

T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ



PROJE BAŞLIĞI
Farklı İrrigasyon Rejimlerinin Kök Kanallarındaki *E.Faecalis* Üzerine
Etkinliğinin Değerlendirilmesi

Proje No:TSD-12-4002

Proje Türü

Tıp Bilimleri

SONUÇ RAPORU

Proje Yürütücüsü:

Adı Soyadı
Birimi/Bölümü
Doç.Dr.Özgür ER
E.Ü.Diş Hekimliği Endodonti Bölümü

Araştırmacının Adı Soyadı
Birimi/Bölümü

Araş.Gör. Öznur Tuncay
E.Ü.Diş Hekimliği Endodonti Bölümü

Mayıs 2014

KAYSERİ

TEŞEKKÜR

Doç.Dr. Özgür ER başkanlığında yürütölmüş olan bu proje Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından TSD-12-4002 nolu proje adıyla desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ.....	3
2. MATERYAL VE METOD.....	5
3. SONUÇ.....	6
4. TARTIŞMA.....	6
5.KAYNAKLAR.....	8

ÖZET

Giriş: Endodontik tedavide en önemli sorunlardan biri enfekte kök kanalının tam sterilizasyonudur. Geleneksel yöntemler kök kanal sisteminin kompleks yapısından dolayı bazı vakalarda başarılı olamamaktadır. Bu çalışmanın amacı foto-aktif dezenfeksiyon (FotoSan; Biozonix Ozonytron XL, MIO international Ozonytron gmbh, Germany) ve gazöz ozonun (Biozonix Ozonytron XL, MIO international Ozonytron gmbh, Germany) *E.faecalis* biyofilmleri ile enfekte kök kanallarındaki etkinliğini değerlendirmektir.

Metod: 65 adet tek köklü insan mandibular premolar diş standart olarak hazırlandı ve *E.faecalis* ile enfekte edildi. Bir haftalık inkübasyon sonrası biyofilm oluşan kök kanalları rastgele 4 gruba (n=15) ayrıldı: G1 pozitif kontrol grubu (tedavi yok), G2 (negatif kontrol grubu) %2.5 NaOCl grubu, G3 gazöz ozon grubu, G4 LAD grubu. Dezenfeksiyon metodları sonrası üreyen *E.faecalis* miktarı koloni oluşum ünitelerinin (CFU) sayımı ile yapıldı. *E.faecalis* biyofilmindeki yapısal değişiklikler SEM analizi ile de görüntülendi.

Sonuç: pozitif kontrol grubu (G1) ile karşılaştırıldığında G3 ve G4'de CFU değerlerinde belirgin azalma gözlenmiştir ($p<0.05$). Negatif kontrol grubu (G2) en etkin sterilizasyonu sağlamıştır. G3 ve G4 arasında istatistiksel farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

Tartışma: Gazöz ozon ve LAD *E.faecalis* biyofilmleri üzerinde etkili bir dezenfeksiyon sağlamıştır.

Anahtar kelimeler: Enterococcus faecalis, ozon, foto-aktif dezenfeksiyon

ABSTRACT

Introduction: *Enterococcus faecalis* is a species commonly isolated from persistent root canal infections. The purpose of this study was to compare the antibacterial effects of gaseous ozone and light-activated disinfection (LAD) methods against *E. faecalis* biofilms.

Methods: Sixty-five human mandibular premolar teeth with straight canals were selected. After root canal preparation, samples were sterilized and were placed into eppendorf tubes with 1 mL brain heart infusion broth (BHI) containing 1.5×10^8 CFUs/mL of *E. faecalis*. After 7 days, the contaminated samples were divided into 4 groups (n=15) according to the disinfection method used: Group 1, saline (positive control group); Group 2, sodium hypochlorite (NaOCl) (negative control group); Group 3, gaseous ozone and Group 4, LAD. Five teeth were used to control the infection and sterilisation process. The colony-forming units (CFUs) were counted and analyzed statistically.

Results: There were statistically significant differences between experimental groups, negative control group and positive control group. The saline group had the highest number of remaining microorganisms. Complete sterilization was achieved in the 2.5% NaOCl group. The LAD and gaseous ozone did not completely sterilize the root canals but there were no statistically difference with NaOCl.

Conclusion: Both LAD and gaseous ozone have a significant antibacterial effect on infected root canals, with the LAD being more effective than the gaseous ozone. However, 2.5% NaOCl was superior in its antimicrobial abilities compared with other disinfection procedures.

Key words: *Enterococcus faecalis*, ozone, light-activated disinfection

1. Giriş

Endodontik tedavinin başarısı, kök kanal sisteminden mikroorganizmaların eliminasyonu ve yeniden enfeksiyon oluşmasının engellenmesine bağlıdır. Kök kanalından enflame ve nekrotik dokuyu, mikroorganizma ve biyofilmlerini ve diğer doku artıklarını temizlemek için sürekli irrigasyon altında el ve döner aletlerle şekillendirilme yapılmaktadır. Enstrumantasyonun asıl amacı; irrigasyonun, dezenfeksiyonun ve kök kanal dolgusunun etkinliğini artırmaktır. Bir çok çalışma göstermektedir ki; enstrumantasyonla kök kanal duvarının büyük bir kısmı dokunulmamış bir şekilde kalmaktadır [1]. Bu durum kök kanalının tüm bölgelerinde etkin bir kimyasal temizlik ve dezenfeksiyonun önemini ortaya koymaktadır. İdeal bir irrigant; yıkama etkisine sahip olmalı, lubrikant özelliği ile preperasyon esnasında alet kırılmasını engellemeli ve dentinin kaldırılmasını kolaylaştırmalı; inorganik dokuları çözebilmeli, kanal periferine penetre olabilmeli, organik yapıları çözebilmeli, bakteri ve mayaları öldürebilmeli, vital periapikal dokulara zarar vermemeli, diş yapısını zayıflatmamalıdır [2]. Hala endodontik kullanımda tek başına tüm bu özellikleri bulunduran bir irrigasyon solüsyonu bulunmamaktadır. Bu nedenle de etkinliğini artırmak için iki ya da daha fazla irrigant kombinasyonu bir arada kullanılmaktadır. Klinik çalışmalar ve araştırmalar göstermektedir ki; geleneksel olarak kullanılan irrigasyon rejimleri özellikle kanallar arası anastomozlarda, kanal uçlarında ve periapikal bölgede etkisiz kalmaktadır [2].

İrrigasyon; enstrumantasyon sırasında ve sonrasında mikroorganizmaların, doku artıklarının ve dentin kalıntılarının kanaldan çıkarılmasını kolaylaştırmaktadır. Ayrıca uygun bir irrigasyon yumuşak ve sert dokuların kök kanal apikalini tıkamasını ve enfekte materyalin periapikal dokuya taşmasını engellemektedir [2]. İrrigasyon solüsyonlarının bir kısmı organik dokuları bir kısmı da inorganik dokuları çözmektedir. Aynı zamanda antimikrobiyal etkiye sahip ve direk mikroorganizmalarla temasta, bakteri ve mayaları öldüren irrigantlar da bulunmaktadır. Bunun yanında sitotoksik etkiye sahip irrigantlar periapikal dokulara ulaştığında şiddetli ağrılara neden olabilirler [3].

Kök kanal irrigasyonunda geleneksel olarak en çok NaOCl kullanılmaktadır. NaOCl iyonları suda Na^+ ve OCl^- (hipoklorit) iyonlarına ayrılır. Antibakteriyel özelliği hipoklorit sağlamaktadır [4, 5]. NaOCl direk temasta düşük konsantrasyonlarda bile antimikrobiyal özelliğe sahiptir. NaOCl pH 11 'de etkinlik göstermektedir ve organik dokuları çözmektedir [6]. NaOCl nekrotik ve canlı organik dokuları çözen yegane irrigasyon preparatıdır [7] ve bu nedenle başarılı bir irrigasyon rejiminin temel ajanıdır. NaOCl'nin değişik konsantrasyonlarda

farklı mikroorganizmalara etkinliğini araştıran birçok çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmaların bir kısmı düşük konsantrasyonlarda bile hedef mikroorganizmaları 2 sn'de öldürdüğünü ortaya koyarken, bir kısmı da aynı türler için daha fazla süre gerektirdiğini iddia etmektedir [8-11]. Aynı zamanda yapılan çalışmalarda naocl'nin *e.faecalis*'e karşı etkili olduğu saptanmıştır [12, 13]. Naocl yüksek konsantrasyonlarda toksik ve periapikal dokuya irritandır [7, 14] ve özellikle edta ve sitrik asit kullanımı sonrası naocl ile irrigasyon dentin duvarlarında erozyona neden olmaktadır [14]. Ayrıca dentin elastisitesi ve dayanıklılığını kötü yönde etkilediğini gösteren çalışmalar da bulunmaktadır [15, 16]. Naocl'nin günümüze kadar birçok farklı kombinasyonu çalışmalarla değerlendirilmiştir ve araştırmalar naocl kadar etkin fakat onun olumsuz özelliklerini barındırmayan bir prptokol bulma yönünde ilerlemektedir.

Ozon doğada doğal olarak olusan ve üç oksijen atomu (o3) içeren bir bilestir. Strasforde gaz formunda 1-100 ppm konsantrasyonda bulunur ve devamlı olarak oksijen molekülünden oluşur ve oksijen molekülüne parçalanır [17]. Ozonun sağlam mikrobiyolojik ve metabolik özellikleri aköz ve gazöz fazda; ona geniş bir alanda kullanılan dezenfektan özelliği kazandırır [18-22]. Ozonun aköz ve gazöz fazda mantar, protozoa ve virüslere karşı etkili ve güvenli bir antimikrobiyal ajan olduğu çalışmalarla gösterilmiştir (30-31). Genel görüş, ozonun oksidant potansiyelinin bakteri ve mantarların stoplazma membranlarının ve hücre duvarlarının parçalanmasına neden olduğudur [23]. Ozonun yukarıda bahsedilen özellikleri endodontide de kullanımını güncel hale getirmiştir. Bazı otörler ozonun geleneksel kanal preperasyona ilaveten final dezendektan olarak kullanımının mükemmel sonuçlar verdiğini ileri sürmektedir [24, 25]. Cardoso ve ark. İnsan dişi kök kanallarında ozonlanmış su kullanımı sonrası *c.albicans* ve *e.faecalis* sayısında belirgin bir azalma bulmuşlardır [26]. Ozonun yeterli konsantrasyon, süre ve doğru yöntemle kullanıldığında çevre dokulara biyouyumlu bir ajan olarak mükemmel bir antimikrobiyal özellik göstermesi onu cazip hale getirmektedir. Yine kullanımına dair daha fazla araştırmaya ihtiyaç bulunmaktadır.

Pad(photo-activated disinfection) sistemi son zamanlarda kök kanallarında dezenfeksiyon için araştırılmakta olan bir sistemdir. Boyayı aktive eden düşük güçte bir ışık uygulamasıyla boyanın(genellikle toluidie mavisi) kök kanallarına uygulanmasıdır [27]. Sistemde fotosensitizer moleküller bakteri membranına tutunur ve ışık uygulaması ile serbest oksijen üretilerek bakteri hücre duvarında parçalanma ve ölüme neden olur [27]. Yapılan çalışmalarda

geleneksel irrigasyonla kalabilen bakterileri elimine etmede pad başarılı olmuştur [28]. Bu sistemin avantajı hasta için toksik olmaması ve kökü çevreleyen dokularda termal hasar oluşturmamasıdır [29]. Pad'ın kullanımına ilişkin daha fazla çalışmalara ihtiyaç vardır.

Kök kanal dezenfeksiyonunda kullanılan irrigasyon rejimleri adına yapılan çalışmalar dikkate alınarak; bu çalışma ile bahsedilen sistemlerin *e.faecalis* ve *c.albicans* üzerine etkinliğinin karşılaştırmalı değerlendirilmesi amaçlanmaktadır. Aynı zamanda kök kanal tedavisinde asıl başarı etkeni kök kanalı dentin tübülleriindeki mikroorganizmaların eliminasyonudur. Böylece bu konu adına yeni bir bakış açısı sunulmuştur.

2. Materyal ve metod

Çalışmada periodontal,protetik veya ortodontik nedenlerle çekilmiş olan(çekim sonrası en fazla 3 ay süre geçmiş) alt premolar dişler kullanıldı. Dişler kullanım zamanına kadar 4°C'de serum fizyolojikte ve deney aşamasında 30 dk. %5.25 naocl'de bekletildi. Dişler 15 mm boyunda olacak şekilde dekorone edildi. 50 no'ya kadar Resiproc döner alet ile mekanik preperasyon yapılacak ve apikal açıklık 15 no ile kontrol edildi. Her eye arasında kök kanalları 2 ml %2.5'lik NaOCl ile irriye edildi ve dezenfeksiyon prosedürlerine göre gruplara ayrıldı. Bütün grup dişleri 10 dk. %17 edta solüsyonunda bekletilip ardından serum fizyolojikle yıkandı,kurulandı. Preperasyonu biten örnekler ependorf tüplere yerleştirildi ve etilen oksit gazı ile steril edildi. Laminer hava kabininde örneklerin bulunduğu ependorf tüplerin içine 100 µl (1 ml) bhi besiyeri konuldu ve sterilizasyonu kontrol etmek için 37°C'de 24 sa inkübe edilen dişlerden kültür örneği alındı. Mikrobiyoloji ünitesinde üretimi yapılan *E.faecalis* suşları diş köklerine inoküle edildi. 1ml besiyeri alındı ve yerine 1 ml enfekte besiyeri konuldu. *E.faecalis* BHI'da 1,5x10⁸ cfu/ml (0.5 mcfarland) değerinde hesaplandı. Örnekler 7 gün 37°C'de 7 gün inkübe edildi. Her iki günde bir besiyeri bakteri canlılığını sağlamak için steril besiyeri ile değiştirildi. İnkübasyon sonrası, gruplardan 1 adet örnek alınarak *E.faecalis*'in üremesi kontrol edildi. Sonrasında irrigasyon yöntemlerine geçildi.

G1: Pozitif kontrol grubu; 5 ml steril %0.9'luk serum fizyolojik ile 2 dk dezenfeksiyon yapıldı.

G2: Negatif kontrol grubu;% ml %2.5 NaOCl ile 2 dk kanal içi irrigasyon yapıldı. Etkinliği durdurmak için kanal 5 ml serum fizyolojikle yıkandı.

G3: Ozon grubu 40 sn %100 yoğunlukta ozon gazı peristaltik hareketlerle kanal içine

uygulandı. Bu protokol 2 defa tekrarlandı ve toplam dezenfeksiyon süresi 2 dk'ya tamamlandı. Tekrar arasında etkinliği artırmak için kanala serum fizyolojikle yıkandı ve kurulandı sonrasında ozon uygulandı. Etkinliği durdurmak için kanallar 5 ml serumla yıkandı.

G4: LAD grubu; 2 dk. Fotosan cihazı ile dezenfeksiyon işlemi yapıldı. Fotosan medium ajanı kanala yerleştirildi, 90 sn beklendi arada bir kanal içi eye ile ajan irrite edildi, sonrasında 30 sn ışık uygulandı. Kanallar 5 ml serum fizyolojikle yıkandı.

Tüm dezenfeksiyon protokolleri tamamlandıktan sonra kanalların içine 40 numara paper point yerleştirildi, 1 dk kanal içinde bekletildi. Sonrasında paper pointler 0.5 ml BHI besiyeri bulunan ependorf tüplerine konuldu, 30 sn vortekslendi ve 0.1 ml'si bhi agar bulunan petri kaplarına ekim yapıldı. 24 sa 37 °c'de %100 nemli ortamda inkübe edildi ve koloni sayımı yapıldı.

3. Sonuçlar

7 günlük inkubasyon sonrası ulaşılan total CFU değeri 10^8 olarak kaydedilmiştir. SEM ile kök kanallarında *E.faecalis* varlığı doğrulanmıştır. NaOCl, ozon ve Lad kullanımı sonrası *E.faecalis* biyofilmleri ilimine eilebilmiştir.

Bütün tedavi grupları pozitif kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, azalmış *E. fecalis* CFU değeri ile sonuçlanmıştır ($p<0.05$). en etkili eliminasyona NaOCl ile ulaşılmıştır ($p<0.05$). NaOCl, ozon ve LAD arasındada istatistiksel farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$).

4. Tartışma

Bu çalışmada Haapasalo & Ørstavik (30) tarafından geliştirilen, *in vitro* enfekte dentin modeli modifiye edilerek kullanılmıştır. bu model kök kanal patları, medikamentler ve kanal içi dezenfeksiyon ajanlarının antibakteriyel etkinliklerinin değerlendirilmesinde kullanılmaktadır (31). Bu çalışmada sıvı ortamda insan dişinin mikroorganizmalarla inkübe edilmesini sağlayarak ağız içi ortamına benzer şekilde klinik koşulları talit etmeye yönelik çalışılmıştır.

Çalışmada kullanılan *E.faecalis* Gram pozitif-fakültatif bir mikroorganizmadır. genellikle doldurulmuş enfekte kök kanallarından izole edilen bir türdür (32). Sert doğasından

dolayı zor ve besinin yetersiz olduğu koşullarda tek kültür halinde yaşayabilir. Bu mikroorganizma tam enfeksiyona neden olduğundan deneysel çalışmalarda kullanım için ideal görünmektedir (33). NaOCl kök kanal enfeksiyonlarında dezenfeksiyon amacıyla en sık kullanılan irriganttır. *E.faecalis*'e karşı oldukça etkindir (30, 34). Bu çalışmada önceki çalışmalara benzer şekilde, negatif kontrol grubu olarak kullanılan %2.5 NaOCl 2 dak. kullanımda %100 bakteriyel eliminasyon sağlamıştır (35).

Ozonun antibakteriyel etkinliği, aköz solüsyonlarda oksidatif radikaller oluşturarak osmotik stabilite ve permeabilitenin etkilenmesiyle hücresel hasar oluşturmaya dayalıdır (36). Yine de güncel anlamda ozonun antibakteriyel etkinliğinde uygulama şekli, zamanı ve dozajı konusunda tam bir fikir birliğine ulaşılamamıştır. Case ve ark.(37) yaptıkları bir çalışmada 2 dk ozon uygulamasının %1 NaOCl uygulamasına nazaran etkili bir antibakteriyel etkinlik sağlamadığı sonucuna ulaşmışlardır. Başka bir çalışmada farklı zamanlarda ozon uygulamasının *E.faecalis*'e karşı etkinliğinin değerlendirilmesinde, sadece 240 sn uygulaması sonrası başarıya ulaşılmıştır (35). Üreyan ve ark'nın (38) çalışmasında ise gazöz ozon *E.faecalis*'e karşı %2.5 NaOCl'ye göre başarısız ama salin uygulamasına göre başarılı olmuştur (30).

Huth ve ark.'nın (39) çalışmasında ise ozonun yüksek doz 1dk uygulaması yada düşük doz > 2.5 dk uygulaması *E.faecalis*'e karşı tam eliminasyon sağlamıştır. bu çalışma ile benzer olarak bizim çalışmamızda da yüksek doz 2 dk ozon uygulaması NaOCl ile benzer sonuç sağlamıştır. çalışmamızdaki ozonun bu başarısı uygulama şekli, dozu ve süresinden kaynaklı olabilir.

LAD sistemi, fotosensitizer ajanın ışıkla aktive edilmesiyle oluşturulan oksijen radikallerinin mikroorganizmalar üzerinde hasar edici etkinlik göstermesi prensibi ile çalışmaktadır (40). Yapılan çalışmalarla minimum toksik etkisi olduğu kanıtlanmıştır (41). LAD'ın antibakteriyel etkinliği fotosensitizer ajanın konsantrasyonundan da etkilenmektedir. Sauza ve ark.'nın (42) çalışmasında *E.faecalis*'e karşı antibakteriyel özelliğin değerlendirilmesinde salin solüsyonunda 15 µg/ml TBO önemli derecede etkin bulunmuştur. Bizim çalışmamızda da kullanılan FotoSan cihazında kullanılan 100 µg/ml konsantrasyonundaki TBO %2.5 NaOCl ile aynı derecede antibakteriyel etkinlik sağlamıştır.

Bu alışma ile proje başlangıcında hedeflenen amaçlara ulaşılmış ve NaOCl'ye alternatif olarak kullanımı hedeflenen yeni dezenfeksiyon metodu olarak ozon ve LAD kullanımının E.faecalis'e karşı oldukça etkin oldukları saptanmış ve klinik kullanım için önemli mit verici sonuçlar elde edilmiştir.

5. Kaynaklar

1. 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):221-230.
2. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291-312.
3. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation--literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000 May;33(3):186-193.
4. Barrette WC Jr, Hannum DM, Wheeler WD, Hurst JK. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry.* 1989;28(23):9172-9178.
5. McKenna SM, Davies KJ. The inhibition of bacterial growth by hypochlorous acid. Possible role in the bactericidal activity of phagocytes. *Biochem J.* 1988 Sep 15;254(3):685-692.
6. Zehnder M1, Kosicki D, Luder H, Sener B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):756-762.
7. 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):856-871.
8. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001;34(6):424-428.
9. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004;37(7):438-446.
10. Vianna ME1, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.

11. Waltimo TM, Orstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J*. 1999 Nov;32(6):421-9.
12. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation techniques and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod* 2002;28(3):181-184.
13. Clegg MS, Vertucci FJ, Walker C, Belanger M, Britto LR. The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *J Endod*. 2006;32(5):434-7.
14. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J*. 2002;35(11):934-9.
15. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int Endod J*. 2001;34(2):120-32.
16. Marending M, Luder HU, Brunner TJ, Knecht S, Stark WJ, Zehnder M. Effect of sodium hypochlorite on human root dentine--mechanical, chemical and structural evaluation. *Int Endod J*. 2007;40(10):786-93.
17. Russell AD. Activity of biocides against mycobacteria. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*. 1996;25:87-101.
18. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: A systematic review of literature. *J Dent* 2008;36: 104-116.
19. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(4):240-246.
20. Nagayoshi M, Kitamura C, Fukuizumi T, Nishihara T, Terashita M. Antimicrobial effect of ozonated water on bacteria invading dentinal tubules. *J Endod*. 2004;30(11):778-781.
21. Ebensberger U, Pohl Y, Filippi A. PCNA-expression of cementoblasts and fibroblasts on the root surface after extraoral rinsing for decontamination. *Dent Traumatol*. 2002;18(5):262-266.
22. Pohanish RP, Sittig's handbook of toxic and hazardous chemicals and carcinogens. 2nd ed. Park ridge. Nj: noyes data corporation, 1985.

23. Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent*. 2006;19(1):67-72.
24. Grootveld M, Silwood CJ, Lynch E. High resolution ¹H NMR investigations of the oxidative consumption of salivary biomolecules by ozone: relevance to the therapeutic applications of this agent in clinical dentistry. *Biofactors* 2006;27(1-4):5-18.
25. Lynch E. Evidence-based efficacy of ozone for root canal irrigation. *J Esthet Restor Dent* 2008;20(5):287-93.
26. Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, and endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(3):85-91.
27. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The effect of variable energy input from a novel light source on the photoactivated bactericidal action of toluidine blue O on *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, 2003. 37: p. 190–193.
28. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ, Wilson M. The photo-activated antibacterial action of toluidine blue O in a collagen matrix and in carious dentine. *Caries Res*. 2004;38(6):530-6.
29. Williams JA, Pearson GJ, Colles MJ. Antibacterial action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *J Dent*. 2006;34(6):363-371.
30. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66: 1375-9.
31. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease? *Photochem Photobiol Sci*. 2004;2:436–50.
32. Love RM. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001;34:399-405.
33. Konopka K, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res*. 2007;86:694–707.
34. Kömerik N, Curnow A, MacRobert AJ, et al. Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa. *Lasers Med Sci*. 2002;17:86–92.

35. Özcan E, Eldeniz AU, Ari H. Bacterial killing by several root filling materials and methods in an ex vivo infected root canal model. *Int Endod J* 2011;44:1102–9.
36. Braslavsky SE, Rubin MB. The history of ozone. Part VIII. Photochemical formation of ozone. *Photochem Photobiol Sci* 2011;10:1515–20.
37. Case PD, Bird PS, Kahler WA, George R, Walsh LJ. Treatment of Root Canal Biofilms of *Enterococcus faecalis* with Ozone Gas and Passive Ultrasound Activation. *J Endod* 2012;38:523–6.
38. Üreyen Kaya B, Kececi AD, GÜltaş HE, et al. Efficacy of endodontic application of ozone and low-temperature atmospheric pressure plasma on root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Lett Appl Microbiol* 2014; 58:8-15.
39. Huth KC, Quirling M, Maier S. Effectiveness of ozone against endodontopathogenic microorganisms in a root canal biofilm model. *Int Endod J* 2009;42:3-13.
40. George S, Kishen A. Augmenting the antibiofilm efficacy of advanced noninvasive light activated disinfection with emulsified oxidizer and oxygen carrier. *J Endod* 2008;34:1119–23.
41. Gambarini G, Plotino G, Grande N.M, et al. In vitro evaluation of the cytotoxicity of FotoSan™ light-activated disinfection on human fibroblasts. *Med Sci Monit* 2011;17:21–5.
42. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, 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;36:292–6.

