırmacı, bu sonuçla LA metodun solüsyonların özelliklerini değiştirmediğini vurgulamaktadır (Sahar-Helft ve ark., 2013).

Küçük ve Kermeoğlu (2019), %0,01 floresan rodamin boyası karıştırılan her biri

5 mL'lik farklı solüsyonların Er,Cr:YSGG (RFT2, 1.25 W, 20 Hz, 25 mJ, 140 μ sn) ile yaklaşık 60 sn süren aktivasyonunu geleneksel şırınga ve ultrasonik aktivasyon ile karşılaştırdı. Orta ve apikal bölgede üstünlük göstermeyen sonuçları dentin penetrasyonunun solüsyon özelliklerine bağlı olduğu şeklinde yorumlamışlardır (Kucuk ve Kermeoglu, 2019).

Solüsyonların başarısı incelendiğinde CFU verilerinden bağımsız ve benzer olarak NaOCl en başarılı ajan olarak karşımıza çıkmaktadır. Er,Cr:YSGG lazer ile (0,75 W, 20 Hz, 140 μ sn) 1 dk'lık aktivasyonu yapılan NaOCl'in kuronal, orta ve apikal bölgelerde NaB ve DDW'a kıyasla bakteri uzaklaştırmada daha başarılı olduğu bulunmuştur ($p<0,05$). Bu bulgu lazer radyasyonunun ajanların kimyasal özelliklerini iyileştirmedigini ancak temas kabiliyetini arttırdığını desteklemektedir.

Geleneksel irrigasyonda kuronal, orta ve apikal bölgelerde salinden çok daha başarılı bulunan NaOCl ($p>0,001$), lazer etkileşimde sadece orta bölgede salinden başarılı olmuştur ($p>0,05$). Ancak, NaB ve DDW solüsyonlarının bakteri uzaklaştırması kuronal, orta ve apikal bölgelerde her iki irrigasyon arasında birbirinden üstün bulunmamıştır ($p>0,05$).

Bulgularımız solüsyonların etkinlik sıralamasının bölgelere göre fark yaratmadığını göstermiştir ($p>0,05$). Ancak, detaylı incelendiğinde solüsyonlarda bölgesel fark olduğu ortaya çıkmaktadır. Örneğin, NaOCl-LA grubunda kuronal ve apikalde etkili bir bakteri uzaklaştırmasının yanı sıra ($p<0,05$), orta bölgedeki başarısı çok daha etkili olmuştur ($p<0,001$). Benzer şekilde, NaB, G metoduna kıyasla LA irrigasyonda kuronal ve apikalde de etkili olduğu ($p<0,05$), ancak, orta bölgede çok daha etkili olduğu bulunmuştur ($p<0,006$).

Bölgelerin alt inceleme sonuçları orta bölgede daha fazla bakteri uzaklaştırma sağlandığını göstermektedir. Bu durum fiber ucun lokalizasyonunun önemli olduğu sonucuna varılabilir. Çalışmamızda, çevresel saçılım yapabilen 500 μ m çapında 14 mm'lik bir fiber uç kanal içinde yukarı aşağı hareketlendirilerek kullanılmıştır. Yukarı aşağı hareket edildiği için 2 mm'den daha fazla ilerlediği ve bu yüzden orta kısımların

kavitasyon darbelerinden daha fazla etkilendiği düşünülebilir. Ayrıca, solüsyonun kanal dışına doğru akışı tübüllere penetre olan bakterileri uzaklaştırmada kavitasyon kadar güçlü olmadığını ve fiber ucun kural bölge hizasında çalışmaması olabilir.

Çalışmamızda, antibakteriyel etkisini saptamadığımız DDW'yun Er,Cr:YSGG lazer (0,75 W, 20 Hz, 140 μ sn) ile 1 dk'lık aktivasyonunda kural ve orta bölgede etkili bir şekilde bakteri uzaklaştırıldığı ($p<0,05$), ancak, apikal bölgede bu başarının azaldığı tespit edildi ($p>0,05$).

Sippus ve Gutknecht (2019), Er:YAG lazer cihazına ait PIPS ve Preciso uçlarını kullanarak salin solüsyonunu aktive ettikleri çalışmada fiber ucun ulaşmadığı apikal bölgeden smear tabakasını uzaklaştırmada etkili bulmamıştır (Sippus ve Gutknecht, 2019).

Çalışmamızda, salin solüsyonunun Er,Cr:YSGG lazer (0,75 W, 20 Hz, 140 μ sn) ile 1 dk'lık aktivasyonu kural, orta ve apikal bölgelerdeki bakteri uzaklaştırma başarısı benzer şekilde etkili bulundu ($p>0,05$). İrrigasyon tekniklerinin smear tabakasını kanal çeperinden uzaklaştırması ile dentin tübüllerinden bakteri uzaklaştırma etkinlikleri farklı değerlendirmek gerekebilir.

Erben ve ark. (2019), kök kanallarının apikale doğru daralmasından dolayı çevresel lazer radyasyonu yayan konik uçların kanal duvarına orta bölgelerde daha çok yaklaştığını ancak apikale doğru yayılım yapmadığı için apikalin orta bölgeden daha az etkilemesi olarak yorumlar (Erben ve ark, 2019).

8. SONUÇLAR

8.1. Mikrodilüsyon Testi Sonuçları

1. %5'lik NaOCl, %0 sağ kalım oranı göstererek *E faecalis*'e karşı yüksek antibakteriyel etkinliğini kanıtladı.
2. %3 NaB, %1'den düşük sağ kalım oranı ile *E faecalis*'e karşı NaOCl'e yakın antibakteriyel etkinlik gösterdi.
3. 25 ppm'lik DDW, %1'den yüksek sağ kalım oranı ile *E faecalis*'e karşı etkili bulunmadı.
4. Er,Cr:YSGG ile yapılan aktivasyon sonucunda her üç solüsyonun da- antibakteriyel etkinliği üzerinde fark yaratmadığı gözlemlendi.
5. Solüsyonların antibakteriyel etkinliği en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla NaOCl, NaB, DDW ve Salin olarak bulundu.

8.2. Mikroskopik Görüntü Analiz Sonuçları

1. Er,Cr:YSGG ile yapılan aktivasyon dentin tübüllerinden bakteri uzaklaştırılmada geleneksel şırınga irrigasyonundan daha başarılı oldu.
2. Lazer aktivasyonu, kural ve apikal bölgelere kıyasla fiber ucun yakın konumlandığı orta bölgede daha fazla bakteri uzaklaştırdı.
3. Solüsyonların bakteri uzaklaştırma etkinliği en yüksekten düşüğe doğru sırasıyla NaOCl, NaB, Salin ve DDW olarak saptandı.

Sonuç olarak; Er,Cr:YSGG lazer ile solüsyonların aktivasyonun dentin tübüllerindeki bakterilerin uzaklaştırılmasında etkin bir araç olduğu ve kullanılan fiber ucun bölgeye yakınlığı bu etkiyi arttırdığı söylenebilir. Ancak, dişin bütünüyle kıyaslandığında CLSM görüntüleme yönteminde taranan bölge noktasaldır ve bu nedenle değerlendirmenin sınırlı bir alan için yapıldığı göz önünde tutulmalıdır.

Deney solüsyonlarından NaB'ın umut verici bulguları *E faecalis*'e karşı NaOCl kadar etkili bir antimikrobiyal ajan olabileceğini göstermiştir. Daha yüksek konsantrasyonlardaki etkinliği yeni çalışmalarla araştırılmasını düşünmekteyiz.

Çalışmamız *in-vitro* bir çalışma olduğundan *in vivo* koşulları yani normal ağız florasında bulunan mikroorganizmaların çeşitliliğinden kaynaklanan kök kanal sistemindeki muhtemel patojenler ve multibiyofilm ortamını tam olarak yansıtmamış

olabilir. NaB'ın kök kanal sistemini etkileyen farklı patojenlere karşı antimikrobiyal etkinliğinin daha detaylı çalışmalarda değerdendirilmesi gerekir.

Çalışmamız, NaB'ın kök kanal tedavilerinde yer alabilecek yeni bir irrigant olabileceğini, DDW'un ise bu alanda başarılı olmadığını göstermiştir. Ancak, bor bileşiklerinin dental alanda kullanımını destekleyecek daha çok araştırmaya ihtiyaç vardır.



9. KAYNAKLAR

Abou-Rass M, Oglesby SW. The effects of temperature, concentration, and tissue type on the solvent ability of sodium hypochlorite. J Endod. 1981; 7:376 –7.

Agarwal A, Deore RB, Rudagi K, Nanda Z, Baig MO, Faree MA. Evaluation of apical vapor lock formation and comparative evaluation of its elimination using three different techniques: an in vitro study. J Contemp Dent Pract. 2017; 18: 790-94.

Ahmad M, Ford TRP, Crum LA. Ultrasonic debridement of root canals: an insight into the mechanisms involved. J Endod. 1987; 13: 93-101.

Alamoudi G, Haidary D, Gutknecht N. Effects of Er, Cr: YSGG laser and radial firing tips in dye removal from simulated curved canals: visualization study. Laser Dent Sci. 2018; 3: 31-36.

Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, Garcia E, Duarte MAH, Bramante CM, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. Int Endod J. 2015; 48: 1188-93.

Arsilan H, Akcay M, Capar ID, Ertas H, Ok E, Uysal B. Efficacy of needle irrigation, EndoActivator, and photon-initiated photoacoustic streaming technique on removal of double and triple antibiotic pastes. J Endod. 2014; 40: 1439-42.

Ávila DS, Somlyai G, Somlyai I, Aschner M. Anti-aging effects of deuterium depletion on Mn-induced toxicity in a C. Elegans Model. Toxicol Lett. 2012; 211: 319– 324.

Aydin S, Demirci S, Dogan A, Sagrac D, Kasikci E, Sahin F. Boron containing compounds promote the survival and the maintenance of pancreatic beta-cells. Mol

Biol Rep. 2019; 46: 5465-78.

Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT. Efficacy of 4 irrigation protocols in killing bacteria colonized in dentinal tubules examined by a novel confocal laser scanning microscope analysis. J Endod. 2016; 42: 928-34.

Bailey PJ, Cousins G, Snow GA, White AJ. Boron-containing antibacterial agents: effects on growth and morphology of bacteria under various culture conditions. Antimicrob Agents Chemother. 1980;17: 549-53.

Balouiri M, Sadiki M, Ibensouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016; 6: 71-79.

Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJD, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. J Endod. 2005; 31: 613-15.

Basmadjian-Charles CL, Farge P, Bourgeois DM, Lebrun T. Factors influencing the long-term results of endodontic treatment: a review of the literature. Int Dent J. 2002; 52: 81-6.

Basov A, Fedulova L, Baryshev M, Dzhimak S. Deuterium-depleted water influence on the isotope (2)H/(1)H regulation in body and individual adaptation. Nutrients. 2019; 11: 1903.

Basrani B, Malkhassian G. Update of endodontic irrigating solutions. In Endodontic Irrigation. 2015; pp: 99-115. Springer, Cham.

Bauer-Kreisel P, Eisenbeis M, Scholz-Muramatsu H. Quantification of dehalospirillum multivorans in mixed-culture biofilms with an enzyme-linked immunosorbent assay. Appl Environ Microbiol. 1996; 62(8):3050–3052

Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod. 1997; 23: 725-27.

Betancourt P, Merlos A, Sierra JM, Camps-Font O, Arnabat-Dominguez J, Vinas M. Effectiveness of low concentration of sodium hypochlorite activated by Er, Cr: YSGG laser against *Enterococcus faecalis* biofilm. Lasers Med Sci. 2019; 34: 247-54.

Blanken J, De Moor RJG, Meire M, Verdaasdonk R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 1: a visualization study. Lasers Surg Med. 2009; 41: 514-19.

Blanken JW, Verdaasdonk RM. Cavitation as a working mechanism of the Er,Cr:YSGG laser in endodontics: a visualization study. J Oral Laser Appl. 2007; 7(2).

Bonilla I, Garcia-González M, Mateo P. Boron requirement in cyanobacteria: its possible role in the early evolution of photosynthetic organisms. Plant Physiology. 1990; 94: 1554-60.

Boros LG, D'Agostino DP, Katz HE, Roth JP, Meuillet EJ, Somlyai G. Submolecular regulation of cell transformation by deuterium depleting water exchange reactions in the tricarboxylic acid substrate cycle. Med Hypothesis. 2016; 87:69-74.

Boutsioukis C, Verhaagen B, Versluis M, Kastrinakis E, Wesselink PR, van der Sluis LW. Evaluation of irrigant flow in the root canal using different needle types by an unsteady computational fluid dynamics model. J Endod. 2010; 36: 875-9.

Briggs M. Boron Oxides, Boric Acid, and Borates. In: Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 2001.

Bronnec F, Bouillaguet S, Machtou P. Ex vivo assessment of irrigant penetration and renewal during the final irrigation regimen. Int Endod J. 2010; 43:663-672.

Bryce G, O'Donnell D, Ready D, Ng Y, Gulabivala JP. Contemporary root canal irrigants are able to disrupt and eradicate single-and dual-species biofilms. *J Endod.* 2009; 35: 1243-48.

Brunson M, Heilborn C, Johnson DJ, Cohenca N. Effect of apical preparation size and preparation taper on irrigant volume delivered by using negative pressure irrigation system. *J Endod.* 2010; 36, 721–4.

Cameron CE. The cracked tooth syndrome: additional findings. *J Am Dent Assoc.* 1976; 93: 971-5.

Carrilho, MR, Carvalho RM, Sousa EN, Nicolau J, Breschi L, Mazzoni A, Tjaderhane L, Tay FR, Agee K, Pashley DH. Substantivity of chlorhexidine to human dentin. *Dent Mater.* 2010; 26: 779-85.

Carvalho AS, Camargo CH, Valera MC, Camargo SE, Mancini MN. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod.* 2008; 34: 1396-400.

Chandra SS, Shankar P, Indira R. Depth of penetration of four resin sealers into radicular dentinal tubules: a confocal microscopic study. *J Endod.* 2012; 38: 1412-16.

Charara K, Friedman S, Sherman A, Kishen A, Malkhassian G, Khakpour M, Basrani B. Assessment of apical extrusion during root canal irrigation with the novel gentlewave system in a simulated apical environment. *J Endod.* 2016; 42: 135-9.

Chen JE, Nurbakhsh B, Layton G, Bussmann M, Kishen A. Irrigation dynamics associated with positive pressure, apical negative pressure and passive ultrasonic irrigations: a computational fluid dynamics analysis. *Aust Endod J.* 2014; 40: 54-60.

Chen X, Stewart PS. Role of electrostatic interactions in cohesion of bacterial biofilms. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002a; 59: 718-20.

Chen X, Schauder S, Potier N, Van Dorsselaer A, Pelczar I, Bassler BL, Hughson FM. Structural identification of a bacterial quorum-sensing signal containing boron. *Nature*. 2002b; 415: 545-9.

Cheng X, Xiang D, He W, Qiu J, Han B, Yu Q, Tian Y. Bactericidal effect of Er:YAG laser-activated sodium hypochlorite irrigation against biofilms of *Enterococcus faecalis* isolate from canal of root-filled teeth with periapical lesions. *Photomed Laser Surg*. 2017; 35: 386-92.

Christo JE, Zilm PS, Sullivan T, Cathro PR. Efficacy of low concentrations of sodium hypochlorite and low-powered Er,Cr:YSGG laser activated irrigation against an *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int Endod J*. 2016; 49: 279-86.

Claxton NS, Fellers TJ, Davidson MW. Laser scanning confocal microscopy. Department of Optical Microscopy and Digital Imaging, Florida State University, Tallahassee. 2006.

Cong FS, Zhang YR, Sheng HC, Ao ZH, Zhang SY, Wang JY. Deuterium-depleted water inhibits human lung carcinoma cell growth by apoptosis. *Exp Ther Med*. 2010; 1: 277-83.

Costerton JW. The biofilm primer. Springer Science and Business Media. 2007; Vol. 1.

Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284: 1318-22.

Cotter JL, Fader RC, Lilley C, Herndon DN. Chemical parameters, antimicrobial activities, and tissue toxicity of 0.1 and 0.5% sodium hypochlorite solutions. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985; 28: 118-22.

Culhaoglu AK, Ozcan E, Kilicarslan MA, Seker E. Effect of boric acid versus conventional irrigation solutions on the bond strenght between fiber post and root dentin. *J Adhes Dent*. 2017; 19, 137-146.

de Beer D, Stoodley P, Lewandowski Z. Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol Bioeng*. 1994; 44:636–641.

de Gregorio C, Estevez R, Cisneros R, Heilborn C, Cohenca N. Effect of EDTA, sonic, and ultrasonic activation on the penetration of sodium hypochlorite into simulated lateral canals: an in vitro study. *J Endod*. 2009; 35: 891-95.

de Groot SD, Verhaagen B, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR, van der Sluis LW. Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualization. *Int Endod J*. 2009; 42: 1077-83.

De Moor RJ, Blanken J, Meire M, Verdaasdonk R. Laser induced explosive vapor and cavitation resulting in effective irrigation of the root canal. Part 2: evaluation of the efficacy. *Lasers Surg Med*. 2009; 41: 520-3.

De Moor RJ, Meire M, Goharkhay K, Moritz A, Vanobbergen J. Efficacy of ultrasonic versus laser-activated irrigation to remove artificially placed dentin debris plugs. *J Endod*. 2010; 36: 1580-3.

de Paz LEC, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod*. 2010; 36: 70-77.

de Paz LEC, Sedgley CM, Kishen A. The root canal biofilm. Springer. 2015; Vol. 9.

De Seta F, Schmidt M, Vu B, Essmann M, Larsen B. Antifungal mechanisms supporting boric acid therapy of *Candida vaginitis*. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 63: 325-36.

del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MAH, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, Bernardineli N, Andrade FB, Ordinola-Zapata R. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod.* 2011; 37: 1134-38.

Dembitsky VM, Al Quntar A, Srebnik M. Natural and synthetic small boron-containing molecules as potential inhibitors of bacterial and fungal quorum sensing. *Chemical Reviews.* 2010; 111: 209-37.

Demirci S, Kaya MS, Doğan A, Kalay Ş, Altın NÖ, Yarat A, Akyüz S, Şahin F. Antibacterial and cytotoxic properties of boron-containing dental composite. *Turkish Journal of Biology.* 2015; 39: 417-26.

Demirci S, Dogan A, Aydin S, Dulger EC, Sahin F. Boron promotes streptozotocin-induced diabetic wound healing: roles in cell proliferation and migration, growth factor expression and inflammation. *Mol Cell Biochem.* 2016; 417: 119-33.

Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Euro J Dent.* 2018; 12: 459-66.

Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod.* 2002; 28: 689-93.

DiVito E, Peters OA, Olivi G. Effectiveness of the erbium: YAG laser and new design radial and stripped tips in removing the smear layer after root canal instrumentation. *Laser Med Sci.* 2012; 27: 273-80.

Dogan A, Demirci S, Caglayan AB, Kilic E, Gunal MY, Uslu U, Cumbul A, Sahin F. Sodium pentaborate pentahydrate and pluronic containing hydrogel increases cutaneous wound healing in vitro and in vivo. *Biol Trace Elem Res.* 2014; 162: 72-9.

Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. Clin Microbiol Rev. 2002; 15: 167-93.

Dumani A, Tanrisever D, D Sihay, SB Kuzu, S Yilmaz, HK Guvenmez. Efficacy of calcium hypochlorite with and without Er, Cr: Yttrium, scandium, gallium, garnet laser activation on *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canals. Nigerian journal of clinical practice. 2019; 22: 215.

Dzhimak SS, Basov AA, Baryshev MG. Content of deuterium in biological fluids and organs: Influence of deuterium depleted water on D/H gradient and the process of adaptation. Dokl Biochem Biophys. 2015; 465: 370-3.

Erben P, Chang AM, Darveau RP, Fong H, Johnson JD, Paranjpe A. Evaluation of the bactericidal potential of 2780-nm ER, CR: YSGG and 940-nm diode lasers in the root canal system. Laser Dent Sci. 2019; 3: 137-46.

Esenaliev RO, Oraevsky AA, Letokhov VS, Karabutov AA, Malinsky TV. Studies of acoustical and shock waves in the pulsed laser ablation of biotissue. Lasers Surg Med. 1993; 13: 470-84.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spano JC, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. Braz Dent J. 2002; 13: 113-7.

Ferreira FBA, AL Ferreira, Gomes BPFA, Souza-Filho FJ. Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. Int Endod J. 2004; 37: 61-69.

Flach N, Bottcher DE, Parolo CC, Firmino LB, Malt M, Lammers ML, Grecca FS. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. Scanning. 2016; 38: 57-62.

Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Auffray Y. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross-protection, and changes in protein synthesis. Appl Environ

Microbiol. 1997; 63: 812-4.

Flaumenhaft E, Bose S, Crespi HL, Katz JJ. Deuterium isotope effects in cytology. Int. Rev. Cytol. 1965; 18, 313-361.

Flemming HC, Wingender J. The biofilm matrix. Nat Rev Microbiol. 2010; 8: 623-33.

Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U. (Eds.). Biofilm highlights. Springer Science & Business Media. 2011; Vol. 5.

Fukumoto Y, Kikuchi I, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. An ex vivo evaluation of a new root canal irrigation technique with intracanal aspiration. Int Endod. 2006; 39:93–99.

Gao Y, Haapasalo M, Shen Y, Wu H, Li B, Ruse ND, Zhou X. Development and validation of a three-dimensional computational fluid dynamics model of root canal irrigation. J Endod. 2009; 35: 1282-87.

García-Herráiz A, Leiva-García R, Silvestre FJ, García-Antón J. Applications of Confocal Laser Scanning Microscopy in Dentistry. Study of the changes of the post-extraction sites. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology. 2012; 569-581.

Gaboriaud F, Dufrene YF. Atomic force microscopy of microbial cells: application to nanomechanical properties, surface forces and molecular recognition forces. Colloids Surf B: Biointerfaces. 2007; 54(1):10–19

George S, Kishen A, Song P. The Role of Environmental Changes on Monospecies Biofilm Formation on Root Canal Wall by *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2005; 31: 867-72.

George R, Meyers IA, Walsh LJ. Laser activation of endodontic irrigants with

improved conical laser fiber tips for removing smear layer in the apical third of the root canal. J Endod. 2008; 34: 1524-7.

George R, Walsh LJ. Apical extrusion of root canal irrigants when using Er:YAG and Er,Cr:YSGG lasers with optical fibers: an in vitro dye study. J Endod. 2008; 34: 706-8.

Görgülü AO, Arslan M. Alternatif Bor Bileşikleri. Balıkesir Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi. 2003; 5: 42-50.

Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. J Endod. 2009; 35: 791-804.

Gulabivala K, Ng YL, Gilbertson M, Eames I. The fluid mechanics of root canal irrigation. Physiological Measurement. 2010; 31;12; R49.

Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. Endodontic Topics. 2005; 10: 103-22.

Gutknecht N, Van Betteray C, Ozturan S, Vanweersch L, Franzen R. Laser supported reduction of specific microorganisms in the periodontal pocket with the aid of an Er, Cr: YSGG laser: a pilot study. The Scientific World Journal. 2015.

Gyöngyi Z, Budan F, Szabo I, Ember I, Kiss I, Krempels K, Somlyai I, Somlyai G. Deuterium depleted water effects on survival of lung cancer patients and expression of Kras, Bcl2, and Myc genes in Mouse lung. Nutr Cancer. 2013; 65(2):240-246.

Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987; 66: 1375-9.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil JM. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endodontic Topics. 2005; 10: 77-102.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*. 2014a; 216: 299-303.

Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, Curtis A, Patel P, Khakpour M. Tissue dissolution by a novel multisonic ultracleaning system and sodium hypochlorite. *J Endod*. 2014b; 40: 1178-81.

Haapasalo M, Wang Z, Shen Y, Park E, Curtis A, Patel P, Vandrangi P. Apical pressure created during irrigation with the GentleWave™ system compared to conventional syringe irrigation. *Clinical oral investigations*. 2016; 20; 7: 1525-34.

Hage W, De Moor RJG, Hajj D, Sfeir G, Sarkis DK, Zogheib C. Impact of Different Irrigant Agitation Methods on Bacterial Elimination from Infected Root Canals. *Dent J (Basel)*. 2019; 7: 64.

Hale GM, Querry MR. Optical constants of water in the 200-nm to 200-μm wavelength region. *Applied Optics*. 1973; 12: 555-63.

Hartke A, Lemarinier S, Pichereau V, Auffray Y. Survival of *Enterococcus faecalis* in seawater microcosms is limited in the presence of bacterivorous zooflagellates. *Current Microbiol*. 2002; 44: 329-35.

Hasegawa T, Takenaka S, Wakamatsu R, Ohsumi T, Domon H, Ohshima H, Terao Y, Noiri Y. A horizontal sequential cutting method to estimate the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2019; 45: 1142-47.

Haulica I, Peculea M, Stefanescu I, Titescu G, Todiras M, Bild W. Effects of heavy and deuterium-depleted water on vascular reactivity. *Rom J Physiol*. 1998; 35:25-32.

He Y, Peterson BW, Jongsma MA, Ren Y, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC. Stress relaxation analysis facilitates a quantitative approach towards antimicrobial penetration into biofilms. *PloS one*. 2013; 8(5).

Henninger E, Berto LA, Eick S, Lussi A, Neuhaus KW. In Vitro Effect of Er:YAG Laser on Different Single and Mixed Microorganisms Being Associated with Endodontic Infections. *Photobiomodul Photomed Laser Surg*. 2019; 37: 369-75.

Hope CK, Garton SG, Wang Q, Burnside G, Farrelly PJ. A direct comparison between extracted tooth and filter-membrane biofilm models of endodontic irrigation using *Enterococcus faecalis*. *Arch Microbiol*. 2010; 192: 775-81.

Huang TY, Gulabivala K, Ng YL. A bio-molecular film ex-vivo model to evaluate the influence of canal dimensions and irrigation variables on the efficacy of irrigation. *Int Endod J*. 2008; 41: 60-71.

Hülsmann M, W Hahn. Complications during root canal irrigation—literature review and case reports. *Int Endod J*. 2000; 33: 186-93.

Hülsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endodontic Topics*. 2005; 10: 30-76.

Iandolo A, Dagna A, Poggio C, Capar I, Amato A, Abdellatif D. Evaluation of the actual chlorine concentration and the required time for pulp dissolution using different sodium hypochlorite irrigating solutions. *J Cons Dent*. 2019; 22(2), 108.

Iyigundogdu ZU, Demir O, Asutay AB, Sahin F. Developing novel antimicrobial and antiviral textile products. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2017; 181(3), 1155-1166.

Jacobs RT, Plattner JJ, Keenan M. Boron-based drugs as antiprotozoals. *Curr Opin Infect Dis*. 2011; 24(6), 586-592.

Jensen SA, Walker TL, Hutter JW, Nicoll BK. Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root canals. *J Endod.* 1999; 25:735–738.

Jardine AP, Da Rosa RA, Santini MF, Wagner M, Só MVR, Kuga MC, Kopper PMP. The effect of final irrigation on the penetrability of an epoxy resin-based sealer into dentinal tubules: a confocal microscopy study. *Clinical oral investigations.* 2016; 20, 117-123.

Jeansonne MJ, White RR. Comparison of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994; 20:276–278.

Jiang LM, Lak B, Eijsvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LW. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod.* 2012; 38: 838-41.

Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, Van Der Sluis LW. Evaluation of a sonic device designed to activate irrigant in the root canal. *J. Endod.* 2010; 36, 143–146.

Kalayci S, Demirci S, Sahin F. Determination of antimicrobial properties of picaridin and DEET against a broad range of microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol.* 2014; 30: 407-11.

Kanoriya D, Singhal S, Garg V, Pradeep AR, Garg S, Kumar A. Clinical efficacy of subgingivally-delivered 0.75% boric acid gel as an adjunct to mechanotherapy in chronic periodontitis: A randomized, controlled clinical trial. *J Invest Clinic Dent.* 2018; 9: e12271.

Katz JJ, Crespi HL. Deuterated organisms: cultivation and uses. *Science.* 1966; 151: 1187-94.

Khademi A, Yazdizadeh M, Feizianfard M. Determination of the minimum instrumentation size for penetration of irrigants to the apical third of root canal

systems. J Endod. 2006; 32: 417-20.

Kirsch J, Basche S, Neunzehn J, Dede M, Dannemann M, Hannig C, Weber MT. Is it really penetration? Locomotion of devitalized *Enterococcus faecalis* cells within dentinal tubules of bovine teeth. Archives of Oral Biology. 2017; 83: 289-96.

Kishen A, George S, Kumar R. *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. J Biomed Mater Res. 2006; 77(2):406–415.

Kishen A. Advanced therapeutic options for endodontic biofilms. Endodontic Topics. 2010; 22: 99-123.

Kishen A, Haapasalo M. Laboratory Models of Biofilms: Development and Assessment. In: The Root Canal Biofilm. Springer. Berlin; Heidelberg; 2015, p:127-154.

Kitazawa K, Ikezoe Y, Uetake H, Hirota N. Magnetic field effects on water, air and powders. Physica B: Condensed Matter. 2001; 294, 709-714.

Kite P, Eastwood K, Sugden S, Percival SL. Use of in vivo-generated biofilms from hemodialysis catheters to test the efficacy of a novel antimicrobial catheter lock for biofilm eradication in vitro. J Clin Microbiol. 2004; 42: 3073-76.

Kovács A, Guller I, Krempels K, Somlyai I, Jánosi I, Gyomgyi Z, Szabó I, Ember IGS. Deuterium depletion may delay the progression of prostate cancer. J Cancer Ther. 2011; 2, 548–556.

Kreth J, Herzberg MC. Molecular principles of adhesion and biofilm formation. In: The root canal biofilm. Springer, Berlin, Heidelberg. 2015; 23-53.

Kucuk M, Kermeoglu F. Efficacy of different irrigation methods on dentinal tubule

penetration of Chlorhexidine, QMix and Irritrol: A confocal laser scanning microscopy study. Aust Endod J. 2019; 45: 202-08.

Langeland K. Tissue response to dental caries. Endod Dent Traumatol. 1987; 3: 149-171.

Laskay G, Somlyai G, Jancsó G. Reduced deuterium concentration of water stimulates O₂-uptake and electrogenic H⁺-efflux in the aquatic macrophyte *Elodea canadensis*. Jpn J Deuterim Sci. 2001; 10(1), 17-23.

Lee HA, Wyatt GM, Bramham SARA, Morgan MR. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day *Salmonella* detection. Appl Environ Microbiol. 1990; 56(6),1541-1546.

Lisitsyn AB, Baryshev MG, Basov AA, Barysheva EV, Bykov IM, DyDykin AS, Tekutskaia EE, Timakov AA, Fedulova LV, Chernukha IM, Dzhimak SS. Influence of deuterium depleted water on the organism of laboratory animals in various functional conditions of nonspecific protective system. Biofizika. 2014; 59(4):757-765.

Love RM. *Enterococcus faecalis*– a mechanism for its role in endodontic failure. Int Endod J. 2001; 34: 399-405.

Luan Q, Desta T, Chehab L, Sanders VJ, Plattner J, Graves DT. Inhibition of experimental periodontitis by a topical boron-based antimicrobial. Journal of Dental Research. 2008; 87: 148-152.

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

Macedo RG, PR Wesselink, F Zaccheo, D Fanali, LWM Van Der Sluis. Reaction rate

of NaOCl in contact with bovine dentine: effect of activation, exposure time, concentration and pH. *Int Endod J*. 2010; 43: 1108-15.

Macedo RG, Verhaagen B, Wesselink, PR, Versluis M, van der Sluis LWM. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J*. 2014a; 47: 147-54.

Macedo R, Verhaagen B, Rivas DF, Versluis M, Wesselink P, van der Sluis L. Cavitation measurement during sonic and ultrasonic activated irrigation. *J Endod*. 2014b; 40: 580-3.

Mah TF, Pitts B, Pellock B, Walker GC, Stewart PS, O'toole GA. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*. 2003; 426, 306-310.

Maiman TH. Stimulated optical radiation in ruby. *Nature*. 1960; 187: 493-94.

Majors PD, McLean JS, Pinchuk GE, Fredrickson JK, Gorby YA, Minard KR, Wind RA. NMR methods for in situ biofilm metabolism studies. *J Microbiol Methods*. 2005; 62:337–344

Malentacca A, Uccioli U, Zangari D, Lajolo C, Fabiani C. Efficacy and safety of various active irrigation devices when used with either positive or negative pressure: an in vitro study. *J Endod*. 2012; 38: 1622-26.

Martin H. Ultrasonic disinfection of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976; 42: 92-99.

Matsumoto H, Yoshito Y, Akifumi A. Visualization of Irrigant Flow and Cavitation Induced by Er:YAG Laser within a Root Canal Model', *J Endod*. 2011; 37: 839-43.

Mattila-Sandholm TW, Wirtanen G. Biofilm formation in the industry: a review. *Food*

Rev. 1992; Int 8:573–603.

McAllister TA, Bae HD, Jones GA, Cheng KJ. Microbial attachment and feed digestion in the rumen. *J Anim Sci.* 1994; 72: 3004–3018

McBain AJ. Chapter 4: in vitro biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol.* 2009; 69:99–132

McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999; 12: 147-79.

Meire MA, Poelman D, De Moor RJ. Optical properties of root canal irrigants in the 300-3,000-nm wavelength region. *Lasers Med Sci.* 2014; 29: 1557-62.

Meire MA, Havelaerts S, De Moor RJ. Influence of lasing parameters on the cleaning efficacy of laser-activated irrigation with pulsed erbium lasers. *Laser Med Sci.* 2016; 31: 653-58.

Mitchell RP, Yang SE, Baumgartner JC. Comparison of apical extrusion of NaOCl using the EndoVac or needle irrigation of root canals. *J Endod.* 2010; 36, 338-341.

Mladin C, Ciobica A, Lefter R, Popescu A, Bild W. Deuterium depleted water has stimulatig effects on long-term memory in rats. *Neurosci Lett.* 2014; 583:154-158.

Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Australian Endodontic Journal.* 2009; 35, 131-139.

Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31: 1-7.

Mosin O, Ignatov I. Studying of Isotopic Effects of Deuterium in Biological Objects. *Chem Eur J.* 2015; 3: 25-42.

Mosin O, Ignatov I. Studying the influence of heavy and deuterium depleted types of water on biological objects. Journal of Medicine, Physiology and Biophysics. 2016; 22, 35-49.

Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. J Endod. 2004; 30: 785-87.

Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. J Endod. 1987; 13: 29-39.

Nair PNR, Stéphane H, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 2005; 99: 231-52.

Nair VS, Nayak M, Ramya MK, Sivadas G, Ganesh C, Devi SL, Vedam V. Detection of adherence of *Enterococcus faecalis* in infected dentin of extracted human teeth using confocal laser scanning microscope: An in vitro Study. J Pharm Bioallied Sci. 2017; 9 (Suppl 1), 41-44.

Neelakantan P, Cheng CQ, Ravichandran V, Mao T, Sriraman P, Sridharan S, Subbarao C, Sharma S, Kishen A. Photoactivation of curcumin and sodium hypochlorite to enhance antibiofilm efficacy in root canal dentin. Photodiagnosis Photodyn. 2015; 12: 108-14.

Nielsen FH. Main content area Boron--an overlooked element of potential nutritional importance. Nutrition today. 1988; 23: 4-7.

Nielsen BA, Baumgartner JC. Comparison of the EndoVac system to needle irrigation of root canals. J Endod. 2007; 33: 611-5.

Olivi G, De Moor RJ. Laser-Activated Irrigation (LAI). In Lasers in Endodontics. Springer, Cham. 2016; pp. 193-217.

Onay EO, Alikaya C, Seker E. Evaluation of antifungal efficacy of erbium, chromium: yttrium-scandium-gallium-garnet laser against *Candida albicans*. Photomedicine and laser surgery. 2010; 28, 73.

Opitz C, Erik A, Kenneth NG, Alexander S, Stephan G. Deuterium induces a distinctive *Escherichia coli* proteome that correlates with the reduction in growth rate. J Biol Chem. 2019; 294: 2279-92.

Ordinola-Zapata R, CM Bramante, IG de Moraes, N Bernardineli, T H Gasparoto, MSZ Graeff, AP Campanelli, RB Garcia. Confocal laser scanning microscopy is appropriate to detect viability of *Enterococcus faecalis* in infected dentin. J Endod. 2008; 34: 1198-201.

Ordinola-Zapata R, CM Bramante, RM Aprecio, R Handysides, DE Jaramillo. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. Int Endod J. 2014; 47: 659-66.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Cavenago B, Graeff MSZ, de Moraes IG, Marciano M, Duarte MAH. Antimicrobial effect of endodontic solutions used as final irrigants on a dentine biofilm model. Int Endod J. 2012; 45: 162-68.

Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. Dental Traumatology. 1990; 6: 142-49.

Özdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. J Endod. 2010; 36: 842-46.

Park E, Shen Y, Khakpour M, Haapasalo M. Apical pressure and extent of irrigant flow beyond the needle tip during positive-pressure irrigation in an in vitro root canal model. J Endod. 2013; 39: 511-15.

Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod.* 1985; 11: 525-8.

Pedulla E, Genovese C, Campagna E, Tempera G, Rapisarda E. Decontamination efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming (PIPS) of irrigants using low-energy laser settings: an ex vivo study. *Int Endod J.* 2012; 45: 865-70.

Peeters HH, Suardita K. Efficacy of smear layer removal at the root tip by using ethylenediaminetetraacetic acid and erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium garnet laser. *J Endod.* 2011; 37: 1585-9.

Peeters HH, Gutknecht N. Efficacy of laser-driven irrigation versus ultrasonic in removing an airlock from the apical third of a narrow root canal. *Aust Endod J.* 2014; 40: 47-53.

Peeters HH, De Moor RJ. Measurement of pressure changes during laser-activated irrigant by an erbium, chromium: yttrium, scandium, gallium, garnet laser. *Lasers Med Sci.* 2015; 30: 1449-55.

Pérez-Heredia M, CM Ferrer-Luque, MP González-Rodríguez. The effectiveness of different acid irrigating solutions in root canal cleaning after hand and rotary instrumentation. *J Endod.* 2006; 32, 993-997.

Peters OA, Schönenberger K, Laib A. Effects of four Ni–Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int Endod J.* 2001; 34: 221-30.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18: 100-03.

Pizzorno L. Nothing boring about boron. *Integrative Medicine: A Clinician's Journal.*

2015; 14: 35.

Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. J Endod. 2007; 33: 81-95.

Postollec F, Norde W, De Vries J, Busscher HJ, Van der Mei HC. Interactive forces between co-aggregating and non-co-aggregating oral bacterial pairs. J Dent Res. 2006; 85:231–234.

Rad RM, Alshemary AZ, Evis Z, Keskin D, Altunbaş K, Tezcaner A. Structural and biological assessment of boron doped bioactive glass nanoparticles for dental tissue applications. Ceramics International. 2018; 44: 9854-64.

Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2004; 37: 438-46.

Ramage G, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition on *Candida albicans* biofilm formation using divalent cation chelators (EDTA). Mycopathologia. 2007; 164: 301.

Rasooli A, Fatemi F, Akbarzadeh K, Dini S, Bahremand S. Synergistic protective activity of deuterium depleted water (DDW) and *Satureja rechingeri* essential oil on hepatic oxidative injuries induced by acetaminophen in rats. J Essent Oil-Bear Plants. 2016; 19, 1086-1101.

Retamozo B, Shabahang S, Johnson N, Aprecio RM, Torabinejad M. Minimum contact time and concentration of sodium hypochlorite required to eliminate *Enterococcus faecalis*. J Endod. 2010; 36, 520-523.

Ricucci D, Martorano M, Bate AL, Pascon EA. Calculus-like deposit on the apical external root surface of teeth with post-treatment apical periodontitis: report of two

cases. Int Endod J. 2005; 38: 262-71.

Ricucci D, Siqueira JF. Apical actinomycosis as a continuum of intraradicular and extraradicular infection: case report and critical review on its involvement with treatment failure. J Endod. 2008; 34: 1124-29.

Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. J Hosp Infect. 1993; 25: 229-38.

Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW. A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. J Endod. 2003; 29: 674-78.

Safavi KE, Spangberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. J Endod. 1990; 16: 207-10.

Sağlam M, U Arslan, ŞB Bozkurt, SS Hakki. Boric acid irrigation as an adjunct to mechanical periodontal therapy in patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. Journal of periodontology. 2013; 84: 1297-308.

Sahar-Helft S, Stabholtz A, Moshonov J, Gutkin V, Redenski I, Steinberg D. Effect of Er:YAG *laser*-activated irrigation solution on *Enterococcus Faecalis* biofilm in an ex-vivo root canal model. Photomed Laser Surg. 2013; 31: 334-41.

Sahin F, Demirci S, Dogan A, Asutay AB. 2018. U.S. Patent No. 9,962,405. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez J, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. Nature Methods. 2012; 9: 676-82.

Schoeffel GJ. The EndoVac method of endodontic irrigation, part 2—efficacy. *Dent Today*. 2008; 27: 82, 84, 86-7.

Schoop U, Moritz A, Kluger W, Patruta S, Goharkhay K, Sperr W, Wernisch J, Gattringer R, Mrass P, Georgopoulos A. The Er:YAG laser in endodontics: results of an in vitro study. *Lasers Surg Med*. 2002; 30: 360-4.

Sedgley CM, Nagel AC, Hall D, Applegate B. Influence of irrigant needle depth in removing bioluminescent bacteria inoculated into instrumented root canals using real-time imaging in vitro. *Int Endod J*. 2005; 38: 97-104.

Shaker LA, Dancer BN, Russell AD, Furr JR. Emergence and development of chlorhexidine resistance during sporulation of *Bacillus subtilis* 168. *FEMS microbiology lett*. 1988; 51: 73-76.

Shakouie S, Milani AS, Eskandarnejad M, Rahimi S, Froughreyhani M, Galedar S, Ranjbar E. Antimicrobial activity of tetraacetylenediamine-sodium perborate versus sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 2016; 10: 43-7.

ShareFF. Endodontic imaging. <https://www.researchgate.net/publication/254861664>. 2013.

Şen BH, Wesselink PR, Türkün M. The smear layer: a phenomenon in root canal therapy. *Int Endod J*. 1995; 28(3), 141-148.

Shen Y, S Stojicic, M Haapasalo. Bacterial viability in starved and revitalized biofilms: comparison of viability staining and direct culture. *J Endod*. 2010; 36: 1820-23.

Shen Y, Stojicic S, Haapasalo, M. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine against bacteria in biofilms at different stages of development. *J Endod*. 2011; 37, 657-661.

Shovelton DS. The presence and distribution of micro-organisms within non-vital

teeth. Br Dent J. 1964; 117: 101-07.

Sim TPC, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. Int Endod J. 2001; 34: 120-32.

Sippus J, Gutknecht N. Deep disinfection and tubular smear layer removal with Er:YAG using photon-induced photoacoustic streaming (PIPS) contra laser-activated irrigation (LAI) techniques. Laser Dent Sci. 2019; 3: 37-42.

Siqueira JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. J Dent Res. 2009; 88: 969-81.

Siqueira JF, Rôças IN, Ricucci D. Internal tooth anatomy and root canal instrumentation. In The Root Canal Anatomy in Permanent Dentition. 2019; pp: 277-302. Springer, Cham.

Siren EK, Haapasalo MP, Waltimo TM, Orstavik D. In vitro antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine or iodine potassium iodide on *Enterococcus faecalis*. Eur J Oral Sci. 2004; 112: 326-31.

Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. J Endod. 2005; 31: 669-71.

Slots J. Rapid identification of important periodontal microorganisms by cultivation. Oral Microbiol Immunol. 1986; 1: 48-55.

Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. Periodontol 2000. 2002; 28: 12-55.

Soleyman-Jahi S, Zendehdel K, Akbarzahed K, Haddadi M, Amanpour S, Muhammadnejad S. In vitro Assessment of antineoplastic effects of deuterium depleted water. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(5):2179-2183.

Solovyeva AM, Dummer PM. Cleaning effectiveness of root canal irrigation with electrochemically activated anolyte and catholyte solutions: a pilot study. *Int Endod J*. 2000; 33: 494-504.

Somlyai G, Jancsó G, Jákli G, Vass K, Barna B, Lakics V, Gaál T. Naturally occurring deuterium is essential for the normal growth rate of cells. *FEBS Lett*. 1993; 317: 1-4.

Spencer HR, Ike V, Brennan PA. The use of sodium hypochlorite in endodontics—potential complications and their management. *British Dental Journal*. 2007; 202: 555-59.

Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. 2008; 6: 199-210.

Stock K, Hibst R, Keller U. Comparison of Er: YAG and Er: YSGG laser ablation of dental hard tissues. In: *Medical Applications of Lasers in Dermatology, Ophthalmology, Dentistry, and Endoscopy*. International Society for Optics and Photonics. 1997; December, Vol. 3192, 88-95.

Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod*. 2013; 39: 473-7.

Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol*. 2002; 56: 187-209.

Strekalova T, Evans M, Chernopiatko A, Couch Y, Costa-Nunes J, Cespuaglio R, Chesson L, Vignisse J, Steinbusch HW, Anthony DC, Pomytkin I, Lecsh KP. Deuterium content of water increases depression susceptibility: The potential role of

a serotonin-related mechanism. Behavioural Brain Res. 2015; 277:237-244

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1994; 78: 522-30.

Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1998; 85: 86-93.

Susila AV, Sugumar R, Chandana CS, Subbarao CV. Combined effects of photodynamic therapy and irrigants in disinfection of root canals. J Biophoto. 2016; 9: 603-09.

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

Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. Int Endod J. 2019; 52: 604-28.

Takeuchi K, Frank JF. Expression of red-shifted green fluorescent protein by *Escherichia coli* O157:H7 as a marker for the detection of cells on fresh produce. J Food Prot. 2001; 64:298–304.

Tasli PN, Dogan A, Demirci S, Sahin F. Boron enhances odontogenic and osteogenic differentiation of human tooth germ stem cells (hTGSCs) in vitro. Biol Trace Elem Res. 2013; 153: 419-27.

Tasneem N, Savitha AN, Jayaram P, Pradeep AR. Efficacy of 0.75% boric acid and 0.2% chlorhexidine subgingival irrigation as an adjunct to scaling and root planing in the treatment of gingivitis: a comparative clinico-microbiological study. J Oral Biol.

2019; 6: 5.

Tay FR, Gu LS, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, Arun SN, Kim J, Looney SW, Pashley DH. Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. J Endod. 2010; 36: 745-50.

Tomita Y, Shima A. Mechanisms of impulsive pressure generation and damage pit formation by bubble collapse. Journal of Fluid Mechanics. 1986; 169: 535-64.

Torabinejad M, Walton RE, Fouad A. Endodontics-e-book: Principles and practice. Elsevier Health Sciences. 2014.

Turakhia MH, Characklis WG. Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms: effect of calcium. Biotechnol Bioeng. 1989; 33: 406-14.

Tunç D. Yeni sentez edilen palladyum bileşiğinin kurkumin ile kombinasyonunun akciğer kanser hücreleri üzerindeki sitotoksik ve apoptotik etkileri. Master's thesis. Uludağ Üniversitesi. 2016. <http://hdl.handle.net/11452/1597>

Turk T, Kaval ME, Sen BH. Evaluation of the smear layer removal and erosive capacity of EDTA, boric acid, citric acid and desy clean solutions: an in vitro study. BMC Oral Health. 2015; 15: 104.

Ulukaya E, Acilan C, Yilmaz Y. Apoptosis: why and how does it occur in biology? Cell biochemistry and function. 2011; 29: 468-80.

Unno K, Busujima H, Shimba S, Narita K, Okada S. Characteristics of growth and deuterium incorporation in *Chlorella ellipsoidea* grown in deuterium oxide. Chemical and pharmaceutical bulletin. 1988; 36: 1828-33.

Urey HC, Brickwedde FG, Murphy GM. A hydrogen isotope of mass 2 and its concentration. Physical Review. 1932, 40: 1.

Usman N, Baumgartner JC, Marshall JG. Influence of instrument size on root canal debridement. J Endod. 2004; 30: 110-12.

van der Sluis L, Boutsoukis C, Jiang L, Macedo R, Verhaagen B, Versluis M. 2015. 'Root canal irrigation.' in, The root canal biofilm (Springer).

van der Sluis LW. Endodontics in motion: New concepts, materials and techniques 3. The role of irrigants during root canal treatment. Nederlands tijdschrift voor tandheelkunde. 2015; 122: 533.

van der Waal SV, van der Sluis LW. Potential of calcium to scaffold an endodontic biofilm, thus protecting the micro-organisms from disinfection. Medical hypotheses. 2012; 79: 1-4.

van Leeuwen TG, van der Veen MJ, Verdaasdonk RM, Borst C. Noncontact tissue ablation by holmium: YSGG laser pulses in blood. Lasers Surg Med. 1991; 11: 26-34.

Vatkar NA, Hegde V, Sathe S. Vitality of *Enterococcus faecalis* inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. J Conserv Dent. 2016; 19: 445-9.

Vera J, Arias A, Romero M. Dynamic movement of intracanal gas bubbles during cleaning and shaping procedures: the effect of maintaining apical patency on their presence in the middle and cervical thirds of human root canals—an in vivo study. J Endod. 2012; 38: 200-03.

Verma R, Sharma DS, Pathak AK. antibacterial efficacy of pastes against *E faecalis* in primary root dentin: a confocal microscope study. Journal of Clinical Pediatric Dentistry. 2015; 39: 247-54.

Violich DR, Chandler NP. The smear layer in endodontics - a review. Int Endod J. 2010; 43: 2-15.

Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. J Endod. 2012; 38.

Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. J Endod. 2013; 39: 1395-400.

Wolfaardt GM, Lawrence JR, Hendry MJ, Robarts RD, Caldwell DE. Development of steady-state diffusion gradients for the cultivation of degradative microbial consortia. Appl Environ Microbiol. 1993; 59:2388–2396.

Wong DT, Cheung GS. Extension of bactericidal effect of sodium hypochlorite into dentinal tubules. J Endod. 2014; 40: 825-9.

Wright PP, Walsh LJ. Optimizing antimicrobial agents in endodontics. Antimicrobial Agents. Croatia: InTech: Rijeka. 2017; 87-107.

Xie X, Zubarev RA. Effects of low-level deuterium enrichment on bacterial growth. PLoS One. 2014; 9.

Yang Y, Shen Y, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, Cao Y, Haapasalo M. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. J Endod. 2016; 42: 1246-50.

Yang F, Zhu M, Zhang J, Zhou H. Synthesis of biologically active boron-containing compounds. Med Chem Comm. 2018; 9: 201-11.

Yao K, K Satake, S Watanabe, A Ebihara, C Kobayashi, T Okiji. Effect of laser energy and tip insertion depth on the pressure generated outside the apical foramen during er:yag laser-activated root canal irrigation. Photomed Laser Surg. 2017; 35: 682-87.

Yarat A. Su. Bölüm 1. In: Biyokimya Temel ve Özel Konular. 1st edition. Editors: Yarat A, Akbay T, Alturfan EI. Akademisyen Kitabevi. 2019; 1-8.

Yavari HR, Rahimi S, Shahi S, Lotfi M, Barhaghi MH, Fatemi A, Abdolrahimi M. Effect of Er,Cr:YSGG laser irradiation on *Enterococcus faecalis* in infected root canals. Photomed Laser Surg. (Suppl 1) 2010; 28(S1), S-91.

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

Yılmaz MT. Minimum inhibitory and minimum bactericidal concentrations of boron compounds against several bacterial strains. Turkish Journal of Medical Sciences. 2012; 42 (Supp. 2): 1423-29.

Zamany A, Safavi K, Spangberg LWS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003; 96: 578-81.

Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006; 32: 389-98.

Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2002; 94: 756-62.

Zhu WC, Gyamfi J, Niu LN, Schoeffel GJ, Liu SY, Santarcangelo F. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis – A review. J Dent 2013; 41: 935-48.

Zmener O, Pameijer CH, Serrano SA, Palo RM, Iglesias EF. Efficacy of the NaviTip FX irrigation needle in removing post instrumentation canal smear layer and debris in curved root canals. J Endod. 2009; 35: 1270-73.

Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. J

Endod. 2010; 36: 793-96.

Zuhal U. Esansiyel bir komponent: bor-borun günlük alımı ve fizyolojik etkileri. Türk Bilimsel Derlemeler Dergisi. 2013; 6: 119-23.



10. EKLER

EK 1.



T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Projenin Adı:Er,Cr:YSGG ile aktive edilmiş/edilmemiş farklı solüsyonların daimi diş kök kanallarında Enterococcus faecalis üzerine etkinliğinin in-vitro incelenmesi
Proje yürütücüsü:Prof.Dr.Serap AKYÜZ
Projedeki Araştırmacılar:Dt.Gülşah BALAN
Onay tarihi ve sayısı:24.05.2018, 2018-200

Sayın Prof.Dr.Serap AKYÜZ
2018-209 Protokol nolu "Er,Cr:YSGG ile aktive edilmiş/edilmemiş farklı solüsyonların daimi diş kök kanallarında Enterococcus faecalis üzerine etkinliğinin in-vitro incelenmesi " isimli in vitro çalışmanız Marmara Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik kurulu tarafından incelenmiş ve etik yönden uygunluğuna karar verilmiştir.

M.Ü.Diş Hekimliği Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı
Prof.Dr.Nimet Gençoğlu

Adı Soyadı	
Prof. Dr. Nimet Gençoğlu	
Prof. Dr. İlknur Tanboğa	
Prof. Dr. Ali Recai Menteş	
Prof. Dr. Yaşar Özkan	
Prof. Dr. Ahu Acar	
Prof. Dr. Zühre Hale Cimilli	
Doç. Dr. Buket Evren	
Prof. Dr. Şebnem Erçalık Yalçinkaya	
Prof. Dr. Filiz Onat	
Dr. Zerrin Kuşun	
Prof. Dr. Afife Binnaz Hazar Yoruç	
Dr.Öğr.Üyesi G. Hale Özcömert Coşkun	
Dr.Öğr.Üyesi Gediz Kocabaş	
Nuri Sertaç Sırma (sivil üye)	



Marmara Üniversitesi
Nişantaşı Kampusu Diş
Hekimliği Fakültesi 34365
Nişantaşı /Şişli/İSTANBUL

0 (212) 246 52 47 (Faks)
0 (212) 231 91 20

dishekimligi@marmara.edu.tr
http://dental.marmara.edu.tr

Ayrıntılı bilgi için: İ.SOYADI Unvan

11. ÖZGEÇMİŞ

Adı	GÜLŞAH	Soyadı	BALAN
Doğum Yeri	İskenderun	Doğum Tarihi	04.12.1982
Uyruğu	T.C.	Mobil Tel.	00 90 544 593 77 19
E-mail	gulsahbalan@marun.edu.tr		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Doktora	Marmara Ün. Diş. Hek. Fak. Pedodonti A.D. (Tezli)	2020
Master	RWTH Aachen Üni. (Laser in Dentistry) Final tezi: Evaluation of temperature measurement on root surface and morphological changes on root canal wall after squent combination of two wavelenghts (1064nm and 2940nm) in endodontics.	2015
Lisans	Marmara Ün. Diş. Hek. Fak.	2007

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (Yıl - Yıl)
1 Pratisyen Diş Hekimi	Özel Hastane	2007-2015

Yabancı Dilleri	Okuduğunu Anlama*	Konuşma*	Yazma*
İngilizce	Çok İyi	İyi	Çok İyi

Yabancı Dil Sınav Notu *								
YDS/2013	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL PBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE
63,75								

	Sayısal	Eşit Ağırlık	Sözel
ALES Puanı /2015	66,361	62,621	55,828

Bilgisayar Bilgisi

Program	Kullanma becerisi
Microsoft Office	İyi

*Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.

AKADEMİK

1. Üyesi Olduğu Uluslararası Kuruluşlar

- WALED- World Academy for Laser Education in Dentistry
- TDB- Türk Diş Hekimleri Birliği

2. YAYINLAR

2.1. Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler (SCI &SSCI&Arts and Humanities)

- Ruya Kuru, Sahin Yilmaz, **Gulsah Balan**, Burcin Alev Tuzuner, Pakize Neslihan Tasli, Serap Akyuz, Feyza Yener Ozturk, Yuksel Altuntas, Aysen Yarat, and Fikrettin Sahin. 2019. 'Boron-rich diet may regulate blood lipid profile and prevent obesity: A non-drug and self-controlled clinical trial', Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 54: 191-198.
- Kuru R., **Balan G.**, Yilmaz G., Yilmaz S., Taşlı PN., Akyüz S., Yarat A. Şahin F. The level of two trace elements in carious, non-carious, primary, and permanent teeth. Eur Oral Res. 2020; 54(2): 77-80.

2.2. Diğer Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- **Gülşah Balan**, Harry Huiz Peteers, Serap Akyüz. The assistance of Er, Cr: YSGG laser in pulp injury related to anterior teeth trauma. Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi) 52(2) (2019): 57-60. <http://dx.doi.org/10.20473/j.djmk.v52.i2.p57-60>
- **Gülşah Balan**, Sadık Kalaycı, Ayşen Yarat, Serap Akyüz, Fikrettin Şahin. An in-vitro study on the effectiveness of different irrigation solutions against *Enterococcus faecalis* with/without Erbium laser activation. European Journal of Research in Dentistry. (Accepted/ 723279). (Tez-Yayın)

2.3. Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

2.3.1. Uluslararası Poster Bildirimi

- **Gulsah Balan**, Serap Akyuz. 2018. 'Laser-Assisted Operculectomy: A Case Report.' 24th IADH Congress. 31 August - 2 September 2018. Journal of Disability and Oral Health. (PS-80) Volume 19, Number 3, pg:129. Dubai, UAE.
- **Ruya Kuru, Gulsah Balan**, Serap Akyuz, Ayşen Yarat. 2018. "Evaluation of Flouride Levels in Primary and Permanent Teeth with and without Caries." Sempozyum Kitabı, (PS-15) Pg:41-42. Marmara Üniversitesi Uluslararası Sempozyumu. 4-5 Mayıs 2018. İstanbul, Türkiye. http://dosya.marmara.edu.tr/dhf/sempozyum_2018/Sempozyum-Kitabi-v2.pdf
- Figen Eray Giray, **Gülşah Balan**, Gökçe Çiçek İldeş, Işıl Özgül Kalyoncu, Ahu Durhan, **Başak Durmuş**. Revascularization of immature permanent maxillary incisors using platelet-rich-fibrin: report of two cases. Abstract book, (PS-051) pg: 162. *Association of Paediatric Dentistry (IAPD) Regional Meeting. 25th Congress of Turkish Society of Paediatric Dentistry. 12 -14 October, 2018. İstanbul, Turkey.*

2.3.2. Uluslararası Sözlü Bildiriler

- **Balan G.**, Kalyoncu I. Ö., Akyüz S. Removal of Soft Dentin Caries with Subablative Parameters in Pediatric Dentistry. Congress program book. Pg:54. 6th Congress of WFLD-ED. 22 - 23 September 2017. Thessaloniki, Greece.
- **Balan G.**, Akyuz S. 2018. "Laser applications for dental trauma patients in Pedodontics." Congress program book, pg:54. 16th Laser Dentistry World Congress. 1-3 October 2018. Aachen, Germany.
- **R. Kuru, G. Balan**, F. Sahin, S. Akyuz, P. N. Tasli, and A. Yarat. 2018. "Boron Levels in Primary and Permanent Teeth." 1st International Balkan Chemistry Congress. 17-20 September 2018. Edirne, Türkiye.
- **Balan G.**, Kalaycı S., Yarat A., Şahin F., Akyuz S. Kök kanal Kök kanal sistemi içinde *Enterococcus faecalis* 'e karşı farklı solüsyonların antimikrobiyal etkinliğinin karşılaştırılması: in-vitro çalışma. Kongre program kitabı, SS-470, pg: 464. Türk Diş Hekimleri Birliği 25. Uluslararası Dişhekimliği Kongresi. 4-7 Eylül 2019. İstanbul, Türkiye. http://www.tdb.org.tr/tdb/v2/yayinlar/Kongre/25.UDK/TDB_2019_Program_Kitapcigi.pdf (Tez-Sunum)

- Kuru R, Yilmaz S, **Balan G**, Tuzuner BA, Tasli PN, Akyuz S, Ozturk FY, Altuntas Y, Yarat A, Sahin F. Boron levels in main body fluids: Can saliva boron levels replace serum boron levels? International Symposium on Boron. 17-19.04.2019.

2.4. Ulusal Hakemli Dergilerde Yayınlanan Makaleler

- **Balan G.**, Akyüz S. 2018. 'Russell Silver Syndrome: A Case Report', Aydın Dental Journal, 3: 31-36. <http://dergipark.gov.tr/adj/issue/40598/487863>

2.5. Ulusal Bilimsel Toplantılarda Sunulan Ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler

2.5.1. Ulusal Poster Bildiri

- **Balan G.**, Akyüz S. 2017. Bir Travma Olgusunda Lazer Destekli Yumuşak ve Sert Doku Uygulamaları. Diş Hekimliği Lazer Akademisi Derneği 1. Sempozyumu. 26 Ekim 2017, İstanbul, Türkiye.
- **Gulsah Balan**, Serap Akyuz. Bir olgu Sunumu: Russell Silver Sendromu. Kongre Bildiri Kitabı, (PS-109) pg: 322. Türk Pedodonti Derneği 24. Bilimsel Kongresi. 19-22 Ekim 2017. Antalya, İstanbul.
- Karaman G.E., **Balan G.**, Akyüz S. 2019. Travma Yaralanmasında Er,Cr:YSGG Uygulaması: Kuron Kök Kırığı Tedavisi. Diş Hekimliği Lazer Akademisi Derneği 2. Sempozyumu. 29 Kasım 2019, İstanbul, Türkiye.

2.6. Katıldığı Kurs Ve Organizasyonlar

- Marmara Üniversitesi MÜSEM. Araştırmacılar için Deney Hayvanları Kullanımına ait Eğitim. No: 2016-01273. 7-18 Kasım 2016.
- European Master Degree in Oral Laser Applications (EMDOLA). University of Parma: May 4-5, 2017.
- 2019-Myobrace İleri Seviye Kurs