

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

**FARKLI İRİGASYON SOLÜSYONLARININ MİKS
BİYOFİLME SAHİP KÖK KANALLARINDA DENTİN
DEZENFEKSİYONUNA ETKİSİ: BİR LAZER
TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOP ÇALIŞMASI**

Dide TEKİNARSLAN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kürşat ER

2024-ANTALYA

T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
DİŞ HEKİMLİĞİ FAKÜLTESİ
ENDODONTİ ANABİLİM DALI

FARKLI İRİGASYON SOLÜSYONLARININ MİKS
BİYOFİLME SAHİP KÖK KANALLARINDA DENTİN
DEZENFEKSİYONUNA ETKİSİ: BİR LAZER
TARAMALI KONFOKAL MİKROSKOP ÇALIŞMASI

Dide TEKİNARSLAN

DİŞ HEKİMLİĞİNDE UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kürşat ER

“Kaynakça gösterilerek tezimden yararlanılabilir”

2024-ANTALYA

ONAY SAYFASI

Dide TEKİNARSLAN tarafından sunulan bu çalışma jürimiz tarafından **oy birliği/ oy çokluğu** ile Endodonti Anabilim Dalı Diş Hekimliğinde Uzmanlık tezi olarak kabul edilmiştir. .../...../.....

İmza

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Kürşat ER
Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti Anabilim Dalı

Üye : Prof. Dr. Alper KUŞTARCI
Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti Anabilim Dalı

Üye : Doç. Dr. Damla KIRICI
Akdeniz Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi
Endodonti Anabilim Dalı

Bu tez, Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Diş Hekimliği Fakültesi

Kurum Yöneticisi

ETİK 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 çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Arş. Gör. Dide TEKİNARSLAN

İmza

Prof. Dr. Kürşat ER

İmza

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca kıymetli bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, desteği ile ufkumu açan ve akademik, klinik çalışmalarımda emeği olan değerli hocam ve tez danışmanım Prof. Dr. Kürşat ER'e,

Eğitimim boyunca gerekli tüm imkan ve olanakları sağlayan sayın Prof. Dr. Alper KUŞTARCI'ya, klinik deneyimlerini ve bilgilerini bizimle her zaman paylaşan hocalarım Doç. Dr. Damla KIRICI ve Doç. Dr. Öznur GÜÇLÜER'e,

Kliniğe ilk adımımı attığımdan beri her zaman yanımda olan, her türlü deneyimini ve bilgisini benimle paylaşan hocalarım Uzm. Dr. Hatice HARORLI ve Uzm. Dt. Simay KOÇ DEVECİ'ye,

Tez çalışmamın kimya bölümündeki büyük yardımları için Akdeniz Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Ömer KESMEZ ve Arş. Gör. Feride DEMİR'e, Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi'nde çalışmamı destekleyen Prof. Dr. Tamer TAŞDEMİR'e, konfokal çalışmalarımda yardımları için KTÜ, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'na ve değerli hocalarım Prof. Dr. Ersan KAYA ve Doç. Dr. Tuba DİNÇER'e, KTÜ, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda mikrobiyoloji çalışmalarında yanımda olan hocalarım Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ, Doç. Dr. Esra KAYA ve Arş. Gör. Mine EĞİN'e ve Karadeniz Teknik Üniversitesi Diş Hekimliği Fakültesi Endodonti Anabilim Dalı'ndaki araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Eğitimim süresince beraber çalıştığım ve bütün zorlukları beraber göğüslediğim eş kıdemlim Damla ERKAL ve bu süre boyunca çalıştığım tüm çalışma arkadaşlarıma ve personele,

Uzmanlık eğitimimin her parçasında desteğini hissettiğim canım arkadaşlarım Barış AKAR, Ayşe TÜRKYÖN KARACAN, Tuğba ERASLAN AKAR, Şeyma HACIALİEFENDİOĞLU, Rümeysa ŞENDİŞÇİ GÖK, İpek ÖZGÜ ve Atilla Recai ÖZME'ye,

Hayatımın her anında desteğini ve sevgisini hissettiğim, her zaman arkamda duran sevgili annem ve babama teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Amaç: Bu çalışmanın amacı, farklı irigantların miks biyofilme sahip kök kanallarında bakteri dezenfeksiyonuna etkisinin değerlendirilmesidir. Çalışmamızda literatürde daha önce sadece Sodyum Hipoklorit (SH) ve Klorheksidin Glukonat (KH)'le karşılaştırılan Poliheksidin Biguanid (PHMB) irigantının, SH ile kombine olarak kullanılması da karşılaştırılmıştır.

Yöntem: Bu çalışmada 60 adet çekilmiş alt küçük azı insan dişi kullanılmıştır. Dişler ProTaper Next eğeleri ile X4'e kadar şekillendirilmiş ve otoklavda steril edikten sonra 7 günlük miks biyofilm ekimi gerçekleştirilmiştir. Biyofilm oluşumundan sonra dişler kullanılan irigantlara göre; SH, KH, PHMB, SH + KH, SH + PHMB ve kontrol grubu (distile su) olacak şekilde rastgele 6 gruba ayrılmıştır. Her gruptan 1 örnek diş irigasyon öncesi ve sonrası olacak şekilde bakteriyel ekim ve CFU sayımına tabii tutulmuştur. Dişler irige edildikten sonra apikalden 2-3 mm, 5-6 mm ve 8-9 mm olacak şekilde Mikrocut ile 3 kesit alınmış ve LIVE/DEAD canlılık kiti ile boyanmıştır. Dişler lazer taramalı konfokal mikroskop ile taranmış ve ölü bakteri penetrasyon derinlikleri ölçülmüştür.

Bulgular: Dişlerin koronal, orta ve apikal üçlülerinin ölü bakteri penetrasyonu karşılaştırıldığında en fazla penetrasyon koronal üçlüde gözlenmiştir ($P < 0.05$).İrigantların dezenfeksiyon etkinliği karşılaştırıldığında ise kontrol grubu diğer tüm irigantlara göre anlamlı şekilde daha az dezenfeksiyon sağlamıştır ($P < 0.05$). Kombine olarak kullanılan irigantlar, PHMB'e göre anlamlı şekilde daha fazla dezenfeksiyon sağlamıştır ($P < 0.05$).

Sonuç: İrigantların kombine kullanımının, tek başına SH, KH ve PHMB kullanımından daha etkili olduğu ve bu yüzden klinik koşullarda final irigasyonunda irigantların kombine kullanılması önerilmektedir. KLTM görüntülerinin biyofilm eliminasyonunu incelemek için etkili bir yöntem olduğu bir kez daha bu çalışma ile gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: irigant, biyofilm, konfokal mikroskop, dezenfeksiyon, dentin tübülü

ABSTRACT

Objective: This study aims to evaluate the effect of different irrigation solutions on bacterial disinfection in root canals with mixed biofilms. In our study, Polyhexanide Biguanide (PHMB) solution, which has previously been compared only with Sodium Hypochloride (SH) and Chlorhexidine Gluconate (KH) in the literature, was also compared in combination with SH.

Method: A total of 60 extracted human mandibular premolars were used in this study. The teeth were shaped to X4 using ProTaper Next files, sterilized in an autoclave, and then subjected to 7 days of mixed biofilm cultivation. After biofilm formation, the teeth were randomly divided into 6 groups according to the irrigation solution: SH, KH, PHMB, SH + KH, SH + PHMB, and a control group (distilled water). One sample tooth from each group was subjected to bacterial culture and CFU counting before and after irrigation. After irrigation, 3 sections of 2-3 mm, 5-6 mm, and 8-9 mm from the apical were taken with Microcut, and the sections were stained using the LIVE/DEAD viability kit. The teeth were scanned using a confocal laser scanning microscope, and dead bacteria penetration depths were measured.

Results: When the dead bacteria penetration in the coronal, middle, and apical thirds of the teeth was compared, the highest penetration was observed in the coronal third ($P < 0.05$). Regarding the disinfection efficacy of the irrigation solutions, the control group provided significantly less disinfection than all other irrigants ($P < 0.05$). Irrigants used in combination provided significantly more disinfection compared to PHMB alone ($P < 0.05$).

Conclusion: The combined use of irrigants was found to be more effective than the use of SH, KH, and PHMB alone. Therefore, it is recommended that irrigation solutions should be used in combination during final irrigation in clinical settings. This study once again demonstrated that CLSM imaging is an effective method for examining biofilm elimination.

Keywords: irrigant, biofilm, confocal microscope, disinfection, dentinal tubule

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
İÇİNDEKİLER	iii
TABLolar DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
RESİMLER DİZİNİ	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Endodontik Enfeksiyonlar	3
2.2. Kök Kanalından İzole Edilen Mikroorganizmalar	4
2.2.1. Enterokoklar	4
2.2.1.1. <i>E. faecalis</i>	5
2.2.2. Streptokoklar	6
2.2.2.1. <i>S. mutans</i>	6
2.2.3. Stafilokoklar	7
2.2.3.1. <i>S. aureus</i>	7
2.2.4. Mantarlar	8
2.2.5. Virüsler	8
2.3. Biyofilm	9
2.3.1. Endodontik Biyofilmler	10
2.4. Biyofilm Saptama Yöntemleri	11
2.4.1. Mikrobiyolojik Kültür Testleri	11
2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu	11
2.4.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	12
2.4.4. Işık Mikroskobu	12

2.4.5. Moleküler Teknikler	12
2.5. İrigasyon Solüsyonları	13
2.5.1. Sodyum Hipoklorit	13
2.5.2. Etilendiamintetraasetik asit	15
2.5.3. Klorheksidin Glukonat	16
2.5.4. Poliheksidin Biguanid	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Etik Kurul Onayı	19
3.2. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması	21
3.3. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Seçimi.....	21
3.4. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Hazırlanması.....	22
3.5. Bakteri Ekimi ve Biyofilmin Hazırlanması	24
3.6. PHMB Solüsyonun Hazırlanması	26
3.7. Kök Kanallarının İrigasyonu	27
3.8. Bakteriyel Örnekleme ve CFU sayımı	29
3.9. Örneklerden Kesit Alınması	29
3.10. Örneklerin Boyanması	31
3.11. İstatistiksel Analiz	33
4. BULGULAR	34
5. TARTIŞMA	42
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	57
KAYNAKLAR	58
EKLER	77

Ek 1. Etik Kurul Onay Belgesi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1. PRILE 2021 kılavuzuna göre çalışmanın akış şeması

Tablo 2. Örnek dişlerin apikal, orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerleri

Tablo 3. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerleri

Tablo 4. İrigasyon öncesi ve sonrası bakteriyel ekiminden elde edilen CFU sonuçları

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları

Şekil 2.1. SH'nin sabunlaşma reaksiyonu

Şekil 2.2. SH'nin amino asit nötralizasyon reaksiyonu

Şekil 2.3. SH'nin kloroaminasyon reaksiyonu

Şekil 3. Örnek dişlerin apikal, orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerlerinin kutu grafiği

Şekil 4. Örnek dişlerin apikal, orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerlerinin sütun grafiği

Şekil 5. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerlerinin kutu grafiği

Şekil 6. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerlerinin sütun grafiği

RESİMLER DİZİNİ

Resim 1. Deneyde kullanılacak dişlerin seçimi

Resim 2. (a) Dişlerin bukkio-lingual, (b) Mezyo-distal radyografik görüntüsü

Resim 3. Çalışmada kullanılan ProTaper Next eğeleri

Resim 4. Çalışmada kullanılan EndoRadar Pro Endo-Motor cihazı

Resim 5. Çalışmada kullanılan şırınga ve 30 G'luk ucu kapalı yandan açık iğne ucu

Resim 6. Akrilik rezin içerisine yerleştirilen diş örnekleri

Resim 7. (a) Bakteri süspansiyonları, (b) BHI besiyeri

Resim 8. Falcon tüpleri içerisinde bulunan diş ve besiyeri

Resim 9. Örnek dişlerin 37 °C'de 7 gün inkübe edilmesi

Resim 10. Çalışmada kullanılan PHMB tozu

Şekil 11. (a) Çalışmada kullanılan SH solüsyonu, (b) TA 200 cihazına bağlanan EDDY uç

Resim 12. Çalışmada kullanılan KH solüsyonu

Resim 13. Örnek dişlerin işaretlenmesi

Resim 14. (a) Microcut cihazı, (b) Örneklerden kesit alınması

Resim 15. (a) Kesme işleminden sonra elde edilen dentin diskleri, (b) Dijital kumpas ile ölçümleri

Resim 16. Örneklerin boyanması için kullanılan LIVE/DEAD BacLight Bakteriyel Canlılık Kiti

Resim 17. Diş kesitlerinin KLTM ile incelenmesi

Resim 18. (a) Canlı bakterileri gösteren yeşil alanlar, (b) Ölü bakterileri gösteren kırmızı alanlar, (c) Ölü ve canlı bakterilerin karşılaştırılması ile elde edilen görüntüler

Resim 19. Ölü bakterilerin penetrasyon derinliğinin hesaplanması

Resim 20. Kontrol grubunda 7 günlük biyofilmin (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerde KLTM ile doğrulanması

Resim 21. SH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 22. KH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 23. PHMB ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 24. SH + KH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 25. SH + PHMB ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 26. Distile su ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri

Resim 27. Distile su ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası

Resim 28. SH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b)

irigasyon sonrası

Resim 29. KH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b)

irigasyon sonrası

Resim 30. PHMB ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b)

irigasyon sonrası

Resim 31. SH + KH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi,

(b) irigasyon sonrası

Resim 32. SH + PHMB ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon

öncesi, (b) irigasyon sonrası

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar

Ark.	Arkadaşları
BHI	Brain Heart Infusion
<i>C. albicans</i>	<i>Candida Albicans</i>
CBP	Kollajen bağlayan proteinler
CDC	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri
CFU	Koloni oluşturan birimler
Dk	Dakika
DNA	Deoksiriboz nükleik asit
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus Faecalis</i>
EPS	Hücre dışı polimerik matriks
FISH	Floresan in situ Hibridizasyon
HIV	İnsan Bağışıklık Yetmezliği Virüsü
Hz	Hertz
KH	Klorheksidin
KKT	Kök kanal tedavisi
KLTM	Konfokal Lazer Taramalı Mikroskop
KTÜ	Karadeniz Teknik Üniversitesi

MO	Mikroorganizma
MRSA	Metisiline Dirençli <i>Staphylococcus Aureus</i>
Ncm	Newton santimetre
TEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PHMB	Poliheksametilen Biguanid Hidroklorid
PI	Propidyum İyodür
Rpm	Devir/Dakika
PUA	Pasif Ultrasonik Aktivasyon
SH	Sodyum Hipoklorit
<i>S. mutans</i>	<i>Streptococcus Mutans</i>
Sn	Saniye
TSA	Tryptic Soy Agar
VBNC	Yaşayabilir ancak kültürlenemez
VRSA	Vankomisine Dirençli <i>Staphylococcus Aureus</i>

Simgeler

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
±	Artı-Eksi
°C	Santigrat derece
µm	Mikrometre
mL	Mililitre

1. GİRİŞ

Kök kanal tedavisinin (KKT) başarısı; pulpa dokusunun, bakterilerin ve yan atıklarının, organik ve inorganik atıklarının kök kanal sisteminden uzaklaştırılmasına dayanmaktadır (1). Bu nedenle, kök kanal sisteminin mekanik ve kimyasal olarak temizlenerek, sızdırmaz bir şekilde kapatılması endodontik tedavinin önemli bir parçasıdır (2).

Mekanik şekillendirme enfekte pulpa dokusunun uzaklaştırılmasını ve ana kök kanalının şekillendirilmesini sağlarken tek başına kullanıldığında kök kanallarının tamamen dezenfekte olmasını sağlayamamaktadır (3). Kök kanal sisteminde lateral kanallar, istmuslar, apikal deltalar ve dallanmalar gibi kök kanal eğelerinin ulaşamayacağı anatomik düzensizlikler bulunmaktadır (4). Bu karmaşık alanlardaki temizlenemeyen debrisin, mikroorganizmaların (MO) ve biyofilmlerin inatçı enfeksiyon oluşturması ve yapılan tedavinin başarısız olmasına sebep olabileceği belirtilmiştir (5, 6).

Kök kanalı içerisinde bulunan MO'lar, bir yüzeye bağlanarak biyofilm adı verilen jel yapılar oluştururlar (7). Bu biyofilmler, dentin tübülleri içerisine nüfus edebilir ve temizlenmesi zor olan alanlarda tekrarlayan enfeksiyonlar oluşturabilirler.

Mekanik şekillendirme tek başına kök kanallarında etkili bir dezenfeksiyon sağlamayacağı için KKT sırasında irigasyona ihtiyaç duyulmaktadır (5). İdeal bir irigantın nekrotik pulpa dokusu artıklarını ve yüksek antimikrobiyal etkinliğe sahip olması gerekmektedir (8). İrigasyonun etkinliği ise, apikalde prepare edilmemiş bölgedeki debrisin temizlenebilmesi, nekrotik doku ve biyofilmlerin uzaklaştırılması, kök kanallarındaki planktonik veya biyofilm oluşturan MO'ların elimine edilmesi yeteneği ile ilişkilidir (9, 10).

Günümüzde, sodyum hipoklorit (SH) organik doku çözücü özelliği ve yüksek dezenfeksiyon etkisi sayesinde KKT esnasında en çok tercih edilen irigasyon çözücüsüdür (11). Klorheksidin (KH), uzun süreli antimikrobiyal etkiye sahip olmasına rağmen doku

Çözücü etkinliğinin olmaması ve sitotoksik etkiye sahip olması nedeniyle irigasyon aşamasında final solüsyonu olarak kullanılması önerilmektedir (12, 13).

KH'nin apikal papilla kök hücrelerine ve fibroblastlara karşı sitotoksitesinden kaynaklı, uzun antimikrobiyal etki ve düşük sitotoksiğe sahip başka bir irigant arayışı devam etmektedir (12). Poliheksametilen Biguanid Hidroklorid (PHMB), düşük toksisiteye ve yüksek antimikrobiyal etkiye sahip katyonik bir antiseptiktir (14). Genellikle yara ve lens solüsyonlarında, ağız gargaralarında, bakteriyel büyümeyi engellemek için kullanılmaktadır (15-17).

Günümüzde mevcut mekanik aletlerin ve kimyasal solüsyonların çeşitliliğine rağmen hiçbir dezenfeksiyon prosedürünün kök kanallarını %100 dezenfekte edemediği rapor edilmiştir (18, 19). Bu nedenle, KKT sırasında optimum dezenfeksiyonu sağlamak için mekanik şekillendirmeye ilave olarak ideal irigant veya kombinasyonlarının arayışı sürmektedir.

Bu tez çalışmasının amacı, farklı irigantların (SH, KH, PHMB, SH + KH, SH + PHMB) dentin tübüllerinde biyofilm oluşturmuş bakterilere karşı dezenfeksiyon etkilerini karşılaştırmaktır. Çalışmanın sıfır hipotezi, farklı irigantları ve kombinasyonlarının miks biyofilme sahip dentin tübüllerinin dezenfeksiyonuna etkisi arasında fark olmayacağıdır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Endodontik Enfeksiyonlar

Pulpa-dentin kompleksi, genellikle oral mikrobiyotayla ilişkisi olmadığı için steril kabul edilmektedir (20). Pulpa ve periradiküler hastalıkların temel nedeni olan MO'lar, koronal, retrograd, kan veya lenfatik yollarla (anakorezis) pulpaya ulaşabilir. Normalde steril kabul edilen kök kanalları periodontal hastalıklar, çürükler, çatlaklar, kırıklar veya kötü ağız hijyeninin varlığında MO'lar için bir hedef haline gelebilir. Bu durum, pulpa-dentin kompleksinin bütünlüğünün bozulmasına ve dolayısıyla KKT ihtiyacına yol açabilir (21, 22). Nekrotik dişlerin doğal savunma mekanizması olmadığı için, düşük oksijenli ortamlarda yaşayabilen fırsatçı MO'ların kök kanalında toplanmasına neden olur. Özellikle nekrotik ve başarısız KKT'li dişlerde MO'lar, kök kanalının apikal üçlüsünde daha fazla toplanarak periapikal doku sıvılarına ulaşabilirler (23).

Endodontik enfeksiyonlar, bulundukları anatomik konumlarına göre sınıflandırılırlar. İntraradiküler enfeksiyonlar, MO'ların kök kanal sistemine giriş zamanına göre primer, sekonder ve inatçı enfeksiyon olarak üç gruba ayrılır. Ekstraradiküler enfeksiyonlar ise, intraradiküler enfeksiyonların ilerlemesiyle meydana gelir ve MO'ların periradiküler dokuları istila etmesiyle tanımlanır.

Primer enfeksiyonlar, bakterilerin pulpa dokusuna ulaşp çoğaldığı ve pulpanın nekrotize olduğu, henüz KKT uygulanmamış dişlerde görülür. Bu enfeksiyonlar, çoğunlukla zorunlu anaerob MO'ların baskın olduğu polimikrobiyal bir yapıya sahiptir (24, 25). Primer enfeksiyonlarda sıklıkla *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium* gibi gram negatif ve *Streptococcus*, *Actinomyces*, *Propionibacterium* gibi gram pozitif bakteriler bulunmaktadır (26, 27).

Kök kanalına sonradan ulaşan MO'ların enfeksiyon oluşturacak sayıya ulaşması veya virülans faktörü kazanması sekonder enfeksiyonların gelişmesine neden olur. Ayrıca, besinsiz ortamlara dayanabilen MO'ların yol açtığı enfeksiyonlar, inatçı enfeksiyonlar olarak tanımlanır. KKT yapılmış ve apikal periodontitisi olan dişlerde sıklıkla *E. faecalis* ve *C. albicans* gibi MO'lar tespit edilmektedir (28).

Ekstraradiküler enfeksiyonlar, intraradiküler enfeksiyonlarla bağılı olarak gelişebileceğı gibi bağımsız şekilde de gelişebilir (29). Ekstraradiküler enfeksiyonların en yaygın formu akut apikal apselerdir. Akut apikal apselerde; *Fusobacterium*, *Dialister*, *Prevotella*, *Treponema* ve *Porphyromonas* gibi gram negatif basil, gram pozitif kok, anaerobik MO'lar baskındır (30, 31). Kronik apikal apselerde ise, apikal kemik yıkımına bağılı periapikal radyolüsen si ve sinüs yolu oluşumu gözlemlenebilir (32). Bu durumda genellikle *P. endodontalis*, *D. invisus*, *S. moorei* türleri tespit edilmektedir (30).

2.2. Kök Kanalından İzole Edilen Mikroorganizmalar

Kök kanal sistemi enfeksiyonları dinamik bir süreç olup, her aşamada farklı bakteri türleri öne çıkabilir. MO'ların değişimi çevresel koşullara, özellikle oksijen seviyesi ve besin kaynaklarına bağılıdır (33). Pulpa enfeksiyonunun erken evrelerinde fakültatif MO'lar baskınken zamanla pulpa dokusunda nekroz ve oksijen eksikliği gelişir. Kan akışının olmaması nekrotik pulpadaki oksijen desteğini keser ve kök kanal sisteminde zorunlu anaerobik MO'ların hayatta kalmasına olanak tanır (34).

Primer kök kanal enfeksiyonları genellikle miks enfeksiyonlardır ve çoğunlukla gram negatif anaerobik bakteriler içerir. Sekonder veya inatçı enfeksiyonlar ise primer enfeksiyonlardan kıyasla daha az çeşitlilik gösterir ve genellikle gram pozitif anaerob bakteriler, özellikle *E. faecalis*, enfeksiyonlarda sıkça tespit edilir (35). Sekonder enfeksiyonlarda ayrıca mantar türlerine de sıkça rastlanabilir (36). Gram pozitif bakterilerin sekonder enfeksiyonlarda daha baskın olmasının nedeni, bu bakterilerin değişen çevresel koşullara daha iyi uyum sağlamaları ve antimikrobiyal ajanlara karşı daha dirençli olmalarıdır.

2.2.1. Enterokoklar

Enterokoklar hem insanlarda hem de hayvanlarda yaygın olarak bulunan gram pozitif koktur ve genellikle gastrointestinal ve genitoüriner sistemlerde yer alırlar (37). Bağırsakta kommensal bakteri olarak kabul edilmekle birlikte fırsatçı patojenler arasında yer alırlar (38). Enterokok kaynaklı enfeksiyonlar arasında bakteriyemi, cerrahi yara

enfeksiyonları, idrar yolu enfeksiyonları, endokardit ve periradiküler apseler örnek olarak verilebilir (39).

Enterokok türleri 10 ve 45 °C arası sıcaklıklar arasında hayatta kalabilir ve asidik, alkali, hipertonik ve hipotonik ortamlardan etkilenmezler (40). *E. faecalis* klinik enfeksiyonlarda en sık karşılaşılan enterokok türüyken, *E. faecium* antibiyotiklere karşı yüksek direnç gösterir. Bu nedenle, Enterokok türleri hastane kaynaklı enfeksiyonlarda önemli bir rol oynar (3). Enterokoklar, Streptokoklar, gram pozitif basiller gibi endodontik tedavi görmüş başarısız dişlerde en fazla izole edilen bakterilerdendir (41).

Enterokokların enfeksiyon patogeneziindeki rolü adezyon ve kolonizasyon yetenekleri, virülans faktörleri ve biyofilm oluşturma kapasiteleri ile yakından ilişkilidir. Bu bakteriler, birçok antibiyotik grubuna karşı doğal bir direnç sergilerken, plazmid ve transpozon gibi direnç genlerini alarak kazanılmış direnç de geliştirebilirler (38).

2.2.1.1. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*)

E. faecalis, sporsuz üreyebilen, fermentatif gram pozitif fakültatif anaerobik koktur. Hücreleri 0.5-1 µm çapında olup oval şeklindedir ve tek başına veya çiftler halinde bulunabilir (42). Küçük boyutu sayesinde dentin tübüllerine 100-400 µm kadar penetre olabilir ve böylece mikrobiyal ajanlardan korunabilir (43).

E. faecalis çevresel stres koşullarında hayatta kalabilme yeteneğine sahiptir ve yaşayabilir ancak kültürlenemez (VBNC) duruma geçebilir ve uygun koşullar sağlandığında eski durumuna dönebilir (44). Yapılan çalışmalar (45, 46), *E. faecalis*'in enfekte kök kanallarında biyofilm içinde 12 aya kadar yaşayabildiğini ortaya koymuştur

E. faecalis, dentin tübüllerine penetre olabilmesinin yanı sıra uzun süreli açlığa dayanıklıdır ve biyofilm oluşturma kapasitesine sahiptir. Biyofilm oluşumu sırasında dentin yüzeyine bağlanan mikrokoloniler, dentin yüzeyinden kalsiyum ve fosfat iyonlarının çözünmesine neden olarak biyofilm tabakasının mineralize olmasını sağlar. Bu mineralizasyon, biyofilmin direncini artırır ve böylece *E. faecalis* biyofilmi irigantlara, kalsiyum hidroksite ve diğer kanal içi ilaçlara karşı direnç geliştirebilir (47).

E. faecalis, elverişsiz ortamlarda dahi hayatta kalma, üreme ve biyofilm oluşturma yeteneği sayesinde dirençli enfeksiyonlara yol açabilir. Primer endodontik enfeksiyon vakalarının %18'inde *E. faecalis* tespit edilirken, başarısız endodontik tedavi görmüş dişlerin %67'sinde bu bakteri izole edilmektedir (48).

2.2.2. Streptokoklar

Streptokoklar, hareketsiz, sporsuz gram pozitif fakültatif anaerob koklardır. Genellikle 2 µm'den daha küçük, oval veya yuvarlak şekllindedirler ve primer ve sekonder endodontik enfeksiyonlarda bulunabilirler (49, 50). Biyofilm oluşumu sırasında, yüzeylere ilk olarak tutunarak diğer bakteri türlerinin kolonizasyonuna zemin hazırlar. Bu ilk adım, polimikrobiyal biyofilm oluşumunu kolaylaştırarak MO'lara ait karmaşık toplulukların gelişmesine olanak tanır (51).

Viridans grubu (oral) streptokoklar, ağız florasının %30-60'ını oluşturan önemli bakterilerdir. Bu MO'lar diş yüzeylerinde, periodontal ceplerde, kök kanallarında, damakta, dilde ve farinks mukozalarında bulunabilirler. Enfeksiyon oluşturmaları, genellikle bulundukları yerden ayrılmaları ve konağın savunma mekanizmasının zayıflamasıyla mümkündür. Bu bakteriler, kök kanalı enfeksiyonunun yanı sıra, subakut bakteriyel endokardit, kronik akciğer enfeksiyonları, genital ve üriner sistem enfeksiyonları, peritonit ve çeşitli apseler gibi patolojilerde de etken olarak izole edilebilirler (52).

2.2.2.1. *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)

S. mutans, diş çürüğünün, pulpa ekspozu ve nekrozunun sık karşılaşılan nedenlerinden biridir. Diş çürüğü dünya nüfusunun %90'ını etkileyen bir sorundur ve *S. mutans* diş çürüğü oluşumunda önemli bir rol oynar. Çürüğün pulpa dokusuna ulaşması, pulpal nekroza ve periapikal lezyonlara yol açabilir (53).

S. mutans'ın diş yüzeyinde biyofilm oluşturma kapasitesi, karbonhidratlardan asit üretimi ve düşük pH ve oksidatif strese karşı dayanıklılığı, bu bakterinin önemli virülans faktörlerindendir (54).

Son araştırmalar, *S. mutans* suşlarının kollajen bağlayıcı proteinlerden (CBP'ler) olan Cnm ve Cbm aracılığıyla insan endotel ve epitel hücresinin sitoplazmasına girebildiğini ve burada hayatta kalabildiğini ortaya koymuştur (55, 56). Bu invazif özellik, bakterinin çevresel zorluklara karşı direnç geliştirmesine yardımcı olur. Cnm ve Cbm proteinleri yalnızca *S. mutans*'a özğüdür ve Cnm (+) suşlar, Cbm (+) olanlara kıyasla daha sık izole edilmektedir (56, 57).

Çeşitli çalışmalar, CBP üreten *S. mutans* suşlarının enfektif endokardit, hemorajik inme, serebral mikrokranmalar, steatohepatit ve IgA nefropatisi gibi oral dış enfeksiyonlarla sıkça ilişkili olduğunu göstermiştir (58, 59). Pulpitisli dişlerin nekrotik pulpa dokularında yapılan bir çalışmada, *S. mutans* suşlarının yüksek oranda bulunduğu (%50) ve bu suşların yaklaşık %20'sinin Cnm genine sahip olduğu tespit edilmiştir (60). Pulpa dokularında bulunan invaziv CBP (+) *S. mutans*, özellikle KKT sırasında organik ve inorganik artıkların dışarı çıkma olasılığı nedeniyle bakteriyemi ve enfeksiyon riskini artırabilir.

2.2.3. Stafilokoklar

Stafilokoklar, spor oluşturmayan, gram pozitif, fakültatif anaerobik özellik gösteren, 0.5-1.5 µm çapında küre şekilli bakterilerdir. Genellikle deri ve mukozalarda normal floranın bir parçası olarak bulunurlar. Bununla birlikte, fırsatçı patojen olarak çeşitli enfeksiyonlara yol açabilirler. Stafilokok türlerinden bazıları, *in vivo* veya *in vitro* koşullarda kapsül oluşturabilme yeteneğine sahiptir. Ayrıca, katalaz ve hyaluronidaz gibi enzimler üretirler, bu da bakterilerin doku içine invazyonunu kolaylaştırarak enfeksiyonların gelişimine katkıda bulunur.

Stafilokoklar endodonti alanında genellikle, inatçı enfeksiyonlarda, apselerde ve biyomateryal kaynaklı enfeksiyonlarda gözlenmektedir (61).

2.2.3.1. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*)

S. aureus, pnömoni, endokardit ve septik şok gibi ciddi enfeksiyonlara yol açabilen bir gram pozitif patojendir. Sağlıklı bireylerin yaklaşık %20-30'u bu bakterinin kalıcı kolonizasyonuna sahipken, %30'unda ise geçici olarak kolonize olmaktadır (62).

S. aureus'un biyofilm oluşturma yeteneği, metisiline dirençli *S. aureus* (MRSA) ve vankomisine dirençli *S. aureus* (VRSA) gibi antibiyotiklere dirençli suşların ortaya çıkmasına neden olmakta ve bu durum kronik enfeksiyonlarla ilişkilendirilmektedir (63). Birçok ilaca direnci bulunan *S. aureus*'a karşı, tedavi seçeneklerinin sınırlı kalması ve morbidite ile mortalite oranlarını artırması nedeniyle halk sağlığı için önemli bir tehdit haline gelmiştir. *S. aureus*'un diş enfeksiyonlarındaki varlığı, özellikle artan antibiyotik direnci nedeniyle büyük bir önem taşımaktadır. Bu nedenle, *S. aureus* kaynaklı diş enfeksiyonlarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan antibiyotiklere karşı gelişen mikrobiyal direnç durumunun incelenmesi ve değerlendirilmesi gereklidir.

2.2.4. Mantarlar

Endodontik enfeksiyona sahip dişlerde %3-18 oranında mantar varlığı bulunduğu ve bunların çoğunluğunun *Candida* türlerinden oluştuğu bildirilmiştir (36,64). Yapılan sistematik ve meta-analizlerde, enfekte kök kanallarında en sık izlenen mantar türünün *C. albicans* olduğu gözlenmiştir (64).

C. albicans dental protezlere ve dentin tübüllerine penetre olup, biyofilm oluşturabilir (65, 66). Biyofilm içerisinde bulunan *C. albicans* hücre dışı polimerik maddeler matriksi (EPS) ile korunarak, hücre büyümesi ve metabolizması yavaşlar, böylece konak immün savunmasına ve antifungal tedavilere karşı daha dirençli hale gelir (66, 67). Bu yüzden KKT'ye yanıt vermeyen inatçı enfeksiyonlarda yaygın olarak bulunur.

2.2.5. Virüsler

Herpes virüslerinin, semptomatik apikal periodontitiste, akut apikal absede, geniş radyolüsent lezyonlarda ve HIV'li hastalarda görülen lezyonlarda rol oynadığı bildirilmiştir (68, 69).

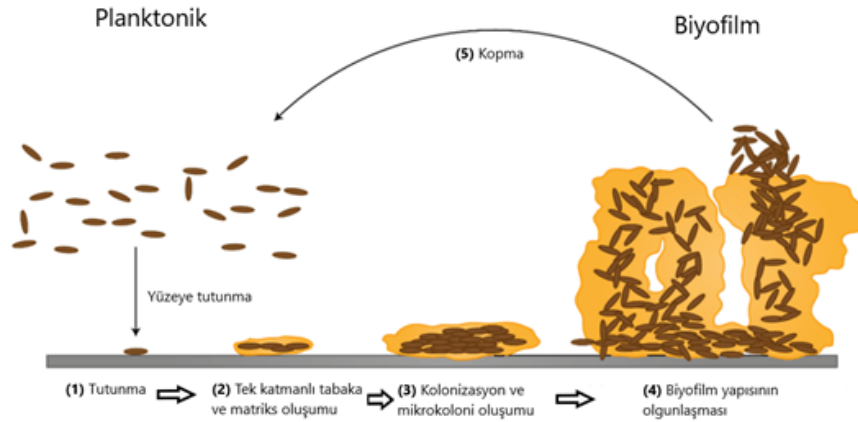
Endodontik ve periodontal hastalıklarda, Herpes virüslerinin bakteriyel patojenlerin epitel hücrelere bağlanmasını ve invazyonunu artırarak virülans faktörlerini güçlendirdiği gözlemlenmiştir (69).

2.3. Biyofilm

Biyofilm, hücrelerin bir yüzeye sıkıca yapıştığı ve kendi ürettikleri EPS ile kaplanmış, hareketsiz çok hücreli mikrobiyal bir topluluk olarak tanımlanabilir (70). EPS moleküllerinin matriks içindeki organizasyonu, biyofilmdeki organizmaların mekanik özelliklerini ve fizyolojik aktivitelerini belirleyen moleküller arası etkileşimlere dayanır.

Biyofilm oluşumu üç temel bileşene ihtiyaç duyar: sıvı bir ortam, bakteri hücreleri ve katı bir yüzey. İlk aşamada, platonik makromoleküller yüzeye adsorbe olur ve organik ile inorganik molekül yüzeylerine bağlanır. İkinci aşamada, MO'lar fimbria ve pilus gibi yapılar aracılığıyla yüzeye tutunur, bu bağlanma polimer üretimi ile güçlenir. Üçüncü aşamada, bağlanan MO'lar metabolik faaliyetlerini sürdürerek çoğalır ve yapısal olarak organize olmuş karmaşık bir mikrobiyal ortam oluşturur. Son aşamada, biyofilm içerisindeki MO'lar biyofilmden ayrılırlar (71).

MO'ların türü ve çevresel faktörlere bağlı olarak, biyofilm içindeki gelişimleri ve düzenleri değişiklik gösterebilir. Bazı MO'lar biyofilmin üst tabakasından ayrılabilir. Bu ayrılma süreci, MO'ların gelişimi sırasında sürekli olarak devam eder ve böylece MO'lar başka alanlara yayılabilir ve yeni koloniler oluşturabilirler (72).



Şekil 1. Biyofilm oluşum aşamaları (73)

Quorum sensing, bakteriyel hücreler arasında iletişimi sağlayan ve komşu hücrelerde gen ekspresyonunu değiştiren bir mekanizmadır. Bu sinyaller, biyofilm içerisindeki bakterilerin fenotipik özelliklerinde değişikliklere yol açar (74).

Biyofilmlerde bulunan bakterilerin, planktonik bakterilere kıyasla, konak savunma mekanizmalarına ve antimikrobiyal maddelere karşı yaklaşık 1000 kat daha fazla direnç sahip oldukları bildirilmektedir (75). Biyofilm yapısına bağlı olarak gelişen direnç, şu mekanizmalarla açıklanmaktadır; (a) EPS, antimikrobiyal ajanların difüzyonu için bariyer görevi görmektedir, (b) Biyofilm içerisindeki bakteriler, planktonik durumdaki bakterilere kıyasla daha düşük bir metabolizma ile daha yavaş büyüme hızına sahiptir, (c) Mikrobiyal hücreler, Quorum Sensing mekanizması aracılığıyla biyofilm yapısındaki yararlı türlerin çoğalmasını destekler, (d) EPS, pH değişiklikleri, UV ışınları, ozmotik şok ve ısı değişikliği gibi çevresel değişkenlere karşı koruma sağlar (76-78).

2.3.1. Endodontik Biyofilmler

Oral mikrobiyota ile karşılaştırıldığında, endodontik mikrobiyota daha az çeşitlilik gösterir. Enfeksiyon ilerledikçe, kök kanalında besin çeşitliliği azalır ve anaerobik bir ortam oluşur. Bu değişiklikler bakteriler için zorlayıcı bir ekolojik niş yaratır. Bakteriyel büyümenin bir parçası olarak biyofilm, bu zorlu koşullarda hayatta kalabildiği için kök kanal sisteminde biyofilm oluşumu desteklenir (79).

Endodontik biyofilmler şu şekilde sınıflandırılabilir;

- **Kanal içi mikrobiyal filmler:** Endodontik enfeksiyona sahip dişlerin kök kanal sisteminde yer alan biyofilmlerdir (80).
- **Ekstraradiküler mikrobiyal filmler:** Kök yüzeyi biyofilmleri olarak da adlandırılan bu biyofilmler, endodontik olarak enfekte olmuş dişlerde kök apeksine bitişik kök yüzeyinde bulunur (81). Ekstraradiküler biyofilmler apikal periodontitis ve sinüs yolu bulunan kronik apikal apselerde bulunabilir (82).
- **Periapikal mikrobiyal filmler:** Endodontik enfeksiyona sahip dişlerin periapikal bölgesinde bulunan biyofilmlerdir. Bu biyofilmler kök kanalı ile ilişkili veya bağımsız olarak bulunabilir (83).
- **Biyomateryal merkezli enfeksiyonlar:** Bakterilerin biyomateryaller üzerine yapışarak oluşturdukları biyofilmlerdir. Biyomateryalin kök kanalı içinde ve kök kanalından taşmış olmasına göre intraradiküler veya ekstradiküler olarak adlandırılabilirler (84).

2.4. Biyofilm Saptama Yöntemleri

Enfekte kök kanallarının tedavisinin temel amacı, kanal içerisindeki mikrobiyal yükü azaltmaktır. Bu, MO'ların, yan ürünlerinin ve debrisin ideal bir şekilde kök kanalından uzaklaştırılmasını gerektirir. Bakteriyel patojenler, apikal patolojilere neden olabileceğinden, kök kanalı içindeki biyofilmin de uzaklaştırılması önemlidir (85). Biyofilmin varlığını tespit etmek için mikrobiyolojik kültür, moleküler ve mikroskopik testler kullanılabilir.

2.4.1. Mikrobiyolojik Kültür Testleri

Bu yöntem, örneklerdeki MO'ların sayısını belirlemek için örnekleme ve kültür işlemlerini içerir. Örnekleme sırasında, kök kanalı içine sıvı eklenir ve bu sıvı ile eğelerle kazıma hareketi yapılarak biyofilm gevşetilir veya sıvı, kağıt konlara emdirilir. (86). Bu işlem sırasında, kanalın apikal, orta ve koronal bölgeleri arasında ayırım yapılamamaktadır (87).

Kültür işleminde, plak üzerinde koloniler oluştuğunda, numunede koloni oluşturan birimlerin (CFU) sayısı belirlenir (88). Bu yöntem, sadece laboratuvar ortamında kültürü yapılabilen MO'ların tespiti için kullanılabilir (86).

2.4.2. Taramalı Elektron Mikroskobu (TEM)

TEM, endodonti alanında önemli bir görüntüleme aracı olarak öne çıkmaktadır. Bu mikroskop, yüksek çözünürlükte yüzey ve yapısal analizler yapabilme kapasitesi sayesinde, kök kanal sistemi ve dentin yapısının detaylı incelenmesine olanak tanır. TEM, özellikle dentin tübüllerinin mikroskopik yapısının, kök kanal dolgu materyallerinin adaptasyonu ve yüzey özelliklerinin, biyofilm oluşumunun ve kök kanal sisteminin karmaşık morfolojisinin analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır (89, 90).

Bu tekniğin dezavantajı ise, fiksasyon, dehidratasyon, püskürtme gibi orijinal biyofilm yapısını etkileyebilen numune hazırlama aşamalarına ihtiyaç duymasıdır (88).

2.4.3. Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop (KLTM)

Biyofilmin floresan boyanması ve numunenin 200 µm derinliğe kadar çok ince optik dilimlerle görüntülenmesi işlemini içerir. Bu optik dilimler, biyofilmin yüzeyinin farklı derinliklerinden elde edilerek yazılım tarafından çakıştırılır ve biyofilmin üç boyutlu görüntüsü oluşturulur (86).

Son yıllarda, endodontik çalışmalarda KLTM, irigantların biyofilmler üzerindeki etkilerinin gözlemlenmesi, kanal dolgu materyallerinin dentine penetrasyonunun ölçülmesi ve retreatment işleminden sonra kök kanalı içerisinde kalan artık dolgu materyalinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (91-93).

KLTM ile elde edilen görüntüler, biyofilmdeki hücrelerin dağılımını, kalınlığını ve biyofilmin biyolojik hacmini belirlemekte kullanılır. Biyofilm analizi sırasında, ölü ve canlı hücreleri farklı renklerde boyayan boyalar kullanılır (94). En yaygın kullanılan boyama yöntemi, SYTO-9 ve propidyum iyodür (PI) kombinasyonudur. SYTO-9, canlı bakteri hücrelerini yeşil floresanla boyarken, PI ölü bakteri hücrelerini kırmızı floresanla boyar.

2.4.4. Işık Mikroskobu

Işık mikroskobu, biyofilmlerin ve kök kanalı içindeki dağılımlarının görüntülenmesi için kullanılır. Geniş bir büyütme aralığına sahip olan ışık mikroskobu, biyofilmin genel yapısını ve MO'ların morfolojisini incelemeyi sağlar. Ancak, ölü veya canlı MO'lar arasında ayırım yapılamaz (86).

2.4.5. Moleküler Teknikler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kısa DNA dizilerinin enzimatik olarak çoğaltılmasına dayanır. Bu yöntem, belirli bir bakteri DNA'sının varlığını veya yokluğunu tespit edilmesini sağlar (95). Moleküler yöntemler, kültürü yapılamamış türler ve VBNC durumundaki bakterileri tespit etmek için de kullanılabilir (86).

2.5. Endodonti’de Kullanılan İrigantlar

Endodontik tedavinin temel amaçlarından biri, periradiküler enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisidir (96). Endodontik tedavilerin başarısı için tek başına mekanik şekillendirme etkili bir yöntem değildir. Kök kanal anatomisinin karmaşıklığı nedeniyle, şekillendirme işlemi sonrasında bile kök kanal sisteminin en az %40'ına erişilemediği belirtilmiştir (97). Bu nedenle, kök kanalının tamamen dezenfeksiyonu için mekanik şekillendirmeye ek olarak kimyasal dezenfeksiyon da uygulanmalıdır.

İdeal bir iriganttan beklenen özellikler (98-100); (a) Geniş antimikrobiyal spektruma ve uzun etkiye sahip olmalı, (b) Periapikal dokuları irrite etmemeli, (c) Dolgu malzemeleri üzerinde olumsuz etkiye sahip olmamalı, (d) Dentin tübüllerine penetre olabilmeli ve dentin dokusunun fiziksel özellikleri üzerine olumsuz etkisi olmamalı, (e) Toksik ve alerjen olmamalı, (f) Smear tabakasını kaldırmalı, (g) Yüzey gerilimi düşük ve lubrikant etkili olmalı, (h) Uygulanması kolay olmalı, (i) Dişte renklenmeye sebep olmamalı, (j) Uygun fiyatlı olmalıdır.

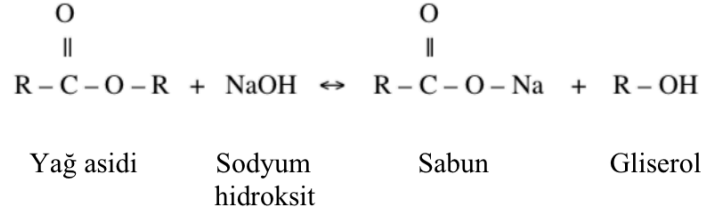
Günümüzde tek başına tüm bu kriterleri karşılayan ideal bir irigant bulunmamaktadır. Bu nedenle, etkili bir irigasyon sağlamak için birden fazla irigantın bir arada kullanılması amaçlanmaktadır (11).

2.5.1. Sodyum Hipoklorit (NaOCl) (SH)

SH, ilk kez 1789'da üretilmiş ve 1. Dünya Savaşı sırasında Dakin (101) tarafından %0.5 SH solüsyonu yara dezenfeksiyonu için kullanılmıştır. 1919'da Coolidge (102), SH'nin irigant olarak kullanımını önermiştir. SH, nekrotik organik dokuyu çözme yeteneği, sporlar ve virüsler üzerindeki etkinliği, düşük vizkositesi, lubrikasyon özelliği, düşük maliyeti ve kolay erişilebilirliği nedeniyle günümüzde KKT’de yaygın olarak kullanılan bir iriganttır (99).

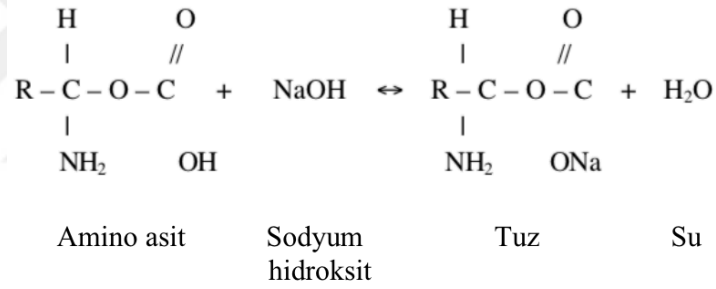
Güçlü antibakteriyel özelliğe sahip olan SH aynı zamanda etkili bir organik doku çözücüsüdür. SH organik doku ile karşılaştığında üç kimyasal reaksiyon oluşturur;

- **Sabunlaşma:** Yağ asitlerini tuz ve gliserole dönüştürerek çözeltinin yüzey gerilimini azaltır.



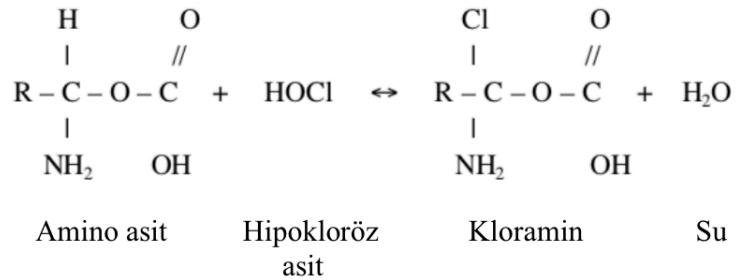
Şekil 2.1. SH'nin sabunlaşma reaksiyonu

- **Amino asit nötralizasyonu:** Aminoasitleri su ve tuz oluşturarak nötralize eder. Hidroksil iyonlarının oluşumu ile pH azalır.



Şekil 2.2. SH'nin amino asit nötralizasyon reaksiyonu

- **Kloraminasyon:** Hipokloröz asit, organik dokularla temas ettiğinde çözücü olarak işlev görür ve proteinlerle reaksiyona girerek amino gruplarıyla kloramin oluşturur. Hipokloröz asit ve hipoklorit iyonları, aminoasitlerin parçalanmasına ve hidrolize uğramasına yol açar. Klor ile amino grupları arasındaki reaksiyonlar sonucunda oluşan kloraminler, hücre metabolizmasını etkiler.



Şekil 2.3. SH'nin kloraminasyon reaksiyonu

Bu reaksiyonlar sayesinde SH, organik doku çözme ve antibakteriyel özelliklere sahiptir (103).

SH'nin doku çözme ve antibakteriyel etkinliği, konsantrasyonuna bağlı olarak değişir ve %0.5-6 arasında farklı konsantrasyonlarda kullanılabilir. Ancak, endodontik tedavi için ideal SH konsantrasyonuna dair farklı görüşler bulunmaktadır (104). Yüksek konsantrasyonlarda doku çözücü özellikleri artmasına rağmen, SH'nin sitotoksitesi de artar. Düşük konsantrasyonlarda ise, hacminin artırılması veya solüsyonun ısıtılması gibi ek işlemlerle SH'nin etkinliği artırılabilir ve böylece sitotoksite azaltılabilir (105).

SH'nin organik dokularla teması sırasında serbest klor değeri zamanla azaldığından, antibakteriyel etkisi de giderek azalır. Bu durum, düşük konsantrasyonlu SH solüsyonlarının etkinliğinin daha hızlı kaybına neden olur, bu yüzden yüksek konsantrasyonlarda kullanılması veya düşük konsantrasyon kullanılıyorsa daha sık ve bolca değiştirilmesi gerektiği belirtilmiştir (106, 107). SH'nin etkinliği, solüsyonun konsantrasyonu, hacmi, doku ile temas süresi, sıcaklığı ve irigasyonun aktive edilmesi gibi faktörlerle değişir (108).

SH, kök kanal sistemindeki inorganik bileşenleri çözme kapasitesine sahip olmadığı için, şelatlayıcı ajanlarla birlikte kullanılması önerilmektedir (109). Klinik uygulamada, SH'den sonra genellikle EDTA kullanılır. SH ve EDTA birlikte kullanıldığında, hipoklorit iyonu azalır, bu da SH'nin hem organik doku çözme yeteneğini hem de antibakteriyel etkinliğini azaltır (110). Bu nedenle, solüsyonlar arasında serum kullanımı önerilmektedir (111).

SH, endodontik tedavilerde sıklıkla tercih edilse de yüksek derecede sitotoksik olabilir ve yan etkileri nedeniyle dikkatli kullanılmalıdır. SH'nin enjeksiyonu veya irigasyon sırasında apikal foramenden sızması, ağrı, şişlik, parestezi, hematoma ve nekroz gibi ciddi komplikasyonlara yol açabilir (112).

2.5.2. Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)

Şelasyon ajanları, 1957'de Nygaard-Østby tarafından dar ve kalsifiye kök kanallarının şekillendirilmesi amacıyla endodontik uygulamalara dahil edilmiştir (113). Şelasyon

ajanları arasında EDTA, en yaygın kullanılan irigasyon solüsyonlarından biridir. EDTA'nın kök kanal tedavisinde jel ve sıvı olmak üzere iki formu bulunmaktadır. EDTA ve benzeri şelatörler, kalsiyum ile stabil bir kompleks oluşturarak iyonları bağlar. Tüm mevcut iyonlar bağlandığında denge sağlanır ve çözünme durur, bu sayede EDTA'nın etkisi kendiliğinden sınırlı (self-limiting) hale gelir (113).

EDTA, sıklıkla son yıkama irigantı olarak tercih edilir. Genellikle %17 konsantrasyonunda kullanılan EDTA, kök kanalları içerisindeki smear tabakasını 1 dk.'dan kısa sürede uzaklaştırabilir. EDTA'nın kendiliğinden sınırlı etkisi olmasına rağmen, kök kanallarda uzun süre bekletildiğinde veya hemen ardından SH kullanıldığında dentin erozyonuna neden olabileceği gözlemlenmiştir (114).

Smear tabakasını etkili bir şekilde uzaklaştırmak için tek başına EDTA kullanımı yeterli değildir. Smear tabakası içerisindeki organik materyalleri temizlemek için SH gibi proteolitik ajanlara ihtiyaç duyulur (115). EDTA, SH ile karıştırıldığında, EDTA'nın kalsiyum kompleksleri oluşturma özelliğini koruduğu, ancak SH'nin klor serbestlemesini engelleyerek doku çözme etkisini yitirdiği bildirilmiştir (116).

EDTA, inorganik doku çözme etkisi sayesinde biyofilm ve smear tabakasındaki inorganik bileşenleri çözerek antibakteriyel etki sağlar (117). EDTA'nın antibakteriyel etkinlik açısından, sitrik asit ve %0.5 SH'den daha yüksek, ancak %2.5 SH ve %0.2 KH'den daha düşük bir etkiye sahip olduğu bildirilmiştir (118).

2.5.3. Klorheksidin Glukonat (KH)

KH, ilk kez 1953 yılında Birleşik Krallık'ta antiseptik krem olarak kullanılan bir katyonik bisguaniddir. PH değeri 5.5-7 arasında renksiz ve kokusuz bir yapıya sahiptir. Endodontik uygulamalar için sıvı ve jel formunda bulunur. KH, gram pozitif ve gram negatif bakterilere, ayrıca mayalara, özellikle *C. albicans*'a karşı etkili geniş spektrumlu bir antimikrobiyal ajandır (119).

KH'nin yüksek konsantrasyonlarda bakterilerin hücre zarına zarar vererek bakterisidal etkili, düşük konsantrasyonlarda ise hücreye kalıcı hasar vermeden bakteriyostatik etki gösterdiği bildirilmiştir (120). KH'nin antibakteriyel etkinliği, konsantrasyonuna bağlı

olarak değişir. Yapılan *in vitro* alışmalarda, %2'lik KH'nin %0.12'lik konsantrasyonundan daha yüksek antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu gözlemlenmiştir (121). Bu nedenle, endodontik uygulamalarda genellikle %2'lik KH kullanılır.

KH, katyonik yapısı sayesinde dentin tübülleri içinde uzun süre etkili kalabilir. Dentin tblllerine nüfuz eden KH'nin kademeli ve uzun süreli salınımı "*substantivite*" olarak adlandırılır. Bu etki, KH'nin konsantrasyonuna ve temas süresine bağlıdır ve 120 güne kadar kök kanal dentininde gözlemlenebilir (122). Substantivite özelliği nedeniyle, final yıkama solüsyonu olarak kullanılması nerilen KH'nin doku çözme özelliği bulunmadığı için, SH gibi diğer ajanlarla kombinasyon halinde kullanılması tavsiye edilir.

KH ve SH'nin bir araya gelmesi durumunda 4-kloro-anilin (PCA) adı verilen renkli bir çökelti oluşur. Bu reaksiyon, SH'in konsantrasyonuna bağlıdır. PCA, dentin tblllerini tıkayabilir ve dişte renk değişimine yol açabilir (123). Ayrıca, PCA toksik olup, temas halinde siyanoza neden olabilecek methemoglobin oluşumuna yol açabilir.

2.5.4. Poliheksidin Biguanid (PHMB)

Poliheksametilen biguanid hidroklorür, 1954 yılında Rose ve Swain (124) tarafından geliştirilmiştir. Suda yüksek çözünürlükte olan PHMB, düşük toksisiteye sahip bir katyonik antimikrobiyal ajandır (125). Günümüzde düşük sistemik toksisitesi nedeniyle kozmetik, sanayi ve gıda sektörlerinde dezenfektan olarak kullanılmaktadır. PHMB, HPV, HIV gibi virüslere, mantarlara ve hem gram pozitif hem de gram negatif bakterilere karşı etkilidir (126-128).

PHMB'nin birincil etki alanı hücre zarlarıdır. Pozitif yüklü bir polikasyon olarak, PHMB hem gram pozitif hem de gram negatif bakteriler ve mantarların hücre zarlarındaki negatif yüklü fosfat baş grupları içeren fosfolipitlerle bağlanarak bir poliheksanid-fosfolipit kompleksi oluşturur (129). Bu kompleks, hücre zarındaki iyon pompalarının işlevini bozarak klor anyonlarının hücre içinde birikmesine ve potasyum katyonlarının sızmasına neden olur. Ayrıca, zarın bütünlüğünü bozarak şeker, amino asit ve enerji metabolizmasının taşınması ve bağlanması ile DNA bağlanması görevli reseptör ve enzimlerin işlevlerini de etkiler (130). Sonuç olarak, zarın daha akışkan ve geçirgen hale

gelmesi, sitoplazmanın dışarı çıkması, hücrenin çökmesi ve nihayetinde hücre ölümüne yol açar (131, 132).

PHMB, düşük konsantrasyonlarda bakteriyostatik, yüksek konsantrasyonlarda ise bakterisidal etkiye sahiptir; bu etki, polimerizasyonun artmasıyla birlikte güçlenir (131). Ayrıca, PHMB, zaman ve konsantrasyona bağlı olarak antifungal aktivite de sergiler (133).

PHMB'nin polisakkaritlere olan yüksek bağlanma afinitesi, bakteriyel ekstraselüler biyofilm matriksinde antiseptik bir etki sağlar. Bu matriks, bakterilerin doğal yaşam alanı olup, biyositlerden koruyan dayanıklı bir yapı sunar. Ekstraselüler biyofilm matriksinin enfeksiyonların kronikleşmesinde rol oynadığı görülmektedir. PHMB'nin biyofilmde birikmesi, yerleşik MO'lar için daha toksik hale gelir (134).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Etik Kurul Onayı

Bu çalışma için Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu'nun TBAEK – 577 sayılı kararı doğrultusunda etik kurul onayı alınmıştır (Ek 1).

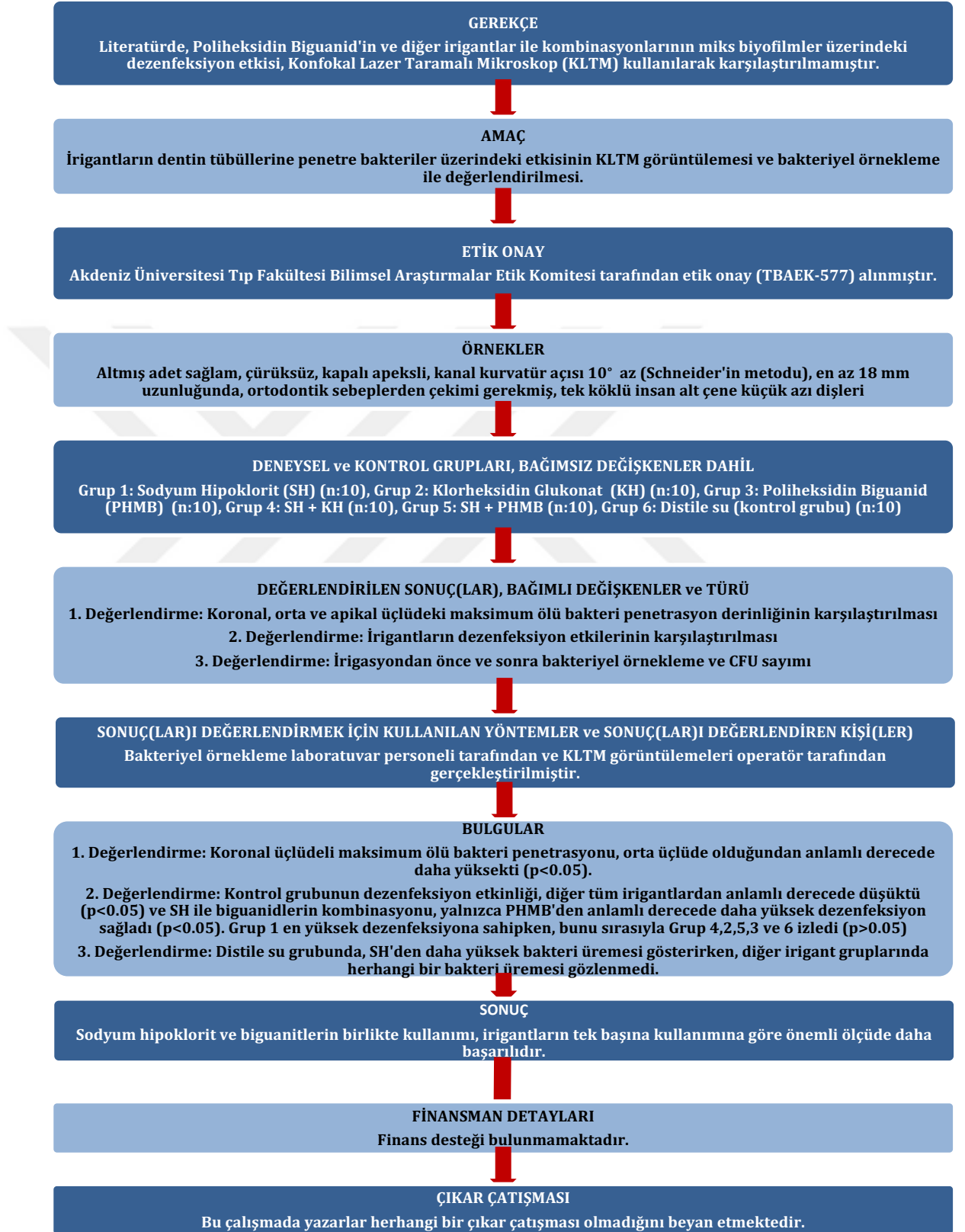
Çalışmada kullanılan diş örneklerine bakteri ekim ve inokülasyon işlemleri Karadeniz Teknik Üniversitesi (KTÜ), Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında, örneklerin KLTm ile görüntülenmesi ise KTÜ, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışma, 2021 yılına ait Endodonti'de Laboratuvar Çalışmaları için Tercih Edilen Raporlama Öğeleri (PRILE) yönergelerine göre yapılmıştır (Tablo 1.) (135).

3.2. Örneklem Büyüklüğünün Hesaplanması

Örneklem büyüklüğünü belirlemek için Vatkari ve ark.'nın araştırması (136) referans alınmıştır. Örnek büyüklüğü, G*Power yazılımı (sürüm 3.1; Heinrich Heine Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Almanya) ile etki büyüklüğü (f) = 0.5, %95 güven aralığı (α = 0.05) ve %80 güç (β = 0.15) ile hesaplandı.

Tablo 1. PRILE 2021 kılavuzuna göre çalışmanın akış şeması

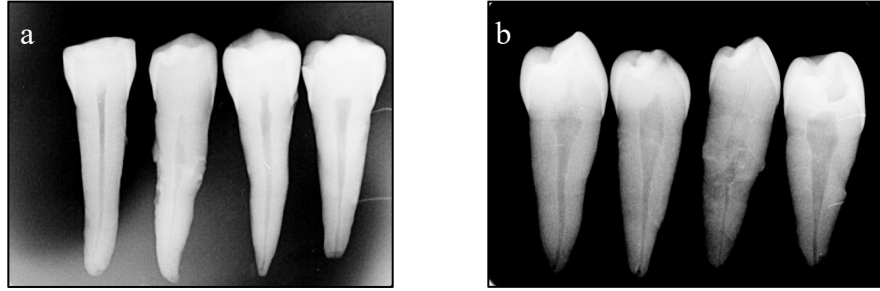


3.3. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Seçimi

Çalışmada kullanılmak üzere, yeni çekilmiş 60 adet alt çene insan küçük azı dişi seçildi. Protetik veya periodontal sebeplerle çekilmesi gereken dişlerin; çürüksüz, daha önce KKT görmemiş, kök uçları kapanmış, çatlak veya kırık içermemesine dikkat edildi (Resim 1). Bu kriterlere uymayan dişler çalışmaya dahil edilmemiştir. Her bir diş için bukkolingual (Resim 2a) ve mezyodistal yönden (Resim 2b) radyograf çekildi ve elde edilen radyograflar Cliniview 10.2 (Dexis, Sidney, Avusturalya) yazılımı kullanılarak görüntülendi.



Resim 1. Deneyde kullanılacak dişlerin seçimi



Resim 2. (a) Dişlerin bukkolingual radyografisi, (b) Dişlerin mezyo-distal radyografisi

Görüntüleme sonuçlarına dayanarak, birden fazla kanalı bulunan ya da kanal kalsifikasyonu veya rezorpsiyonu saptanan dişler çalışma dışında bırakıldı. Dahil edilmeyen dişlerin yerine ek diş örnekleri dahil edildi.

Seçilen dişlerin üzerindeki sert ve yumuşak doku kalıntıları bir kretuar yardımıyla temizlendi ve kurumalarını önlemek amacı ile çalışma süresi boyunca dişler serum fizyolojik solüsyonu içerisinde muhafaza edildi.

3.4. Çalışmada Kullanılacak Dişlerin Hazırlanması

Örneklerin standardizasyonunu sağlamak amacıyla, tüm dişlerin uzunluğu 18 ± 1 mm olacak şekilde örnek dişlerin koronal kısımları, acretöre (KAVO Gentle Silence Lux 8000 B, Biberach, Almanya) takılan 8 nolu elmas fissur frez (Shenzhen Dian Fong Abrasives, Guangdong, Çin) kullanılarak uzaklaştırıldı.

Giriş kaviteleri ise 1.4 nolu elmas rond frez (Shenzhen Dian Fong Abrasives) ile açıldı. Kök kanalı içerisine yerleştirilen #10 K-tipi eğenin (Shenzhen Perfect Medical Instruments), apikal uçta gözlendiği ilk uzunluğundan 1 mm çıkarılarak çalışma boyutu belirlendi.

Kök kanallarının şekillendirilmesi, üretici firmanın yönergelerine uygun şekilde ProTaper Next eğe sistemi (Dentsply Sirona, Erlangen, Almanya) (Resim 3) ile gerçekleştirildi. Sırasıyla X1, X2, X3 ve X4 nolu eğeler, 300 rpm hız ve 2 Ncm tork rotasyon moduna ayarlanmış EndoRadar Pro (Woodpecker DTE, Tokyo, Çin) (Resim 4) ile kullanıldı.



Resim 3. Çalışmada kullanılan ProTaper Next eğeleri



Resim 4. Çalışmada kullanılan EndoRadar Pro Endo-Motor cihazı

Şekillendirme işlemi esnasında kullanılan her eğeden sonra kök kanalları 30 gauge (G) ucu kapalı yandan açık iğne (Medic, Şangay, Çin) ile 2.5 mL'lik şırınga (Genject, Sincan, Ankara) (Resim 5) kullanılarak, 2 mL %2.5 SH (Cerkamed, Pawloski, Polonya) ile yıkandı. MO inokülasyonundan önce smear tabakasını uzaklaştırmak için, her örnek sırasıyla 2 mL %17 EDTA, 2 mL distile su ve 2 mL %2.5 SH ile irigasyona tabi tutuldu.



Resim 5. Çalışmada kullanılan şırınga ve 30 G'lik ucu kapalı yandan açık iğne ucu

Şekillendirme işlemi tamamlanan dişlerin kök yüzeyleri, tırnak cılası (L'Oreal, Paris, Fransa) ile kaplandıktan sonra akrilik rezine yerleştirilerek çalışma blokları oluşturuldu (Resim 6). Dişlerin koronal bölgelerinin üst yüzeyleri, akrilik rezin ile aynı seviyede olacak şekilde yerleştirildi. Dişlerin kök kanallarına akrilik rezin materyalinin girmesini

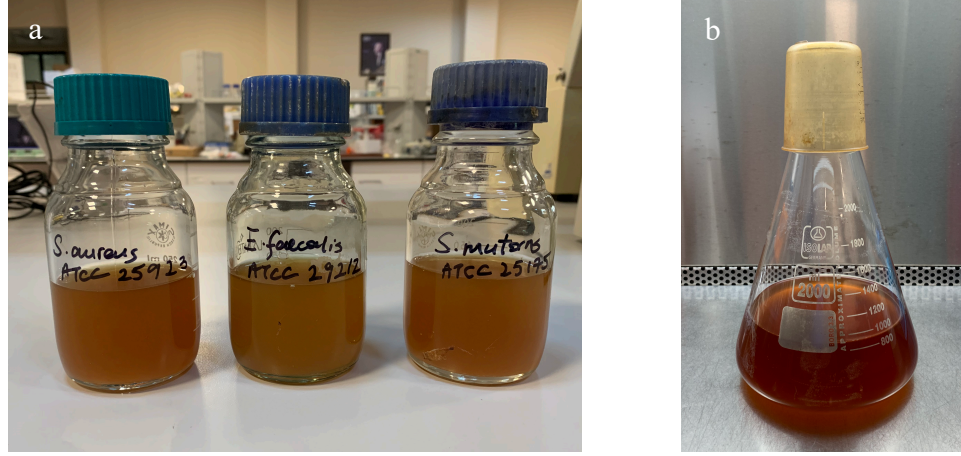
önlemek için, örneklerin kanal ağızları teflon bant ile kapatıldı. Akrilik rezinin sertleşme işlemi tamamlandıktan sonra, dişler 121 °C sıcaklık ve 1 atm basınç altında 15 dk. otoklavda steril edildi.



Resim 6. Akrilik rezin içerisine yerleştirilen diş örnekleri

3.5. Bakteri Ekimi ve Biyofilmin Hazırlanması

Kök kanallarında biyofilm oluşumu için gerekli olan, *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. mutans* (ATCC 25175), *S. aureus* (ATCC 25923) suşları KTÜ, Tıp Fakültesi, Temel Tıp Bölümü, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı laboratuvarından temin edildi. Suşlar -80 °C'den çıkarıldıktan sonra Tryptic Soy Agar (TSA) besiyerinde 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. Plaklardan tek koloni alınıp 150 mL'lik (Resim 7a) Brain Heart Infusion (BHI) (Difco Laboratories, Detroit, ABD) besiyeri bulunan şişelere ekimi yapıldı ve 37 °C'de 24 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan sonra her şişede bulunan bakteri kültürü OD₆₀₀ değeri spektrofotometre cihazı (Eppendorf BioPhotometer, Hamburg, Almanya) ile ölçüldü. Her bakteriden OD₆₀₀'ü 1.3 olacak şekilde, 50 mL alınarak 850 mL'lik BHI besiyerine (Resim 7b) eklendi.



Resim 7. (a) Bakteri süspansiyonları, (b) BHI besiyeri

Falkon tüplerine, örnek diş ve her örnek diş için 20 mL besiyer eklendi (Resim 8). Örnek dişler 37 °C’de 7 gün inkübasyona bırakıldı (Resim 9). CFU sayımı için, her bakteriden 10^8 ’e kadar fosfat tamponlu salin (PBS) içerisinde seri dilisyonlar hazırlandı ve ekimi yapıldı 37 °C’de 24 saat inkübasyona bırakıldı ve sonrasında CFU/mL hesaplaması yapıldı.



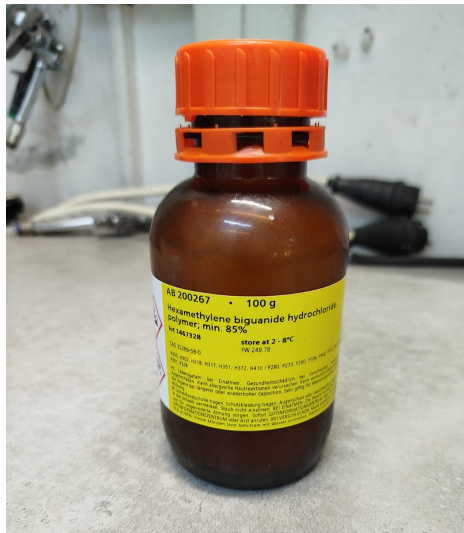
Resim 8. Falcon tüpleri içerisinde bulunan diş ve besiyeri



Resim 9. Örnek dişlerin 37°C'de 7 gün inkübe edilmesi

3.6. PHMB İrigantının Hazırlanması

Çalışmada kullanılacak PHMB irigantı, %85 saflıktaki heksametilen biguanid hidroklorid polimerinden (Aber GmbH, Karlsruhe, Almanya) (Resim 10) elde edilmişti. 0.7 gramlık toz, 2.3 gram steril deiyonize su ile karıştırıldı ve %0.2 konsantrasyonunda 300 mL'lik PHMB elde edildi.



Resim 10. Çalışmada kullanılan PHMB tozu

3.7. Kök Kanallarının İrigasyonu

Diş örnekleri uygulanan iriganta göre; 5 deney ($n = 10$) ve 1 kontrol ($n = 10$) grubu olacak şekilde rastgele 6 gruba [SH, KH, PHMB, SH + KH, SH + PHMB ve pozitif kontrol (distile su)] ayrıldı;

Grup 1 (SH Grubu): 2.5 mL'lik şırıngaya takılan ucu kapalı, yandan açık 30 G'luk endodontik iğne ile %2.5 SH (Resim 11a) kök kanalına uygulandı. TA 200 cihazına takılan 25/.04 esnek poliamid uç (Resim 11b), çalışma uzunluğundan 2 mm kısa olacak şekilde kanal içerisine yerleştirildi ve kök kanalları 20 sn. boyunca aktive edildi. İrigasyon ve aktivasyon işlemleri 3 kez tekrarlandı. Uygulamanın sonunda her örnek için toplamda 6 mL SH, 1'er dk. süreyle kullanıldı.



Resim 11. (a) Çalışmada kullanılan SH irigantı, (b) TA 200 cihazına bağlanan EDDY uç

Grup 2 (KH Grubu): %2'lik KH (Microvem, Altun Sterilizasyon, İstanbul, Türkiye) solüsyonu (Resim 12), 2.5 mL'lik şırıngaya takılan ucu kapalı, yandan açık 30 G endodontik iğne kullanılarak kök kanalına uygulandı. TA 200 cihazı yardımıyla solüsyon 20 sn. boyunca aktive edildi. İrigasyon ve aktivasyon işlemleri 3 kez tekrarlandı. Uygulamanın sonunda her örnek için toplamda 6 mL KH, 1'er dk. süreyle kullanıldı.



Resim 12. Çalışmada kullanılan KH irigantı

Grup 3 (PHMB Grubu): %0.2 PHMB solüsyonu, 2.5 mL'lik şırıngaya takılan ucu kapalı, yandan açık 30 G endodontik iğne yardımıyla kök kanalına uygulandı. Solüsyon, TA 200 cihazı ile 20 sn. boyunca aktive edildi. İrigasyon ve aktivasyon işlemleri 3 kez tekrarlandı. Uygulamanın sonunda her örnek için toplamda 6 mL PHMB, 1'er dk. süreyle kullanıldı.

Grup 4 (SH + KH Grubu): %2.5 SH solüsyonu, 2.5 mL'lik şırıngaya takılan ucu kapalı, yandan açık 30 G endodontik iğne kullanılarak kök kanalına uygulandı. TA 200 cihazı ile 20 sn. süreyle, 3 döngü boyunca 3 mL SH aktive edildi. SH'nin uzaklaştırılması için distile su kullanıldı. Ardından, kök kanalı %2 KH irigantı ile işlem görerek, 20 sn. periyotlarla ve 3 döngü şeklinde toplamda 3 mL KH aktive edildi.

Grup 5 (SH + PHMB Grubu): %2.5 SH, 2.5 mL'lik bir şırıngaya takılı, ucu kapalı yandan açık 30 G endodontik iğne kullanılarak kök kanalına uygulandı. TA 200 cihazı ile 20 sn. süreyle, toplamda 3 döngüde 3 mL SH aktive edildi. SH'nin uzaklaştırılması için distile su kullanıldı. Ardından kök kanalı %0.2 PHMB ile işlem görerek 20 sn. periyotlarla 3 döngüde toplamda 3 mL olarak aktive edildi.

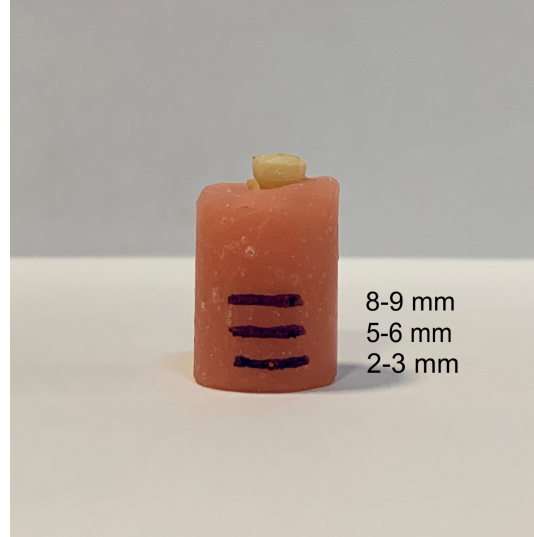
Grup 6 (Distile Su Grubu): *E. faecalis*, *S. mutans* ve *S. aureus* türlerinin kök kanallarında biyofilm tabakası oluşturduğunu gözlemlemek ve doğrulamak amacıyla, bu grup distile su ile irigasyona tabi tutuldu.

3.8. Bakteriyel Örnekleme ve CFU Sayımı

İlk bakteriyel örnekleme, irigant uygulamadan önce, her gruptan rastgele seçilen bir örnek diş ile gerçekleştirildi ve S1 olarak kaydedildi. Steril bir #30 H-tipi eğre ile kök kanalı içerisinde 30 sn. boyunca kuvvetli bir şekilde kazıma hareketi yapıldı. Daha sonra 200 µL PBS ile pipetleme hareketi yapılarak kök kanalı içerisindeki süspansiyon toplandı. İrigasyon işlemlerinin hemen ardından, aynı kök kanallarında benzer örnekleme işlemi uygulanarak bu örnek S2 olarak kaydedildi. S1 ve S2 tüplerindeki bakteriyel süspansiyonlar vortekslenip PBS ile seri olarak seyreltilti. 100 µL'lik alikotlar, BHI agara yayılarak 37 °C'de 48 saat inkübe edildi ve ardından CFU sayımı yapıldı.

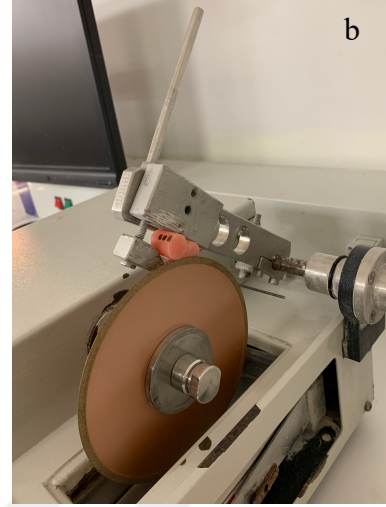
3.9. Örneklerden Kesit Alınması

Aktive edilen dişler steril kağıt konlar (Pearl Endo, Ho Chi Minh City, Vietnam) ile kurutuldu. Akrilik blokların içerisine gömülmüş diş örnekleri, kökün apikalinden 2 mm, 5 mm ve 8 mm uzaklığında olacak şekilde asetat kalemi ile işaretlendi (Resim 13).



Resim 13. Örnek dişlerin işaretlenmesi

Mikrocut cihazına (Metkon Microcut 125, Bursa, Türkiye) (Resim 14a) yerleştirilen 0.3 mm kalınlığındaki elmas kesme diski kullanılarak, işaretlenen seviyelerden yaklaşık 1 ± 0.1 mm kalınlığında su soğutması altında yatay kesitler alındı (Resim 14b).



Resim 14. (a) Microcut cihazı, (b) örneklerden kesit alınması

Her diş örneği için apikal, orta ve koronal olmak üzere 3 bölgeden kesit alındı (Resim 15a). Dijital kumpas kullanılarak dentin disklerinin kalınlıkları kontrol edildi (Resim 15b).



Resim 15. (a) Kesme işleminden sonra elde edilen dentin diskleri, (b) dijital kumpas ile ölçümleri

3.10. Dentin Disklerinin Boyanması

Her bir dentin diskinde, üretici firmanın talimatlarına uyularak hazırlanan LIVE/DEAD BacLight Bakteriye Canlılık Kiti (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) uygulandı (Resim 16).

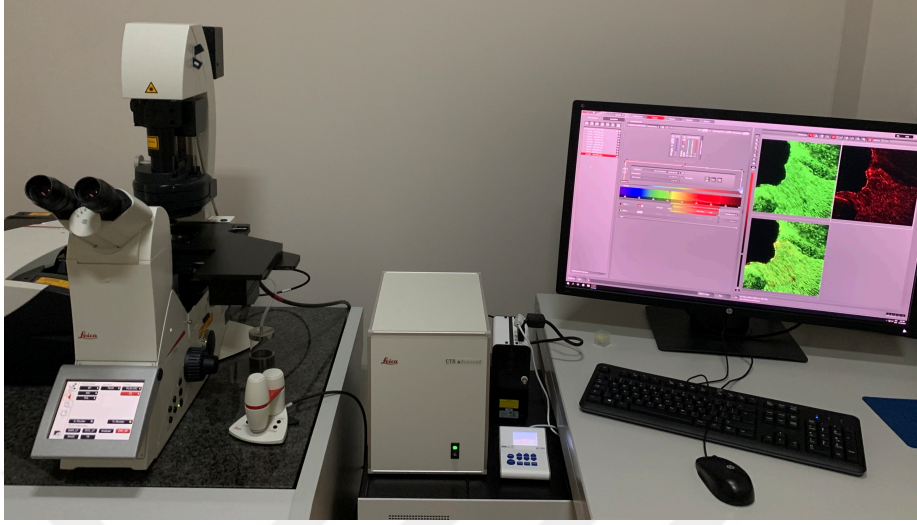


Resim 16. Örneklerin boyanması için kullanılan LIVE/DEAD BacLight Bakteriye Canlılık Kiti

Boyama kiti, örneklerin yüzeyine uygulanarak 37 °C’de 20 dk. süreyle inkübasyona alındı. Bu sürenin tamamlanmasının ardından, boyanın dentin disklerindeki reaksiyonunu durdurmak ve kök kanal duvarlarına penetre olmayan bakterileri temizlemek amacıyla örnekler 1 mL PBS ile yıkandı. Boyama kitinin, laboratuvar ışığından etkilenmesini önlemek için inkübasyon süresince örnekler alüminyum folyo ile sarıldı.

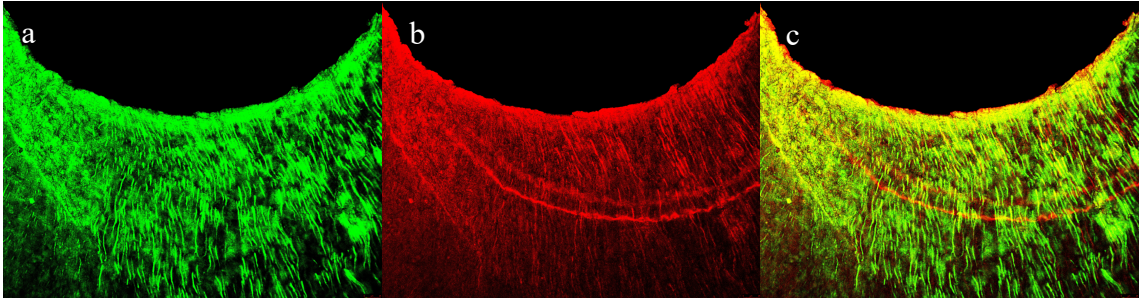
Deney prosedürlerinin ardından, LIVE/DEAD BacLight Bakteriye Canlılık Kiti ile boyanan canlı bakteriler, sağlam hücre zarlarına sahip oldukları için SYTO 9 (yeşil floresans) ile 488 nm uyarma/emisyon dalga boyunda görüntülendi. Hücre zarları hasar görmüş ölü bakteriler ise propidyum iyodür (PI - kırmızı floresans) kullanılarak 543 nm uyarma/emisyon dalga boyunda lazerler ile görüntülendi. Bu işlemler, KLTM (Leica, TCS SP8 MP, Mannheim, Almanya) cihazında 2 farklı kanalda (kırmızı ve yeşil) gerçekleştirildi.

Canlılık kiti ile boyanan kesitler, lam üzerine yerleştirildikten sonra 4x ve 20x büyütme altında KLTM ile incelendi (Resim 17).

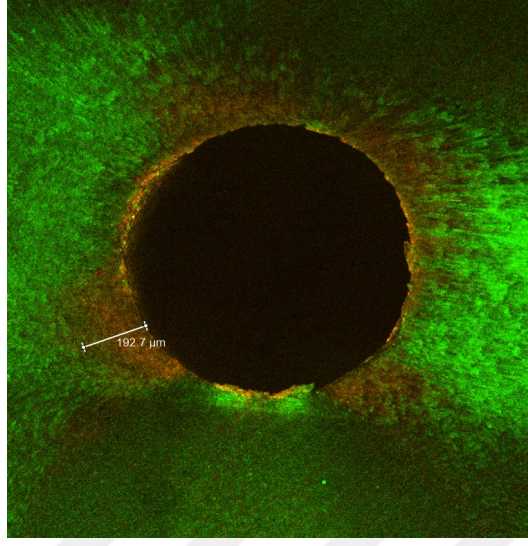


Resim 17. Diş kesitlerinin KLTm ile incelenmesi

Görüntüler, yeşil ve kırmızı floresan boyaların başlama ve bitiş noktalarının net bir şekilde görüneceği şekilde tarandı. Test gruplarına ait örneklerde, dentin tübülleri içerisindeki hücre zarları hasar görmüş bakterilerin (ölü bakteri) derinliğinin istatistiksel analizi için elde edilen KLTm görüntüleri, Leica Application Suite-Advanced Fluorescence yazılımı (version 2.6.0.7266; LAS AF, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Almanya) kullanılarak analiz edildi. Analizde, dentin tübülleri giren kırmızı floresanın (ölü bakteri) derinliği ölçüldü (Resim 18). Ölçüm, kanal lümeni ile dentin tübülleri içerisindeki kırmızı floresanın sonlandığı nokta arasındaki mesafenin belirlenmesiyle gerçekleştirildi (Resim 19).



Resim 18. (a) Canlı bakterileri gösteren yeşil alanlar, (b) Ölü bakterileri gösteren kırmızı alanlar, (c) Ölü ve canlı bakterilerin çakıştırılması ile elde edilen görüntüler



Resim 19. Ölü bakterilerin penetrasyon derinliğinin hesaplanması

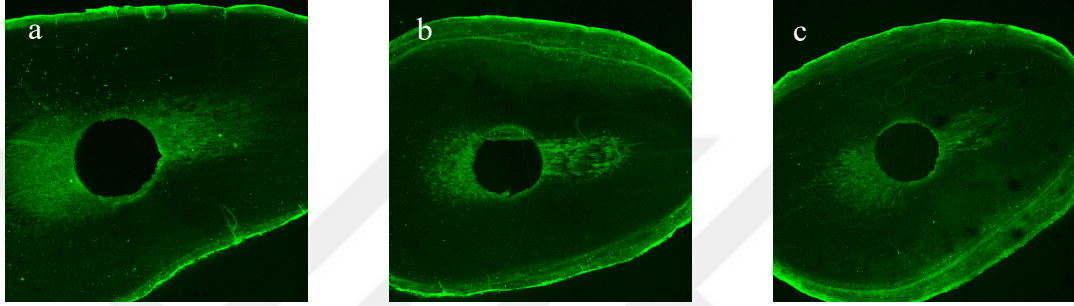
3.11. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda karşılaştırılan maksimum ölü bakteri penetrasyon derinliği IBM SPSS 2017 yazılımı kullanılarak analiz edildi. Bağımlı iki grup analizinde, normal dağılım gösterilmediği için veriler Wilcoxon testi ile incelendi. Bağımsız ikiden fazla grup karşılaştırmalarında ise, normal dağılım göstermeyen verilerde veya gruplardan en az birinde örneklem sayısı 30'un altına düştüğü durumlarda Kruskal-Wallis H testi kullanıldı. Kruskal Wallis H testinin sonucuna göre, Post-Hoc Bonferroni düzeltmesi uygulandı. Çalışmada istatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1. Biyofilmin Dentin Tübül Penetrasyonu

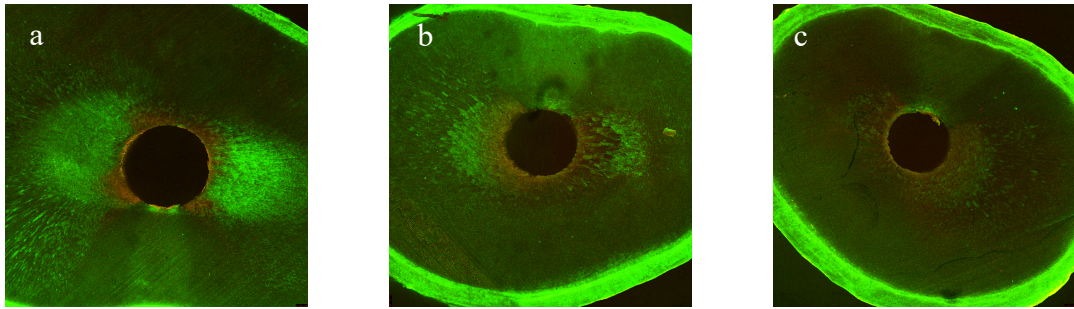
Pozitif kontrol grubu için 7 günlük bakteri inokülasyonundan sonra her gruptan rastgele seçilen bir dişte, alınan üç kesitte de biyofilm oluşumu KLTM görüntüleri ile doğrulandı.



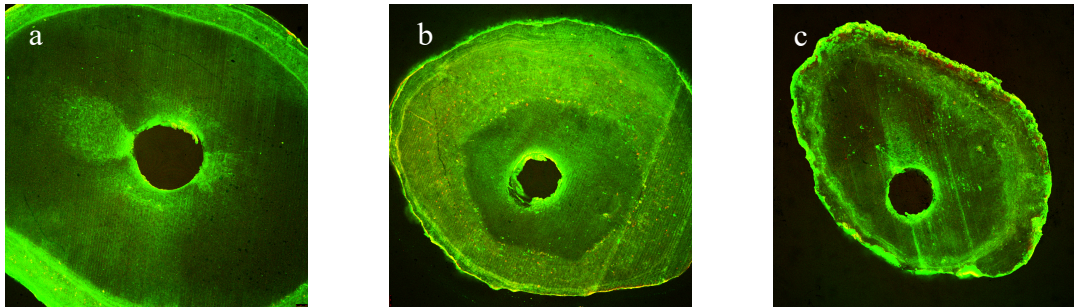
Resim 20. Kontrol grubunda 7 günlük biyofilmin (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerde KLTM ile doğrulanması

4.2. Ölü Bakterilerin Dentin Tübül Penetrasyon Derinliği

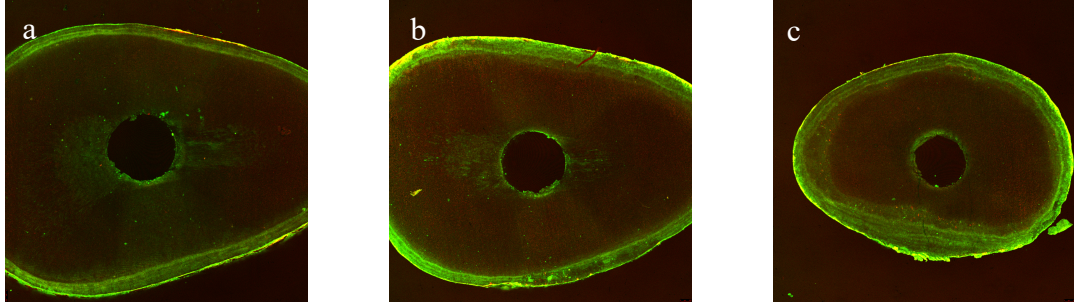
İrigasyon işlemlerinden sonra incelenen diş örneklerinin koronal, orta ve apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri Resim 21-26’da gösterilmiştir.



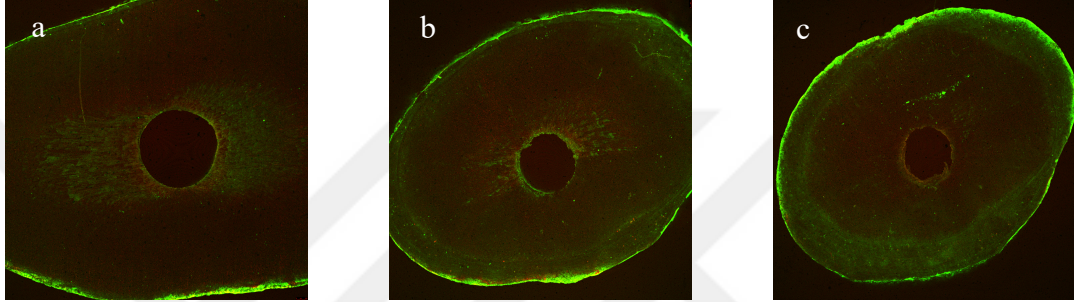
Resim 21. SH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri



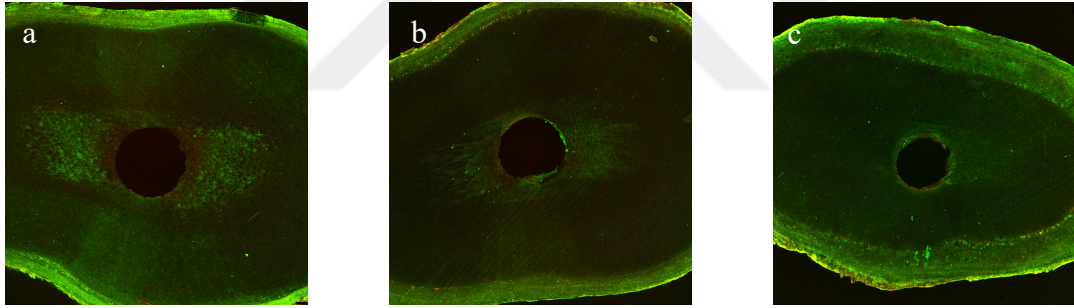
Resim 22. KH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTM görüntüleri



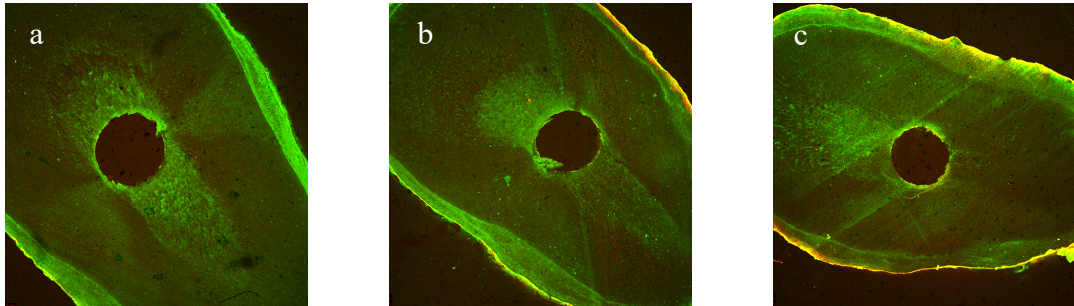
Resim 23. PHMB ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTm görüntüleri



Resim 24. SH + KH ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTm görüntüleri



Resim 25. SH + PHMB ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTm görüntüleri



Resim 26. Distile su ile irige edilen grubun (a) koronal, (b) orta ve (c) apikal kesitlerinin KLTm görüntüleri

4.3. Verilerin İstatistiksel Değerlendirilmesi

Çalışmada, 4x büyütmede alınan KLTM görüntüleri apikal, orta ve koronal üçlüdeki maksimum ölü bakteri penetrasyon derinliği karşılaştırılmıştır. Veriler ortanca ve çeyrekler arası aralık olarak verilmiştir. Veriler normal dağılmadığı için istatistiksel analiz için Kruskal-Wallis testi kullanılmıştır. Bu test sonucunda, gruplar arasında anlamlı fark bulunduğu, çiftler arasındaki farklılıkları belirlemek amacıyla Post-Hoc Bonferroni düzeltmesi uygulanmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $P < 0.05$ olarak belirlendi.

Örnek dişlerin apikal, orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerleri karşılaştırmaları Tablo 2.'de detaylı şekilde gösterilmiştir. Elde edilen değerler arasında anlamlı farklılıklar saptanmıştır ($p = 0.028$). Post-Hoc Bonferroni analizi sonucunda, orta ve koronal üçlüler arasında anlamlı bir fark tespit edilmiştir ($p = 0.035$). Örnek dişlerin koronal üçlüdeki maksimum ölü bakteri penetrasyonun, orta üçlü değerlerine göre anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur ($P < 0.05$).

Tablo 2. Örnek dişlerin apikal,orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerleri

Değişkenler	Bakteri Grupları			p^k	Post-Hoc Analiz Sonuçları		
	Apikal ($n = 60$)	Orta ($n = 60$)	Koronal ($n = 60$)		p^{1-2}	p^{1-3}	p^{2-3}
7. Gün	39.4 (28.14 - 65.03)	28.92 (20.6 - 53.3)	45.61 (28.37 - 68.86)	0.028	0.127	>0.999	0.035

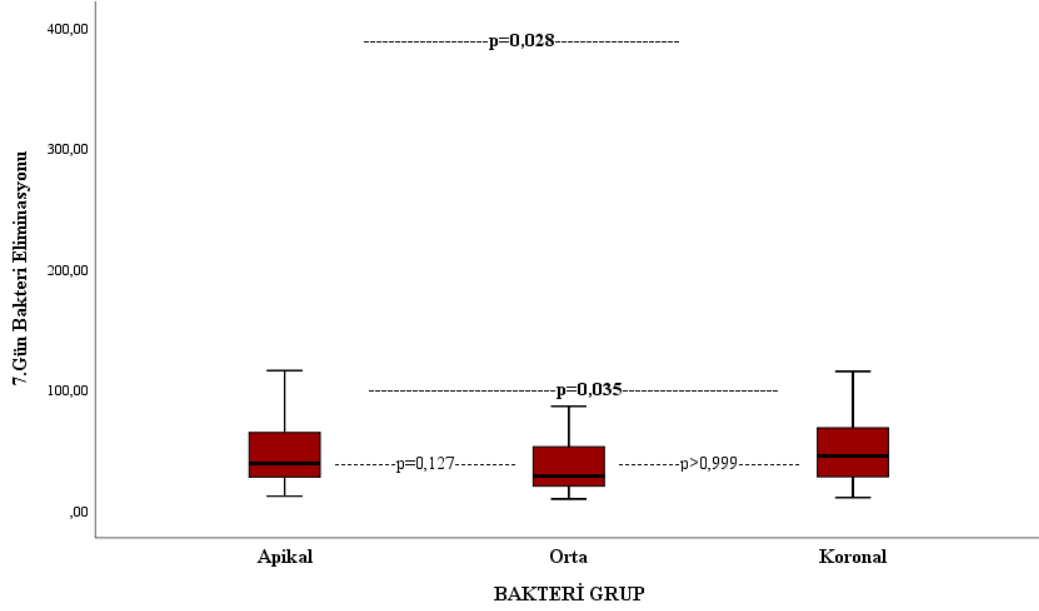
^kKruskalWallis H Test, Post-Hoc Bonferroni düzeltmesi, *Med(IQR)*

Post-Hoc analiz sonuçlarının gösteriminde kullanılan rakamların karşılıkları şöyledir:

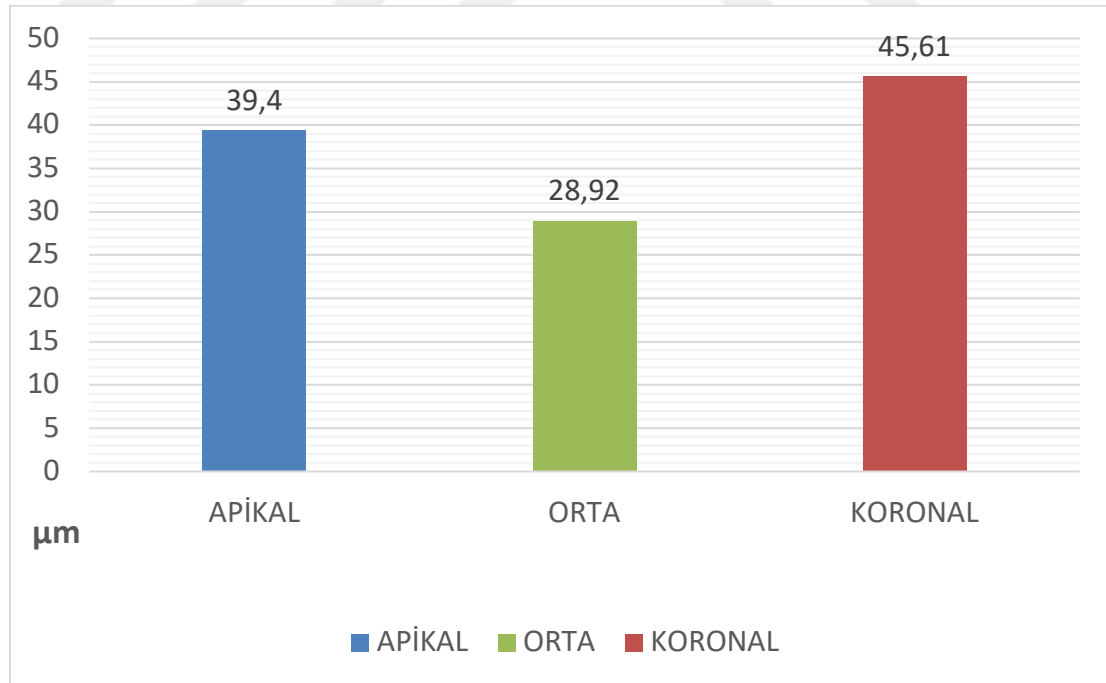
1: Apikal

2: Orta

3: Koronal



Şekil 3. Örnek dişlerin apikal,orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerlerinin kutu grafiği



Şekil 4. Örnek dişlerin apikal,orta ve koronal üçlüsündeki maksimum ölü bakteri penetrasyon değerlerinin sütun grafiği

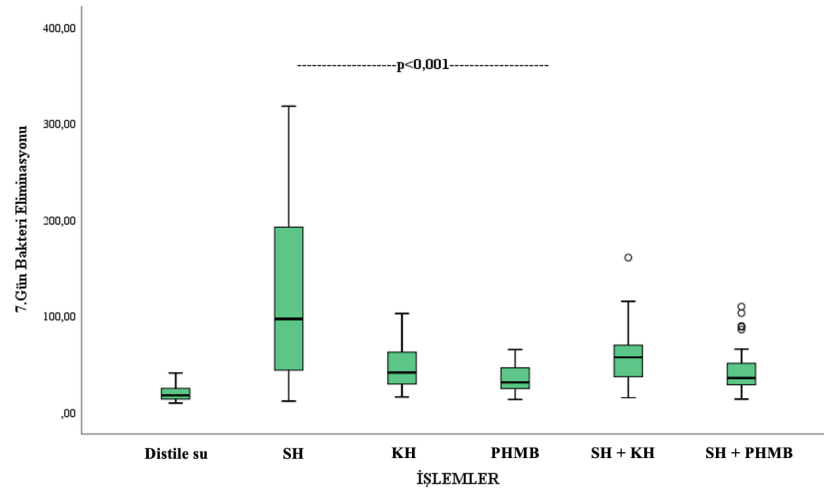
Çalışmamızda ayrıca farklı irigantların dentin tübüllerindeki dezenfeksiyon etkisi karşılaştırılmıştır. İrigantların bakteri eliminasyonun karşılaştırılması Tablo 3.'de detaylı şekilde gösterilmiştir. İstatistiksel analize göre, distile su grubunun dentin tübüllerindeki dezenfeksiyonu diğer tüm irigantlara göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($P < 0.05$). SH + KH ve SH + PHMB gruplarındaki dezenfeksiyon etkisi PHMB grubuna göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($P < 0.05$). Kombine kullanılan irigantlar karşılaştırıldığında SH + KH grubu SH + PHMB grubundan daha başarılıdır. İrigantlar tek başlarına değerlendirildiğinde ise SH grubu, KH ve PHMB gruplarına göre daha başarılı bulunmuştur. Fakat bu iki değerlendirmede de gruplar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır.

Tablo 3. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerleri

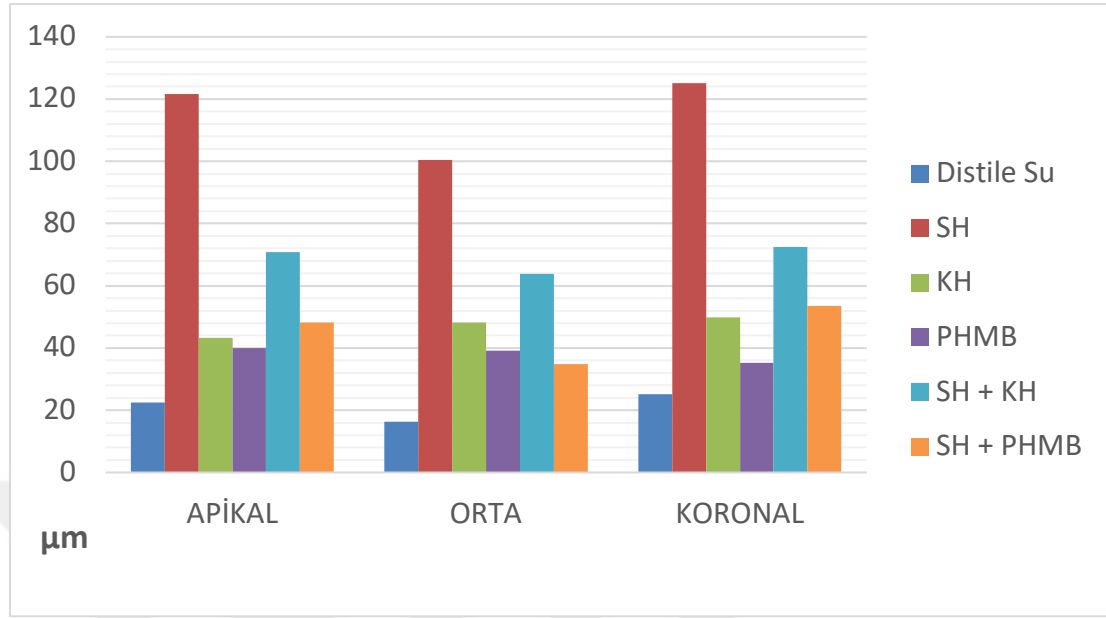
Biyofilm	Kullanılan irigantlar						Post-Hoc Analiz Sonuçları
	Distile Su (n=10)	SH (n=10)	KH (n=10)	PHMB (n=10)	SH + KH (n=10)	SH + PHMB (n=10)	
7. Gün	18.06 (14.1-25.21) ^a	97.35 (44.19-192.7) ^A	41.77 (29.8-62.8) ^A	31.45 (25.1-46.6) ^{A,b}	57.57 (37.47-70.12) ^{A,B}	36.08 (29.03-51.28) ^{A,B}	1<2,3,4,5,6 4<5,6

Post-Hoc analiz sonuçlarının gösteriminde kullanılan rakamların karşılıkları şöyledir:

- 1: Distile Su
- 2: SH
- 3: KH
- 4: PHMB
- 5: SH + KH
- 6: SH + PHMB



Şekil 5. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerlerinin kutu grafiği



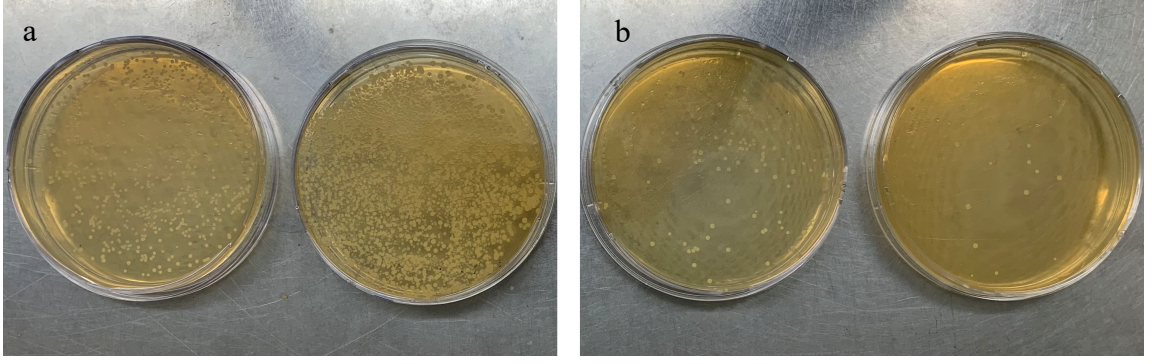
Şekil 6. İrigantlara göre bakteri eliminasyon değerlerinin sütun grafiği

4.4. Bakteriyel Örnekleme ve CFU Sayımı

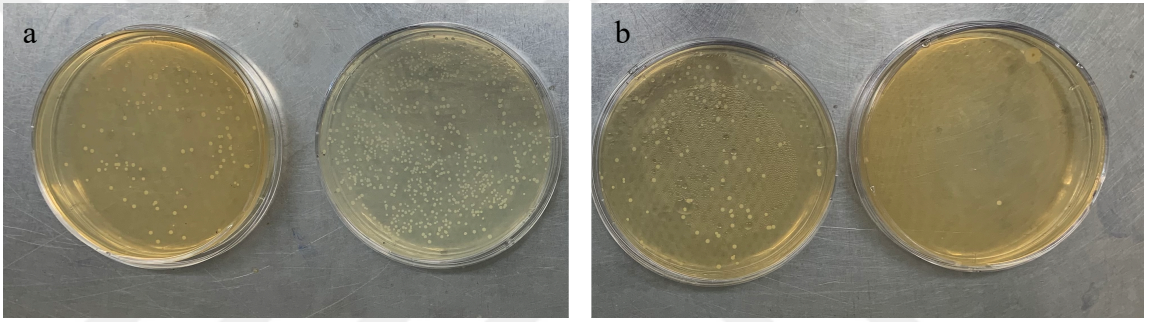
Her gruptan bir adet örnek diş bakteriyel örnekleme için seçildi. İrigasyondan önce ve sonra olmak üzere elde edilen bakteriyel süspansiyonlar TSA agarlara ekilip, inkübasyon süresinden sonra CFU sayımı yapıldı. Kombine olarak kullanılan irigantlarda beş logdan fazla azalma ve diğer irigantlara göre daha az bakteri üremesi gözlenmiştir. İrigantlar tek başına kullanıldığında, KH'nin diğer irigantlara kıyasla daha etkili bir dezenfeksiyon sağladığı görülmüştür.

Tablo 4. İrigasyon öncesi ve sonrası bakteriyel ekiminden elde edilen CFU sonuçları

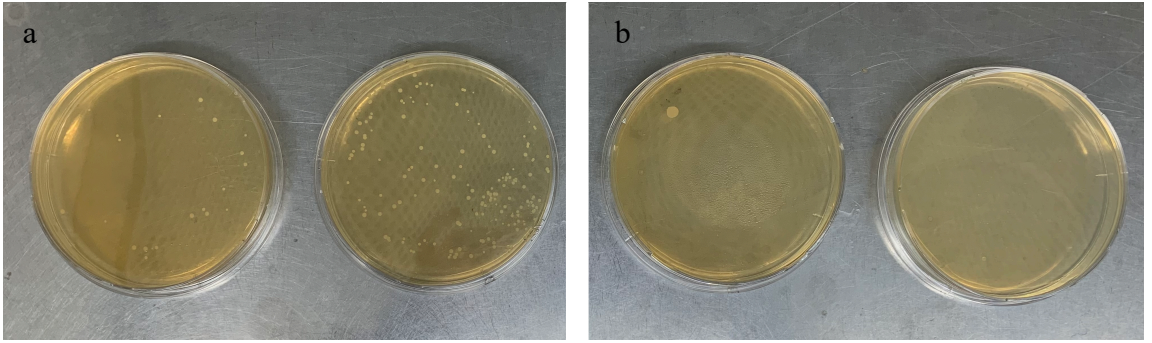
	YIKAMA ÖNCESİ CFU	YIKAMA SONRASI CFU	Log AZALMASI
Distile su	1.3×10^7	3×10^6	0.64
SH	5×10^6	1.16×10^4	2.63
KH	1.9×10^7	3×10^2	4.8
PHMB	2.6×10^7	4.8×10^2	4.73
SH + KH	3.2×10^7	1×10^2	5.50
SH + PHMB	2.6×10^7	1×10^2	5.41



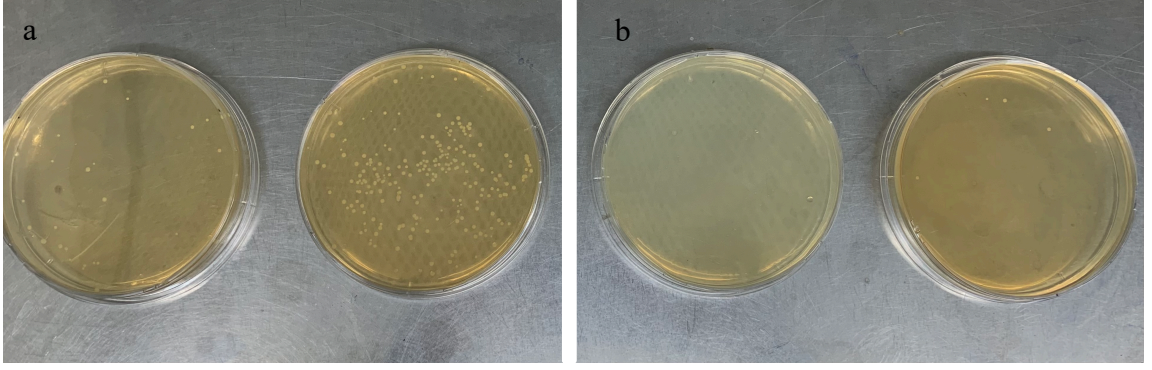
Resim 27. Distile su ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası



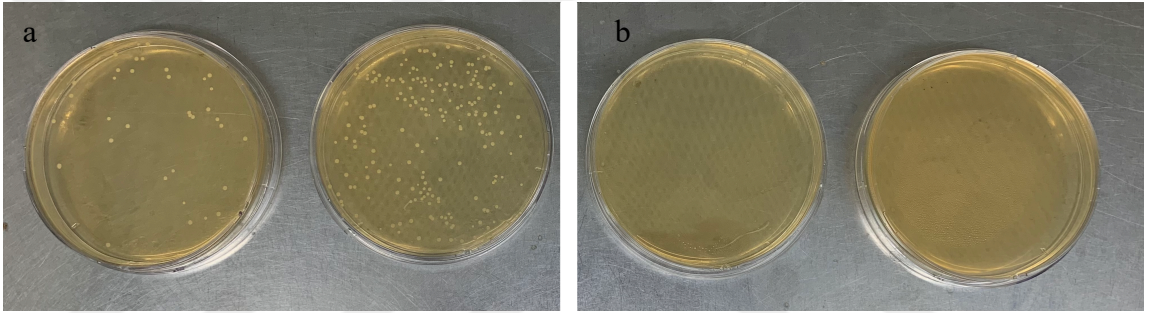
Resim 28. SH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası



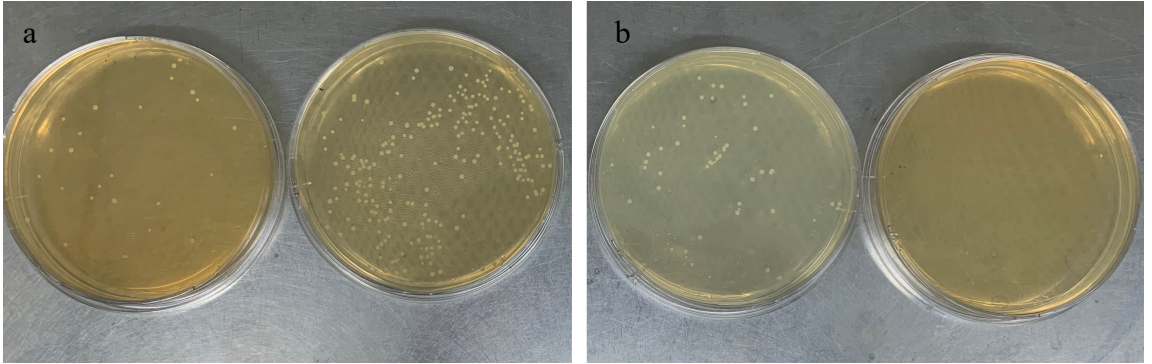
Resim 29. KH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası



Resim 30. PHMB ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası



Resim 31. SH + KH ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası



Resim 32. SH + PHMB ile irige edilen dişlerin bakteriyel örnekleme; (a) irigasyon öncesi, (b) irigasyon sonrası

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, dentin tübüllerinde bulunan *E. faecalis*, *S. mutans* ve *S. aureus* biyofilmleri üzerine farklı irigantların (SH, KH, PHMB ve bunların kombinasyonları) dezenfeksiyon etkisi, KLTM görüntüleri kullanılarak değerlendirilmiştir. Çalışmadan elde edilen bulgulara göre, koronal üçlüde orta üçlüye göre daha etkili bir dezenfeksiyon sağlanmıştır. İrigantlar karşılaştırıldığında ise, kombine olarak kullanılan irigantların PHMB'nin tek başına kullanılmasından daha etkili bir dezenfeksiyon sağlamıştır. Bu bulgular “*farklı irigasyon solüsyonları ve kombinasyonlarının miks biyofilme sahip dentin tübüllerinin dezenfeksiyonuna etkisi arasında fark olmayacağı*” şeklindeki sıfır hipotezinin reddedilmesi ile sonuçlanmıştır.

KKT, kanal sistemindeki MO'ların, pulpa dokusu kalıntılarının ve dentin debrisinin temizlenmesinin ardından, tekrarlayan enfeksiyonların önlenmesi için kök kanalının sızdırmaz bir şekilde doldurulmasına dayanır (11). Mekanik şekillendirmenin ana hedefi, kanal dezenfeksiyonunu optimize ederek etkili bir kanal dolumu için uygun şartları sağlamaktır (11). Ayrıca, kök kanal şekillendirilmesi esnasında dentin duvarındaki biyofilm tabakasının uzaklaştırılması ile mikrobiyal yük azaltılmaktadır. Ancak, kök kanal sistemi içinde lateral kanallar, aksesuar kanallar, isthmuslar, apikal delta ve finler gibi yapısal düzensizlikler bulunur (4). Kök kanal şekillendirmesi sırasında eğelerin erişemediği bu bölgeler, yeterli dezenfeksiyonun sağlanmasını zorlaştırabilir (137). Yapılan bazı çalışmalarda (97, 138), kök kanal preparasyonu sonrasında kanal yüzeyinin %30-50'sinin eğeler tarafından ulaşılamayan alanlar olarak kaldığı tespit edilmiştir. Bu sebeple, irigasyon süreci, kök kanal dezenfeksiyonunun sağlanmasında ve sonrasında başarılı bir KKT sonucu için kritik bir öneme sahiptir.

Günümüzde endodontik tedavilerde, biyofilmi tamamen ortadan kaldıran ve aynı zamanda ideal irigant özelliklerine sahip bir solüsyon bulunmamaktadır (139). Bu nedenle, ideal irigant ve aktivasyon yöntemlerine yönelik araştırmalar halen sürmektedir. Literatürde, günümüzde kullanılan irigantların kök kanalındaki miks biyofilmler üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalar (140-142) mevcut olmasına rağmen, PHMB

solüsyonunun SH ile kombinasyonunun miks biyofilm üzerindeki etkisini karşılaştıran çalışma bulunmamaktadır.

Endodontide biyofilm çalışmaları için çekilmiş insan dişleri, sığır dişleri ve polimetakrilat gibi biyolojik olmayan materyaller kullanılmaktadır (143). Çalışmalarda kullanılan çekilmiş insan dişleri genellikle farklı yaş gruplarından ve bireylerden toplandığı için dentin yapısı ve bileşenleri değişkenlik gösterebilmektedir. Özdemir ve ark. (144) *E. faecalis*'in genç ve yaşlı bireylerin kök kanalı dentinine tutunması incelenmiş ve yaşlı dentin örneklerinde daha yoğun ve hacimli bir biyofilm oluşumu gözlemlenmiştir. Biyolojik olmayan malzemeler kullanıldığında ise, insan dişlerinde gözlenen bu yapısal değişkenlikler ortadan kalktığı için örnekler arası standardizasyon daha kolay sağlanabilmektedir. Fakat sentetik malzemelerden üretilen kök kanalları pürüzsüz yüzeye sahip olmaları, düz seyri ve yuvarlak kesitinin mükemmel olması nedeniyle klinik durumdan farklıdır ve sıvı akışını etkileyebilir (143). Ayrıca, MO'ların sentetik materyale tutunma şekli doğal materyalden tamamen farklı olabileceği için, biyofilm yapısında da değişiklikler meydana gelebilir. Bilimsel araştırmalar, mikrobiyoloji çalışmalarında çekilmiş insan dişlerinin morfolojik özelliklerinin bakterilerin tutunma yeteneği ve biyofilm oluşumu üzerinde önemli bir rolü olduğunu bildirmişlerdir (145). Bu deneyde kullanılan enfekte dentin modeli, Haapasalo ve Ørstavik (89) tarafından tanımlanmış olup, deneylerde klinik koşulları en iyi şekilde temsil etmesi amacıyla çekilmiş insan dişleri tercih edilmiştir.

Çalışmamızda, 60 adet insan alt çene küçük azı dişi kullanılmıştır. Alt çene küçük azı dişleri genellikle tip 1 kanal yapısına ve düz kanal anatomisine sahip olması, ayrıca önceki çalışmalarda aynı diş grubunun tercih edilmesi, karşılaştırılabilirliği artıran nedenlerden olduğu için bu çalışma için bu dişler tercih edilmiştir (146, 147).

Diş boyutlarındaki farklılıkların çalışma sonucunu etkilememesi için, dişlerin uzunluğu 18 mm olacak şekilde standardize edilmiştir. Çekilmiş dişlerde yapılan çalışmalarda boy standardizasyonun sağlanmasının amacı, bakteri ekimini ve kanal şekillendirilmesini kolaylaştırmaktadır (89, 148).

Şekillendirme yapılmamış kök kanallarında biyofilm oluşturulması klinik koşulları ideal olarak temsil etmektedir. Ancak, şekillendirme yapılmamış kök kanallarında bakteri ekimi daha zahmetli ve yetersiz olacaktır. Ayrıca, mikrobiyolojik değerlendirme yapabilmek için kök kanalının tamamına erişim sağlanarak örnek alınması gerekmektedir. Bu nedenlerden dolayı kök kanalları içerisinde biyofilm oluşturmada önce şekillendirme işlemi yapılmalıdır (86).

Zaman tasarrufu sağlamak ve etkili bir kök kanal şekillendirmesi gerçekleştirmek amacıyla, nikel-titanyum (NiTi) alaşımından üretilen eğe sistemleri sıklıkla tercih edilmektedir (149). ProTaper Next döner eğeleri, döngüsel yorgunluğa karşı direnci artırmak amacıyla ısıtılma işlemi uygulanmış M-wire teknolojisiyle üretilmiştir. ProTaper Next, şekillendirme sırasında eğenin yorulmasını en aza indirmek için kanal duvarlarıyla temas noktalarını azaltan ofset tasarıma sahiptir. Bunun yanı sıra, değişken koniklik ve dikdörtgen kesit özelliği de bulunur. Diğer eğe sistemleri ile karşılaştırıldığında kök dentini yüzeyinde daha az çatlak oluşturduğu tespit edilmiştir (150). Bu nedenlerden kaynaklı, çalışmamızda kök kanal şekillendirmesi sırasında ProTaper Next eğe sistemi kullanılmıştır.

Apikal çapın şekillendirilmesine dair farklı görüşler bulunmasına rağmen kurvatür açısı 0-10° olan kanallar için ISO 40 0.4 apikal şekillendirmenin kök kanalının irigasyonu için yeterli olduğu belirtilmiştir (151). Yapılan çalışmalarda (152, 153) da kök kanallarının #40 boyutundan daha küçük şekillendirilmesi sonucu şırınga ile yapılan irigasyonun etkinliğinin daha az olduğu bildirilmiştir. Shuping ve ark. (154), SH'nin kök kanalının apikal bölgesinde etkili bir dezenfeksiyon sağlayabilmesi için en az #30-35 boyutlarına kadar genişletme yapılmasının gerekli olduğunu belirtmişlerdir. Brunson ve ark. (151) EndoVac negatif basınçlı irigasyon sistemi üzerine yaptıkları çalışmada ise, apikalde yeterli irigasyon sağlanabilmesi için apikal genişlemenin en az #40/0.04 veya #40/0.06 olması gerektiğini belirtmişlerdir.

Kök kanallarının apikal bölgesinde etkili bir irigasyon yapabilmek için alt çene küçük azı dişlerde yapılan çalışmalar dikkate alınarak ProTaper Next döner eğe ile sırasıyla X1 (17/.04), X2 (26/.06), X3 (30/.07), X4 (40/.06) eğeleri kullanılarak dişlerin apikal şekillendirmesi #40 olacak şekilde hazırlanmıştır (155, 156).

Mekanik şekillendirmeden sonra kök kanalları içerisinde oluşan organik ve inorganik maddeleri içeren yapı smear tabakası olarak tanımlanmaktadır. Dentin tübüllerini tıkayan bu tabaka, dentin geçirgenliğini azaltmakta ve bakteri ile ürünlerine karşı bir bariyer işlevi görmektedir. Yapılan araştırmalarda (157, 158), smear tabakasının organik içeriğini uzaklaştırmak için SH kullanımı önerilirken, inorganik içeriği gidermek amacıyla EDTA kullanılmaktadır. Bu çalışmada smear tabakasını uzaklaştırmak için kök kanalları sırasıyla SH, salin ve EDTA ile irige edilmiştir.

Literatürde biyofilm incelemeleri için yapılan bazı çalışmalarda, dişlerin dış yüzeyleri, çevresel kontaminasyonu önlemek amacıyla tırnak cilası ile kaplanmıştır (159, 160). Bu çalışmada da dişlerin dış yüzeyleri tırnak cilası ile kaplanmış; böylece hem çevresel kontaminasyonun engellenmesi hem de kök yüzeyinde biyofilm oluşumunun en aza indirilmesi hedeflenmiştir.

Endodontik biyofilm oluşturmada önce, biyofilm oluşturulacak yüzeylerin, MO'lardan arındırılması ve sterilizasyonu gereklidir. Çekilmiş insan ve sığır dişleri doğal olarak çok sayıda MO içerir ve yapılarının özellikleri nedeniyle bu dişlerin sterilizasyonu zordur. Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC), araştırmalarda kullanılacak çekilmiş dişlerin buharla sterilizasyonuna yönelik bir kılavuz oluşturmuştur (161). Ayrıca, MO'ların yok edilmesinde otoklavın daha etkili bir yöntem olduğu bildirilmiştir (162). Bu kılavuza göre dişlerin 121 °C sıcaklıkta 40 dk. süreyle otoklavlanması gerektiği belirtilmektedir. Çalışmamızda MO inokülasyonundan önce örnek dişler 121 °C, 1 atm ve toplamda 45 dk. otoklavda buharla steril edilmiştir.

Kök kanal dezenfeksiyon ajanlarının karşılaştırıldığı araştırmalarda genellikle *E. faecalis* ile monomikrobiyal biyofilmler oluşturulmaktadır (86). Üç veya daha fazla MO içeren polimikrobiyal biyofilmleri kullanan çalışmalar oldukça sınırlıdır (163, 164). Ancak, endodontik biyofilm, birçok türün bir arada bulunduğu karmaşık bir yapıdır.

Monomikrobiyal biyofilm modeli sistemleri, sade yapısı, standardizasyon olanakları ve kontrol avantajları ile birlikte uygulaması oldukça kolay, tekrarlanabilirliği yüksek ve yüksek deneysel verimlilik sağlamaktadır. Ancak, polimikrobiyal modellerin kullanımı da birçok avantaj taşımaktadır. Örneğin, doğal biyolojik sistemler genellikle çeşitli türlerden oluşan topluluklardır ve enfekte kök kanalları da bu tür toplulukların tipik örneklerinden biridir (86). Polimikrobiyal biyofilmlerin, tek tür biyofilmlerle karşılaştırıldığında daha fazla biyofilm biyokütlesi ürettiği gösterilmiştir. Bu nedenle, birden fazla türden oluşan biyofilm toplulukları genellikle monomikrobiyal popülasyonlardan daha kalın biyofilmler oluşturur (165).

Polimikrobiyal biyofilmler, klinik koşullara daha iyi uyum, artan metabolik kapasite ve stres toleransı ile biyofilm eradikasyonuna karşı daha yüksek direnç sunar. Ancak, bu karmaşıklık, deneysel çalışmalarda bazı zorluklar ortaya çıkarır. Örneğin, çok türlü biyofilmlerin kültür edilmesi için daha fazla başlangıç kültürü, çeşitli ortam türleri ve ek işlem aşamaları gerektirir. Bu nedenle, bu model sistemleri genellikle zaman alıcı ve maliyetli olmaktadır (166). Bütün bu özellikler dikkate alındığında, çalışmamızda klinik koşulları daha iyi temsil etmesi için polimikrobiyal biyofilm tercih edilmiştir

Swimberghe ve ark. (86), son yıllarda dezenfeksiyon amacıyla yapılan biyofilm modeli sistemlerine dair inceledikleri 77 çalışmada, %86 oranında monomikrobiyal sistemlerin tercih edildiğini ve bu MO'ların çoğunlukla *E. faecalis* olduğunu (tüm çalışmalarda %79, monomikrobiyal biyofilm çalışmalarında ise %92 oranında) belirtmişlerdir. Ayrıca, literatürde, kök kanalı içerisinde bulunan bakteri türlerinin yaklaşık %85'inin *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Actinomyces* ve *Enterococcus* gibi fakültatif anaerobik cinslerine ait olduğu belirtilmektedir (86). Zorunlu anaerob bakterilerin ise sadece %14 oranında kullanıldığı bildirilmiştir. Kullanılan bakterilerin büyük çoğunluğunun gram pozitif olduğu ifade edilmiştir. Endodontik biyofilm örnekleri oluşturulurken kök kanalı içerisinde yaygın olarak bulunan bakterilerin kullanılması önemlidir.

E. faecalis, insan ağız boşluğunda ve gastrointestinal sistemde bulunan, fakültatif anaerob özellikte gram pozitif bir koktur. Bu MO, tedavi edilmemiş kök kanallarında bulunan mikrobiyal floranın küçük bir bölümünü oluşturmakla birlikte, özellikle KKT sonrası

oluşan kalıcı periradiküler lezyonların patogeneğinde önemli bir etkiye sahiptir. Primer endodontik enfeksiyonların yalnızca %18'inde izole edilmesine rağmen, KKT yapılmış dişlerde bu oran %67'ye kadar çıkmaktadır (167, 168). *E. faecalis* ayrıca, erişimin zor olduğu aksesuar kanallar, apikal deltalar ve isthmuslar gibi bölgelerde biyofilm oluşturma ve bu alanları kolonize etme kapasitesine sahiptir. Antimikrobiyal ajanlara karşı direnç geliştirme mekanizmaları sayesinde, KKT sırasında uygulanan kemomekanik enstrümantasyonla tam olarak elimine edilmesini zorlaştırır (8). Molander ve ark. (41) ve Rôças ve ark. (169) *E. faecalis*'in uzun süreli besin yokluğu ve ortamın alkali olması gibi zorlu koşullara karşı yüksek direnç gösterdiği rapor edilmiştir. Bu özellikler ve başarısız endodontik tedavi gören dişlerden sıklıkla izole edilmesi nedeniyle, çalışmamızda kök kanal kontaminasyon modeli olarak *E. faecalis* tercih edilmiştir.

Diş çürüğünün ana elemanlarından biri olan *S. mutans*, patojenik etkisini esas olarak diş yüzeylerine yapışma ve biyofilm oluşturma, yüksek dozda laktik asit üretme ve düşük pH, oksidatif stres gibi olumsuz çevresel koşullara dayanma yeteneği ile gösterir (54). Sakkaroz varlığında biyofilm oluşturma ve plak birikiminin artmasıyla beraber mine demineralizasyonuna sebep olmaktadır. Çürük gelişimine neden olan bu mekanizma tedavi edilmediğinde pulpal ve periapikal rahatsızlıklara neden olabilmektedir (53). *S. mutans* kök kanalına yerleştikten sonra glukoz gibi mevcut karbonhidrat kaynakları ile biyofilm oluşturarak bakteri kolonizasyona katkı sağlamaktadır. Ayrıca, yapılan çalışmalarda (49, 170) *S. mutans*'ın primer ve sekonder enfeksiyonlarda bulunduğu kanıtlanmıştır. *S. mutans*'ın biyofilm oluşturma ve endodontik enfeksiyonların en sık nedeninin çürük olmasından dolayı çalışmamızda bir diğer bakteri olarak *S. mutans* tercih edilmiştir.

S. aureus hem planktonik topluluklar hem de yerleşik biyofilm şeklinde yaşayabilen yaygın bir bakteridir. Çeşitli ekolojik ortamlara uyum sağlayabilir ve hem akut hem de kronik enfeksiyonlara yol açabilir (171). Bazı Stafilokok türlerinin MRSA genine sahip olması, bu bakterilerin antibiyotiklere karşı direnç seviyesini artırmaktadır. Özellikle KKT tekrarlandığı durumlarda tedaviye direnç gösteren ve seanslar arasında kök kanalının ağız ortamına açık bırakıldığı vakalarda sıklıkla gözlenen bir MO'dur (172). Ayrıca, dental apse vakalarında *S. aureus*'un görülme oranı %5-15 arasında değişmektedir (173).

Yapılan çalışmalarda (174, 175) *S. aureus*'un *Candida* hiflerine karşı yüksek afinitesi olduğu gözlenmiştir. Stafilokok ve *Candida* ko-enfeksiyonu, monomikrobiyal biyofilmlere kıyasla daha büyük biyokütle ve ilaç direncine sahip polimikrobiyal biyofilm oluşturabilir. Bu nedenlerden kaynaklı, çalışmamızda biyofilm oluşumu için diğer bakterilerle beraber *S. aureus* tercih edilmiştir.

Swimberghe ve ark. (86) endodontik literatürde biyofilm model sistemleri üzerine yaptıkları incelemede, *E. faecalis* ile yapılan çalışmaların çoğunluğunda ATCC 29212 suşunun kullanıldığı bildirilmiştir. Bu tez çalışmasında da literatürde sıklıkla kullanılan *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. mutans* (ATCC 25175) ve *S. aureus* (ATCC 25923) suşları kullanılmıştır.

E. faecalis'in kök kanallarında inkübasyon süresine ilişkin yapılan araştırmalar, bu sürenin değişiklik gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Çeşitli çalışmalarda inkübasyon sürelerinin 24 saat, 48 saat, 72 saat, 14 gün ve 21 gün olarak belirlendiği rapor edilmiştir (143, 176-180). Fakat endodontik deneyler kapsamında standartlaştırılmış bir kanal içi biyofilm modeli geliştirilmesi sürecinde, inkübasyon süreleri hakkında ortak bir görüş birliği sağlanamamıştır (181).

Stojicic ve ark. (182), farklı dezenfektan ajanların polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki etkisini inceledikleri çalışmada, 3 haftalık inkübasyon süresinin ardından biyofilmdeki bakterilerin dezenfektanlara karşı daha az duyarlı hale geldiğini bildirmiştir. De Meyer ve ark. (143) tarafından yapılan çalışmada, elde edilen hücre sayısı değerlendirilmiştir. *E. faecalis* ve *S. mutans*'ın oluşturduğu çift türlü bir biyofilm geliştirilmiş ve 48, 72 ve 168 saatlik inkübasyon süreleri test edilmiştir. Kültür yöntemi kullanılarak yapılan analizlerde, 48 ve 72 saatlik biyofilmler arasında elde edilen hücre sayısında anlamlı bir fark bulunmamış, ancak 168 saatlik inkübasyondan sonra önemli ölçüde daha az hücre elde edilmiştir. Seneviratne ve ark. (183), mikrotitre plakta *E. faecalis* biyofilmleri yetiştirmiş ve 72 saat sonunda maksimum hücre geri kazanımı gözlemlemiş, ardından 7 gün sonra bir düşüş olduğunu rapor etmişlerdir. Ayrıca, Swimberghe ve ark. (86), mikrobiyolojik temelli *in vitro* çalışmalarında bakterilerin inkübasyon sürelerinin 1 ila 70 gün arasında

önemli ölçüde değişkenlik gösterdiğini bildirmiştir. Çalışmamızda, daha önceki araştırmalar örnek alınarak inkubasyon süresi 7 gün olarak belirlenmiştir.

İrigasyon aşamasında kullanılan solüsyon hacmi kök kanalı dezenfeksiyonu için önemli bir faktördür. Sedgley ve ark. (184), 6 mL irigantın antibakteriyel etkinliğinin, 3 mL'den daha etkili olduğunu, ancak daha büyük hacimlerde bu etkinlikte bir değişiklik gözlemlenmediğini bildirmiştir. Çalışmamızda, her diş için 6 mL irigant kullanılmıştır.

Kök kanalı içerisinde etkili bir irigasyon yapabilmek için iğne ucunun apikal bölgeye yakın olması ve yapılan apikal şekillendirmeye uygun bir iğne boyutunun seçilmesi önemlidir (185). İrigasyon sırasında açık uçlu iğneler apikalden 2-3 mm kısa, kapalı uçlu iğnelerin ise apikalden 1-2 mm kısa olması önerilmiştir (186). Küçük çaplı iğnelerin apikale daha kolay ulaşabildiği ve büyük çaplı iğnelere göre kanal içerisinde daha iyi irigant değişimi yapabildiği bildirilmiştir (187). Bu özellikler dikkate alınarak, çalışmamızda 30 G'lik kapalı uçlu irigasyon iğnesi apikalden 2 mm geride konumlandırılarak kullanılmıştır.

Günümüzde klinisyenler tarafından klasik şırınga irigasyonu hem uygun maliyetli hem de pratik olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Bu teknikle şırınganın ucundan en fazla 1 mm irigant akışı olmaktadır (186). Dolayısıyla klasik şırınga irigasyonunun ulaşmasının pek mümkün olmadığı finler, istmuslar, lateral kanallar, anastomozlarda etkili bir irigasyon sağlanamayabilir. Günümüzde etkili bir dezenfeksiyon sağlamak ve irigantların etkinliğini artırmak için irigasyon aktivasyon yöntemleri kullanılmaktadır (188).

EDDY, ucu keskin olmayan esnek poliamidden üretilmiş 25.04 mm boyutunda, steril ve tek kullanımlık yeni bir sonik irigasyon aktivasyon sistemidir. 5000-6000 Hz frekansında, hava basıncıyla çalışan bir piyasemen (Air Scaler) tarafından etkinleştirilir (189). EDDY, ultrasonik cihazlarla benzer şekilde karmaşık kök kanal sistemlerinde "*kavitasyon*" ve "*akustik akış*" oluşturarak etkin temizlik sağlar (190). Bu sebeple çalışmamızda, üretici firmanın önerilerine uygun olarak TA 200 cihazına bağlanan EDDY sonik uç, 20 sn. süreyle kullanılmıştır.

EDDY ve pasif ultrasonik aktivasyonun (PUI) biyofilm dezenfeksiyonu üzerindeki etkisi literatürde tartışılmıştır. Neuhaus ve ark. (191) ve Hoedke ve ark. (192) EDDY'nin PUI'e göre biyofilm uzaklaştırmada daha etkili olduğunu savunurken, Swimberghe ve ark. (193) ve Al-Zuhair ve ark. (194) aktivasyon yöntemleri arasında fark bulamamıştır. EDDY'nin salınım frekansı PUA'dan daha düşük olmasına rağmen, 350 µm olan yer değiştirme genliği, PUI'nin 75 µm'lik genliğinden oldukça yüksektir. EDDY sonik bir sistem olmasına rağmen, diğer bir sonik sistem olan EndoAktivatörden daha başarılı bulunmuştur. Bunun nedeni, EDDY'nin 6000 Hz'lik salınım frekansında çalışırken, EndoAktivatör salınım frekansı 190 Hz'dir (195).

Kök kanalının yalnızca mekanik olarak şekillendirilmesi ile, özellikle kompleks anatomiye sahip dişlerde, bakterilerin tamamını elimine edilememektedir (196). Bu nedenle, kanal içerisinde kalan debrislerin uzaklaştırılması, MO'ların ortadan kaldırılması ve kanal dezenfeksiyonunun sağlanması için irigantların kullanılması gereklidir (197). Endodontik irigant olarak kullanılan SH konsantrasyonu, genellikle %0.5-6 arasında değişmektedir. Örneğin, %1 SH gibi düşük konsantrasyonlar kabul edilebilir düzeyde biyolojik uyumluluk sunmaktadır (198). Ancak, KKT'de kullanılan ideal SH konsantrasyonu hakkında ortak bir görüş bulunmamaktadır. Byström ve ark. (3) SH'nin yüksek konsantrasyonlarının *E. faecalis* ve *C. albicans* gibi MO'lara karşı daha etkili olduğunu öne sürerken, Cvek ve ark. (199) düşük ve yüksek konsantrasyonların bakteriyel yükü azaltmada benzer etkinlik gösterdiğini bildirmiştir. Kök kanalındaki bakteri düzeylerinde %0.5 ve %3 SH kullanımından sonra kayda değer bir azalma görülürken %2.5 SH'nin kemomekanik preparasyon sonrasında kök kanalındaki bakteriyel çeşitliliği önemli ölçüde azalttığı rapor edilmiştir (200). Spanberg ve ark. (201) %5.25'lik SH konsantrasyonunun yüksek sitotoksik özellik gösterdiğini belirtmiş ve bunun yerine %2.5'luk SH kullanımını önermişlerdir. Bu veriler değerlendirildiğinde, bu çalışmada %2.5 SH'nin kullanımı tercih edilmiştir.

KH, geniş spektrumlu antibakteriyel özelliğe ve “*substantivite*” etkisine sahip bir irigasyon solüsyonudur (122). Mine ve dentin yapısında bulunan hidroksiapatit veya glikoproteinlerin anyonik gruplarına bağlanır, yavaşça salınır ve bu süreçte konsantrasyonu azalırken antibakteriyel etkisini uzun süre korur. KH'nin “*substantivite*”

özelliği sayesinde etkisini 12 haftaya kadar sürdürebildiği için endodontide final irigantı olarak kullanılması önerilmektedir (202, 203). KH organik doku ve smear tabakasını ortadan kaldıramamaktadır. Ayrıca, ortamda organik madde bulunmasının KH'nin etkisini azalttığı literatürde de bildirilmiştir (197). Bu yüzden KH'nin SH ile birlikte kullanılması önerilmiştir.

PHMB, biyosidal katyonik bir polimerdir. Geniş spektrumlu antibakteriyel ve antifungal aktivitesi nedeniyle tıpta uzun yıllardır farklı uygulamalarda kullanılan bir antiseptiktir (204-206). PHMB'nin antimikrobiyal etkisinin, bakteriyel fosfolipid zarını delme yeteneğine dayandığı ve bu süreç sonucunda bakterinin öldüğü düşünülmektedir (207). PHMB içeren maddeler, genellikle hastanelerde ve veteriner kliniklerinde yüzey dezenfeksiyonu amacıyla %0.1-0.2 konsantrasyonlarında kullanılmıştır. %0.2'lik PHMB ağız gargarası olarak kullanılmaktadır, antiseptik etkinliğinin yanı sıra, yeniden epitelizeasyon sürecinde de rol aldığı bildirilmiştir (208). Ayrıca, sekonder bakteriyel enfeksiyonu da önler. Literatürde, miks biyofilmlere karşı farklı irigantlar, kombinasyonları ve PHMB solüsyonunun kök kanal dezenfeksiyonunu kıyaslayan sınırlı araştırma bulunmaktadır. PHMB'i klinikte sıklıkla kullandığımız irigantlarla karşılaştırmak ve dentin tübül dezenfeksiyonuna etkisini incelemek için çalışmamızdaki irigantlardan biri olarak PHMB tercih edilmiştir.

Dentin tübül penetrasyonunu inceleyen pek çok çalışmada, kök kanalı farklı seviyelerde ve sayılarda kesitlerde incelenmiştir. Bu tez çalışmasında, kökün apikal, orta ve koronal bölgelerindeki dentin tübül penetrasyonunu karşılaştırmak amacıyla, apikalden sırasıyla 2, 5 ve 8 mm uzaklıktaki kesitler alınarak analiz yapılmıştır. Bu bölgelerin belirlenmesinde, önceki çalışmaların (209, 210) yöntemleri referans alınmıştır.

Endodontik mikrobiyoloji araştırmalarında, farklı dezenfeksiyon yöntemlerinin antimikrobiyal etkisini incelemek amacıyla moleküler teknikler, bakteri kültürü, biyoluminesans, kolorimetrik yöntemler, TEM, ışık mikroskobu ve KLTM gibi mikroskopik tekniklerle birlikte çeşitli yöntemler kullanılmaktadır (107). TEM, numunelerin hazırlanmasında etanol banyosu ile dehidrasyon gibi ek işlemler gerektiren iki boyutlu bir değerlendirme sağlar (211). TEM, KLTM'ye kıyasla daha yüksek büyütme

oranlarına sahiptir, fakat yüksek büyötmeye bağlı olarak sadece belirli bir alanı göröntölemektedir. KLTM, floresan maddeler sayesinde örneğ yüzeyinde işleğ uygulanmaksızın daha küçöğ büyötmelerde geniş alanların ya da tüm örneğ yüzeyinin incelenmesine olanak tanır (212).

KLTM analizinde floresan boyalar, biyofilmin dağılımını ve üç boyutlu yapısının incelenmesine, ayrıca canlı ve ölü bakteri oranı ile biyofilm hacmi gibi kantitatif parametrelerin analizine imkân tanır (86). İrigantların dentin tübüllerine nüfuz etme düzeylerini, irigasyon aktivasyon tekniklerinin etkinliğini, intrakanal ilaçların ve kök kanal dolumu esnasında kullanılan patlarının dentin tübüllerine girişini, ayrıca obturasyon tekniklerinin dentinal tüböl penetrasyonuna etkisini incelemek için KLTM kullanımının faydalı olduğu araştırmacılar tarafından da belirtilmiştir (209, 213, 214). İlâveten, yalnızca kanal yüzeyinin değil, aynı zamanda tübüllerde bulunan MO'ların incelenmesine olanak tanınması, minimum hazırlık gereksinimi ile yüksek çözünürlükte biyofilmin doğrudan gözlemlenebilmesi ve költürö yapılamayan ya da költürlenmesi oldukça güç olan bakterilerin göröntölenmesi gibi önemli avantajlar sağlamaktadır (212).

Kishen ve ark. (215), KLTM analizinde canlılık boyalarının kullanımının, inkübasyon sonrasında dentin tübüllerine penetre olan bakteriyel biyofilmi değerlendirmek için etkili bir yaklaşım olduğunu belirtmiştir. Del Carpio-Perochena ve ark. (216) da polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki hücre canlılığı ve bakteri hacmini ölçmek amacıyla KLTM'den yararlanmıştır. Bu bilgiler ışığında, mevcut çalışmada test edilen irigantların antibakteriyel etkinliği KLTM analizi ile incelendi.

Literatürdeki çalışmalara benzer olarak, bu çalışmada da hem canlı hem de ölü bakterileri KLTM ile göröntöleyebilmek için LIVE/DEAD BacLight bakteriyel canlılık boyası kiti kullanılmıştır (182, 216). LIVE/DEAD BacLight bakteriyel canlılık boyasının yüzeyde bulunan bakterilerin canlılığını ve miktarını tespit etmede etkili bir yöntem olduğu daha önce yapılan çalışmalarda bildirilmiştir. Ancak, Hoefel ve ark. (217) SYTO 9 ve PI ile boyanan yüzeylerin her zaman tam olarak bakteri canlılığı arasındaki farkı ayıramadığı ve bunun yerine ara hücresele bir formun göröntölenebildiğini bildirmiştir. Çalışmamızda

bakteri örnekleme ve CFU sayımı ile KLTM sonuçları arasındaki farkın bu ara hücrel formdan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Literatürde, farklı irigantların dentin tübüllerindeki biyofilme etkisini incelemek amacıyla, farklı derinliklerde kırmızı (ölü bakteri) ve yeşil floresansın (canlı bakteri) yoğunluklarının ölçüldüğü ve maksimum penetrasyon derinliğinin hesaplandığı çalışmalar bulunmaktadır (218, 219). Bu bilgiler ışığında, diğer çalışmalarla karşılaştırma yapabilmek için irigantların etkinliği ölü bakterilerin maksimum penetrasyon derinliği hesaplaması kullanılarak yapılmıştır.

İrigant uygulaması öncesi ve sonrası bakteriyel örnekleme ile CFU sayımı, dentin tübülleri içerisindeki bakteri sayısı azalmasının nicel olarak belirlenmesinde yardımcı olarak kullanılırken, KLTM görüntülemesi ise ölü ve canlı bakterilerin yüzdesel hesaplanması ve irigantlardan sonra biyofilm yapısındaki değişiklikleri incelemek için kullanılmıştır. CFU sayımı, yüksek değişkenliğe sahip bir yöntemdir çünkü logaritmik ölçek kullanımı, bu yöntemin sadece yüzeysel derinliklerdeki bakteri sayısını tahmin etmesine olanak tanırken dişte bulunan total hücre sayısını veremez (220). H-tipi eğeler kullanılarak bakteriyel örnekleme yapılması sadece ana kanalla sınırlı kalmaktadır. Fakat Peters ve ark. (221) göre, pulpaya daha yakın yüzeylerde yüksek sayıda anaerobik bakteri ve gram pozitif bakteriler bulunmakta ve daha fazla bakteri türü tespit edilmektedir.

İstatistiksel analizden elde edilen bulgulara göre en fazla ölü bakteri penetrasyonu koronal üçlüde gözlenmektedir ($P < 0.05$). KH grubu dışında diğer tüm irigantlarda en fazla penetrasyon sırasıyla koronal, apikal ve orta üçlüde sağlanmıştır. Bunun sebebi, koronal üçlüde bulunan dentin tübüllerinin sayısının ve çapının daha büyük olmasıyla açıklanabilir (222). Apikal üçlüdeki dezenfeksiyonun orta üçlüdekinden daha fazla olmasının nedeni şırınga ile irigasyon yapılması olabilir. Şırınga ucunun apikalden 2 mm kısa olacak şekilde yerleştirilmesi ve çıkan solüsyonun hızının artması ile apikal kısımda daha fazla dezenfeksiyon sağlanmış olabilir (223). Elde edilen verilerin diğer çalışmalardan farklı olmasının sebebi, kullanılan diş tipinin ve kanal çapının farklı olması olabilir.

İrigantların dentin tübüllerindeki dezenfeksiyonları karşılaştırıldığında, kontrol grubunun dentin tübüllerindeki dezenfeksiyonu diğer tüm irigantlara göre anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur ($P < 0.05$). Vatkar ve ark. (136), SH, KH ve distile suyun maksimum ölü bakteri penetrasyon derinliklerini karşılaştırdıkları çalışmada, distile suyun bakteriler üzerine dezenfeksiyon etkisinin olmadığını, SH ve KH irigantlarının daha etkili olduğunu gözlemlemiştir. Buck ve ark. (224), distile suyun iyi bir irigant olmadığını, kök kanalını yıkmak dışında bir etkisi olmadığını bildirmiştir.

SH maksimum ölü bakteri penetrasyon açısından en yüksek etkinliğe sahip olmasına rağmen diğer irigantlarla arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Ruiz-Linares ve ark. (225), farklı irigantların polimikrobiyal biyofilmler üstündeki antimikrobiyal etkinliğini KLTM ile inceledikleri çalışmada SH'nin diğer irigantlardan daha başarılı olduğunu tespit etmiştir. Arias-Moliz ve ark. (226), antimikrobiyal etkinliğin KLTM ile incelendiği çalışmada, SH'nin kontrol grubu ve KH'den daha etkili olduğunu bildirmişlerdir. SH, KH ve setrimitin karşılaştırıldığı KLTM çalışmasında Guerreiro-Tanomaru ve ark. (227), SH'nin biyofilm dezenfeksiyonunda daha etkili olduğunu gözlemlemiştir. Fakat, Roças ve ark. (228) ise, %2.5'luk SH ve %2'lik KH'nin antibakteriyel etkinliğini karşılaştırmış ve irigantlar arasında dezenfeksiyon açısından farklılık bulunmadığını bildirmiştir. Ercan ve ark. (229) da KH ve SH'nin antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırmış ve KH'nin daha başarılı olduğunu bulmuştur. Mikic ve ark. (230), %0.2 PHMB, %2.5 SH ve %0.2 KH'i karşılaştırmış ve PHMB ve SH'nin benzer antimikrobiyal etkinliğe sahip olduğunu belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda, SH'nin yüksek antimikrobiyal etkinlik göstermesi literatürdeki diğer çalışmalarla uyumluluk göstermektedir.

KH grubunda, PHMB'e kıyasla maksimum ölü bakteri penetrasyonunda daha başarılı sonuçlar elde edilirken irigantlar arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır. Dammaschke ve ark. (231), PHMB'i, KH ve diğer irigantlarla karşılaştırmış ve KH'nin daha başarılı dezenfeksiyon sağladığını tespit etmiştir. Zaugg ve ark. (232), KH, PHMB ve kalsiyum hidroksitin monomikrobiyal biyofilm üzerindeki dezenfeksiyon etkisini karşılaştırmış ve KH'nin dezenfeksiyon etkisinin PHMB'e göre daha başarılı olduğunu bildirmişlerdir. Farklı irigantların ilaca dirençli bakteriler üzerine antibakteriyel etkinliği

değerlendirildiğinde Günther ve ark. (233), KH'nin PHMB'den daha etkili olduğunu bildirmiştir. Koburger ve ark. (234), farklı irigantların polimikrobiyal biyofilmler üzerindeki antibakteriyel etkinliğini karşılaştırmış ve PHMB'nin KH'den daha etkili olduğunu gözlemlemiştir. Ayrıca Chandki ve ark. (235), %2 KH ve %0.2 PHMB karşılaştırmış ve PHMB'nin substantivitesinin daha uzun olduğunu bildirmiştir. Literatürdeki görülen bu farklılıklar, çalışmalarda kullanılan farklı PHMB konsantrasyonlarına ve farklı deney aşamalarına bağlı olarak görülebilir. Ayrıca, yapılan çalışmalarda ticari markaların PHMB irigantları kullanılırken, bizim çalışmamızda PHMB'nin toz formundan solüsyon hazırlanması, arada gözlenen farklılıkların nedenlerinden biri olabilir.

Kombine olarak kullanılan SH + KH ve SH + PHMB grupları, PHMB grubundan anlamlı şekilde daha başarılı bulunmuştur ($P < 0.05$). Kuruvilla ve ark. (236), SH ve KH'nin kombine kullanımının, irigantların tek başına kullanılmasından daha etkili olduğunu gözlemlemiştir. Gomes ve ark. (237) farklı irigantların ve kombinasyonlarının bakteri inhibisyon alanlarını karşılaştırmış ve SH + KH kombine kullanımının daha büyük bakteriyel inhibisyon alanı oluşturduğu bildirmiştir. Flach ve ark. (238), KLTM görüntülemesi ile irigantların ve kombinasyonlarının antimikrobiyal etkinliğini karşılaştırdıkları çalışmada kombine olarak kullanılan irigantların, tek başlarına kullanılması arasında fark olmadığını belirtmiştir. Özkan ve ark. (239), farklı irigantların ve kombinasyonlarının *E. faecalis* üzerinde antimikrobiyal etkinliğini değerlendirmiş ve KH grubunun SH + KH grubundan daha başarılı dezenfeksiyon sağladığını bildirmiştir. Kombine grupta daha düşük düzeyde dezenfeksiyon etkisinin gözlenmesinin, irigantların birbiriyle etkileşimi sonucu ortaya çıkan reaksiyon ürünlerinin dentin tübüllerini tıkamasıyla ilişkisi olduğunu belirtmiştir. Kombine olarak kullanılan irigantların, SH'nin organik çözücü etkisi ve KH, PHMB'nin antibakteriyel etkisini aynı anda göstermesinden kaynaklı daha iyi dezenfeksiyon sağladığını düşünmekteyiz. Literatürde ise daha önce SH ve PHMB'nin kombine olarak kullanıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Dentin tübüllerinin çapları, genç bireylerde daha genişken yaşlı bireylerde daha dardır (240). Yapılan çalışmada yaş grubuna dikkat edilmeden kullanılan çekilmiş insan dişlerinin, dentin tübüllerine penetre olan bakteri sayısı üzerindeki etkisi çalışmanın

limitasyonlarından biridir. Bu çalışmanın diğer limitasyonları ise KLTM analizi için örnek dişlerin su soğutması altında disk ile kesilmesi, çalışmaya sadece tip 1 alt çene küçük azı dişlerin dahil edilmesidir.



6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Yapılan çalışmada 6 farklı irigantın dentin tübüllerine penetre olmuş miks biyofilme etkisi incelenmiştir. Elde edilen bulgulara göre;

1. Karşılaştırılan irigantların, dentin tübülü dezenfeksiyonu üzerine farklı etkileri olduğu için sıfır hipotezi reddedilmiştir. İstatistik analize göre irigantlar dentin tübüllerinde dezenfeksiyon sağlarken, hiçbir irigant bakteri penetrasyonunu tamamen ortadan kaldıramamıştır.
2. İrigantların kombine kullanımının, tek başına SH, KH ve PHMB kullanımından daha etkili olduğu ve bu yüzden klinik koşullarda final irigasyonunda irigantların kombine kullanılması tercih edilebilir.
3. Dentin tübüllerine penetre olan bakterilerin ve biyofilmin, floresan boyalar kullanılarak ölü ve canlı bakterilerin ayrımında KLTM görüntülemesi kullanımının uygun bir görüntüleme tekniği olduğu görülmüştür.
4. PHMB solüsyonunun dentin tübülü dezenfeksiyonu üzerine etkisini araştırmak için daha fazla çalışma yapılmasına ihtiyaç vardır.
5. Elde edilen sonuçların klinik koşullara yansıtarken dikkatli olunması ve daha fazla *in vitro* çalışma ile desteklenmesi önerilir.

KAYNAKLAR

1. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011;37(10):1380–5.
2. Ghorbanzadeh A, Aminsobhani M, Sohrabi K, Chiniforush N, Ghafari S, Shamshiri AR, et al. Penetration depth of sodium hypochlorite in dentinal tubules after conventional irrigation, passive ultrasonic agitation and Nd: YAG laser activated irrigation. *J Lasers Med Sci.* 2016;7(2):105.
3. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Eur J Oral Sci.* 1981;89(4):321–8.
4. Tomson RME, Polycarpou N, Tomson PL. Contemporary obturation of the root canal system. *Br Dent J.* 2014;216(6):315–22.
5. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A. Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca (OH) 2. *J Endod.* 2005;31(5):359–63.
6. Plotino G, Grande NM, Mercade M, Cortese T, Staffoli S, Gambarini G, et al. Efficacy of sonic and ultrasonic irrigation devices in the removal of debris from canal irregularities in artificial root canals. *J. Appl. Oral Sci.* 2019;27:e20180045.
7. Costerton JW. Introduction to biofilm. *Int J Antimicrob Agents.* 1999;11(3–4):217–39.
8. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291–301.
9. Boutsoukakis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: a computational fluid dynamics study. *Int Endod J.* 2009;42(2):144–55.

10. Tay FR, Gu L sha, Schoeffel GJ, Wimmer C, Susin L, Zhang K, et al. Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. *J Endod.* 2010;36(4):745–50.
11. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014;216(6):299–303.
12. Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49(8):764–73.
13. Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J Endod.* 2013;39(11):1413–5.
14. Müller G, Kramer A, Schmitt J, Harden D, Koburger T. Reduced cytotoxicity of polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) by egg phosphatidylcholine while maintaining antimicrobial efficacy. *Chem Biol Interact.* 2011;190(2–3):171–8.
15. Cazzaniga A. The Effect of an Antimicrobial Gauze Dressing Impregnated with 0.2-percent Polyhexamethylene Biguanide as a Barrier to Prevent *Pseudomonas aeruginosa* Wound Invasion. *Wound-compend Clin Res Prac.* 2002;14:169–76.
16. Rosin M, Welk A, Bernhardt O, Ruhnau M, Pitten F, Kocher T, et al. Effect of a polyhexamethylene biguanide mouthrinse on bacterial counts and plaque. *J Clin Periodontol.* 2001;28(12):1121–6.
17. Bouattour Y, Chennell P, Wasiak M, Jouannet M, Sautou V. Stability of an ophthalmic formulation of polyhexamethylene biguanide in gamma-sterilized and ethylene oxide sterilized low density polyethylene multidose eyedroppers. *PeerJ.* 2018;6:e4549.

18. Siqueira Jr JF, Rôças IN, Paiva SSM, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;104(1):122–30.
19. Ghorbanzadeh A, Bahador A, Sarraf P, Ayar R, Fekrazad R, Asefi S. Ex vivo comparison of antibacterial efficacy of conventional chemomechanical debridement alone and in combination with light-activated disinfection and laser irradiation against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Photodiagnosis Photodyn Ther.* 2020;29:101648.
20. Taschieri S, Del Fabbro M, Samaranayake L, Chang JWW, Corbella S. Microbial invasion of dentinal tubules: a literature review and a new perspective. *J Investig Clin Dent.* 2014;5(3):163–70.
21. Lukic D, Karygianni L, Flury M, Attin T, Thurnheer T. Endodontic-like oral biofilms as models for multispecies interactions in endodontic diseases. *Microorganisms.* 2020;8(5):674.
22. Chawla A, Kumar V. Evaluating the efficacy of different techniques and irrigation solutions for removal of calcium hydroxide from the root canal system: A scanning electron microscope study. *J. Conserv. Dent.* 2018;21(4):394–400.
23. Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004;15(6):348–81.
24. Gomes BPF de A, Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res.* 2018;32(suppl 1):e69.
25. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: part 2—redefining the endodontic microbiota. *J Endod.* 2005;31(7):488–98.

26. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res.* 2002;81(11):761–6.
27. Khemaleelakul S, Baumgartner JC, Pruksakorn S. Identification of bacteria in acute endodontic infections and their antimicrobial susceptibility. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):746–55.
28. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol.* 2008;46(11):3599–606.
29. Siqueira Jr JF. Periapical actinomycosis and infection with *Propionibacterium propionicum*. *Endod Topics.* 2003;6(1):78–95.
30. Siqueira Jr JF, Rôças IN. Microbiology and treatment of acute apical abscesses. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):255–73.
31. Pinheiro ET, Gomes B, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1–11.
32. Tronstad L, Barnett F, Riso K, Slots J. Extraradicular endodontic infections. *Dent Traumatol.* 1987;3(2):86–90.
33. Tani-Ishii N, Wang C, Tanner A, Stashenko P. Changes in root canal microbiota during the development of rat periapical lesions. *Oral Microbiol Immunol.* 1994;9(3):129–35.
34. Fabricious L, Dahlen G, Öhman A, Möller A. Predominant indigenous oral bacteria isolated from infected root canals after varied times of closure. *Eur J Oral Sci.* 1982;90(2):134–44.
35. Siren EK, Haapasalo MPP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30(2):91–5.

36. Siqueira Jr JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(5):632–41.
37. Facklam RR, Carvalho M da GS, Teixeira LM. History, taxonomy, biochemical characteristics, and antibiotic susceptibility testing of enterococci. The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance. 2002;1–54.
38. Gürüz A, Başustaoğlu A, İnal A, Sığ A, Saygıner A, Özsoy A, et al. Streptokoklar ve Enterokoklar. *Hipokrat Kitabevi*, 2019; 473-499.
39. Fisher K, Phillips C. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology (N Y)*. 2009;155(6):1749–57.
40. Huycke MM, Sahm DF, Gilmore MS. Multiple-drug resistant enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. *Emerg Infect Dis.* 1998;4(2):239.
41. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller Å, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J.* 2003;36(7):500–8.
42. Rôças IN, Siqueira Jr JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod.* 2004;30(5):315–20.
43. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J.* 2005;38(10):735–42.
44. Lleo MM, Bonato B, Tafi MC, Signoretto C, Boaretti M, Canepari P. Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *J Appl Microbiol.* 2001;91(6):1095–102.
45. Wang QQ, Zhang CF, Chu CH, Zhu XF. Prevalence of *Enterococcus faecalis* in saliva and filled root canals of teeth associated with apical periodontitis. *Int J Oral Sci.* 2012;4(1):19–23.

46. Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *Int Endod J*. 2005;38(10):735–42.
47. Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: a review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(1):1–12.
48. Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro. *Int Endod J*. 2015;48(6):602–10.
49. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One*. 2018;13(1):e0190469.
50. Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE. Pyrosequencing analysis of cryogenically ground samples from primary and secondary/persistent endodontic infections. *J Endod*. 2017;43(8):1309–16.
51. Gomez A, Nelson KE. The oral microbiome of children: development, disease, and implications beyond oral health. *Microb Ecol*. 2017;73:492–503.
52. Menon T, Naveenkumar V. Use of 16s rRNA Gene sequencing for the identification of viridans group Streptococci. *Cureus*. 2023;15(10).
53. Eriksson L, Lif Holgersson P, Esberg A, Johansson I. Microbial Complexes and Caries in 17-Year-Olds with and without *Streptococcus mutans*. *J Dent Res*. 2018;97(3):275–82.
54. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1):10–1128.
55. Berlutti F, Catizone A, Ricci G, Frioni A, Natalizi T, Valenti P, et al. *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* are able to adhere and invade human gingival fibroblast cell line. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010;23(4):1253–60.

56. Miller JH, Avilés-Reyes A, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, Sampson E, et al. The collagen binding protein Cnm contributes to oral colonization and cariogenicity of *Streptococcus mutans* OMZ175. *Infect Immun*. 2015;83(5):2001–10.
57. Avilés-Reyes A, Miller JH, Lemos JA, Abranches J. Collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* and related streptococci. *Mol Oral Microbiol*. 2017;32(2):89–106.
58. Inenaga C, Hokamura K, Nakano K, Nomura R, Naka S, Ohashi T, et al. A potential new risk factor for stroke: *Streptococcus mutans* with collagen-binding protein. *World Neurosurg*. 2018;113:e77–81.
59. Otsugu M, Nomura R, Matayoshi S, Teramoto N, Nakano K. Contribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding proteins in the presence of serum to the pathogenesis of infective endocarditis. *Infect Immun*. 2017;85(12):10–1128.
60. Nomura R, Ogaya Y, Nakano K. Contribution of the collagen-binding proteins of *Streptococcus mutans* to bacterial colonization of inflamed dental pulp. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159613.
61. de Almeida Gomes BPF, Vianna ME, Matsumoto CU, Zaia AA, Ferraz CCR, de Souza Filho FJ. Disinfection of gutta-percha cones with chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005;100(4):512–7.
62. Otto M. *Staphylococcus* colonization of the skin and antimicrobial peptides. *Expert Rev Dermatol*. 2010;5(2):183–95.
63. Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(2):114–22.

64. Mergoni G, Percudani D, Lodi G, Bertani P, Manfredi M. Prevalence of *Candida* species in endodontic infections: Systematic review and meta-analysis. *J Endod.* 2018;44(11):1616–25.
65. Douglas LJ. *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 2003;11(1):30–6.
66. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016;18(5):310–21.
67. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *J Bacteriol.* 2001;183(18):5385–94.
68. Chen V, Chen Y, Li H, Kent K, Baumgartner JC, Machida CA. Herpesviruses in abscesses and cellulitis of endodontic origin. *J Endod.* 2009;35(2):182–8.
69. Sabeti M, Slots J. Herpesviral-bacterial coinfection in periapical pathosis. *J Endod.* 2004;30(2):69–72.
70. Costerton JW. *The biofilm primer.* Springer; 2007.
71. Garg N, Garg A. *Textbook of endodontics.* Boydell & Brewer Ltd; 2010.
72. Lee SF, Li YH, Bowden GH. Detachment of *Streptococcus mutans* biofilm cells by an endogenous enzymatic activity. *Infect Immun.* 1996;64(3):1035–8.
73. Vasudevan R. Biofilms: microbial cities of scientific significance. *J Microbiol Exp.* 2014;1(3):00014.
74. Cvitkovitch DG, Li YH, Ellen RP. Quorum sensing and biofilm formation in *Streptococcal* infections. *J Clin Invest.* 2003;112(11):1626–32.
75. Patel R. Biofilms and antimicrobial resistance. *Clinical Orthopaedics and Related Research (1976-2007).* 2005;437:41–7.

76. Larsen T. Susceptibility of *Porphyromonas gingivalis* in biofilms to amoxicillin, doxycycline and metronidazole. *Oral Microbiol Immunol*. 2002;17(5):267–71.
77. Flemming HC. EPS—then and now. *Microorganisms* 4: 41. 2016.
78. Davey ME, O’toole GA. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol.* 2000;64(4):847–67.
79. Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *CDEJ*. 2010;13(4):233–9.
80. Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*. 1997;13(1):121–48.
81. Frank SA, Barbour AG. Within-host dynamics of antigenic variation. *Infect Genet Evol*. 2006;6(2):141–6.
82. Harn W, Chen Y, Yuan K, Chung C, Huang P. Calculus-like deposit at apex of tooth with refractory apical periodontitis. *Dental Traumatology*. 1998;14(5):237–40.
83. Hornef MW, Wick MJ, Rhen M, Normark S. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat Immunol*. 2002;3(11):1033–40.
84. Wilson M. Susceptibility of oral bacterial biofilms to antimicrobial agents. *J Med Microbiol*. 1996;44(2):79–87.
85. Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005;54(8):777–83.
86. Swimberghe RCD, Coenye T, De Moor RJG, Meire MA. Biofilm model systems for root canal disinfection: a literature review. *Int Endod J*. 2019;52(5):604–28.
87. Sathorn C, Parashos P, Messer HH. How useful is root canal culturing in predicting treatment outcome? *J Endod*. 2007;33(3):220–5.

88. Kishen A, Haapasalo M. Biofilm models and methods of biofilm assessment. *Endod Topics*. 2010;22(1):58–78.
89. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and of dentinal tubules. *J Dent Res*. 1987;66(8):1375–9.
90. Ricucci D, Siqueira Jr JF. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. *J Endod*. 2010;36(8):1277–88.
91. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MSZ, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J*. 2014;47(11):1058–63.
92. Bouillaguet S, Wataha JC, Lockwood PE, Galgano C, Golay A, Krejci I. Cytotoxicity and sealing properties of four classes of endodontic sealers evaluated by succinic dehydrogenase activity and confocal laser scanning microscopy. *Eur J Oral Sci*. 2004;112(2):182–7.
93. Uzunoğlu-Özyürek E, Askerbeyli-Örs S, Türker SA. Evaluation of the amount of remained sealer in the dentinal tubules following re-treatment with and without solvent. *CDEJ*. 2020;23(4):407–11.
94. Bridier A, Dubois-Brissonnet F, Boubetra A, Thomas V, Briandet R. The biofilm architecture of sixty opportunistic pathogens deciphered using a high throughput CLSM method. *J Microbiol Methods*. 2010;82(1):64–70.
95. Pérez-Osorio AC, Franklin MJ. qRT-PCR of microbial biofilms. *Cold Spring Harb Protoc*. 2008;2008(10):pdb-prot5066.
96. Ørstavik D. Essential endodontology: prevention and treatment of apical periodontitis. John Wiley & Sons; 2020.

97. 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(3):221–30.
98. Peters OA, Peters CI. Cleaning and shaping of the root canal system. *Cohen's Pathway of the Pulp* ed. 2020;12:236–303.
99. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006;32(5):389–98.
100. Darcey J, Jawad S, Taylor C, Roudsari RV, Hunter M. Modern endodontic principles part 4: irrigation. *Dent Update*. 2016;43(1):20–33.
101. Dakin HD. On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds. *Br Med J*. 1915;2(2852):318.
102. Coolidge ED. The diagnosis and treatment of conditions resulting from diseased dental pulps. *J Nat Dent Assoc*. 1919;6(4):337–49.
103. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J*. 2002;13:113–7.
104. Yang Y, Shen YA, Wang Z, Huang X, Maezono H, Ma J, et al. Evaluation of the susceptibility of multispecies biofilms in dentinal tubules to disinfecting solutions. *J Endod*. 2016;42(8):1246–50.
105. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J*. 1982;15(4):187–96.
106. Hauman CHJ, Love RM. Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J*. 2003;36(2):75–85.
107. Basrani B. Endodontic irrigation. *Chemical Disinfection of the root canal system* Cham, Switzerland: Springer International Publishing AG. 2015;

108. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod.* 2010;36(9):1558–62.
109. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008;34(3):268–72.
110. Tonini R, Giovarruscio M, Gorni F, Ionescu A, Brambilla E, Mikhailovna IM, et al. In vitro evaluation of antibacterial properties and smear layer removal/sealer penetration of a novel silver-citrate root canal irrigant. *Materials.* 2020;13(1):194.
111. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod.* 2010;36(7):1154–7.
112. Zhu W chun, Gyamfi J, Niu L na, Schoeffel GJ, Liu S ying, Santarcangelo F, et al. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis—a review. *J Dent.* 2013;41(11):935–48.
113. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810–30.
114. Retana-Lobo C, Ramírez-Mora T, Murillo-Gómez F, Maria Guerreiro-Tanomaru J, Tanomaru-Filho M, Reyes-Carmona J. Final irrigation protocols affect radicular dentin DMP1-CT expression, microhardness, and biochemical composition. *Clin Oral Investig.* 2022;26(8):5491–501.
115. Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen H, Grady J. New method of irrigation during endodontic treatment. *J Endod.* 1976;2(9):257–60.
116. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J.* 2003;36(6):411–5.

117. Menezes ACSC de, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. *Pesqui Odontol Bras*. 2003;17:349–55.
118. Siqueira Jr JF, Batista MMD, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod*. 1998;24(6):414–6.
119. Block SS. Disinfection, sterilization, and preservation. Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
120. Basrani B. Chlorhexidine gluconate. *Aust Endod J*. 2005;31(2):48–52.
121. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine-and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;96(5):618–24.
122. Souza MA, Menon CZ, Nery LF, Bertol CD, Rossato-Grando LG, Cecchin D. Effect of root canal preparation techniques on chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig*. 2018;22:859–65.
123. Rossi-Fedele G, Doğramacı EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JAP. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod*. 2012;38(4):426–31.
124. Rose FL, Swain G. Polymeric Diguanides. 702, 1954. p. 268.
125. Mashat BH. Polyhexamethylene biguanide hydrochloride: features and applications. *BJES*. 2016;4(1):49–55.
126. Krebs FC, Miller SR, Ferguson ML, Labib M, Rando RF, Wigdahl B. Polybiguanides, particularly polyethylene hexamethylene biguanide, have activity against human immunodeficiency virus type 1. *Biomed Pharmacother*. 2005;59(8):438–45.

127. Messick CR, Pendland SL, Moshirfar M, Fiscella RG, Losnedahl KJ, Schriever CA, et al. In-vitro activity of polyhexamethylene biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. *J Antimicrob Chemother.* 1999;44(2):297–8.
128. Gentile A, Gerli S, Di Renzo GC. A new non-invasive approach based on polyhexamethylene biguanide increases the regression rate of HPV infection. *BMC Clin Pathol.* 2012;12:1–5.
129. Allen MJ, White GF, Morby AP. The response of *Escherichia coli* to exposure to the biocide polyhexamethylene biguanide. *Microbiology (N Y).* 2006;152(4):989–1000.
130. Maris P. Modes of action of disinfectants. *Rev Sci Tech.* 1995;14(1):47–55.
131. Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P. A study of the antibacterial activity of some polyhexamethylene biguanides towards *Escherichia coli* ATCC 8739. *J Appl Microbiol.* 1983;54(3):345–53.
132. Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE. Barrier properties of the Gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Microbiol.* 1990;69(4):585–92.
133. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999;12(1):147–79.
134. Kaehn K. Polihexanide: a safe and highly effective biocide. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23(Suppl. 1):7–16.
135. Nagendrababu V, Murray PE, Ordinola-Zapata R, Peters OA, Rôças IN, Siqueira Jr JF, et al. PRILE 2021 guidelines for reporting laboratory studies in Endodontology: a consensus-based development. *Int Endod J.* 2021;54(9):1482–90.

136. Vatkar NA, Hegde V, Sathe S. Vitality of *Enterococcus faecalis* inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. *J Conserv Dent.* 2016;19(5):445–9.
137. Hülsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics.* 2005;10(1):30–76.
138. Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Irrigating solutions in root canal treatment. *Endodontic Practice Today.* 2019;13(2).
139. Neelakantan P, Cheng CQ, Mohanraj R, Sriraman P, Subbarao C, Sharma S. Antibiofilm activity of three irrigation protocols activated by ultrasonic, diode laser or Er: YAG laser in vitro. *Int Endod J.* 2015;48(6):602–10.
140. Mohammed SA, Vianna ME, Penny MR, Hilton ST, Knowles JC. The effect of sodium hypochlorite concentration and irrigation needle extension on biofilm removal from a simulated root canal model. *Aust. Dent. J.* 2017;43(3):102–9.
141. Herrera DR, Santos ZT, Tay LY, Silva EJ, Loguercio AD, Gomes BPFA. Efficacy of different final irrigant activation protocols on smear layer removal by EDTA and citric acid. *Microsc Res Tech.* 2013;76(4):364–9.
142. Jiang LM, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LWM. Comparison of the cleaning efficacy of different final irrigation techniques. *J Endod.* 2012;38(6):838–41.
143. De Meyer S, Meire MA, Coenye T, De Moor RJG. Effect of laser-activated irrigation on biofilms in artificial root canals. *Int Endod J.* 2017;50(5):472–9.
144. Özdemir HO, Buzoğlu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: in vitro study. *J Endod.* 2010;36(5):842–6.

145. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod*. 2012;38(10):1376–9.
146. Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellin E, Conte G, Cianconi L. Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *J Endod*. 2013;39(11):1456–60.
147. Urban K, Donnermeyer D, Schäfer E, Bürklein S. Canal cleanliness using different irrigation activation systems: a SEM evaluation. *Clin Oral Investig*. 2017;21:2681–7.
148. Kho P, Baumgartner JC. A comparison of the antimicrobial efficacy of NaOCl/Biopure MTAD versus NaOCl/EDTA against *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2006;32(7):652–5.
149. Tharuni SL, Parameswaran A, Sukumaran VG. A comparison of canal preparation using the K-file and Lightspeed in resin blocks. *J Endod*. 1996;22(9):474–6.
150. Gavini G, Santos M dos, Caldeira CL, Machado ME de L, Freire LG, Iglecias EF, et al. Nickel–titanium instruments in endodontics: a concise review of the state of the art. *Braz Oral Res*. 2018;32:e67.
151. 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(4):721–4.
152. Wu MK, Wesselink PR. Efficacy of three techniques in cleaning the apical portion of curved root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;79(4):492–6.
153. Falk KW, Sedgley CM. The influence of preparation size on the mechanical efficacy of root canal irrigation in vitro. *J Endod*. 2005;31(10):742–5.

154. Shuping GB. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000;26:751–5.
155. Gu Y, Perinpanayagam H, Jin DJW, Yoo YJ, Jeong JS, Lim SM, et al. Effect of different agitation techniques on the penetration of irrigant and sealer into dentinal tubules. *Photomed Laser Surg.* 2017;35(2):71–7.
156. Gawdat SI, Bedier MM. Influence of dual rinse irrigation on dentinal penetration of a bioceramic root canal sealer: A Conofocal microscopic Analysis. *Aust Endod J.* 2022;48(3):481–6.
157. Ulusoy ÖİA, Savur İG, Çelik B. Etilendiamin tetraasetik asit, perasetik asit ve etidronik asitin sodyum hipokloritin doku çözme kapasitesi üzerine etkisi: in vitro. *Acta Odontol Turc.* 2017;34(2):50–4.
158. Kuah HG, Lui JN, Tseng PSK, Chen NN. The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of the smear layer. *J Endod.* 2009;35(3):393–6.
159. Garcez AS, Ribeiro MS, Tegos GP, Nunez SC, Jorge AOC, Hamblin MR. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers Surg Med.* 2007;39(1):59–66.
160. Cheng Y, Lu C, Yen G. Phytochemicals enhance antioxidant enzyme expression to protect against NSAID-induced oxidative damage of the gastrointestinal mucosa. *Mol Nutr Food Res.* 2017;61(6):1600659.
161. Prevention C for DC and. 2003 CDC infection control recommendations for dental health-care settings. *Compend Contin Educ Dent.* 2004;25(1 Suppl):43–53.
162. Dunleavy EM, Roche D, Tagami H, Lacoste N, Ray-Gallet D, Nakamura Y, et al. HJURP Is a Cell-Cycle-Dependent Maintenance and Deposition Factor of CENP-A at Centromeres. *Cell.* 2009;137(3):485–97.

163. Albuquerque MTP, Nagata J, Bottino MC. Antimicrobial efficacy of triple antibiotic-eluting polymer nanofibers against multispecies biofilm. *J Endod.* 2017;43(9):S51–6.
164. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod.* 2014;40(2):285–90.
165. Madsen JS, Røder HL, Russel J, Sørensen H, Burmølle M, Sørensen SJ. Coexistence facilitates interspecific biofilm formation in complex microbial communities. *Environ Microbiol.* 2016;18(8):2565–74.
166. West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS. The social lives of microbes. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2007;38(1):53–77.
167. Siqueira JF, De Uzeda M, Fonseca MEF. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996;22(6):308–10.
168. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren 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(1):86–93.
169. Rôças IN, Hülsmann M, Siqueira Jr JF. Microorganisms in root canal-treated teeth from a German population. *J Endod.* 2008;34(8):926–31.
170. Pinheiro ET, Gomes B, Ferraz CCR, Sousa ELR, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J.* 2003;36(1):1–11.
171. Rivera-Yoshida N, Bottagisio M, Attanasi D, Savadori P, De Vecchi E, Bidossi A, et al. Host Environment Shapes *S. aureus* Social Behavior as Revealed by Microscopy Pattern Formation and Dynamic Aggregation Analysis. *Microorganisms.* 2022;10(3):526.

172. Zan R, Kutlu G, Hubbezoglu I, Sumer Z, Tunc T, Mutlu Z. Bactericidal effects of various irrigation solutions against staphylococcus aureus in human root canal. *J Istanbul Univ Fac Dent*. 2015;49(1):19–26.
173. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol*. 2009;58(2):155–62.
174. Carolus H, Van Dyck K, Van Dijck P. *Candida albicans* and *Staphylococcus* species: a threatening twosome. *Front Microbiol*. 2019;10:2162.
175. Eichelberger KR, Cassat JE. Metabolic adaptations during *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* co-infection. *Front Immunol*. 2021;12:797550.
176. Souza LC, Brito PRR, de Oliveira JCM, Alves FRF, Moreira EJJ, Sampaio-Filho HR, et al. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of *Enterococcus faecalis*. *J Endod*. 2010;36(2):292–6.
177. Beltes C, Sakkas H, Economides N, Papadopoulou C. Antimicrobial photodynamic therapy using Indocyanine green and near-infrared diode laser in reducing *Enterococcus faecalis*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2017;17:5–8.
178. Rios A, He J, Glickman GN, Spears R, Schneiderman ED, Honeyman AL. Evaluation of photodynamic therapy using a light-emitting diode lamp against *Enterococcus faecalis* in extracted human teeth. *J Endod*. 2011;37(6):856–9.
179. Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schaperl Z, Baraba A, Anić I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J*. 2013;46(4):339–47.
180. Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. Ex vivo killing of *Enterococcus faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *Int Endod J*. 2013;46(7):649–59.

181. Meire MA, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Evaluation of Nd: YAG and Er: YAG irradiation, antibacterial photodynamic therapy and sodium hypochlorite treatment on *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.* 2012;45(5):482–91.
182. Stojicic S, Shen Y, Haapasalo M. Effect of the source of biofilm bacteria, level of biofilm maturation, and type of disinfecting agent on the susceptibility of biofilm bacteria to antibacterial agents. *J Endod.* 2013;39(4):473–7.
183. Seneviratne CJ, Yip JWY, Chang JWW, Zhang CF, Samaranayake LP. Effect of culture media and nutrients on biofilm growth kinetics of laboratory and clinical strains of *Enterococcus faecalis*. *Arch Oral Biol.* 2013;58(10):1327–34.
184. 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(2):97–104.
185. Abou-Rass M, Piccinino M V. The effectiveness of four clinical irrigation methods on the removal of root canal debris. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1982;54(3):323–8.
186. Boutsoukis C. Syringe irrigation revisited. *Endodontic Practice Today.* 2019;13(2).
187. Druttman ACS, Stock CJR. An in vitro comparison of ultrasonic and conventional methods of irrigant replacement. *Int Endod J.* 1989;22(4):174–8.
188. Susila A, Minu J. Activated irrigation vs. conventional non-activated irrigation in endodontics—A systematic review. *Eur Endod J.* 2019;4(3):96.
189. Senia ES, Marshall FJ, Rosen S. The solvent action of sodium hypochlorite on pulp tissue of extracted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1971;31(1):96–103. Horiba N, Maekawa Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. A pilot study of Japanese green tea as a medicament: antibacterial and bactericidal effects. *J Endod.* 1991;17(3):122–4.

191. Neuhaus KW, Liebi M, Stauffacher S, Eick S, Lussi A. Antibacterial efficacy of a new sonic irrigation device for root canal disinfection. *J Endod.* 2016;42(12):1799–803.
192. Hoedke D, Kaulika N, Dommisch H, Schlafer S, Shemesh H, Bitter K. Reduction of dual-species biofilm after sonic-or ultrasonic-activated irrigation protocols: A laboratory study. *Int Endod J.* 2021;54(12):2219–28.
193. Swimberghe RCD, De Clercq A, De Moor RJG, Meire MA. Efficacy of sonically, ultrasonically and laser-activated irrigation in removing a biofilm-mimicking hydrogel from an isthmus model. *Int Endod J.* 2019;52(4):515–23.
194. Al-Zuhair H, Su Z, Liu H, Wang Z, Haapasalo M, Hieawy A, et al. Antimicrobial effects of agitational irrigation on single-and multispecies biofilms in dentin canals. *Odontology.* 2023;111(1):49–56.
195. Jiang LM, Verhaagen B, Versluis M, van der Sluis LWM. Evaluation of a sonic device designed to activate irrigant in the root canal. *J Endod.* 2010;36(1):143–6.
196. Hess W, Zürcher E. The anatomy of the root-canals of the teeth of the permanent dentition. J. Bale, sons & Danielsson, Limited; 1925.
197. Mohammadi Z, Abbott P V. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J.* 2009;42(4):288–302.
198. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13:113–7.
199. Cvek M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal débridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontol Revy.* 1976;27(1):1–10.
200. Gonçalves LS, Rodrigues RCV, Junior CVA, Soares RG, Vettore MV. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine as irrigant solutions for root canal disinfection: a systematic review of clinical trials. *J Endod.* 2016;42(4):527–32.

201. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials: 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1973;36(6):856–71.
202. Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular-and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod.* 2007;33(6):690–2.
203. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.* 2004;98(4):488–92.
204. Romanowski EG, Yates KA, O'Connor KE, Mah FS, Shanks RMQ, Kowalski RP. Evaluation of polyhexamethylene biguanide (PHMB) as a disinfectant for adenovirus. *JAMA Ophthalmol.* 2013;131(4):495–8.
205. Sibbald RG, Coutts P, Woo KY. Reduction of bacterial burden and pain in chronic wounds using a new polyhexamethylene biguanide antimicrobial foam dressing-clinical trial results. *Adv Skin Wound Care.* 2011;24(2):78–84.
206. Sowlati-Hashjin S, Carbone P, Karttunen M. Insights into the polyhexamethylene biguanide (PHMB) mechanism of action on bacterial membrane and DNA: A molecular dynamics study. *J Phys Chem B.* 2020;124(22):4487–97.
207. Szkołuda P, Karpiński TM. Polyhexanide (PHMB)—properties and applications in medicine. *Eur J Biol Res.* 2020;10(3):225–31.
208. Daeschlein G, Assadian O, Bruck JC, Meinel C, Kramer A, Koch S. Feasibility and clinical applicability of polyhexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(6):292–6.
209. Küçük M, Kermeoğlu 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(2):202–8.

210. Akcay M, Arslan H, Mese M, Durmus N, Capar ID. Effect of photon-initiated photoacoustic streaming, passive ultrasonic, and sonic irrigation techniques on dentinal tubule penetration of irrigation solution: a confocal microscopic study. *Clin Oral Investig*. 2017;21:2205–12.
211. Gharib SR, Tordik PA, Imamura GM, Baginski TA, Goodell GG. A confocal laser scanning microscope investigation of the epiphany obturation system. *J Endod*. 2007;33(8):957–61.
212. Mamootil K, Messer HH. Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *Int Endod J*. 2007;40(11):873–81.
213. Machado R, Cruz ATG, de Araujo BM de M, Klemz AA, Klug HP, da Silva Neto UX. Tubular dentin sealer penetration after different final irrigation protocols: A confocal laser scanning microscopy study. *Microsc Res Tech*. 2018;81(6):649–54.
214. Tuncer AK, Ünal B. Comparison of sealer penetration using the EndoVac irrigation system and conventional needle root canal irrigation. *J Endod*. 2014;40(5):613–7.
215. Kishen A, Shrestha A, Del Carpio-Perochena A. Validation of biofilm assays to assess antibiofilm efficacy in instrumented root canals after syringe irrigation and sonic agitation. *J Endod*. 2018;44(2):292–8.
216. del Carpio-Perochena A, Bramante CM, de Andrade FB, Maliza AGA, Cavenago BC, Marciano MA, et al. Antibacterial and dissolution ability of sodium hypochlorite in different pHs on multi-species biofilms. *Clin Oral Investig*. 2015;19:2067–73.
217. Hoefel D, Grooby WL, Monis PT, Andrews S, Saint CP. Enumeration of water-borne bacteria using viability assays and flow cytometry: a comparison to culture-based techniques. *J Microbiol Methods*. 2003;55(3):585–97.
218. Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GTJ. 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(6):928–34.

219. Li Q, Zhang Q, Zou X, Yue L. Evaluation of four final irrigation protocols for cleaning root canal walls. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):29.
220. Miller MJ. A fresh look at USP< 1223> validation of alternative microbiological methods and how the revised chapter compares with PDA TR33 and the proposed revision to Ph. Eur. 5.1. 6. *Am Pharm Rev.* 2015;18(5):22–35.
221. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2001;27(2):76–81.
222. Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J.* 2001;34(5):346–53.
223. Boutsoukis C, Lambrianidis T, Kastrinakis E. Irrigant flow within a prepared root canal using various flow rates: a computational fluid dynamics study. *Int Endod J.* 2009;42(2):144–55.
224. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod.* 2001;27(3):206–8.
225. Ruiz-Linares M, Aguado-Pérez B, Baca P, Arias-Moliz MT, Ferrer-Luque CM. Efficacy of antimicrobial solutions against polymicrobial root canal biofilm. *Int Endod J.* 2017;50(1):77–83.
226. Arias-Moliz MT, Ordinola-Zapata R, Baca P, Ruiz-Linares M, García García E, Hungaro Duarte MA, et al. Antimicrobial activity of chlorhexidine, peracetic acid and sodium hypochlorite/etidronate irrigant solutions against *Enterococcus faecalis* biofilms. *Int Endod J.* 2015;48(12):1188–93.
227. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MSZ, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. Confocal laser scanning microscopy. *Int Endod J.* 2014;47(11):1058–63.

228. Rôças IN, Siqueira Jr JF. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod.* 2011;37(2):143–50.
229. Ercan E, Özekinci T, Atakul F, Gül K. Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod.* 2004;30(2):84–7.
230. Mikić IM, Cigić L, Kero D, Govorko DK, Mehić GP, Simeon P. Antimicrobial effectiveness of polyhexamethylene biguanide on *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis* and *Candida albicans*. *Med Glas.* 2018;15(2).
231. Dammaschke T, Jung N, Harks I, Schafer E. The effect of different root canal medicaments on the elimination of *Enterococcus faecalis* ex vivo. *Eur J Dent.* 2013;7(04):442–8.
232. Zaugg LK, Zitzmann NU, Hauser-Gerspach I, Waltimo T, Weiger R, Krastl G. Antimicrobial activity of short-and medium-term applications of polyhexamethylene biguanide, chlorhexidine digluconate and calcium hydroxide in infected immature bovine teeth in vitro. *Dental Traumatology.* 2014;30(4):326–31.
233. Günther F, Blessing B, Dapunt U, Mischnik A, Mutters NT. Ability of chlorhexidine, octenidine, polyhexanide and chloroxylonol to inhibit metabolism of biofilm-forming clinical multidrug-resistant organisms. *J Infect Prev.* 2021;22(1):12–8.
234. Koburger T, Hübner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP–iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J Antimicrob Chemother.* 2010;65(8):1712–9.
235. Chandki R, Nikhil V, Kalyan SS. Comparative evaluation of substantivity of two biguanides-0.2% polyhexanide and 2% chlorhexidine on human dentin. *CDEJ.* 2020;23(1):46–50.

236. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.* 1998;24(7):472–6.
237. Vianna ME, Gomes BPFA. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod.* 2009;107(4):585–9.
238. Flach N, Böttcher DE, Parolo CCF, Firmino LB, Malt M, Lammers ML, et al. Confocal microscopy evaluation of the effect of irrigants on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. *Scanning.* 2016;38(1):57–62.
239. Özkan HB, Çobankara FK, Sayın Z, Özer F. Evaluation of the antibacterial effects of single and combined use of different irrigation solutions against intracanal *enterococcus faecalis*. *Acta Stomatol Croat.* 2020;54(3):250.
240. Xu C, Wang Y. Chemical composition and structure of peritubular and intertubular human dentine revisited. *Arch Oral Biol.* 2012;57(4):383–91.