

**UNIVERZITET U BEOGRADU**  
**STOMATOLOŠKI FAKULTET**

**Jelena M. Marinković**

**Dejstvo etarskih ulja na bakterije inficiranog  
korenskog kanala mladih stalnih zuba**

**doktorska disertacija**

**Beograd, 2021**

**BELGRADE UNIVERSITY**  
**SCHOOL OF DENTAL MEDICINE**

**Jelena M. Marinković**

**The potential of essential oils towards bacteria from  
infected root canals of young permanent teeth**

**Doctoral Dissertation**

**Belgrade, 2021**

---

Dr Dejan Marković, redovni profesor, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, mentor

---

Dr Ana Ćirić, viši naučni saradnik, Instituta za biološka istraživanja „Siniša Stanković“- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, mentor

---

Dr Tamara Perić, vanredni profesor, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, predsednik komisije

---

Dr Milena Radunović, docent, Stomatološkog fakulteta u Beogradu, Univerziteta u Beogradu, član komisije

---

Dr Tatjana Marković, naučni savetnik, Instituta za lekovito bilje „Dr Josif Pančić“ Beograd, član komisije

---

Dr Biljana Nikolić, vanredni profesor, Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, član komisije

---

Dr Jelena Filipović Tričković, naučni saradnik, Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ - Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu, član komisije

Datum odbrane

## ZAHVALNICA

### *Mom mentoru Dejanu*

Kada sam upisala prvu godinu doktorskih studija jedan od naših profesora je rekao: „mentor je onaj koji te uzme za ruku i vodi te kroz proces doktorskog rada”. U tom trenutku nisam mogla da sagledam ni deo značaja te rečenice. Sada kada se osvrnem na godine koje su prošle i Vašu ulogu u procesu izvođenja disertacije ona je bila toliko važna i velika da je izrazito emotivno obojena, a teško je verbalizovati. U ovoj zahvalnici ja ću to pokušati, ali nisam sigurna koliko ću biti uspešna; Hvala što ste bili uz mene svakog dana i svakog trenutka. Neizmerno Vam hvala što ste imali razumevanja za moje dileme i rešenje za svaki moj problem. Hvala na strpljenju, hvala na idealnom usmeravanju; znam da Vam nekada nije bilo lako i u tome i sagledavam Vašu veličinu. Bili ste i dalje ste, izuzetno važan deo mog života; imajući roditeljsko – zaštitničku ulogu u njemu. Obožavam Vas i divim Vam se. Možda ja i nisam bila najbolji kandidat, ipak nas je bilo mnogo, ali je meni ste sigurno bili najbolji mentor. Bila mi je čast i zadovoljstvo!

### *Mom mentoru Ani*

Hvala za strpljenje i za podršku. Hvala za savete i usmeravanja. Hvala za otvorena vrata sveta mikrobiologije koji se ispostavio kao jako interesantan.

### *Tanji Marković*

Hvala što ste bili uz mene svakog dana od prvog dana, kao „treći” mentor. Hvala za mnoge reči podrške. Hvala za svaki savet. Nikad neću zaboraviti kako smo pisale i naš prvi rad za Lekovite sirovine, ni SS rad. Nikad neću zaboraviti ni pozdravnu rečenicu kad sam se 2018. ponovo vratila u svet nauke. I hvala što ste vi Markovići umešali prste u to pa sam imala gde da se vratim (Hvala za Vinču)!

### *Biljani Nikolić*

Za kratko vreme ste zauzeli važno mesto u mom (istraživačkom) životu. Nemam razloga da krijem da se divim takvom spoju nauke i umetnosti koji sam kod Vas prepoznala. Hvala što ste mi objasnili suštinu. Hvala što ste satima sedeli sa mnom i učili me. I hvala što ste u pravim trenucima izgovorili prave reči.

*Dragani Mitić –Ćulafić*

Hvala što ste mi otvorili vrata laboratorije. Hvala na iskrenom i prijateljskom prijemu, savetu, vođenju i usmeravanju. Hvala što sam se sa Vama osećala kao da sam deo ekipe, a nikad kao gost.

*Stefani Đukanović i Stefani Cvetković*

Drage moje Stefane, hvala vam obema za divno vreme provedeno u vašem društvu. Stefana Đ, bila si odlična učiteljica, bilo je tako zabavno raditi biofilme sa tobom. Čak i u vreme kada nam nije sve išlo od ruke. Stefana C. hvala ti za svu nesebičnu pomoć i za tvoje vešto formatiranje slika.

*Gvozdena Tasiću*

Hvala za savete, za razumevanje, za podršku. Hvala što si omogućio da neometano realizujem sve i hvala što si se upustio u nastavak.

*Snežani Brkić*

Hvala na prijateljskoj pomoći u razrešenju mikrobioloških dilema.

*Mileni Radunović*

Hvala za prijateljsku i stručnu pomoć oko metodoloških dilema. Hvala za upoznavanje sa svetom anaeroba.

*Marini Kostić*

Hvala za pomoć u prvim danima u mikrobiološkoj laboratoriji.

*Marini Soković*

Hvala na prijemu u laboratoriju.

*Snežani Pašalić*

Hvala za mnogo toga, za Vinču, za savete, za podršku, za usmeravanje i sigurnost. Hvala ti što si bila tu i što si još uvek tu. Tvoje prisustvo za mene ima veliki značaj.

*Dunji Bakić*

Hvala što je tvoja kreativnost obogatila tezu.

*Vukomanu Jokanoviću*

Hvala za prijem na projekat *Hemijsko i strukturno dizajniranje nanomaterijala za primenu u medicine i inženjerstvu tkiva*.

*Kolegicama iz kancelarije*

Hvala Bojani, Milici i Jadranki koje su me iz dana u dan podržavale i sa mnom prošle kroz turbulentne dane izvođenja eksperimenata.

*Hvala kolegama iz Laba 0.50*, koji su, svako na svoj način, ulepšali moje dane u izvođenju studije.

Posebno se zahvaljujem svojoj ćerki koja je zajedno sa mnom jednog toplog leta 2017-te učestvovala u eksperimentima i nije se mnogo bunila.

A od svih najviše hvala *Tebi moj mužu*

*Ničega ne bi bilo bez Tebe, a i čak da se realizovalo, ne bi ni upola imalo ovakav značaj. Volim te*

## Dejstvo etarskih ulja na bakterije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba

### Sažetak

Teza istražuje potencijal odabranih etarskih ulja prema izolatima iz inficiranih korenskih kanala. Po prvi put daje uvid u mikrobiom mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom i ističe prisustvo fakultativnih (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*) i striktnih anaeroba (*Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*). Prikazuje hemijski sastav ulja: *Cinnamomum camphora cineoliferum*, *Melaleuca ericifolia*, *Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum petersonii*, *Thymus zygis* i vrsti *Pelargonium* i *Cymbopogon* (*P. roseum*, *P. graveolens*, *C. citratus* i *C. martinii*). Istraživanje antibakterijskog efekta prema referentnim i kliničkim sojevima pokazalo je manju osetljivost izolata i dalo poredak ulja po efikasnosti: *T. zygis* > *C. martinii* > *C. citratus* > *L. petersonii* > *P. graveolens* > *P. roseum* > *E. citriodora* > *M. ericifolia* > *C. camphora cineoliferum*. Ulja *P. graveolens*, *L. petersonii* i *C. citratus* inhibirala su samo inicijalnu fazu formiranja biofilмова, dok je efekat ulja *C. martinii* i *T. zygis* bio inhibitoran i na biofilmove u nastajanju i na one preformirane. Napravljen je novi način njihove isporuke u vodenoj fazi u formi nano- (*C. martinii*), odnosno mikroemulzija (*T. zygis*). Antibiofilmni efekat emulzija, ispitan na eksperimentalno inficiranim kanalima ekstrahovanih zuba, bio je obećavajući i u slučaju samostalne primene, ali i u finalnoj irigaciji. Rezultate je potvrdila SEM mikroskopija. Inicijalna procena bezbednosti primene, kroz testove citotoksičnosti na MRC-5 ćelijama, pokazala je da je, u ostvarenim eksperimentalnim uslovima, citotoksičnost analiziranih ulja i triantibiotske paste bila uporediva. Rezultati ohrabruju dalja istraživanja u cilju praktične primene ulja i njihovih emulzija u terapiji infekcija pulpnog prostora mladih stalnih zuba.

Ključne reči: apikalni periodontitis, mladi stalni zubi, bakterije, *Enterococcus*, etarska ulja, emulzije, hemijski sastav, antibakterijska aktivnost, antibiofilmna aktivnost, citotoksičnost

Naučna oblast: Stomatologija

Uža naučna oblast: Oralna mikrobiologija

# The potential of essential oils towards bacteria from infected root canals of young permanent teeth

## Abstract

The thesis investigates the potential of selected essential oils towards isolates from infected root canals. For the first time, it provides insight into the microbiota of young permanent teeth with apical periodontitis and emphasizes the presence of facultative (*Streptococcus*, *Actinomyces*, *Enterococcus*) and strict anaerobes (*Veillonella*, *Prevotella*, *Fusobacterium*). It shows the chemical composition of the essential oils of *Cinnamomum camphora cineoliferum*, *Melaleuca ericifolia*, *Eucalyptus citriodora*, *Leptospermum petersonii*, *Thymus zygis* and from the species *Pelargonium* and *Cymbopogon* (*P. roseum*, *P. graveolens*, *C. citratus* and *C. martinii*). Investigation of the antibacterial effect towards reference and clinical strains suggested following order of efficiency: *T. zygis* > *C. martinii* > *C. citratus* > *L. petersonii* > *P. graveolens* > *P. roseum* > *E. citriodora* > *M. ericifolia* > *C. camphora cineoliferum*. The essential oils of *P. graveolens*, *L. petersonii* and *C. citratus* inhibited only the initial phase of biofilm formation, while the ones of *C. martinii* and *T. zygis* inhibited both emerging and preformed biofilms. A new way of the delivery of *C. martinii* and *T. zygis* essential oils, in the form of nano- and microemulsion, respectively, was made. The antibiofilm effect of emulsions, tested on experimentally infected canals of extracted teeth, was promising during singular application, but also in the final irrigation. The results were confirmed by SEM microscopy. Cytotoxicity tests on MRC-5 cells showed that toxicity of the analyzed oils and triple antibiotic paste, used as control, was comparable. Results encourage further research for the practical application of the oils and emulsions in the treatment of infected root canals of young permanent teeth with apical periodontitis.

Key words: apical periodontitis, young permanent teeth, bacteria, *Enterococcus*, essential oils, emulsions, chemical composition, antibacterial activity, antibiofilm activity, cytotoxicity

Scientific field: Dentistry

Specific scientific field: Oral Microbiology



<b>UVOD.....</b>	<b>3</b>
<i>Opšti pojmovi o inficiranoj pulpi, inficiranim korenskim kanalima i apikalnom periodontitisu.....</i>	<i>3</i>
<i>Klasifikacije apikalnih periodontitisa .....</i>	<i>7</i>
<i>Bakterije izolovane iz inficiranih kanala sa apikalnim periodontitisom.....</i>	<i>8</i>
<i>Bakterije i biofilm.....</i>	<i>10</i>
<i>Mladi stalni zubi i specifičnosti lečenja infekcija ovih zuba .....</i>	<i>11</i>
<i>Bakterije koje mogu da prežive standardni endodontski tretman .....</i>	<i>14</i>
<i>Etarska ulja.....</i>	<i>17</i>
<i>Hemijske karakteristike etarskih ulja .....</i>	<i>23</i>
<i>Uloga etarskih ulja u stomatologiji.....</i>	<i>24</i>
<b>CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....</b>	<b>25</b>
<b>MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>26</b>
MATERIJAL.....	26
METODE .....	28
<i>Odabir inficiranih korenskih kanala .....</i>	<i>28</i>
<i>Prikupljanje uzoraka iz korenskih kanala i identifikacija kultivabilnih izolata.....</i>	<i>29</i>
<i>Hemijska karakterizacija ulja.....</i>	<i>29</i>
<i>Ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja.....</i>	<i>30</i>
Priprema bakterijske suspenzije.....	30
Mikrodiluciona metoda - metoda za ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja na slobodno živeće (planktonske) ćelije .....	30
<i>Ispitivanje delovanja etarskih ulja na bakterijske biofilmove .....</i>	<i>31</i>
Ispitivanje dejstva etarskih ulja na jednospecijske biofilmove.....	31
Ispitivanje dejstva etarskih ulja na multispecijski biofilm.....	32
<i>Formulisanje iriganasa na bazi etarskih ulja, njihova karakterizacija i procena njihovog antibiofilmnog efekta na biofilm korenskih kanala .....</i>	<i>32</i>
Formiranje biofilmova u korenskim kanalima.....	33
<i>In situ</i> irigacija i kvantifikacija broja preživelih bakterijskih ćelija.....	34
<i>Skenirajuća Elektronska Mikroskopija (SEM) multispecijskih biofilmova u korenskim kanalima koji su tretirani irigansima na bazi etarskih ulja .....</i>	<i>34</i>
<i>Ispitivanje citotoksične aktivnosti etarskih ulja.....</i>	<i>35</i>
<b>REZULTATI I DISKUSIJA .....</b>	<b>36</b>
<i>Izolacija i identifikacija mikroorganizama poreklom iz inficiranog korenskog kanala i njihova kvantifikacija radi određivanja predominantnih vrsta.....</i>	<i>36</i>
<i>Odabir etarskih ulja na osnovu dostupnih podataka iz literature.....</i>	<i>40</i>
<i>Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) etarskih ulja na predominantnim bakterijskim izolatima i ATCC sojevima.....</i>	<i>50</i>
<i>Ispitivanje efekata etarskih ulja na biofilm .....</i>	<i>58</i>
<i>Irigansi zasnovani na etarskim uljima i njihova antibiofilмна aktivnost .....</i>	<i>64</i>

<i>Ispitivanje razlika u osetljivosti između kliničkih bakterijskih izolata i referentnih sojeva (ATCC kolekcije) na delovanje etarskih ulja</i> .....	69
<i>Ispitivanje citotoksičnosti etarskih ulja, natrijum-hipohlorita i triantibiotske paste</i> .....	73
<i>Definisanje potencijalnih etarskih ulja ili njihovih aktivnih komponenti za dalja predklinička i klinička ispitivanja u cilju unapređenja efikasnosti endodontske terapije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba</i> .....	76
<b>ZAKLJUČAK</b> .....	<b>77</b>
<b>LITERATURA</b> .....	<b>79</b>

*U dugogodišnjem sukobu mikroorganizama i tehnologije, mikroorganizmi će pobediti*

*(preuzeto od Alberta Ajnštajna)*



## Lista skraćenica

ATCC bakterijska kolekcija - Američki tip kolekcije referentnih sojeva (eng. *American Type Culture Collection*)

DMEM - Dulbekov Modifikovani „Eagle“ Medijum

DMSO - dimetil sulfoksid

EF - *Enterococcus faecalis*,

EFAT19 - *Enterococcus faecalis* ATCC 19433

EFAT29 - *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

FID - plameno jonizujući detektor

Fu.NuAT - *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586

GC - gasna hromatografija

Gram (-) - Gram negativne bakterije

Gram (+) - Gram pozitivne bakterije

MALDI-TOF-Masena spektrometrija sa matricom potpomognutom laserskom desorpcijom/ionizacijom i analizatorom na bazi vremena preleta (eng. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight Mass Spectrometry*)

MBK - minimalna baktericidna koncentracija

MIK - minimalna inhibitorna koncentracija

MRC-5 - ćelijska linija fetalnih fibroblasta pluća čoveka

MS - masena spektrometrija

MTA - mineralni trioksidni agregat

MTT – 3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5)-difenil-tetrazolijum-bromid

NaOCl – natrijum-hipohlorit

NOA - nativna ulja Australije

Pr.Bu - *Prevotella buccae*

Pr.De - *Prevotella denticola*

Pr.Or - *Prevotella oralis*

RI - retencioni indeks

SEM - Skenirajuća elektronska mikroskopija

SIAT - *Streptococcus salivarius* ATCC 9222

SnAT - *Streptococcus sanguinis* ATCC 10556

StAn - *Streptococcus anginosus*

StGo - *Streptococcus gordonii*

StM - *Streptococcus mitis*/*Streptococcus oralis*

StPn - *Streptococcus parasanguinis*

StSl - izolati vrste *S. salivarius*

StSn - izolati vrste *S. sanguinis*

TAP - triantibiotska pasta

Tween 20/80 - polioksietilen (20/80) sorbitan monolaurat

Ve.PaAT - *Veillonella parvula* ATCC 10790

## UVOD

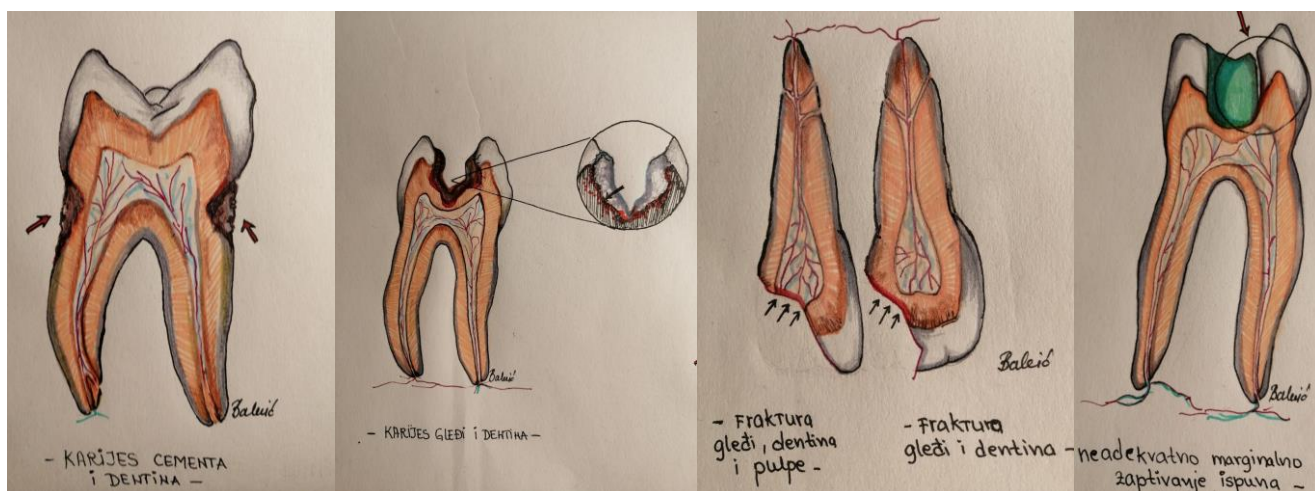
Prvi koraci u spoznaji infekcije prisutne u prostoru u kome se nalazi zubna pulpa počeli su još davne 1683. godine, kada je Entoni van Levenhuk, posmatrao materijal iz šupljine korenskog kanala. On je na mikroskopu kućne izrade primetio žive strukture, ne znajući tada da je reč o mikroorganizmima. Samo dve stotine godina nakon toga infekcija u prostoru zubne pulpe postaje prepoznata kao najčešća infekcija koja se javlja u ljudskom organizmu (Svensäter i sar., 2011). Iako prvi koraci u razumevanju mikrobiologije odgovorne za endodontsku patologiju, kao i značaj ove patologije, datiraju još od tada, ovaj proces je vrlo dinamičan i još uvek traje. U nadi da će celokupnom naučnom znanju doprineti istraživanja i saznanja prezentovana u ovoj tezi, naredne stranice biće posvećene upravo mikrobiologiji inficiranog pulpnog prostora.

### *Opšti pojmovi o inficiranoj pulpi, inficiranim korenskim kanalima i apikalnom periodontitisu*

Zubna pulpa je vaskularizovano i inervisano vezivno tkivo zuba. Ona je smeštena u prostoru koji se naziva kavum pulpe. Poznato je da je ovaj prostor sterilan i okružen tvrdim zubnim tkivima kao što su dentin, gleđ i cement. Dentin je prvo čvrsto tkivo koje okružuje zubnu pulpu i u kruničnom i u korenskom delu. Gleđ i cement su spoljna tkiva koja okružuju dentin; gleđ okružuje dentin u kruničnom delu zuba, dok cement to čini u korenskom delu zuba (Živković i sar., 2009). Na ovaj način, gleđ i cement se mogu smatrati svojevrsnom zaštitom tkivima ispod. S tim u vezi, postavlja se pitanje odakle mikroorganizmi i kako dospevaju u ovaj sterilni prostor pulpe? Ispitivanja ove problematike od strane mnogih autora (Dahlen & Moller, 1991, Bammann & Estrela, 2009, Narayanan & Vaishnavi, 2010, Gomes & Herrera, 2018) dala su sledeće zaključke:

- Mikroorganizmi u pulpu dospevaju iz usne duplje, gde su deo normalne mikrobiote.
- Mikroorganizmi u pulpu dospevaju najčešće kroz dentinske kanaliće.
- Mikroorganizmi u pulpu mogu dospeti i direktnim prodorom u nju.

Kako usna duplja predstavlja nesterilnu sredinu, koja broji oko 700 različitih vrsta mikroorganizama (Zijngel et al., 2010), jasno je da komunikacija između kavuma pulpe i usne duplje može dovesti do posledične kontaminacije prostora u kome je pulpa. Najčešći put nastanka ove komunikacije je kroz kompromitovanje integriteta gleđi ili cementa i invaziju dentinskih kanalića od strane mikroorganizama. Dentinski kanalići su tubularne formacije koje na jednom kraju komuniciraju sa čvrstim tkivima iznad (gleđi i cementom), a sa druge strane sa sadržajem komore pulpe. Jednom kada dospeju u dentinske kanaliće, mikroorganizmi napreduju kroz iste iz pravca gleđi i cementa prema pulpi. Do ovoga najčešće dolazi usled karijesa ili povreda zuba. Karijes, koji može po svojoj lokaciji biti karijes gleđi, karijes gleđi i dentina, karijes cementa ili karijes cementa i dentina, uvek uslovljava prodor mikroorganizama u pulpu kroz dentinske kanaliće. Na isti način se ostvaruje prodor mikroorganizama u pulpu i kod povreda zuba, kod kojih postoji linija loma u dentinu. Naime, linija loma može biti takva da učini pulpu direktno eksponiranu usnoj duplji, usled čega mikroorganizmi dospevaju pravo u nju. Pored već opisanog, infekcija pulpnog prostora može biti i vezana za sam proces lečenja infekcije zuba i nastati kao kontaminacija u toku ili nakon završenog lečenja, kao posledica neadekvatnog zaptivanja definitivnog ispuna (**Slika 1**), (Narayanan & Vaishnavi 2010, Svensäter i sar., 2011, Gomes & Herrera, 2018).



**Slika 1.** Putevi prodora mikroorganizama kroz dentin ili direktno u prostor u kome se nalazi zubna pulpa (Marinković J).

Kada prvi put mikroorganizmi iz spoljašnje sredine, kroz dentinske kanaliće ili direktno, dospeju u koronarni deo kavuma pulpe, oni će izazivati infekciju pulpnog prostora koja će napredovati kroz korenski kanal/ korenske kanale (endodontska infekcija). Istovremeno sa ovim prodorom, počinju prve reakcije u pulpi kao odgovor na faktore virulencije mikroorganizama (Narayanan & Vaishnavi 2010, Gomes & Herrera, 2018). Kako su najčešći izazivači infekcije kavuma pulpe bakterije, one će predstavljati predmet istraživanja ove doktorske teze. Faktori virulencije bakterija razlikuju se u zavisnosti da li je reč o Gram pozitivnim - Gram (+), ili Gram negativnim - Gram (-) bakterijama. Podela na Gram (+) i Gram (-) bakterije načinjena je na osnovu razlike u njihovom bojenju (bojenje po Gramu), koja se uočava pod mikroskopom, a posledica je razlike u građi ćelijskog zida bakterija. Faktori virulencije se mogu podeliti na one koji su integralni deo bakterijske ćelije ili one koji predstavljaju produkt bakterijske ćelije (Narayanan & Vaishnavi 2010):

Faktorima virulencije koji su deo bakterijske ćelije pripadaju:

- (1) Lipopolisaharid koji je deo zida Gram (-) bakterija;
- (2) Peptidoglikan i lipotejhojna kiselina koji su komponente ćelijskog zida Gram (+) bakterija;
- (3) Fimbrije (pile) tj. dugi filamentozni makromolekuli koji se nalaze na površini velikog broja Gram (-) bakterija;
- (4) Kapsula tj. dobro organizovani spoljašnji sloj ćelijskog zida bakterija, od polisaharida ili drugih materijala.

Faktorima virulencije koji su produkt bakterijskih ćelija pripadaju:

- (5) Egzotoksini;
- (6) Ekstraćelijski proteini, poput ekstracelularnih enzima;
- (7) Zasićene masne kiseline;
- (8) Superoksidni anjon.

Zubna pulpa zbog svoje dobre vaskularizacije i inervacije proizvodi imunološki odgovor, kao reakciju na opisane faktore virulencije bakterija. Ovaj odgovor podrazumeva aktivaciju makrofaga, T



limfocita, sistema komplementa i drugo. Međutim, ovaj odgovor pulpe, iako snažan, nije dovoljan da eliminiše bakterije ni iz dentina, a ni kasnije iz pulpe. To je prvenstveno posledica činjenice da imunološke ćelije i molekuli stvoreni u vezivnom tkivu pulpe ne mogu efikasno da uđu u dentin. Pored toga, potencijal ovog odgovora je i dodatno ograničen činjenicom da je tkivo zubne pulpe u komunikaciji sa periodoncijumom i sa ostatkom tela samo kroz apikalni otvor, apikalne delte i dodatne kanale, tako da je iz tog razloga pulpa organ bez kolateralne cirkulacije. Zato, kada se ovaj odbrambeni odgovor pulpe iscrpi, pulpa prelazi iz reverzibilne upalne reakcije u ireverzibilnu, stvaraju se gnojne kolekcije i nekrotična područja, da bi na kraju došlo do njene potpune nekroze i infekcije (Narayanan & Vaishnavi 2010, Gomes & Herrera, 2018). Kao odgovor na ovu slabost pulpe, mikroorganizmi u prostoru pulpe se umnožavaju, a pravac njihovog širenja će biti prvo u sve delove kanala, a kasnije i van njega. Infekcija korenskih kanala može biti prepoznata ranije, dok nije došlo do njenog širenja van korenskog kanala (intrakanalna/ intraradikalna) ili kasnije, kada je prisutna van korenskih kanala (ekstraradikalna/ ekstrakanalna), (Narayanan & Vaishnavi 2010).

Ekstraradikalno širenje infekcije poznato je kao apikalni periodontitis. Ovakvo širenje infekcije može biti dramatično, sa burnom kliničkom slikom, označeno kao simptomatski apikalni periodontitis, ili će simptomi izostati (asimptomatski apikalni periodontitis). Ovo zavisi od prisutnih bakterija u kavumu pulpe, ali i imunološkog odgovora samog pacijenta (Metzger i sar., 2011, Živković i sar., 2017).

Simptomatski apikalni periodontitis karakterišu burni klinički simptomi, kao što su bol pri zagrižaju, osetljivost na kuckanje, osetljivost na dodir iznad vrha korena i otok. Ovi simptomi su znak širenja infekcije sledećim redom (Metzger i sar., 2011, Živković i sar., 2017):

- (1) u prvoj fazi infekcija se nalazi u periodontalnom tkivu i nju odlikuje bol pri zagrižaju, osetljivost na kuckanje i osetljivost na dodir iznad vrha korena (intraparodontalna faza infekcije),
- (2) potom se infekcija širi u kost i odlikuje je pojačavanje bola (enosealna faza),
- (3) potom infekcija dospeva ispod periosta u kojoj kulminira bol (subperiostalna faza),
- (4) da bi se na kraju infekcija proširila u meka tkiva, kada prestaje bol, a u kliničkoj slici dominira otok (submikozna faza, **Slika 2**).



**Slika 2.** Infekcija iz korenskog kanala se proširila u okolna meka tkiva, usled čega je dominantan klinički simptom otok mekog tkiva (Marinković J).

Premda je ova forma klinički dramatična, ona je nešto ređa. Češća je asimptomatska forma apikalnih periodontitisa, kod koje se dijagnoza apikalnog periodontitisa postavlja kao slučajni nalaz na rendgen snimku. Dominantan znak je resorpcija kosti (**Slika 3**), koja je direktna posledica toga da ćelije zapaljenske reakcije (makrofagi i T limfociti), oslobađajući svoje medijatore zapaljenja (citokine), uslovljavaju aktivaciju osteoklasta- ćelija odgovornih za resorpciju kosti (Metzger i sar., 2011).



**Slika 3.** Resorpcija kosti, vidljiva iznad premolara, nastala je kao posledica proširene infekcije i aktivacije osteoklasta (Marinković J).

Za kliničare nije iznenađenje da ove dve faze mogu ići uporedo, pa tako asimptomatska forma može dobiti i kliničke manifestacije i preći u simptomatsku formu (Metzger i sar., 2011). Ovo je obično uslovljeno ili promenom odbrambenog statusa pacijenta, ili promenom virulencije mikroorganizama (Metzger i sar., 2011).

Opšti medicinski klinički značaj pomenutih infekcija leži u širenju ove infekcije prema vitalnim organima. Pa tako, kada je pravac širenja infekcije usmeren prema gornjim respiratornim putevima, orbiti, vratu ili mozgu, dolazi do životno ugrožavajućih stanja. Ništa manje zabrinjavajuća stanja nisu ni ona kod kojih se bakterije i njihovi produkti šire krvnim sudovima i mogu da dovedu do promena na srčanim zaliscima i miokardu (Skaug & Bakken, 2011). Sve pomenuto, bezuslovno sugeriše značaj kontrole i eliminacije opisanih infekcija.

U cilju boljeg razumevanja apikalnih periodontitisa, naredni odeljak biće posvećen njihovoj klasifikaciji.

### *Klasifikacije apikalnih periodontitisa*

Najčešće klasifikacije apikalnih periodontitisa (Narayanan & Vaishnavi 2010, Metzger i sar., 2011, Živković i sar., 2017, Gomes & Herrera, 2018) načinjene su na osnovu:

- (1) vremena bakterijske kolonizacije,
- (2) prisutne ili odsutne prateće kliničke slike.

Podela apikalnih periodontitisa u odnosu na vreme bakterijske kolonizacije razlikuje primarne, sekundarne i perzistentne apikalne periodontitise. Primarne apikalne periodontitise odlikuje činjenica da su mikroorganizmi po prvi put dospeli u kavum pulpe i inficirali ga, dok se terminom sekundarne infekcije označava ponovna infekcija u prostoru pulpe. Sekundarni apikalni periodontitisi najčešće nastaju kada je kompromitovano rubno zaptivanje ispuna i posledično intrakanalno punjenje. Infekcija može nastati i kada bakterije nisu eliminisane standardnim terapijskim procedurama, te se ovakvi periodontitisi označavaju kao perzistentni apikalni periodontitisi. Perzistentni apikalni periodontitisi mogu nastati i nakon primarne, ali i sekundarne bakterijske kolonizacije, odnosno bakterije otporne na terapiju mogu biti po prvi put kolonizatori, ili dodatno otežavati lečenje sekundarno inficiranog prostora pulpe.

U primarnim i sekundarnim apikalnim periodontisima prisutan je izrazit biodiverzitet. U proseku se nalazi između 10 i 30 različitih vrsta mikroorganizama po kanalu. Za razliku od toga, perzistentne infekcije odlikuje značajno manji broj bakterija, obično manje od 5, jer vrlo mali broj vrsta ima sposobnost da bude otporan na standardnu terapiju (Gomes & Herrera, 2018).

Simptomatske i asimptomatske infekcije su uobičajena klinička raspodela infekcija. Simptomatske i asimptomatske infekcije proširene van korenskih kanala, tj. simptomatski i asimptomatski periodontitisi, su detaljno objašnjeni u prethodnom poglavlju.

Sada kada smo se upoznali sa klasifikacijama apikalnih periodontitisa, naredno poglavlje biće posvećeno bakterijama izolovanim iz inficiranih kanala sa apikalnim periodontitisom.

### *Bakterije izolovane iz inficiranih kanala sa apikalnim periodontitisom*

Kako bi se bolje razumela endodonska mikrobiologija i patologija koja proističe iz nje, mnogi istraživači su pokušavali da predstave bakterijske sojeve iz inficiranih korenskih kanala u svojim studijama. Saznanja o bakterijskom sastavu u kanalima proistekla su iz uzorkovanja kanala i analiza ovih uzoraka molekularnim ili tehnikama kultivacije (Jacinito i sar., 2003, Sakamoto i sar., 2007, Sassone i sar., 2008, Siqueira i sar., 2009, Rôças i sar., 2011, Tennert i sar., 2014, Lysakowska i sar., 2015, Lee i sar., 2017).

Kako je broj izolovanih bakterijskih sojeva izrazito visok i u solidnoj meri se razlikuje među istraživačima, pregledom dostupnih literaturnih podataka, autor se odlučio da predstavi vrste koje su prepoznate od strane većine autora ovakvih studija u **Tabeli 1.**

**Tabela 1.** Bakterijski sojevi prepoznati od strane većine autora koji su se bavili tematikom mikrobiološkog sastava zuba sa apikalnim periodontitisom

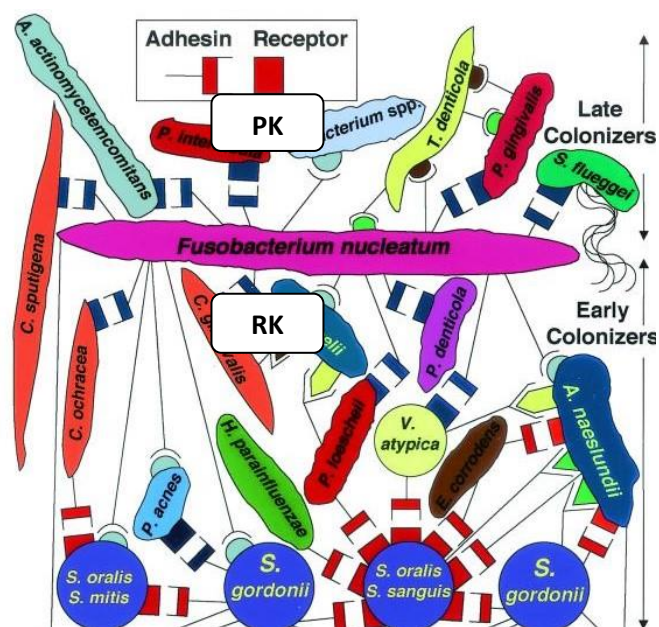
Aerotolerancija soja	Bojenje po Gramu	Bakterijska vrsta	Referenca	
Fakultativni anaerobi	Gram (+)	<i>Streptococcus</i> spp.	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Tennert i sar., 2014 Lysakowska i sar., 2015 Lee i sar., 2017	
		<i>Enterococcus faecalis</i>	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lysakowska i sar., 2015 Lee i sar., 2017	
		<i>Propionibacterium acnes</i>	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lysakowska i sar., 2015 Lee i sar., 2017	
		<i>Actinomyces</i> spp.	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lysakowska i sar., 2015	
		<i>Gemella morbilorum</i>	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Rôças i sar., 2011 Lysakowska i sar., 2015	
	Gram (-)	<i>Eikenella corrodens</i>	Sassone i sar., 2008 Rôças i sar., 2011 Tennert i sar., 2014 Lee i sar., 2017	
	Striktne anaerobi	Gram (+)	<i>Parvimonas micra</i>	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Tennert i sar., 2014 Lee i sar., 2017
		Gram (-)	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Jacinito i sar., 2003 Sakamoto i sar., 2007 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Tennert i sar., 2014 Lee i sar., 2017
			<i>Prevotella</i> spp.	Jacinito i sar., 2003 Sakamoto i sar., 2007 Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lee i sar., 2017
			<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Tennert i sar., 2014 Lee i sar., 2017
<i>Prophyromonas endodontalis</i>			Sakamoto i sar., 2007 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lee i sar., 2017	
<i>Dialister invisus</i>			Sakamoto i sar., 2007 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lee i sar., 2017	
Gram (-)		<i>Veillonella</i> spp.	Jacinito i sar., 2003 Sassone i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lee i sar., 2017	
		<i>Treponema denticola</i>	Sassone i sar., 2008 Siqueira i sar., 2009 Rôças i sar., 2011 Lee i sar., 2017	

Sve bakterije koje su izolovane iz inficiranih kanala nalaze se u slobodno živećoj formi u lumenu korenskih kanala (planktonska forma), ili adherirane za zid korenskog kanala formirajući biofilm, u tzv. sesilnoj bakterijskoj formi (Gomes i sar., 2014). Smatra se da nakon invazije kavuma pulpe iz dentina, od strane planktonskih bakterijskih ćelija, one vrlo brzo započinju formiranje biofilma (Svensäter & Bergenholtz, 2004), kao strukturno i funkcionalno savršenije organizacione forme, koja im pruža mogućnosti za uspješnije preživljavanje. Takođe, treba imati u vidu da ovaj proces nije statičan, već da planktonske ćelije stalno izlaze i vraćaju se u sam biofilm (Metzger i sar., 2011). S tim u vezi naredno poglavlje biće posvećeno razumevanju biofilma.

### *Bakterije i biofilm*

Bakterijski biofilm je specifična zajednica bakterijskih mikrokolonija uronjenih u ekstraćelijski matriks i formira se na podlogama organskog i neorganskog porekla. Mikrokolonije mogu formirati bakterijske ćelije istih ili različitih vrsta. Ekstraćelijski matriks je izgrađen iz proteina, polisaharida, nukleinskih kiselina i soli. Uobičajeni je odnos da 85% zapremine biofilma pripada matriksu, dok preostalih 15% čine bakterijske ćelije (Nivens i sar., 2001, Whitchurch i sar., 2002). Osnovni preduslov koji mora biti ispunjen, da bi se formirao biofilm, je da postoje optimalna gustina populacije i odgovarajuća podloga tj. supstrat, za koji će se biofilm prilepiti. Takođe, neophodno je da ceo kompleks zajednica - supstrat, bude u vlažnom, odnosno tečnom medijumu. S tim u vezi, za biofilm se obično vezuje trijada sledećih činilaca: podloga, zajednica bakterijskih ćelija u matriksu i tečni medijum (Costerton i sar., 1987).

Razvoj biofilma je uređeni proces. Kada planktonska bakterijska ćelija dođe u kontakt sa podlogom, ona može da se veže za nju, preko flagela, pila, proteina ili polisaharida, tj. strukturnih delova bakterijske ćelije. Iz ove faze, bakterijska ćelija može postati deo budućeg biofilma, ili se može vratiti natrag u planktonsko stanje. Bakterije koje prve dolaze u kontakt sa podlogom i prve učestvuju u stvaranju biofilma nazivaju se inicijalni kolonizatori. U dentalnim biofilmovima to su članovi roda *Streptococcus* tj. predstavnici vrsta *S. mitis*, *S. oralis*, *S. sanguinis* i *S. gordonii*. Članovi roda *Streptococcus*, nakon inicijalnog vezivanja za podlogu, ostvaruju koadheziju i koagregaciju sa članovima istog, ali i drugih rodova. Na ovaj način omogućavaju drugim bakterijama da ih slede u formiranju ove složene strukture. Koadhezija je termin koji se odnosi na prepoznavanje među ćelijama, od kojih je jedna već zakačena za podlogu. Koagregacija je termin koji se odnosi na povezivanje dve genetski različite bakterijske ćelije. Zahvaljujući koadheziji i koagregaciji, za inicijalne kolonizatore (predstavnici roda *Streptococcus*) vezaće se rani kolonizatori, kao što su: *Capnocytophaga gingivalis*, *Capnocytophaga ochracea*, *Propionibacterium acnes*, *Actinomyces israelii*, *Actinomyces naeslundii*, *Veillonella atypica*, *Prevotella denticola*, *Eikenella corrodens* i druge. Potom će se pojaviti u biofilmu bakterija koja predstavlja sponu između ranih i kasnih kolonizatora, a to je predstavnik vrste *Fusobacterium nucleatum*. *F. nucleatum* se iz ovog razloga smatra glavnim koagregatorom u biofilmu. Zahvaljujući *F. nucleatum*, deo biofilma postaju i kasni kolonizatori, kao što su *Prevotella intermedia* i *P. gingivalis*. Na ovaj način, posedujući inicijalne kolonizatore, rane kolonizatore, bakteriju koja omogućava sponu i pozne kolonizatore, biofilm postaje potpuno izgrađena struktura (**Figura 1**), (Kolenbrander i sar., 2002, Berger i sar., 2018).



**Figura 1.** Dinamika bakterijske kolonizacije u biofilmu (figura je preuzeta od Kolenbrander i sar., 2002, 18.9.2020.)  
PK- pozni kolonizatori, RK- rani kolonizatori u biofilmu

Pored već navedenih bakterijskih ćelija, biofilm, kao trodimenzionalna struktura, sadrži i međućelijske komunikacione molekule, kanale za transport i razmenu tih molekula, ali i kanale za razmenu hranjivih materija i produkata metabolizama (Usha, 2010). Na ovaj način česta je razmena hranljivih materija između različitih vrsta, a metaboličke aktivnosti jednih, neretko omogućavaju povoljnu sredinu za rast drugima. Kako se biofilm menja zbog promene uslova za rast bakterija, ili promene dostupnosti nutrijenata, ili se menjaju fizičko - hemijske karakteristike samog supstrata, biofilm možemo posmatrati kao jednu dinamičnu strukturu (Palmer i sar., 1997, Donlan i sar., 2002, Jhaharia i sar., 2015).

Biofilm je takođe i struktura sa specifičnom zaštitnom ulogom za bakterijske ćelije, od odbrambenog sistema domaćina i antimikrobnih supstanci. Ova zaštita proističe na prvom mestu iz činjenice da je sam matriks teško prodoran za antimikrobna sredstva (Nivens i sar., 2001, Whitchurch i sar., 2002). Pored ovoga, primećuje se da međubakterijska razmena može podrazumevati i razmenu genetskog materijala. Usled ove razmene genetskog materijala, bakterije unutar biofilma mogu postati otpornije nego kada su u planktonskom stanju (Jhaharia i sar., 2015).

Sada, kada je u prethodnim odeljcima objašnjeno koje bakterije i na koji način dospevaju u prostor komore pulpe, kao i kako one mogu biti organizovane u tom prostoru, sledeći odeljak će biti posvećen mladim stalnim zubima, koji nisu izuzeti od endodontske patologije. Poseban akcenat biće stavljen na specifičnosti u lečenju inficiranih kanala mladih stalnih zuba.

### *Mladi stalni zubi i specifičnosti lečenja infekcija ovih zuba*

Mladi stalni zubi predstavljaju novoiznikle stalne zube, čiji koren nije do kraja formiran (Fuks & Peretz, 2016). Nakon erupcije krunice u usnoj duplji, korenu je potrebno još tri godine da u

potpunosti završi rast. Iako se čini da ovaj period nije vremenski dugačak, nisu retke infekcije nepotpuno formiranih korenskih kanala (Singh i sar., 2017). Kako vrh korena nije formiran, širenje infekcije u okolna tkiva je još brže i jednostavnije, što nedvosmisleno ukazuje na značaj njene eliminacije.

Premda je osnovni postulat endodoncijske terapije eliminacija bakterija (u biofilmu i slobodno živećih iznad njega) iz korenskog kanala i posledična trodimenzionalna opturacija kanalnog prostora, kod mladih stalnih zuba su oba ova koraka u endodontskoj terapiji problematična (Trope, 2006).

Eliminacija bakterija iz kanala je složen proces koji u svom prvom koraku podrazumeva narušavanje integriteta biofilma i eliminaciju svih bakterijskih ćelija, kroz dobru instrumentaciju zidova korenskih kanala. Instrumentacija podrazumeva struganje korenskih kanala, kako bi se kroz razaranje biofilma, ćelije biofilma i planktonske ćelije učinile dostupne sredstvu za ispiranje, odnosno irigansu. Irigans je, sa druge strane, sredstvo sa dvojakom ulogom. Ono ima zadatak da hemijski deluje i izazove smrt bakterijske ćelije, ali i da mehanički ispere sadržaj. Najčešće korišćen irigans u endodonciji je natrijum-hipohlorit (NaOCl, Živković i sar., 2017). O benefitima primene upravo ovog irigansa govori njegov neupitni antibiofilmni potencijal (Guerreiro-Tanomaru i sar., 2014, Neelakantan i sar., 2014). Ovaj irigans se može koristiti u različitim koncentracijama, s tim što se zna da su njegove više koncentracije brže efikasne, ali i više toksične (Zhang i sar., 2003, Mohammadi & Iran, 2008, Marion i sar., 2012, Darrag, 2013).

Kod mladih stalnih zuba nije moguće ni vršiti temeljnu instrumentaciju, niti irigaciju sa visokim koncentracijama natrijum-hipohlorita. Objašnjenje leži u činjenici da je debljina dentina njihovih korenskih kanala mala. Iz toga razloga neophodno je da instrumentacija bude minimalna ili da se uopšte ne čini, kako ne bi dovela do dodatnog istanjenja zidova i njihovog posledičnog loma. Druga karakteristika zuba sa nezavršenim rastom je da ove zube odlikuje široko otvoreni apeksni otvor. Široko otvoreni apeksni otvor je problematičan sa aspekta mogućeg lakog prodora dezinficijensa u tkivo apikalne papile. Prodor natrijum-hipohlorita u tkivo apikalne papile, deluje toksično na ćelije ovog tkiva i posledično otežava formiranje vrha korena (Trope, 2006, Fuks & Peretz, 2016). Iz ovog razloga primenom nižih koncentracija natrijum-hipohlorita, kao što su 0,5, 1 i 1,5%, izbegava se povreda tkiva apikalne papile (Trope, 2006, Fuks & Peretz, 2016), ali zato mora biti sprovedeno obilno ispiranje, koje kompenzuje nižu primenjenu koncentraciju (Trope, 2006, Neelakantan i sar., 2017).

Kako je učinak instrumentacije i irigacije u endodontskoj terapiji mladih stalnih zuba izazovan, akcenat je na medikaciji kao poslednjem koraku za obeskličenje kanala. Klasičan pristup u medikaciji mladih stalnih zuba, koristi se još od svog prvog predstavljanja 1966. godine i predstavlja višeseansnu medikaciju kanala kalcijum-hidroksidnom pastom (Trope, 2006). Zadatak kalcijum-hidroksida u terapiji mladih stalnih zuba je dvojak. Pored osnovnog cilja da obeskliči korenski kanal i spreči širenje/eliminiše proširenu infekciju van kanala, kalcijum-hidroksid ima i zadatak da omogući završetak korenskog rasta kroz formiranje apikalne barijere. Ova barijera se sastoji iz osteocementnog tkiva ili tkiva sličnog koštanom (Silveira i sar., 2015). Kalcijum-hidroksid ovu dvojnju ulogu (baktericidnu i ulogu u formiranju vrha korena) ispunjava zahvaljujući svom visokom pH koji iznosi 12,5-12,8. Baktericidni efekat kalcijum-hidroksid ima zbog prisustva OH<sup>-</sup> anjona, koji oštećuje bakterijsku membranu i DNK bakterije. Oštećenja bakterijske membrane se odvijaju kroz denaturaciju proteina, ili kroz oštećenje lipoproteina, fosfolipida ili nezasićenih masnih kiselina. Posledično, ove akcije dovode do oštećenja transporta nutrienata ili oštećenja bakterijske DNK (Mohammadi i sar., 2012, Silveira i sar., 2015). Potencijal da omogući apeksifikaciju (da omogući završetak korenskog rasta) ovaj materijal takođe ostvaruje zahvaljujući visokom pH. Alkalna sredina, koju materijal pravi,



neutrališe laktičnu kiselinu iz osteoklasta, prevenirajući na taj način resorpciju mineralnih komponenti dentina. Kalcijumovi joni indukuju ekspresiju kolagena i uslovljavaju mineralizaciju. Enzim alkalna fosfataza cepa fosfatne estere i oslobađa fosfatne jone koji reaguju sa kalcijumom iz krvotoka i formiraju kalcijum-fosfat, koji je deo hidroksiapatita. Na ovaj način nastaje material sličan cementu, dentinu i kosti, koji predstavlja apikalnu matricu apeksifikacije (Trope 2006, Silveira i sar., 2015).

U kliničkim uslovima ovaj pristup podrazumeva zamenu paste u korenskom kanalu, jednom u mesec dana ili jednom u tri meseca. Tačna dinamika zavisi od radiografskog izgleda paste u kanalu. Pastu je potrebno zameniti pre njene potpune resorpcije kako bi se predupredila re-infekcija. Sa druge strane, previše česta izmena paste takođe nije preporučljiva zbog nekroze periapeksa koja može da ometa apeksifikaciju.

Premda je široko primenjivana i najviše izučavana, ova metoda nije bez nedostataka. Nedostaci metode se ogledaju u dugom trajanju terapije (6 - 18 meseci), mogućnošću reinfekcije, i/ili frakture korena u toku lečenja, kao što može biti i upitan kvalitet samog tvrdog tkiva koje je izvršilo apeksifikaciju. Ovo tvrdo tkivo često u mineralnoj potki ima organska ostrvca usled čega nema apsolutnu čvrstinu dentinskog ili cementnog tkiva (Trope, 2006).

Kako bi se rešili gore navedeni nedostaci pojavio se novi pravac u zbrinjavanju ovakvih zuba. Novi pravac nije čekao da materijal u funkciji vremena pravi apikalno zarastanje (apikalnu barijeru) već je zahtevao to imedijatno od samog materijala. Kao materijal koji sam formira apikalnu barijeru predstavljen je mineralni trioksidni agregat (MTA). Primena mineralnog trioksidnog agregata je metoda koja je predstavljena 1999. godine, a sam materijal je sačinjen od kalcijum-silikata, bizmut oksida, kalcijum-karbonata, kalcijum-aluminata i kalcijum-sulfata. Metoda je zadržala dezinfekciju i medikaciju sa kalcijum-hidroksidom u trajanju od mesec dana, ali umesto niza ponavljanih postavljanja paste kalcijum-hidroksida, u drugom koraku endodontske terapije je načinjena razlika. Nakon uklanjanja prvog punjenja kalcijum-hidroksidne paste vrši se postavljanje i formiranje apikalne barijere sa MTA-om. Materijal se potiskuje apikalno, što je omogućeno njegovim osobinama da dobro toleriše vlagu i da je biokompatibilan (Trope, 2006). Ovaj pristup jeste u mnogome ubrzao endodontsku terapiju mladih stalnih zuba, ali ni ova tehnika nije u potpunosti bez nedostataka. Inicijalno, ali i definitivno vreme vezivanja materijala je dugo, usled čega nije moguće izvršiti obturaciju istog dana kada se formira apikalna matrica. Takođe, upotreba ovog materijala može dovesti do prebojavanja zuba i jako je teško ukloniti materijal kada postoji potreba za time (Trope, 2006).

Oba gore navedena pristupa kao osnovni medikament koriste kalcijum-hidroksid. Međutim, nekada ovaj medikament nema dovoljan potencijal da eliminiše bakterijske ćelije ili krpice biofilma koje ostaju nakon instrumentacije i irigacije. Ovakve situacije prati pogoršanje kliničke slike pa se pribegava upotrebi drugog medikamenta - triantibiotske paste (TAP, Trope, 2006). Triantibiotska pasta sačinjena je iz tri antibiotika metronidazola (500mg), ciprofloksacina (200mg) i minociklina (100mg) pomešanih u odnosu 1:1:1. Ovaj antiobiotski miks je nastao kao rezultat izuzetne redukcije broja bakterija nakon njegove primene (Hoshino i sar., 1996). Ova pasta je zbog svog superiornog antibakterijskog efekta našla svoju primenu i u novom terapijskom modalitetu kao što je Regenerativna terapija mladih stalnih zuba (Trope, 2006, Fuks i Peretz, 2016).

Regenerativna terapija u lečenju infekcija mladih stalnih zuba je zasnovana na polazištu da je moguće dobiti regeneraciju nekrotične pulpe koja bi uslovlila pravi i prirodni završetak rasta korena. Osnovna ideja ovog pristupa je da može doći do formiranja nove pulpe, odnosno tkiva sličnog pulpnom iz krvnog ugruška. Ovaj krvni ugrušak nastao bi tako što bi se isprovociralo krvarenje preko otvorenog

apeksa korenskog kanala. Zadatak ovog ugruška je da bude potka za nediferencirane mezenhimne ćelije apikalne papile (Murray, 2007). Smatra se da se upravo ove nediferencirane ćelije mogu usmeriti u ćelije slične odontoblastima i da mogu biti stimulirane da omoguće budući razvoj korena (Trope, 2006). Ono što se navodi kao osnovni problem metode je problem uspostavljanja sterilnosti u korenskom kanalu pre formiranja krvnog ugruška. Iz tog razloga su neki istraživači odustali od generalne preporuke koju je dalo Američko udruženje endodontista (AAE, 2016), ali i autori (Martin i sar., 2014, Fuks & Peretz, 2016), da koncentracija natrijum-hipohlorita u irigaciji mladih stalnih zuba bude 1,5%, pa se tako mogu naći primenjene koncentracije iznad 5% NaOCl (Iwaya i sar., 2001, Banchs & Trope, 2004, Petrino, 2007, Reynolds i sar., 2009). Preporučena medikacija je medikacija primenom TAP, sa koncentracijom 0,1 – 1,0 mg/mL. Na ovaj način, nakon potpune sterilizacije, formiraće se krvni ugrušak na koji se pakuje apikalna matrica od MTA (Trope, 2006). Kada se izbegne bakterijska kontaminacija mezenhimnih ćelija (Nair, 2014), smatra se da je moguće postići revaskularizaciju i apeksogenezu, odnosno, prirodno formiranje vrha korena (Trope, 2006). Premda zvuči vrlo optimistično, metoda je još uvek mlada pa će vreme pokazati opravdanost njene primene.

Kada sumirano sva tri pristupa u lečenju inficiranih mladih stalnih zuba koja su opisana, možemo primetiti da:

- (1) izostavljaju instrumentaciju kanala,
- (2) podrazumevaju irigaciju kanala sa nižim koncentracijama hipohlorita (0,5 - 1,5%)
- (3) i podrazumevaju medikaciju kalcijum-hidroksidnom ili TAP-om

Naredno poglavlje biće usmereno na prikaz sojeva koji su sposobni da prežive ove korake u terapiji endodontskih infekcija. Na ovaj način, biće sugerisani sojevi koji, kao „perzisteri“ u korenskim kanalima, mogu onemogućiti njegovo obeskličenje i posledično sprečiti kontrolu endodontske infekcije.

### *Bakterije koje mogu da prežive standardni endodontski tretman*

Činjenica da postoje bakterijski sojevi koji mogu da sačuvaju virulenciju, nakon izlaganja standardnim terapeutima u endodonciji, može ukazati na kliničke situacije u kojima se ne može kontrolisati endodontska infekcija i njeno širenje. Pregled bakterijskih izolata, koji su u literaturi prikazani kao oni koji mogu da prežive u kanalima nakon standardno primenjene terapije, biće prikazan kroz endodontske faze lečenja:

- (1) Kako se instrumenacija u terapiji mladih stalnih zuba svodi na minimum ili ne vrši, prvi korak u endodontskom tretmanu mladih stalnih zuba je irigacija. Izolati iz korenskih kanala koji su bili podvrgnuti irigaciji natrijum-hipohloritom i preživeli je, su prikazani u **Tabeli 2**.

**Tabela 2.** Bakterijske vrste koje su izolovane nakon irigacije sa natrijum-hipohloritom

Aerotolerancija soja	Bojenje po Gramu	Bakterijska vrsta	Referenca		
Fakultativni anaerobi	Gram (+)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Lew i sar., 2015		
		<i>Streptococcus oralis</i>	Lew i sar., 2015		
		<i>Streptococcus mitis</i>	Sakamoto i sar., 2007		
		<i>Streptococcus parasanguinis</i>	Sakamoto i sar., 2007		
		<i>Streptococcus salivarius</i>	Sakamoto i sar., 2007		
		<i>Enterococcus faecalis</i>	Lew i sar., 2015		
		<i>Propionibacterium acnes</i>	Peters i sar., 2002		
	Gram (-)	<i>Staphylococcus aureus</i>	Sakamoto i sar., 2007		
		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Peters i sar., 2002		
		<i>Gemella morbillorum</i>	Peters i sar., 2002		
		<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Lew i sal., 2015		
		<i>Capnocytophaga</i> spp.	Peters i sar., 2002		
		Striktne anaerobi	Gram (+)	<i>Solobacterium</i> spp.	Sakamoto i sar., 2007
				<i>Eubacterium limosum</i>	Peters i sar., 2002
<i>Eggerthella lentum</i>	Peters i sar., 2002				
Gram (-)	<i>Peptostreptococcus micros</i>		Peters i sar., 2002		
	<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>		Peters i sar., 2002		
	<i>Fusobacterium nucleatum</i>		Lew i sar., 2015, Peters i sar., 2002		
	<i>Fusobacterium necroforum</i>		Peters i sar., 2002		
Gram (-)	<i>Prevotella oralis</i>	Peters i sar., 2002			
	<i>Prevotella prevotii</i>	Peters i sar., 2002			
	<i>Prevotella intermedia</i>	Peters i sar., 2002			

(2) U klasičnom pristupu lečenja mladih stalnih zuba može doći do infekcije, prilikom izmena kalcijum-hidroksidne paste i na taj način se može kompromitovati lečenje (Trope, 2006). Međutim, postoji mnogo veći problem koji je vezan za primenu ove paste, bez obzira da li je reč o klasičnom pristupu, pristupu lečenja mladih stalnih zuba sa formiranjem apikalne barijere primenom MTA-a ili lečenju regenerativnim pristupom; to je činjenica da iako je najšire primenjivana kao intrakanalni medikament, kalcijum- hidroksidna pasta nije efikasna kada se u kanalu nađu alkalno tolerantni sojevi (Sakamoto i sar., 2007). Ovi sojevi, kao što im samo ime kaže, sposobni su da prežive visok pH

(alkalni šok), koji je osnova baktericidnog efekta ove paste (Trope 2006, Silveira i sar., 2015). U **Tabeli 3** se nalaze sojevi koji su već prepoznati kao alkalno - tolerantni.

**Tabela 3.** Bakterijske vrste koje su izolovane nakon medikacije sa kalcijum - hidroksidnom pastom

Aerotolerancija soja	Bojenje po Gramu	Bakterijska vrsta	Referenca
Fakultativni anaerobi	Gram (+)	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Lew i sar., 2015, Sakamoto i sar., 2007
		<i>Streptococcus mitis</i>	Nakajo i sar., 2004, Sakamoto i sar., 2007,
		<i>Streptococcus salivarius</i>	Sakamoto i sar., 2007
		<i>Streptococcus constellatus</i>	Nakajo i sar., 2004
		<i>Streptococcus anginosus</i>	Nakajo i sar., 2004
		<i>Streptococcus cristatus</i>	Sakamoto i sar., 2007
		<i>Enterococcus faecalis</i>	Lew i sar.,2015, Nakajo i sar., 2004
		<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Nakajo i sar., 2004
		<i>Enterococcus faecium</i>	Nakajo i sar., 2004
		<i>Propionibacterium acnes</i>	Peters i sar., 2002, Sakamoto i sar., 2007
		<i>Staphylococcus spp.</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Actinomyces odontolyticus</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Actinomyces meyeri</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Rothia spp.</i>	Sakamoto i sar., 2007
		<i>Gemella morbillorum</i>	Peters i sar., 2002
		Fakultativni anaerobi	Gram (-)
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	Nakajo i sar., 2004		
Striktne anaerobe	Gram (+)	<i>Capnocytophaga spp.</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Bifidobacterium spp.</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Eubacterium limosum</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Prevotella shahii</i>	Sakamoto i sar., 2007
		<i>Peptostreptococcus micros</i>	Peters i sar., 2002
Striktne anaerobe	Gram (-)	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Nakajo i sar., 2004, Peters i sar., 2002, Sakamoto i sar., 2007
		<i>Fusobacterium necrogenes</i>	Peters i sar., 2002
		<i>Neisseria spp.</i>	Sakamoto i sar., 2007
		<i>Veillonella parvula</i>	Sakamoto i sar., 2007

Kako smo iz prethodno opisanih literaturnih navoda (predstavljeno u **Tabelama 2 i 3**) uočili da su bakterijski sojevi vrsta *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *P. acnes*, *A. odontolyticus*, *G. morbilorum*, *E. cancerogenes*, *Capnocytophaga* spp., *E. limosum*, *P. micros* i *F. nucleatum* otporni na natrijum-hipohlorit i medikament kalcijum-hidroksid, želeli smo da proverimo da li u literaturi postoje podaci o njihovoj rezistenciji na TAP. Medikacija primenom TAP-a se smatra superiornijom od medikacije kalcijum-hidroksidom u pogledu sterilizacije lumena korenskih kanala, a njena uloga u terapiji inficiranih kanala mladih stalnih zuba je detaljno opisana na prethodnim stranicama. Iako rezistencija pomenutih sojeva na TAP nije ispitivana (prema saznanjima autora ove disertacije), u literaturi je poznato da su predstavnici grupe *Streptococcus viridans*, kao i sojevi *P. acnes*, *A. odontolyticus*, *P. micros* i *F. nucleatum* (Jungermann et al., 2012, Rôças i Siqueira, 2012, Steininger & Willinger, 2016) rezistentni na neku od tri komponente koje ulaze u sastav TAP-a.

Problem rastuće antibiotske rezistencije, o kome se sve više govori u naučnoj javnosti, nažalost, nije zaobišao ni stomatologiju. Postoje podaci koji ukazuju da je u stomatologiji prisutna zloupotreba, odnosno prekomerno propisivanje antibiotika, pa su sve glasnije preporuke o restrikciji primene antibiotika u stomatološkoj praksi (Dar-Odeh i sar., 2010). Međutim, svedoci smo činjenice da klasični terapeutici nisu dovoljni da stanu na put širenja infekcije iz korenskih kanala. Iz tog razloga, čini se da ima smisla tragati za novim antimikrobnim sredstvom/sredstvima, ali koje nije zasnovano na antibioticima. Ono bi moglo da dodatno obeskliči kanal i da deluje ili kao podrška hipohloritu (u fazi irigacije), ili kao dopuna/alternativa klasičnim medikamentima. Takođe, potrebno je da ovakvo sredstvo ne doprinosi formiranju rezistentnih sojeva, da bi se zaista smatralo u svakom pogledu superiornijim od onoga sa čime trenutno raspolažemo.

Ovako kompleksan zadatak nije stavljen samo pred stomatološku naučnu zajednicu. U eri antibiotske rezistencije, mnoge medicinske grane, kao i veterina, poljoprivreda, prehrambena tehnologija i druge oblasti, se suočavaju sa istim problemom, o čemu govori veliki broj naučnih studija, indeksiranih u bazama Scopus, Web of Science i PubMed, koje traže alternative antibioticima u prirodnim proizvodima. Po ugledu na naučne trendove i mi smo se za ovaj opšti problem okrenuli prirodi, jer smatramo da su prirodni proizvodi najbezbedniji. Još važnije je da smo u literaturi pronašli smernice o izuzetnom antimikrobnom potencijalu prirodnih proizvoda, tj. konkretno etarskih ulja. Iz ovog razloga, drugi deo ovog uvoda biće posvećen etarskim uljima, kao nedovoljno istraženim prirodnim proizvodima sa obećavajućim antimikrobnim potencijalom, koji može biti od izuzetnog značaja i za stomatološku praksu.

### *Etarska ulja*

Etarska ulja su prirodni produkti sekundarnog metabolizma aromatičnih biljaka. Njihova primena u klasičnoj medicini nije nepoznanica. Prvi rad sa tematikom etarskih ulja, prema podacima iz baze Scopus, datira još iz davne 1825. godine, da bi od 2000. godine na ovu temu godišnje bilo publikovano više od 1000 radova, sa tendencijom rasta ovog broja iz godine u godinu. Za samo 20 godina na temu etarskih ulja, prema podacima iz baze Scopus, publikovano je čak 65688 od 78765 ikada publikovanih radova. Ovi podaci govore u prilog enormnom porastu interesovanja naučnika za etarska ulja u protekle dve decenije. Od toga, približno 10000 (precizno 9959) radova se bavi ispitivanjem antimikrobnog potencijala etarskih ulja. Razlog za ovo veliko interesovanje istraživača leži u činjenici da su etarska ulja potentni antimikrobni agensi, a ne povezuju se sa problemom bakterijske rezistencije (Marković, 2011).

Kako bi se detaljnije razumeli ovi prirodni proizvodi, ovo poglavlje će biti posvećeno poreklu etarskih ulja odabranih za istraživanja u ovoj studiji, kao i nekim njihovim organoleptičkim osobinama koje ih čine šire prepoznatljivim.

#### *Etarsko ulje Ravintsare*

Etarsko ulje biljke *Cinnamomum camphora cineoliferum* L. Presl. može se dobiti iz stabla, listova ili grančica ove drvenaste biljne vrste (**Slika 4**) koja spontano raste u Kini, Tajvanu i Japanu. Etarsko ulje je bezbojno, a miris mu je svež, blag i sladunjav (Marković, 2011). Delujući kao relaksans, ovo ulje Marković (2011) predlaže kao dobar izbor u eliminaciji straha od stomatološke intervencije kod dece, dajući mu direktnu konekciju sa stomatološkom praksom. Autorka takođe sugeriše i njegova dobra antimikrobna svojstva, od interesa za tematiku ovog doktorata.



**Slika 4.** *Cinnamomum camphora cineoliferum* L. Presl. (slika je preuzeta sa sajta <https://www.theplantguru.com/page/ingredient-spotlight-ho-wood/>, 7.8.2020).

#### *Etarsko ulje Geranijuma i Geranijum ruže*

Etarska ulja Geranijuma i Geranijum ruže su poreklom iz iste biljne vrste *Pelargonium graveolens* L'Hér. (**Slika 5**), s tim što je etarsko ulje Geranijum ruže dobijeno iz sorte koja je potekla iz *P. graveolens* var. *roseum*, varijeteta koji spontano raste na ostrvu Reunion. Etarska ulja se dobijaju iz svežih ili prosušenih listova i/ili cvetnih drški biljke. Geografsko poreklo biljne vrste *P. graveolens* su Afričke zemlje (Egipat, Alžir, Maroko), zemlje južne Amerike i južne Evrope, kao i Indija i Kina. Organoleptička svojstva ova dva ulja, konkretno njihova boja i miris, variraju u zavisnosti od porekla. Tako boja ulja može varirati od žućkaste do zelenkasto braon, a miris može podsećati na miris limuna, ruže ili matičnjaka (Marković, 2011). O izuzetnom antimikrobnom potencijalu ulja biljne vrste *P. graveolens* govori i sistematični pregled koji daje Marković (2011) u poglavlju koje se bavi uljima ove biljne vrste, kao i doktorska teza (Nikolić, 2015).



**Slika 5.** *Pelargonium graveolens* L'Hér. (slika je je preuzeta sa sajta, <https://www.ventos.com/ecommerce/product/egypt-geranium-essential-oil/?lang=en>, 7.8.2020).

#### *Etarsko ulje Limunskog čajevca*

Etarsko ulje biljne vrste *Leptospermum petersonii* F.M.Bailey dobija se iz listova drvenaste ili žbunaste biljke (**Slika 6**). Njeno prirodno poreklo je istočna obala Australije, ali se ova biljka gaji na plantažama u Keniji, Južnoj Africi i Gvatemali (Nikolić, 2015). Boja ulja je uglavnom žućkasta, dok je sam miris osvežavajuć i podseća na limun (Miris-Brophy i sar., 2000). Nikolić (2015) je u svojoj doktorskoj tezi pokazao izuzetan antimikrobni efekat ovog ulja na oralne bakterije.



**Slika 6.** *Leptospermum petersonii* F.M.Bailey (slika je preuzeta sa sajta, <https://triggplants.com.au/product/leptospermum-petersonii-lemon-tea-tree-in-68mm-super-tube/>, 7.8.2020)



### *Etarsko ulje Limunskog eukaliptusa*

Etarsko ulje se dobija iz listova, grančica, a povremeno i iz cvetnih pupoljaka drvenaste biljke *E. citriodora* Hook. (**Slika 7**). Poreklo ove biljke je južni Kvinslend, mada se ona gaji i u drugim delovima Australije, u Kini, na Sejšelskim ostrvima, u južnoj i centralnoj Africi, južnoj Americi, Gvatemali i istočnoj Evropi. Bezbojna ili bledo žuta boja odlikuje ovo ulje, dok je miris jak i podseća na mešavinu ulja matičnjaka i geranijuma (Marković, 2011). Dobar antibakterijski potencijal etarskog ulja biljne vrste *E. citriodora* već je dokazan (Cimanga i sar., 2002, Nikolić, 2015), a posebno je značajno da je on dokazan i na rezistentnim bakterijskim sojevima (Mulyaningsih i sar., 2011).



**Slika 7.** Iz *Eucalyptus citriodora* Hook. (slika je preuzeta sa sajta [https://www.lgbotanicals.com/Eucalyptus-citriodora-Lemon-Eucalyptus-Essential-Oil\\_p\\_501.html](https://www.lgbotanicals.com/Eucalyptus-citriodora-Lemon-Eucalyptus-Essential-Oil_p_501.html), 7.8.2020).

### *Etarsko ulje Rosaline*

*Melaleuca ericifolia* (**Slika 8**), iz čijeg se lišća ili grančica dobija etarsko ulje Rosaline, raste u formi žbuna ili niskog drveta. Poreklo ove biljne vrste je Australija i Tasmanija (Brophy & Doran, 2004). Boja etarskog ulja je zlatno žuta (<https://www.nativeoilsaustralia.com.au/rosalina-essential-oil/>), a miris je cvetan i umerenog intenziteta. O antimikrobnom potencijalu ovog ulja, prema saznanjima autora ove teze, nisu dostupni podaci.





**Slika 8.** *Melaleuca ericifolia* (Sm.) Kuntze (slika je preuzeta sa sajta [https://en.wikipedia.org/wiki/Melaleuca\\_ericifolia](https://en.wikipedia.org/wiki/Melaleuca_ericifolia), 7.8.2020).

#### *Etarsko ulje limunske trave*

Etarsko ulje limunske trave dobija se iz listova istoimene biljke *C. citratus* (**Slika 9**). Nativno se ova biljka nalazila u predelima jugo-zapadne Azije i Alžiru, dok se danas ona uzgaja u različitim delovima sveta, posebno u tropskim regionima i savanama. Miris ulja podseća na limun, a boja je žućkasta (Mohamed Hanaa i sar., 2012, Boukatem i sar., 2014). Već je potvrđen umereni antibakterijski efekat ovog etarskog ulja na oralne patogene (Almeida i sar., 2013) i antibiotik - rezistentne sojeve (Naik i sar., 2010).



**Slika 9.** Limunska trava ili latinski *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf (slika je preuzeta sa sajta <https://www.gardenia.net/plant/cymbopogon-citratus>, 7.8.2020).

### *Etarsko ulje Palmarose*

Etarsko ulje biljne vrste *Cymbopogon martinii* Roxb. dobija se iz sveže ili delimično osušene biljke ili biljke u cvetu. U pitanju je višegodišnja trava (**Slika 10**) koja raste samoniklo u Indiji, a gaji se na Sejšelima i na Komorskim ostrvima. Ulje se prepoznaje kao bistra pokretljiva tečnost svetložute boje, čiji miris je jako blag i podseća na miris ruže (Marković, 2011). Dobar antimikrobni potencijal ovog ulja, potvrđen u mnogim studijama, prikazuje autorka Marković (2011) u poglavlju posvećenom ovom ulju.



**Slika 10.** *Cymbopogon martinii* Roxb. (slika je preuzeta sa sajta <https://hysses.com/blogs/essential-oil-benefits/palmarosa-benefits-and-uses>, 7.8.2020.)

### *Etarsko ulje Španskog timijana*

Etarsko ulje biljne vrste *Thymus zygis* Loefl. dobija se iz delimično osušenog kompletnog ? biljnog materijala, ređe iz belih cvetova ove žbunaste vrste (**Slika 11**). Ona spontano raste u Španiji, Maroku, Rusiji, Kini i na Balkanu. Ulje koje se iz nje dobija je narandžaste do braon boje, jakog slatkastog mirisa (Marković, 2011). O obećavajućem antibakterijskom potencijalu ovog ulja svedoče literaturni podaci (Rota i sar., 2008).



**Slika 11.** *Thymus zygis* Loefl. (slika je preuzeta sa sajta <https://www.stlarrys.com/products/thyme-thymus-zygis-loepl-organic-essential-oil>, 7.8.2020).

Iako je prva odrednica svakog etarskog ulja aromatična biljka iz koje ono potiče, priroda se ipak postarala za unikatnost svakog ulja. Ne samo da se ulja različitih biljaka hemijski razlikuju, već se hemijski razlikuju i ulja istih biljnih vrsta različitog porekla, tj. staništa i uslova rasta (Marković, 2011), što je još jedna potvrda koliko su ona jedinstvena i neponovljiva. S tim u vezi, da bi se neko ulje preciznije opisalo, neophodno je poznavanje njegovog hemijskog sastava (Marković, 2011). Iz ovog razloga naredni odeljak će biti posvećen hemijskim karakteristikama etarskih ulja.

### *Hemijske karakteristike etarskih ulja*

Etarska ulja su kompleksne smeše koje mogu sadržavati i do 300 pojedinačnih komponenti (Dhifi i sar., 2016), mada je ovaj broj najčešće od 20 do 60 (Chouhan i sar., 2017). Od svih komponenti ulja, uglavnom su 2 ili 3 zastupljene u relativno visokom procentu (20-70%), pa se ujedno i smatraju „glavnim“ komponentama tog ulja (Marković, 2011, Chouhan i sar., 2017).

Komponente etarskih ulja su organski molekuli, koji po svom hemijskom sastavu odgovaraju dominantno terpenima, mada u sastav mnogih ulja ulaze i ne-terpenska jedinjenja. Terpeni nastaju kondenzacijom različitog broja izoprenskih jedinica (2,metil1,3-butadien). Kondenzacijom dve izoprenske jedinice nastaju monoterpeni, a kondenzacijom tri, nastaju seskviterpeni, itd. Monoterpeni i seskviterpeni su najčešći terpeni u etarskim uljima i u zavisnosti od zastupljenosti kiseonika u njima razlikuju se oksigenovani i hidrokarbonski mono-, odnosno seskviterpeni (Nikolić, 2015).

Upravo je hemijski sastav ulja ključ njihovog biološkog potencijala. Veza između hemijskog sastava ulja i njegovog antibakterijskog dejstva nije do kraja razjašnjena, ali naučnici su već nebrojeno puta nagovestili da su za to primarno odgovorne dominantne komponente ulja. U mnogim radovima citirani su autori Dorman i Deans (2000), koji su pokušavali da antibakterijski učinak dominantnih komponenti objasne tako što su sugerisali mehanizam po kome bi one mogle da deluju baktericidno ili bakteriostatski. Kroz mehanizam delovanja komponenti pomenuti autori su objašnjavali baktericidno ili bakteriostatsko delovanje etarskih ulja u njihovom punom sastavu. Iako je ovo donekle već



sugerisano i dalje je odabir ulja sa kojima treba ući u istraživanja prilično zahtevan posao, a to se može učiniti samo na osnovu njihovog hemijskog sastava tj. na osnovu poznavanja hemijskog sastava mnogih etarskih ulja i njihovih glavnih komponenti koje bi se mogle pokazati kao efikasne u eliminaciji bakterija. Razlog tome je sa jedne strane individualnost bakterijskog odgovora na data ulja, ali i složenost međusobnih interakcija komponenti koje ulaze u sastav tih ulja.

Jasna saznanja iz ove oblasti još uvek nisu definisana, i do sada su se mnoge naučne informacije na ovu temu otkrивale gotovo intuitivno, što nikako ne umanjuje njihov značaj. A o značaju govore i novije publikacije o ulozi i/ili primeni etarskih ulja u stomatologiji, te možemo slobodno konstatovati da postoji veliko interesovanje naučnika na ovu temu. Zato je u sledećem odeljku napravljen kratak osvrt na dosadašnja istraživanja na temu uloge etarskih ulja u stomatologiji.

### *Uloga etarskih ulja u stomatologiji*

Solidan broj originalnih istraživanja koja su publikovana poslednjih godina uslovlila je izradu meta analiza (Araujo i sar., 2015, Haas i sar., 2016) i strategije zasnovane na njima (Takenaka i sar., 2019), koje su sugerisale superiornu ulogu etarskih ulja u eliminaciji plaka. Studije i analize su pokazale da primena etarskih ulja u formi vodica za ispiranje usta dovodi do smanjenja biofilma, ali i da prevenira oboljenja u stomatologiji koja su uslovljena biofilmom (Araujo i sar., 2015, Charugundla i sar., 2015, Haas i sar., 2016, Alnouri i sar., 2020). Na ovaj način i kliničke studije su potvrdile ono što su rezultati istraživanja *in vitro* sugerisala (Serbiak i sar., 2018, Alexa i sar., 2019, Horváth i sar., 2019), a to je snažan antibakterijski i antibiofilmni efekat raznih etarskih ulja.

Čini se da ni sama endodoncija nije ostala imuna na primenu etarskih ulja. Odavno je poznata uloga ovih prirodnih proizvoda u pastama za definitivno punjenje korenskih kanala i u rastvaračima tih pasti (Martos i sar., 2011). Međutim, potvrđeni antibiofilmni potencijal koji su pokazale vodice za ispiranje usta sa uljima usmerio je po nekog pionira - istraživača u pravcu iskorišćavanja ovog potencijala u inficiranim korenskim kanalima. Manji broj tih ambicioznih istraživača je već pokušavao da nađe mesto etarskim uljima u fazama endodontske terapije, razmatrajući ih kao podršku standardnoj medikaciji (Abbaszadegan i sar., 2016, Ahirwar i sar., 2018, Shakya i sar., 2019), dok je samo jedan rad do sada razmatrao primenu etarskih ulja u vidu irigansa (Benbelaid i sar., 2018).

Danas svedočimo tome, da je pored sveukupno 4 publikacije koje testiraju moguće modalitete primene etarskih ulja u u obradi inficiranih kanala, ova doktorska teza potpuno u trendu. Od nje imamo velika očekivanja i nadamo se da će ona pokrenuti neka pitanja koja će možda trasirati nove pravce i neke nove dizajne primene etarskih ulja. Na ovaj način ćemo možda doprineti promenama u savremenoj endodonciji kakvu danas znamo.

Iz svega navedenog, naredni odeljak će biti posvećen listi ciljeva koji su bili okosnica ove doktorske disertacije.

## CILJEVI ISTRAŽIVANJA

**Cilj 1:** *Izolacija i identifikacija mikroorganizama poreklom iz inficiranog korenskog kanala i njihova kvantifikacija, radi određivanja predominantnih vrsta.*

**Cilj 2:** *Definisanje hemijskog sastava etarskih ulja uključenih u istraživanja.*

**Cilj 3:** *Ispitivanje antibakterijskog potencijala kroz određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) etarskih ulja, na predominantnim bakterijskim izolatima i odgovarajućim referentnim ATCC sojevima.*

U okviru cilja 3 definisan je i **pod-cilj 3a:** *Procena antibiofilmnog potencijala odabranih etarskih ulja.*

**Cilj 4:** *Uporedna analiza razlika u osetljivosti između kliničkih bakterijskih izolata i referentnih sojeva (ATCC) na delovanje etarskih ulja*

**Cilj 5:** *Uporedno ispitivanje citotoksičnosti etarskih ulja, natrijum-hipohlorita i triantibiotske paste u MIK i MBK koncentracijama, specifičnim testovima citotoksičnosti.*

**Cilj 6:** *Definisanje potencijala odabranih etarskih ulja ili njihovih aktivnih komponenti za dalja predklinička i klinička ispitivanja, usmerena na unapređenje efikasnosti endodontske terapije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba.*

## MATERIJAL I METODE

U sprovođenju istraživanja u okviru ove disertacije korišćena su prirodna etarska ulja, referentni bakterijski sojevi, kao i odgovarajuće hranjive pologe za rast bakterijskih sojeva, koji su navedenim redom predstavljeni u poglavlju MATERIJAL. Metode primenjene u izvođenju teze uključivale su metode za formiranje baze bakterija izolovanih iz inficiranih korenskih kanala, metode za testiranje antibakterijskog i antibiofilmnog dejstva etarskih ulja na izolovanim i referentnim bakterijskim sojevima, kao i procenu bezbednosti primene odabranih etarskih ulja. Sve navedene metode su detaljno objašnjene u istoimenom odeljku.

### MATERIJAL

Za testiranje antibakterijskog, antibiofilmnog i citotoksičnog efekta, a na osnovu pažljivog pregleda literature, odabrano je devet komercijalnih prirodnih etarskih ulja, izolovanih iz aromatičnih biljaka pet različitih familija. Etarska ulja su kupljena od distributera u zemlji (**Tabela 4**), a njihovi uzorci su deponovani u kolekciji Instituta za proučavanje lekovitog bilja „Dr Josif Pančić“ iz Beograda.

**Tabela 4.** Etarska ulja aromatičnih biljaka i njihovo poreklo

Familija	Lokalni naziv etarskog ulja	Latinski naziv biljke iz koje se ulje dobija	Zemlja porekla	Proizvođač
<i>Lauraceae</i>	Ulje Ravintsare	<i>Cinnamomum camphora cineoliferum</i>	Madagaskar	Oshadhi, Nemačka
<i>Geraniaceae</i>	Ulje Geranijuma	<i>Pelargonium graveolens</i>	Madagaskar	Oshadhi, Nemačka
	Ulje Geranijum ruže	<i>Pelargonium roseum</i>	Maroko	Oshadhi, Nemačka
<i>Myrtaceae</i>	Ulje Limunskog čajevca	<i>Leptospermum petersonii</i>	Australija	Herba d.o.o, Srbija
	Ulje Limunskog eukaliptusa	<i>Eucalyptus citriodora</i>	Madagaskar	Oshadhi, Nemačka
	Ulje Rosaline	<i>Melaleuca ericifolia</i>	Australija	Herba d.o.o, Srbija
<i>Poaceae</i>	Ulje Limunske trave	<i>Cymbopogon citratus</i>	Indija	Herba d.o.o, Srbija
	Ulje Palmarose	<i>Cymbopogon martinii</i>	Nepal	Oshadhi, Nemačka
<i>Lamiaceae</i>	Ulje Španskog timijana	<i>Thymus zygis</i>	Španija	Oshadhi, Nemačka

Procena antibakterijskog i antibiofilmnog potencijala ovih ulja, uključivala je procenu njihovog dejstva na kliničke izolate i referentne bakterijske sojeve. Svi referentni sojevi bili su iz Američkog tipa kolekcije - ATCC kolekcije i prikazani su u **Tabeli 5**.

**Tabela 5.** Referentni sojevi ATCC kolekcije testirani u studiji

Bakterijski soj	ATCC broj
<i>Streptococcus sanguinis</i>	ATCC 10556
<i>Streptococcus salivarius</i>	ATCC 9222
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 19433
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	ATCC 25586
<i>Veillonella parvula</i>	ATCC 10790

U radu sa kliničkim i referentnim sojevima korišćene su različite tečne i čvrste hranjive podloge. Sve hranjive podloge bile su poznatog sastava i pravljene su prema priloženim uputstvima (**Tabela 6**). Nakon njihove pripreme, sterilizacija je vršena autoklaviranjem 15 min na 121°C.

**Tabela 6.** Korišćene mikrobiološke podloge, sastav i uputstvo za njihovo pravljenje.

Mikrobiološke podloge	Sastav	Količina (g)*	Poreklo podloga
Luria-Bertani bujon (LB)	Natrijum-hlorid	5	HiMedia, India
	Bakto tripton	10	
	Ekstrakt kvasca	5	
Luria-Bertani agar (LA)	Natrijum-hlorid	5	HiMedia, India
	Bakto tripton	10	
	Ekstrakt kvasca	5	
	Agar	15	
Miler-Hinton bujon (MHB)	MHB prah	21	HiMedia, India
Miler-Hinton agar (MHA)	MHB prah	21	HiMedia, India
	Agar	15	
Krvni agar	Triptozni pepton	20	Torlak, Srbija
	Ekstrakt kvasca	3	
	Natrijum-hlorid	5	
	Ovčja krv	5%	
	Agar	15	
Šedler bujon	Pepton	8,2	HiMedia, India
	Glukoza	5,8	
	Ekstrakt kvasca	5	
	Tris puffer	3	
	Mesni ekstrakt	2,5	
	Natrijum-hlorid	1,7	
	Sojino brašno	1	
	Dikalijum fosfat	0,8	
	L-cistin	0,4	
	Vitamin K	0,001	
Hemin	0,005		
Brucela krvni agar (BBA)	Bakto tripton	10	BioMerieux, Francuska
	Pepton	10	
	Ekstrakt kvasca	2	
	Glukoza	1	
	Natrijum-hlorid	5	
	Natrijum-bisulfit	0,1	
	Hemin	0,005	
	Vitamin K	0,001	
	Ovčja krv	5%	
Agar	15		

\* Predstavljena količina je rastvarana u 1L dH<sub>2</sub>O, osim ako nije drugačije naznačeno u tabeli

U eksperimentima kao pozitivna kontrola korišćena je mešavina tri antibiotika, koja u kliničkim uslovima služi za pravljenje antibiotske paste (TAP). Tri antibiotska mešavina je pripremljena mešanjem tri antibiotika: metronidazola (Orvagyl®, Galenika, Belgrade, Serbia, 400 mg), minocyclina (Minocin®, Pfizer, New York, USA, 100 mg) i ciprofloxacina (Ciprofloxacin®, Remedica LTD, Limassol, Cyprus, 200 mg) u odnosu 1:1:1, po preporuci datoj od strane Japanskog fakulteta za medicinske i dentalne nauke, Niigata Univerzitet (<https://www.endoexperience.com/Howtoprepare3Mix.docx>). Priprema ove mešavine podrazumevala je da se tablete metronidazola i ciprofloksacina, zasebno smrve u dva avana sa tučkovima, kako bi se dobio fini antibiotski prah. Sadržaj kapsule minociklina dobijen je otvaranjem iste. Dobijeni prah svakog antibiotika je odmeravan na analitičkoj vagi kako bi se dobilo po 3mg svakog antibiotskog praha. Potom je ovaj prah rastvaran u 9mL sterilne destilovane vode, do dobijanja suspenzije od 1mg/mL. Ova suspenzija je dodatno razblažena 100 puta, kako bi se dobila koncentracija tri antibiotika koja je mogla biti dalje testirana.

## METODE

Kako bi se obezbedili uslovi za testiranje etarskih ulja, inicijalno je sačinjena bakterijska kolekcija iz izolovanih i identifikovanih bakterija poreklom iz inficiranih korenskih kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom. Da bi se uspostavila kolekcija bilo je neophodno da se izvrši odabir inficiranih korenskih kanala, prikupljanje uzoraka iz tih kanala i identifikacija kultivabilnih izolata. Sve faze, nepohodne za uspostavljanje kolekcije, biće detaljno opisane. Formiranje bakterijske kolekcije i prikupljanje uzoraka iz kanala izvršeno je uz saglasnost Etičkog odbora Stomatološkog fakulteta u Beogradu pod brojem 36/7 donetog na sednici održanoj dana 7.3.2019.godine.

### *Odabir inficiranih korenskih kanala*

Kod 35 pacijenata, Klinike za dečju i preventivnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, klinički i/ili radiografski dijagnostikovana je primarna nekroza pulpe i infekcija korenskog kanala sa širenjem u periapikalni prostor (apikalni periodontitis). Pacijenti su bili uzrasta od 8 do 18 godina oba pola (15 muškog i 20 ženskog pola). Na Kliniku su se javili radi lečenja datog zuba, ili je dijagnoza apikalnog periodontitisa zuba postavljena tokom neke druge stomatološke intervencije. Pacijenti koji su se javili radi lečenja zuba sa apikalnim periodontitisom svrstani su u grupu pacijenata sa pozitivnom simptomatologijom i njih je bilo 21. Preostalih 14 pacijenata je imalo asimptomatski apikalni periodontitis zuba, stoga je prepoznavanje ovog periodontitisa i bilo slučajan nalaz tokom druge stomatološke intervencije.

Uzorci su prikupljeni iz korenskih kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom čiji roditelji su, u skladu sa odlukom Etičkog komiteta, upoznati sa planom i ciljevima istraživanja i dali saglasnost za uzimanje uzoraka. Uzorkovanje nije vršeno iz inficiranih korenskih kanala pacijenata:

- koji boluju od sistemskih oboljenja;
- koji su bili pod antibiotskom terapijom;
- na čijim zubima je već primenjena neka od endodontskih terapijskih procedura (drenaža, irigacija, medikacija i sl.);
- koji su odustali od učešća u studiji.



Prateći klinički simptomi kao što su bol, osetljivost zuba na perkusiju i otok, ili odsustvo nabrojanih simptoma, su bili zabeleženi u poseban karton, u cilju uočavanja njihove povezanosti sa bakterijskim profilom inficiranog korenskog kanala mladog stalnog zuba.

#### *Prikupljanje uzoraka iz korenskih kanala i identifikacija kultivabilnih izolata*

Samom uzorkovanju je prethodila odgovarajuća priprema zuba koja je uključivala uklanjanje mekih naslaga sa zuba, uklanjanje karijesa i formiranje pristupnog kaviteta. Suvo radno polje je obezbeđeno postavljanjem koferdama. Potom je izvršena trepanacija i obezbeđen pristup korenskom kanalu. Provera prohodnosti korenskog kanala vršena je sterilnim endodontskim instrumentom, proširivačem, veličine 20 (20 K-file, Kerr Dental, USA) bez upotrebe iriganasa. U cilju prikupljanja bakterija iz kanala, u lumen kanala plasiran je sterilni papirni poen (PD, Nemačka) u vremenskom trajanju od 60s. U slučajevima kada je korenski kanal bio suv, korišćena je aktivacija sadržaja kanala, kroz ostvarivanje kontakta sterilnog endodontskog proširivača #15 sa zidovima kanala u trajanju od 60s. Nakon toga je aplikovan papirni poen u trajanju od 60s. Papirni poen izvučen iz kanala je direktno utrljavan na Brucela hranjivu podlogu, obogaćenu 5% ovčijom krvlju, i sa 5 mg/l hemina i 1 mg/l vitamina K. U roku od 30min, pod anaerobnim uslovima, Brucela podloge su prenošene u mikrobiološku laboratoriju u cilju bakterijske identifikacije. U mikrobiološkoj laboratoriji, Brucela podloge su inkubirane anaerobno na 37°C, 7 dana. Nakon inkubacije, sve morfološki različite kolonije su ponovo zasejavane, u cilju dobijanja čistih kolonija. Kada su dobijene čiste kolonije, one su identifikovane Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time Of Flight masenom spektrometrijom (MALDI-TOF MS, VITEK® MS bioMerieux, France). To je vršeno tako, što je čista kolonija svežeg bakterijskog izolata (posle 18h do 72h inkubacije) bila izložena laserskim zracima unutar aparata, dajući uparene i jonizovane produkte koji su putovali kroz električno polje u vakuumskoj cevi do linearnog detektora koji stvara maseni spektar. Ovaj spektar je upoređivan sa spektrom u bazi znanja (VITEK® MS V3.0 baza znanja) i bakterijske vrste analiziranog uzorka su identifikovane i izražene kroz vrednost poverenja (verovatnoća od 60 do 99,9%). Nakon identifikacije, čisti izolati su umnoženi i u tri ponovaka čuvani u 50% glicerolu u zamrzivaču, na -80 °C, do daljih testiranja.

Kada je formirana mikrobiološka baza, pristupljeno je analizi hemijskog sastava etarskih ulja na način koji će biti opisan.

#### *Hemijska karakterizacija ulja*

Hemijski sastav etarskih ulja određen je kroz kvalitativnu i kvantitativnu analizu uzoraka ulja. Uzorak je dobijen tako što je 1 µL etarskog ulja rastvoren u 10 µL etanola (koncentracije 75%). GC/FID analize su rađene na Agilent Technologies gasnom hromatografu, model 7890A, opremljenom split-splitless injektorom povezanim sa HP-5 kolonom (30 m • 0,32 mm, debljine filma 0,25 µm) i plameno-jonizujućim detektorom (FID). Noseći gas gasnog hromatografa je bio vodonik (1 mL/min/210°C). Temperatura injektora iznosila je 250°C, detektora 280°C, dok je temperatura kolone menjana u linearnom režimu temperaturskog programiranja od 40-260°C (4°/min). GC/MS analize rađene su na HP G 1800C Series II GCD analitičkom sistemu, sa HP-5MS kolonom (30 m • 0,25 mm • 0,25 µm). Noseći gas je bio helijum. Temperatura transfer linije je iznosila 260°C. Maseni spektri snimani su u EI režimu (70 eV), u opsegu m/z 40-400. U svim slučajevima etanolni rastvori uzoraka etarskih ulja (1 µL) injektirani su u split-režimu (1:30). Identifikacija pojedinačnih komponenti vršena je masenospektrometrijski i preko Kovačevih indeksa, uz korišćenje različitih baza masenih spektara

(NIST/Wiley), poređenjem sa eksperimentalno određenim indeksima (AMDIS) i raspoloživim literaturnim podacima (Adams, 2009).

Kada su mikrobiološki sastav inficiranih korenskih kanala i hemijski sastav etarskih ulja postali poznati, pristupljeno je mikrobiološkim testovima, od kojih su prvi bili testovi ispitivanja antibakterijskog dejstva etarskih ulja.

#### *Ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja*

Ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja uključivalo je utvrđivanje njihovog dejstva na slobodno živeće - planktonske ćelije, primenom mikrodilucione metode. Mikrodiluciona metoda je test kojim se ispituje uticaj ulja na bakterije u trajanju od 24h. Iz ovog razloga pozitivna kontrola u testovima bila je triantibiotska mešavina/smeša, kakva se koristi za spravljanje TAP; Ova mešavina je odabrana za pozitivnu kontrolu iz dva razloga: TAP je medikament u terapiji inficiranih kanala mladih stalnih zuba, a pored toga je jasno da su antibiotici ili njihove mešavine pogodni za 24h- testiranja, zbog svog dokazanog produženog delovanja. NaOCl nije mogao biti primenjen kao pozitivna kontrola, jer ovo oksidaciono sredstvo ima kratkotrajni efekat. Pored pripreme pozitivne kontrole, bilo je potrebno pripremiti i etarska ulja za testiranje, te su ona rastvarana u emulgatorima kao što su DMSO i Tween 20/80 (DMSO, Santa Cruz Biotechnology, Inc., SAD; Tween 20/80, Sigma-Aldrich, SAD) u odnosu 1:1. Kada su pripremljene test supstance bilo je neophodno pripremiti i obezbediti istovetni broj bakterijskih ćelija u medijumu. Zato je sa posebnom pažnjom pristupano pripremi bakterijske suspenzije.

#### *Priprema bakterijske suspenzije*

Priprema inokuluma (bakterijske suspenzije) podrazumevala je aktivaciju ranije smrzananih bakterijskih uzoraka; oni su, po potrebi, bili aktivirani zasejavanjem na odgovarajuće čvrste hranjive podloge. Za kultivaciju fakultativnih anaeroba korišćene su Luria-Bertani agar ili Krvni agar hranjive podloge, koje su potom inkubirane, zavisno od vrste izolata, 48h ili 72h na 37°C. Kultivacija striktnih anaeroba vršena je u anaerobnim uslovima na Brucela hranjivim podlogama, u trajanju od 7 do 10 dana. Sa čvrstih hranjivih podloga, zasejavanjem pojedinačnih kolonija u tečne hranjive podloge (Luria-Bertani bujon za fakultativne ili Šedler bujon za striktno anaerobe), dobijane su prekoćne bakterijske kulture. U cilju obezbeđivanja identičnog bakterijskog inokuluma za svaki eksperiment polazna bakterijska koncentracija bila je  $1 \times 10^8$  CFU/ mL.

Kada je obezbeđena bakterijska suspenzija i kada su pripremljene test supstance na već opisani način, moglo se pristupiti izvođenju mikrodilucionog testa za procenu antibakterijskog potencijala ispitivanih supstanci.

Mikrodiluciona metoda - metoda za ispitivanje antibakterijskog dejstva etarskih ulja na slobodno živeće (planktonske) ćelije

Metoda procenjuje antibakterijski efekat posmatranih agenasa *in vitro* i izvodi se u mikrotitracionim pločama sa 96 bunarića (CLSI, 2009, Tsukatani, 2012). Ona podrazumeva određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i minimalnih baktericidnih koncentracija (MBK) etarskih ulja rastvorenih u emulgatorima. U cilju određivanja vrednosti MIK, testirane koncentracije ulja su dobijane dvostrukim razblaživanjima. Broj ćelija po bunariću, koji je izlagan različitim koncentracijama ulja, iznosio je  $1,0 \times 10^4$  CFU/bunariću. Ovaj broj ćelija dobijen je razblaženjem početnog inokuluma ( $1 \times 10^8$  CFU/ mL). Nakon 24h inkubacije mikrotitracionih ploča na 37°C, u

bunariće je dodavan indikator inhibicije rasta bakterija (p-jodonitrotetrazolijum ili resazurin, Sigma-Aldrich, Merck, SAD). Minimalne inhibitorne koncentracije su predstavljene kao najmanje koncentracije ulja na kojima je, kroz odsustvo promene boje indikatora, uočena inhibicija rasta bakterija. Da bi se odredila Vrednost MBKa, vršeno je dodatno zasejavanje 5 µL iz bunarića, u kojima je indikator boje pokazao da nije bilo bakterijskog rasta, na hranjive podloge. Ove hranjive podloge su potom inkubirane u trajanju do 72h, za fakultativne anaerobe, odnosno do 10 dana za striktno anaerobe, na 37°C, nakon čega je vršena analiza prisutnostirasta bakterijskih ćelija.

Nakon ispitivanja antibakterijskog dejstva ulja, naredni testovi su bili posvećeni proceni antibiofilmnog potencijala istih.

#### *Ispitivanje delovanja etarskih ulja na bakterijske biofilmove*

U cilju ispitivanja dejstva etarskih ulja na biofilmove, posmatran je uticaj etarskih ulja na jednospecijske biofilmove (bakterijski biofilm pravi soj jedne bakterijske vrste), kao i na multispecijski biofilm (biofilm koji formiraju tri soja, različitih vrsta). Jednospecijski modeli su testirani samo Kristal violet metodom, dok je multispecijski biofilm bio ispitivan primenom Kristal violet metode i Metode za brojanje bakterijskih kolonija. Kristal violet metoda je korišćena radi određivanja uticaja etarskih ulja na celokupnu biomasu biofilma (bakterijske ćelije i polisaharidni matriks, zajedno), dok je brojanjem kolonija sa hranjivih ploča (Metodom za brojanje bakterijskih kolonija) utvrđivan tačan broj preživelih ćelija (slobodno živećih i ćelija unutar multispecijskog biofilma). U nastavku će prvo biti opisano ispitivanje uticaja etarskih ulja na jednospecijske biofilmove, a potom na multispecijski biofilm.

#### *Ispitivanje dejstva etarskih ulja na jednospecijske biofilmove*

Ispitivanje dejstva etarskih ulja na jednospecijske biofilmove uključivalo je procenu uticaja etarskih ulja na biomasu biofilma, i to u fazi inicijalnog formiranja biofilma, kao i nakon formiranja biofilma.

Ispitivanje dejstva etarskih ulja u toku formiranja jednospecijskog biofilma imalo je zadatak da proceni uticaj ulja na inicijalno vezivanje bakterija za supstrat i vršeno je tako što su istovremeno dodavani inokulumi *S. salivarius* ( $1 \times 10^5$  CFU/ bunariću), subinhibitorne koncentracije etarskih ulja i tečna podloga do ukupne zapremine od 200 µL, u bunariće mikrotitracione ploče sa 96 bunara sa ravnim dnom. Nakon 24h-inkubacije na 37 °C kvantifikacija potencijala inhibiranja biofilma izvršena je po sledećoj shemi: prvo je sadržaj bunarića odstranjen, bunarčići isprani, a adherirane ćelije fiksirane sušenjem na vazduhu. Nakon sušenja u svaki bunarčić je uneta boja kristal violet (Sigma-Aldrich, Merck, SAD). Nakon 20 minuta, ploče su isprane i osušene na vazduhu. Da bi se resuspendovala boja i omogućilo očitavanje rezultata u svaki bunarčić je dodat 96% etanol (Zorka, Šabac). Optička gustina je očitana na spektrofotometru na talasnoj dužini od 570 nm, a inhibicija formiranja biofilma pod uticajem test supstanci procenjena poređenjem vrednosti očitanih iz tretiranih i netretiranih bunarčića (Stepanović et al., 2000).

Procenat inhibicije biofilma računat je po sledećoj formuli:  $[(OG_{kontrola} - OG_{uzorak}) / OG_{kontrola}] \times 100$ , gde je OG-optička gustina ili apsorbancia.

Ispitivanje dejstva etarskih ulja na već formirani jednospecijski biofilm imalo je za cilj da proceni potencijal ulja da dovede do destrukcije već postojećeg biofilma inicijalnog kolonizatora; ono je vršeno tako što je primarno dopušteno da izolat formira biofilm, da bi kasnije taj biofilm bio izložen dejstvu

etarskih ulja. To je praktično podrazumevalo sledeće: Jednospecijski biofilm su formirali izolati *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis* svaki zasebno, tako što je inokulum svakog izolata dodavan u mikrotitracione ploče (u svakom bunariću bilo je  $2 \times 10^5$  CFU) i inkubiran u trajanju od 24h na 37 °C. Nakon toga, svi već formirani biofilmovi su izlagani ispitivanim uljima u četiri koncentracije (4MIC, 2MIC, MIC i MIC/2) i dodatno inkubirani 24h. Kvantifikacija uticaja ispitivanih test supstanci na već formirane biofilme izvršena je na način koji je opisan u prethodnom pasusu.

#### Ispitivanje dejstva etarskih ulja na multispecijski biofilm

Analiza dejstva ulja na multispecijski biofilm obuhvatala je procenu uticaja na biomasu već formiranog biofilma, a potom i procenu dejstva etarskih ulja na same ćelije. U cilju formiranja multispecijskog biofilma, sačinjenog iz *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis*, inokulum svakog izolata je dodavan u ploče u odnosu 2: 1: 1, tako da u svakom bunariću ima ukupno  $2 \times 10^5$  CFU. U bunariće je inicijalno dodavan *S. mitis* ( $10^5$  CFU/bunariću), a potom su dodavani inokulumi  $5 \times 10^4$  CFU/bunariću *S. sanguinis* i *E. faecalis* 2 i 2,5h nakon *S. mitis*. Nakon 24h inkubacije ploča, svi već formirani biofilmovi bili su izloženi ispitivanim supstancama u četiri koncentracije (4MIC, 2MIC, MIC i MIC/2). Kvantifikacija potencijala ulja u destrukciji biofilma izvršena je u skladu sa prethodno opisanom za jednospecijske biofilme.

Kako bi se razdvojio uticaj etarskih ulja na celokupnu biomasu od uticaja na bakterijske ćelije i utvrdilo da li postoji redukcija njihovog broja, vršeno je brojanje preživelih ćelija iz biofilma, kao i onih iznad biofilma (planktonskih, slobodno živećih ćelija). U ove svrhe, multispecijski biofilmovi su formirani u eppendorf tubama (Eppendorf, Hamburg, Nemačka) prema prethodno opisanoj shemi. Broj planktonskih ćelija dobijen je iz supernatanta, tako što su supernatanti premešteni u nove tubice, iz kojih je izvršeno zasejavanje alikvota od 100  $\mu$ L, iz razblaženja  $10^{-6}$  ( $10^{-7}$  razblaženje), na hranjive podloge. Za brojanje ćelija iz biofilma, nakon uklanjanja supernatanta je dodato 100  $\mu$ L dH<sub>2</sub>O u tubice, posle čega su tubice bile podvrgnute ultrazvuku u vremenskom trajanju od 5 minuta (Sonorex, Bandelin Electronic, Nemačka). Na ovaj način je razbijen biofilm i omogućeno je zasejavanje alikvota od 100  $\mu$ L razblaženja ( $10^{-6}$ ) na podloge. Nakon 72 h-inkubacije hranjivih podloga na 37°C, iz broja kolonija preračunat je broj preživelih ćelija.

U svim testovima procene uticaja etarskih ulja na biofilme za pozitivnu kontrolu testiran je TAP, dok je za procenu uticaja negativne kontrole analizirano delovanje emulgatora (DMSO, Tween 20/80), u kojima su ulja rastvarana, na formirane biofilme.

Kada je ispitano antibiofilmno delovanje etarskih ulja koje je detaljno opisano u ovom odeljku, postojala je tendencija da se uslovi testiranja približe kliničkoj praksi. Zato se radilo na formulisanju iriganasa zasnovanim na etarskim uljima i njihovom antibiofilmnom testiranju. Metodološka objašnjenja za ovo - „klinički-sličnije“ testiranje antibiofilmnog potencijala iriganasa zasnovanim na uljima su data u narednim redovima.

#### *Formulisanje iriganasa na bazi etarskih ulja, njihova karakterizacija i procena njihovog antibiofilmnog efekta na biofilm korenskih kanala*

Kako bi se omogućila primena etarskih ulja u eliminaciji biofilma unutar korenskih kanala, dizajnirani su irigansi zasnovani na odabranim etarskim uljima. Etarska ulja koja su na osnovu inicijalnog skrininga (opisanog u poglavlju *Ispitivanje delovanja etarskih ulja na bakterijske biofilme*), pokazala najviši antibakterijski potencijal bila su polazna osnova za dizajniranje novih iriganasa po sledećoj shemi: čista ulja su mešana sa 98% etanolom u jednakim zapreminskim

volumenima. Potom im je dodavana dH<sub>2</sub>O, tako da je ukupna zapremina iriganasa iznosila (6 mL). Zapremina ulja u ukupnoj zapremini irigansa je podešavana tako da koncentracija ulja odgovara vrednosti 10MIK, prethodno određenoj primenom mikrodilucionog testa. Kao pozitivna kontrola u testiranju ovih iriganasa korišćen je 1,5% NaOCl, jer se on standardno koristi za irigaciju mladih stalnih zuba u kliničkim uslovima.

U cilju fizičko-hemijske karakterizacije iriganasa na bazi etarskih ulja, oni su podvrgnuti ultrazvučnoj homogenizaciji u vremenu od 30min na 125 RPM (Ultrasonic homogenizers Sonopuls, Bandelin Electronic, Nemačka). Nakon toga su određivani veličina čestica i indeks polidisperzije (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK). Srednje vrednosti pomenutih parametara su dobijene prema intenzitet-vreme fluktuacijama laserskog snopa koji je pogađao uzorak pod uglom od 90° (Balta i sar., 2017).

Potom su ovako okarakterisani irigansi podvrgnuti mikrobiološkim testovima, u cilju procene njihovog potencijala u eliminaciji biofilma koji je formiran na prethodno pripremljenim korenskim kanalima ekstrahovanih zuba. Dva različita tipa biofilma su formirana u korenskim kanalima (biofilm *E. faecalis* kao i multispecijski biofilm sačinjen od *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis*).

Kako bi se procenio uticaj iriganasa zasnovanih na etarskim uljima na posmatrane biofilme korišćena je metoda *in situ* irigacije korenskih kanala.

Procena uspešnosti eliminacije bakterijskih biofilмова u korenskim kanalima izvađenih zuba - *in situ* irigacija korenskog kanala

*In situ* irigacija korenskog kanala je sprovedena po ugledu na metodu koju je opisao Souza i sar. (2018). Protokol je podrazumevao tri koraka: formiranje biofilma u korenskim kanalima, postupak irigacije kanala i kvantifikaciju preživelih bakterijskih ćelija.

Formiranje biofilмова u korenskim kanalima

Premolari ekstrahovani iz ortodontskih razloga dezinfikovani su u 2% rastvoru NaOCl i potom čuvani u fiziološkom rastvoru na sobnoj temperaturi do početka eksperimenta. Dijamantskom šajbom (Ortho Tehnology, USA) sa vodenim hlađenjem odvojen je krunični od korenskog dela zuba. Dužina korenskog kanala koja će biti hemo-mehanički obrađivana (radna dužina), utvrđivana je korišćenjem K # 10 turpija (Dentspli-Maillefer, Švajcarska), tako što je dužina iglice, dobijena kada se iglica pojavi na apikalnom foramenu, umanjena za 1mm. Korenski kanali su na ovako određenu radnu dužinu obrađivani ručnim turpijama veličine #15 - 70 (Dentspli-Maillefer, Švajcarska). Pre svake promene instrumenta, vršena je irigacija kanala sa 2 mL 2% NaOCl. Po završetku hemomehničke obrade kanala razmazni sloj je uklonjen, postavljanjem 1mL 15% etilendiamintetrasirćetne kiseline (EDTA, Natupharma, Brazil) u trajanju od 1min. Nakon toga, kanali su finalno ispirani sa 2 mL 2% NaOCl i 2 mL 0,85% NaCl, sušeni sterilnim papirnim poenima (ProTaper Universal, Dentspli-Maillefer, Švajcarska), a vrh svakog korena zatvaran je glas-jonomernim cementom (Fuji IX, GC, Japan). Nakon hemo-mehaničke obrade i sušenja kanala, a u cilju postizanja potpune sterilnosti, koreni su autoklavirani na 121°C u trajanju od 20 min.

Nakon autoklaviranja, svaki koren je pod sterilnim uslovima postavljan vertikalno u ependorf tubice. Kako bi se formirao biofilm soja vrste *E. faecalis*, na svakih 48h je u kanal dodavano 2x10<sup>4</sup> CFU *E. faecalis* u vremenskom periodu od 15 dana. Sličan pristup je korišćen kod formiranja multispecijskog biofilma u kanalima, s tim što su za potrebe formiranja mutispecijskog biofilma na

svakih 48h unošeni različiti izolati sledećim redom: inicijalno  $2 \times 10^4$  CFU *S. mitis*, 2h kasnije  $1 \times 10^4$  CFU *S. sanguinis*, i 30 min kasnije  $1 \times 10^4$  CFU *E. faecalis*. Kod mutipecijskog biofilma načinjena je i inicijalna kontrola sastava biofilma, u cilju verifikacije prisustva sve tri bakterije, 72 h nakon prvog zasejavanja u kanale. Verifikacija prisustva sve tri bakterije načinjena je kroz re-identifikaciju Maldi TOF-om. Nakon utvrđenog prisustva sva tri izolata unutar korenskog kanala, zadržana je ista periodičnost i dužina kultivacije kao i kod *E. faecalis* jednospecijskog biofilma (zasejavanje na 48h, 15 dana). Tokom celog perioda kultivacije svi korenski kanali su inkubirani na 37°C.

#### *In situ* irigacija i kvantifikacija broja preživelih bakterijskih ćelija

U cilju procene potencijala antibiofilmnog dejstva iriganasa koji sadrže etarska ulja, korišćena su dva nezavisna eksperimentalna pristupa. Prvi pristup je imao za cilj da proceni antibiofilmnu efikasnost samog irigansa, poređenjem iriganasa na bazi etarskih ulja sa 1,5% NaOCl. Drugi pristup u irigaciji je koncipiran da utvrdi da li se irigansi zasnovani na uljima mogu potencijalno koristiti kao dopuna standardnoj finalnoj irigaciji inficiranog korenskog kanala (**Tabela 7**). Drugi pomenuti pristup je procenjivao efikasnost iriganasa koji su sadržali ulja nakon primene 1,5% NaOCl i 0,85% NaCl. Oba pristupa su podrazumevala brojanje bakterija u uzorcima pre (S1-N/N') i posle irigacije (S2-N/N').

**Tabela 7.** Pristupi u testiranju iriganasa na bazi etarskih ulja.

			Primenjeni irigansi
	Pre irigacije	Posle irigacije	
Prvi pristup	S1-A	S2-A	1.5% NaOCl
	S1-B	S2-B	Irigans na bazi <i>T. zygis</i> etarskog ulja
	S1-C	S2-C	Irigans na bazi na <i>C. martinii</i> etarskog ulja
Drugi pristup	S1-A'	S2-A'	1.5% NaOCl, 0.85% NaCl
	S1-B'	S2-B'	1.5%NaOCl, 0.85% NaCl, Irigans na bazi <i>T. zygis</i> etarskog ulja
	S1-C'	S2-C'	1.5% NaOCl, 0.85% NaCl, Irigans na bazi <i>C. martinii</i> etarskog ulja

Određivanje broja bakterija iz korenskog kanala podrazumevalo je sledeće korake: (1) uzorkovanje iz kanala, papirnim poenom #30 u trajanju od 60s, (2) prebacivanje uzorka u tubicu koja je sadržala 1 000  $\mu$ L 0,85% NaCl, (3) odvajanje uzorkovanih bakterijskih ćelija sa papirnog poena i njihovu homogenizaciju u fiziološkom rastvoru, primenom ultrazvučnog kupatila u vremenu od 5min i (4) finalno zasejavanje na hranjive podloge alikvota od 100  $\mu$ L u razblaženjima ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  i  $10^{-4}$ ). Iz broja kolonija sa čvrstih hranjivih podloga preračunavan je broj ćelija, dok je procenat redukcije biofilma određen iz odnosa između broja ćelija pre i posle irigacije.

Kako bi se vizuelno potvrdio efekat iriganasa zasnovanih na etarskim uljima, izvršena je SEM mikroskopija korenških kanala.

*Skenirajuća Elektronska Mikroskopija (SEM) multispecijskih biofilmova u korenskim kanalima koji su tretirani irigansima na bazi etarskih ulja*

Korenski kanali su snimani SEM mikroskopom (model JEOL JSM-6610LV opremljen sa EDS, energetskim disperzivnim spektrometrom iz Oksforda Ks-Mak). U ove svrhe korenski kanali su podeljeni u dve polovine korišćenjem dijamantskog diska, potom su ove polovine korenskih kanala dezinfikovane i autoklavirane u skladu sa opisanim u odeljku: *In situ* irigacija i kvantifikacija broja preživelih bakterijskih ćelija. Sami multispecijski biofilmovi su formirani po shemi koja je objašnjena u odeljku: Formiranje biofilmova u korenskim kanalima), nakon čega su isti tretirani po shemi datoj u odeljku: *In situ* irigacija i kvantifikacija broja preživelih bakterijskih ćelija). Potom su svi uzorci sušeni na vazduhu i premazani zlatom pomoću BALTEC-SCD-005. Određivanje morfoloških karakteristika korenskih kanala, izvršeno je pod vakuumom, sa naponom ubrzanja elektronskog snopa od 20 kV.

Kada su kompletirani svi mikrobiološki testovi, razmišljalo se o bezbednosti primene etarskih ulja u eliminaciji biofilmova od značaja za pedijatrijsku endodonciju. Iz tog razloga, ulja su podvrgnuta testovima citotoksičnosti.

#### *Ispitivanje citotoksične aktivnosti etarskih ulja*

Citotoksičnost etarskih ulja je ispitivana testom redukcije tetrazolijumove soli (3-(4,5-dimetil(tiazol-2-il)-3,5-difenil-tetrazolijum-bromid), MTT). Test je zasnovan na metaboličkoj sposobnosti ćelija, kod kojih je prisutna aktivnost enzima sukcinat dehidrogenaze, da konvertuju tetrazolijumovu so, čiji je rastvor žute boje, u kristale formazana, intenzivne ljubičaste boje. Kolorimetrijsko očitavanje intenziteta ljubičaste boje, na 570 nm, služi za kvantifikaciju ćelijskog rasta. Za ispitivanje citotoksičnosti korišćena je MRC-5-kontrolna ćelijska linija fibroblasta pluća. Ćelije su gajene u DMEM medijumu sa dodatkom penicilina i streptomicina (koktel pen/str 100 mg/mL) i 10% fetalnog seruma na 37°C u CO<sub>2</sub> inkubatoru. Potom su zasejavane u 96-bunarne ploče i inkubirane 24 h na 37°C, u prisustvu 5% CO<sub>2</sub> (broj ćelija po bunariću iznosio je 2x10<sup>4</sup> ćelija). Nakon adherencije ćelije su tretirane serijama dvostrukih razblaženja ulja u koncentracionom opsegu od 0,0625-2 mg/mL. Izlaganje ćelija uljima je podeljeno u dva nezavisna pristupa. U prvom pristupu ćelije su bile u kontaktu sa uljima 30min, dok je u drugom slučaju vreme tog kontakta bilo 24h. Kao pozitivna kontrola u testiranjima, u okviru prvog pristupa korišćen je 1,5% NaOCl, dok je u drugom slučaju pozitivna kontrola bio TAP. Po ostvarivanju željenog vremena kontakta, medijum je uklanjan i dodavan je MTT rastvor (finalne koncentracije 0,5 mg/mL). Nakon dodavanja MTT rastvora, ploče su inkubirane dodatnih 3 h. Po isteku ovog vremena medijum je uklanjan i dodavan je DMSO. Optička gustina je merena na 570 nm, pomoću mikrolejt čitača (Multiskan FC, Thermo Scientific, Kina).

Procenat ćelijskog preživljavanja računat je po formuli:  $[OG_{\text{uzorak}} / OG_{\text{kontrola}}] \times 100$ , gde je OG-optička gustina ili apsorbanca, a optička gustina kontrole određena je za netretirane bunariće.

U cilju dobijanja relevantnih činjenica i pravilnog tumačenja rezultata iz ove doktorske disertacije, vršena je statistička obrada svih dobijenih rezultata u SpSS programu. Testovi koji su korišćeni bili su One Way ANOVA i T test nezavisnih uzoraka.

## REZULTATI I DISKUSIJA

### *Izolacija i identifikacija mikroorganizama poreklom iz inficiranog korenskog kanala i njihova kvantifikacija radi određivanja predominantnih vrsta*

U toku istraživanja, prema usvojenoj metodologiji, prikupljeno je 35 uzoraka iz 35 korenskih kanala mladih stalnih zuba, kod kojih je potvrđena dijagnoza apikalnog periodontitisa. Broj identifikovanih bakterijskih izolata iznosio je između 3 i 7 po kanalu. Ukupno je izolovano i identifikovano 148 sojeva bakterija. Svi sojevi su razvrstani u 45 vrsta, odnosno 22 roda. Od ovih sojeva formirana je kolekcija bakterijskih izolata. U cilju jasnijeg tabelarnog prikaza kolekcije, svi izolati podeljeni su na fakultativne i striktne anaerobe (**Tabela 8**).

Fakultativni anaerobi su po broju izolata dominirali u odnosu na striktne anaerobe, i izolovani su i identifikovani iz svih 35 uzoraka. Među njima najzastupljeniji su bili oni koji pripadaju rodovima *Streptococcus*, *Actinomyces* i *Enterococcus*. Konkretno, u okviru roda *Streptococcus*, najčešće izolovani bili su *S. mitis*/*S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis* i *S. gordonii*, dok su *A. odontolyticus* i *E. faecalis* bili dominantni predstavnici svojih rodova (**Tabela 8**).

Striktne anaerobe identifikovani su iz 27 uzoraka. Najčešće su izolovani predstavnici roda *Veillonella*, *Prevotella* i *Fusobacterium* i to sa visokom pojedinačnom učestalošću *V. parvula* i *F. nucleatum* (**Tabela 8**).

U cilju uočavanja povezanosti između bakterija i kliničke slike, analizirana je učestalost prisustva bakterija u kanalima sa simptomatskim, odnosno asimptomatskim apikalnim periodontitisima. Mladih stalnih zuba sa simptomatskim apikalnim periodontitisom bilo je 21 i iz njih je identifikovano 86 izolata. Zuba sa asimptomatskim apikalnim periodontitisom je bilo 14 i iz njih je identifikovano 62 izolata. Najčešće izolovani sojevi u obe ispitivane grupe bili su *V. parvula*, *S. mitis*/*S. oralis*, *S. salivarius*, *F. nucleatum* i *S. sanguinis*. Analizom bakterijskog sastava iz kanala mladih stalnih zuba sa simptomatskim apikalnim periodontitisom zapažena je učestalost striktnih anaeroba, *V. parvula* i *F. nucleatum*. Ovi anaerobi su takođe izolovani i iz zuba sa asimptomatskim apikalnim periodontitisom, ali je njihova zastupljenost u tim zubima bila manja. U cilju raspoznavanja izolata karakterističnih samo za zube sa simptomatskim apikalnim periodontitisom, uočena su dva striktna anaeroba *P. micra* i *P. buccae* i jedan fakultativni anaerob *S. constellatus*. Oni su izolovani i identifikovani iz inficiranih kanala sa prisutnom kliničkom slikom, dok ih u asimptomatskim slučajevima nije bilo (**Figura 2**), što može navesti na pretpostavku da bi navedene bakterije potencijalno mogle poslužiti kao markeri za zube sa simptomatskim apikalnim periodontitisom. Ipak, ovakavu hipotezu treba proveriti na mnogo većem uzorku, uz odgovarajuću statističku obradu podataka.

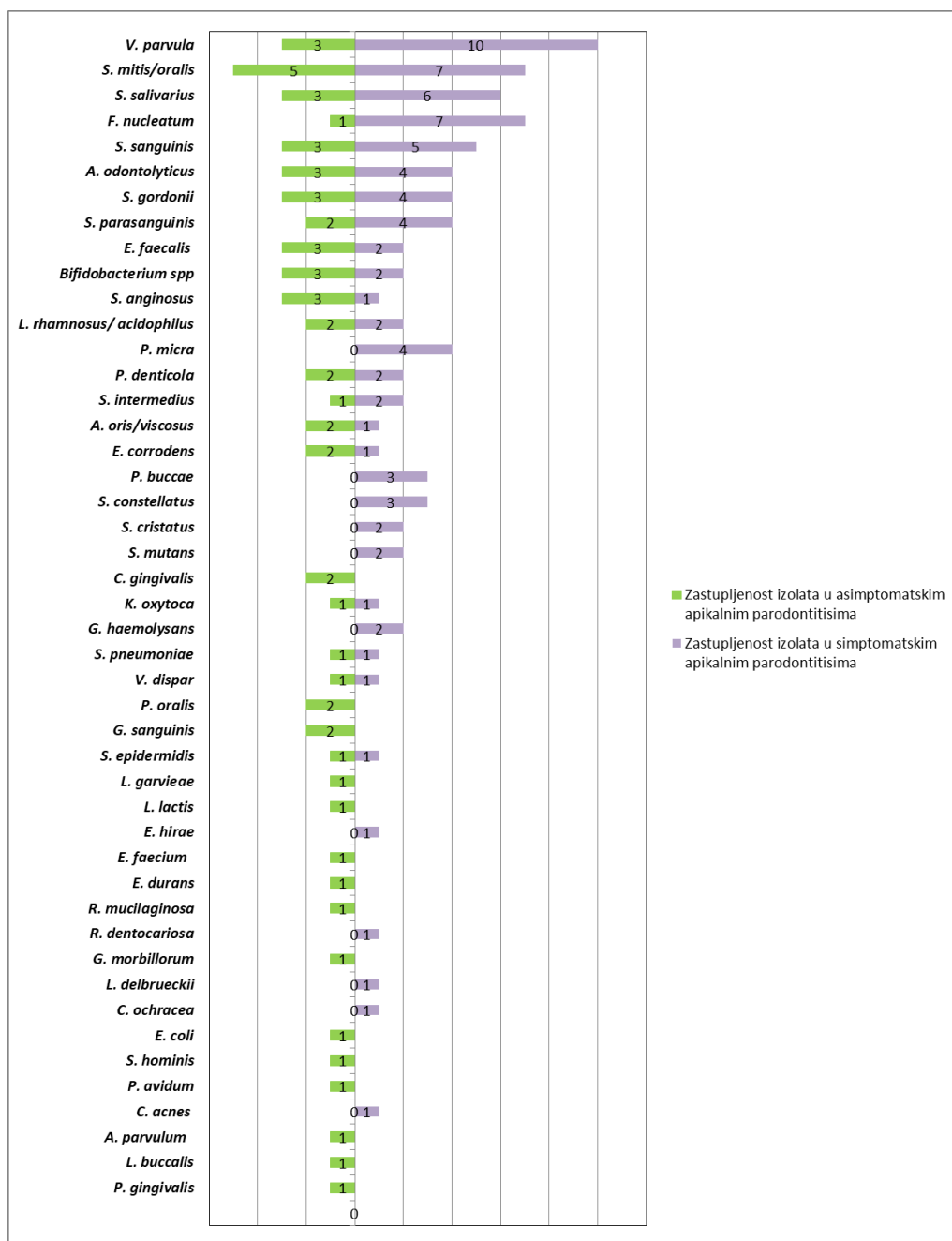


**Tabela 8.** Kolekcija bakterijskih izolata

<i>Fakultativni anaerobi</i>			<i>Striktne aneroberi</i>		
<i>Rod</i>	<i>Vrsta</i>	<b>broj izolata</b>	<i>Rod</i>	<i>Vrsta</i>	<b>broj izolata</b>
<i>Streptococcus</i>	<i>S. mitis/ S. oralis*</i>	12	<i>Veillonella</i>	<i>V. parvula</i>	13
	<i>S. salivarius</i>	9		<i>V. dispar</i>	2
	<i>S. sanguinis</i>	8	<i>Prevotella</i>	<i>P. buccae</i>	3
	<i>S. gordonii</i>	7		<i>P. denticola</i>	4
	<i>S. parasanguinis</i>	6		<i>P. oralis</i>	2
	<i>S. anginosus</i>	4	<i>Fusobacterium</i>	<i>F. nucleatum</i>	8
	<i>S. intermedius</i>	3		<i>Parvomonas</i>	<i>P. micra</i>
	<i>S. constellatus</i>	3	<i>Bifidobacterium</i>	**	5
	<i>S. cristatus</i>	2	<i>Propionibacterium</i>	<i>P. avidum</i>	1
	<i>S. mutans</i>	2	<i>Cutibacterium</i>	<i>C. acnes</i>	1
<i>S. pneumoniae</i>	2	<i>Atopobium</i>	<i>A. parvulum</i>	1	
<i>Actinomyces</i>	<i>A. odontolyticus</i>	7	<i>Leptotrihia</i>	<i>L. buccalis</i>	1
	<i>A. oris/ A. viscosus*</i>	3	<i>Porphyromonas</i>	<i>P. gingivalis</i>	1
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	5			
	<i>E. hirae</i>	1			
	<i>E. faecium</i>	1			
	<i>E. durans</i>	1			
<i>Gemella</i>	<i>G. haemolysans</i>	2			
	<i>G. sanguinis</i>	2			
	<i>G. morbillorum</i>	1			
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. rhamnosus/L. casei/L. acidophilus*</i>	4			
	<i>L. delbrueckii</i>	1			
<i>Eikenella</i>	<i>E. corrodens</i>	3			
	<i>C. ochracea</i>	1			
<i>Capnocytophaga</i>	<i>C. gingivalis</i>	2			
	<i>S. hominis</i>	1			
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. epidermidis</i>	2			
	<i>L. garvieae</i>	1			
<i>Lactococcus</i>	<i>L. lactis</i>	1			
	<i>R. mucilaginoso</i>	1			
<i>Rothia</i>	<i>R. dentocariosa</i>	1			
	<i>K. oxytoca</i>	2			
<i>Klebsiella</i>	<i>E. coli</i>	1			

\* ove vrste ne mogu biti razlikovane MALDI-TOF MS metodom.

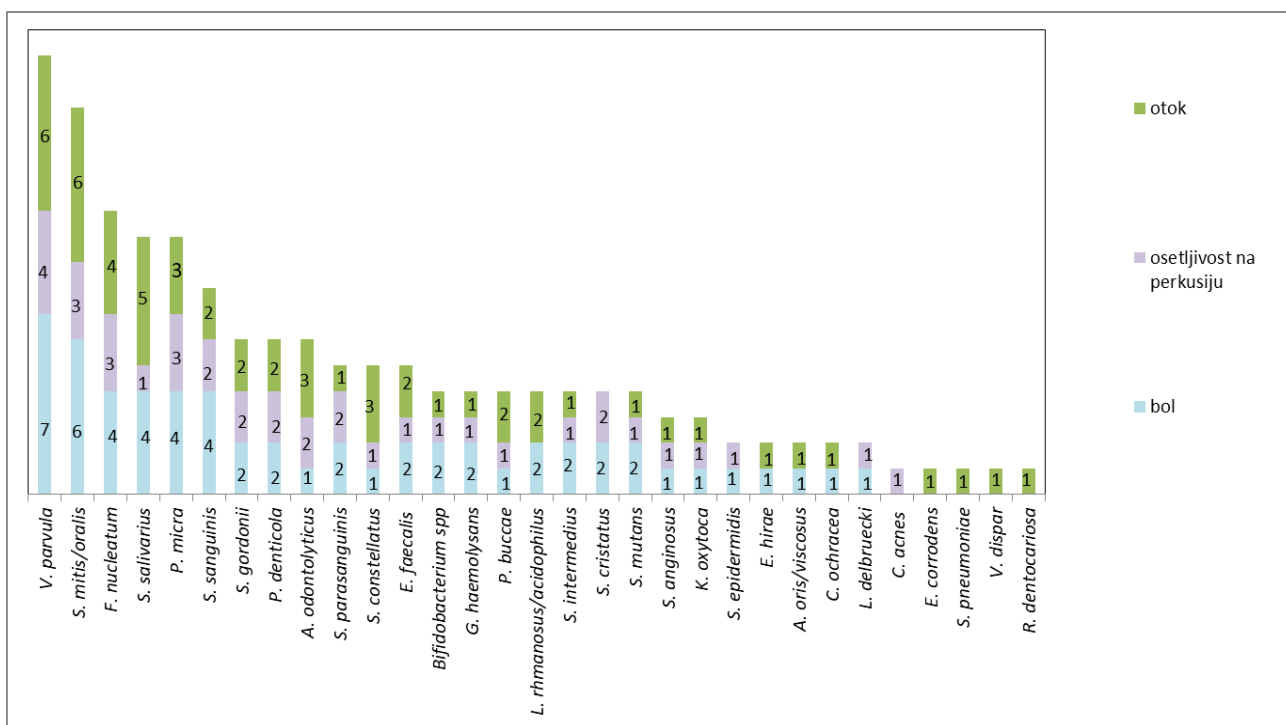
\*\* MALDI-TOF MS metodom nisu mogle biti identifikovane pojedinačne vrste u okviru roda *Bifidobacterium*



**Figura 2.** Distribucija izolata u asimptomatskim i simptomatskim korenskim kanalima

Definisanje veze između prisustva bakterija u kanalu i konkretnih kliničkih manifestacija, tj. kliničkih simptoma apikalnog periodontitisa, moglo bi biti od značaja za kliničku praksu. Na osnovu dobijenih rezultata u ovom istraživanju pokazana je povezanost između prisustva određenih bakterija u biofilmu korenskih kanala i jednog od tri klinička simptoma - bol, osetljivost na perkusiju i otok mekih tkiva. Ukupno 2/3 izolata u ovoj studiji moglo se povezati sa sva tri klinička simptoma (**Figura 3**), ali su takođe uočene i neke druge pravilnosti. U inficiranim korenskim kanalima zuba sa početnim fazama širenja infekcije van kanala, koje odlikuje bol i osetljivost zuba na perkusiju, detektovani su *S. cristatus*, *C. acnes*, *L. delbrueckii* i *S. epidermidis*. Iz kanala zuba, koje karakteriše progresija širenja

infekcije van kanala u meka tkiva (karakterističan klinički simptom otok mekih tkiva), bili su izolovani *S. pneumoniae*, *E. hirae*, *A. oris* / *A. viscosus*, *C. ochracea*, *R. dentocariosa*, *E. corrodens* i *V. dispar*.



**Figura 3.** Povezanost identifikovane vrste i kliničkog simptoma.

Svih 35 korenskih kanala iz kojih je vršeno uzorkovanje, a kod kojih je postavljena dijagnoza apikalnog periodontitisa, bilo je pozitivno na prisustvo bakterija. Svi ovi pacijenti imali su infekciju u kojoj su bakterije po prvi put kolonizovale kavum pulpe i proširile se van korenskih kanala. U momentu kada su ove infekcije prepoznate, 60% zuba je imalo infekciju praćenu kliničkom manifestacijom, bolom, osetljivošću na perkusiju ili otokom, dok je preostalih 14 zuba imalo asimptomatski apikalni periodontitis.

U cilju jednostavnije, ali i mikrobiološki uobičajenije analize bakterijskog sastava kanala, svi izolati su inicijalno razvrstani u odnosu na svoju aerotoleranciju na fakultativne i striktno anaerobe. Prikaz bakterija izolovanih iz kanala kroz njihovo razvrstavanje na fakultativne i striktno anaerobe koristili su mnogi istraživači (Ercan i sar., 2006, Cogulu i sar., 2008, Lysakowska i sar., 2015) i u skladu je sa sredinom kakva je u korenskim kanalima. U bakterijskoj kolekciji, koja je proizvod ove doktorske disertacije, dominiraju fakultativni anaerobi, što je u skladu sa studijom koju su sproveli Ercan i saradnici (2006). Najčešći izolati među fakultativnim anaerobima bili su predstavnici roda *Streptococcus*, što odgovara nalazima koje su prezentovali Siqueira i saradnici (2002), kao i Guimarães i saradnici (2012). Među striktnim anaerobima, koji su generalno manje zastupljeni, često su izolovani predstavnici bakterijske vrste *F. nucleatum* što potvrđuje i rezultat Guimarães i sar., (2012). Treba imati na umu da se prethodno navedeni literaturni podaci, o najčešće izolovanim sojevima iz roda *Streptococcus* i pripadnicima vrste *F. nucleatum*, odnose na korenske kanale odraslih pacijenata (Siqueira i sar., 2002, Guimarães i sar., 2012). Mikrobiološki sastav inficiranih korenskih mladih stalnih zuba do sada nije adekvatno ispitan. Samo jedna studija je ispitala mikrobiom korenskih kanala stalnih zuba dece, starosti do 13 godina (Cogulu et al., 2008), ne navodeći tada da li se radilo o

zubima sa nezavršenim rastom (mladim stalnim zubima). U toj studiji najčešće izolovan je bio enterokok (*Enterococcus faecalis*), što je u skladu sa visokom prevalencom istog i u ovoj studiji.

Veći broj različitih vrsta bakterija izolovan je i identifikovan iz zuba sa asimptomatskim apikalnim periodontitisom (35) u odnosu na simptomatske slučajeve (31), (**Figura 2**). Ovaj nalaz je jako interesantan obzirom na činjenicu da je ukupan broj simptomatskih inficiranih kanala bio 1,5 puta veći u odnosu na asimptomatske (60% simptomatskih, 40% asimptomatskih kanala). Ovo može indirektno ukazati na činjenicu da veliki broj različitih bakterija može živeti u biofilmu korenskog kanala bez izazivanja kliničkih tegoba. Takođe, u biofilmu se mogu naći i određeni sojevi čije prisustvo uslovljava ili ubrzava pojavu kliničke slike. S tim u vezi, fokus je bio usmeren upravo na sojeve čijem bi se prisustvu u biofilmu kanala mogli pridružiti pomenuti konkretni klinički simptomi. Ono što je do sada poznato je da veća zastupljenost anaeroba u inficiranim korenskim kanalima korelira sa kliničkim simptomima (Jacinito i sar., 2003), što je utvrđeno i u našoj studiji, pri čemu su posebno istaknuti *P. micra* i *P. buccae*. Iako su ova dva soja anaerobnih bakterija bila zastupljena samo u zubima sa simptomatskim apikalnim periodontitisom, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da je njihovo prisustvo direktno odgovorno za pojavu kliničkih simptoma. Međutim, možemo pretpostaviti da je prisustvo *P. micra* i *P. buccae*, u konzorcijumu sa drugim bakterijskim vrstama, dobra polazna osnova za dalja istraživanja o njihovom uticaju na klinički nalaz. Premda smo i mi, kao i mnogi autori pre nas, želeli da ispitamo da li postoji izvesna veza između identifikovanog soja u kanalu i konkretnih kliničkih simptoma, nismo uspeli da uočimo jasnu korelaciju. Iako su naši rezultati u saglasnosti sa navodom Al-Omari i Al-Samahi (2014), da je *A. viscosus* prepoznat kao izolat iz inficiranih kanala praćenih bolom i osetljivošću na kuckanje, dok su predstavnici roda *Veillonella* izolovani i identifikovani iz inficiranih kanala praćenih oticanjem, tek istraživanja na većem broju uzorka vodila bi pouzdanim tvrdnjama.

Uzorkovanje iz korenskih kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom imalo je za cilj formiranje kolekcije izolovanih bakterija za dalja istraživanja, a dobijeni rezultati analize bakterijskog sastava i njihova moguća povezanost sa kliničkom slikom interesantan su put za nastavak istraživanja. Obimnija epidemiološka studija će nam pomoći da razumemo i definišemo mikrobiološku osnovu inficiranih kanala naše populacije. Na ovaj način i naša saznanja će pomoći celokupnom boljem razumevanju uloge mikrobiologije u razvoju endodontske patologije.

Obzirom da ovo nije bio glavni cilj istraživanja, za dalje potrebe doktorata dobijeni rezultati bili su odlična osnova u selekciji izolata čija će osetljivost na odabrana etarska ulja biti ispitivana. Odabir etarskih ulja, kao i analiza njihovog hemijskog sastava, biće predmet interesovanja narednog odeljka.

#### *Odabir etarskih ulja na osnovu dostupnih podataka iz literature*

Etarska ulja korišćena u ovoj doktorskoj tezi odabrana su na osnovu detaljnog pregleda dostupne literature, iz koga su publikovana i dva pregledna rada o konstituentima etarskih ulja poznatim po efikasnosti protiv sojeva vrsta *S. sanguinis*, *S. salivarius* i *E. faecalis* (Bogojević et al., 2016; Marinković et al., 2019). Pregledi literature su uključivali pretragu originalnih radova sa podacima o hemijskom sastavu i efikasnosti ulja, izraženu kroz vrednosti MIK dobijene mikrodilucionom metodom. Radovi su pretraživani u indeksnim bazama Web of Science, Scopus i Medline. Takođe, pretraga podataka uključivala je i analizu dostupnih doktorskih disertacija sa sličnom tematikom. Prilikom pretraživanja, nije bilo vremenskog ograničenja, te su analizirani svi radovi publikovani između 1996. i 2017. godine. Ključne reči za pretragu bile su: *Streptococcus sanguinis/*

*Streptococcus sanguis* i „essential oil“; *S. sanguinis*/*S. sanguis* i „essential oil“, *S. sanguinis*/*S. sanguis* i „essent\* oil\*“, *Streptococcus salivarius* i „essential oil“, *S. salivarius* i „essential oil“, *S. salivarius* i „essent\* oil\*“, *Enterococcus faecalis* i „essential oil“, *E. faecalis* i „essential oil“, *E. faecalis* i „essent\* oil\*“.

Efikasnost etarskih ulja je namenski analizirana na predstavnicima vrsta *S. sanguinis*, *S. salivarius* i *E. faecalis*. Premda su inicijalno vrste *S. sanguinis* i *S. salivarius* bile odabrane zbog činjenice da su u pitanju inicijalni kolonizatori u biofilmu (Frias-Lopez & Duran-Pinedo 2012, Zhang i sar., 2015), njihovo prisustvo u kanalima sa apikalnim periodontitisom je više puta sugerisano (Rolph i sar., 2001, Jacinito i sar., 2003, Rôças & Siqueira 2012, Provenzano i sar., 2015, Lysakowska i sar., 2016). Autori ovog preglednog rada došli su do saznanja da je *S. sanguinis* vrsta koja je sposobna da penetrira u dentinske kanaliće u solidnoj dubini od 150 do 792 µm (Perez i sar., 1993, Berkiten i sar., 2000), što joj daje mogućnost da bude zaštićena od standardnih antimikrobnih sredstava primenjenih u terapiji inficiranih kanala (Matsuo i sar., 2003). Ovo su detaljno potvrdile studije koje su sproveli Sakamoto i sar., 2007 i Lew i sar., 2015; pokazujući da su predstavnici obe vrste *S. sanguinis* i *S. salivarius* otporni na hemomehaničku obradu kanala, ali i medikaciju. *E. faecalis* je takođe namenski odabran kao vrsta koja slovi za najrezistentniju intrakanalnu vrstu, o čemu jasno svedoče njegovi nalazi u zubima sa perzistentnim kanalnim infekcijama (Stuart i sar., 2006, Gomes i sar., 2008, Rôças & Siqueira, 2012, Abbaszadegan i sar., 2016). Njegova sposobnost da invadira dentinske tubule, zajedno sa činjenicom da je adaptabilan na izmene uslova u kanalu koje su za sojeve drugih vrsta letalne, čini ovog patogena izrazito problematičnim sa aspekta eradikacije standardnim terapeutima (Bogojević i sar., 2016).

Logika kojom smo se vodili podrazumevala je da selekcija ulja efikasnih na inicijalne kolonizatore, kao i na one za koje je jasno da su otporni na endodontsku terapiju, pruža nadu da će biti efikasni i za sve druge bakterije u inficiranom korenskom kanalu.

Pregledni radovi zasnovani na literaturnim podacima su ukazali da bi etarska ulja bogata oksigenovanim monoterpenima mogla biti efikasna protiv pomenutih bakterija, kao i to da bi ulja koja obiluju geraniolom, 1,8-cineolom i timolom mogla biti efikasnija od ulja u kojima dominiraju neki drugi oksigenovani monoterpeni.

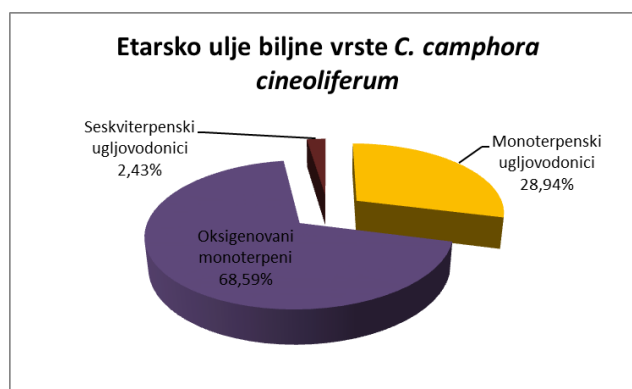
### *Hemijski sastav ispitivanih etarskih ulja*

Za potrebe ove disertacije, a na osnovu pomenutih preglednih radova, odabrano je devet etarskih ulja poreklom iz sledećih biljnih vrsta: *Cinnamomum camphora cineoliferum*, *Pelargonium graveolens*, *Pelargonium roseum*, *Leptospermum petersonii*, *Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca ericifolia*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* i *Thymus zygis*. Kako se hemijski sastav nekog etarskog ulja smatra direktno odgovornim za njegov antimikrobni potencijal (Dorman & Deans, 2000), a podrazumeva procentualnu zastupljenost svih pojedinačnih komponenti u tom ulju, prikaz sastava ulja testiranih u ovoj studiji dat je u **Tabelama 9-13**.

Hemijski sastav etarskog ulja lista *C. camphora cineoliferum* (poznatog kao Ravintsara ulje ili ulje kamfora sa Madagaskara) poreklom iz familije *Lauraceae*, prikazan je u **Tabeli 9**, dok se na **Figuri 4** može videti pripadnost identifikovanih komponenti ovog ulja određenim hemijskim klasama.

**Tabela 9.** Hemijski sastav etarskog ulja lista *C. camphora cineoliferum*.

Etarsko ulje biljne vrste		
RI	Komponente	<i>C. camphora cineoliferum</i> . % (m/m)
903.7	$\alpha$ -tujen	0,9
908.9	<b><math>\alpha</math>-pinen</b>	<b>5,5</b>
922.3	kamfen	0,2
947.7	<b>sabinen</b>	<b>15,3</b>
949.6	$\beta$ -pinen	3,2
968.0	mircen	1,3
992.5	$\alpha$ -terpinen	0,1
1002.1	<i>o</i> -cimen	0,3
1004.9	$\beta$ -felandren	0,9
1007.3	<b>1,8-cineol</b>	<b>59,5</b>
1026.0	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen	0,4
1034.6	$\gamma$ -terpinen	0,7
1044.9	<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,3
1063.6	terpinolen	0,2
1075.8	<i>trans</i> -sabinen hidrat	0,2
1099.0	<i>cis-para</i> -Menth-2-en-1-ol	0,1
1142.4	borneol	0,1
1144.3	$\delta$ -terpineol	0,5
1153.1	terpinen-4-ol	1,9
1168.3	<b><math>\alpha</math>-terpineol</b>	<b>6,1</b>
1362.4	$\beta$ -elemen	0,2
1387.0	<i>cis</i> -kariofilen	0,7
1448.4	dauca-5-8-dien	0,7
1453.9	$\gamma$ -gurjunen	0,2
<i>Suma identifikovanih komponenti</i>		99,96

**Figura 4.** Pripadnost identifikovanih komponenti ulja lista *C. camphora cineoliferum* određenim hemijskim klasama.

Analizom etarskog ulja lista *C. camphora cineoliferum* identifikovano je 27 komponenti koje zajedno predstavljaju 99,96% ulja. Među njima, najzastupljenija komponenta je bila 1,8-cineol, po kojoj je ova biljna vrsta i dobila, na svoj binomijalni latinski naziv, dodatak „*cineoliferum*“. Pored 1,8-cineola, dominantnim sadržajem izdvojili su se i sabinen >  $\alpha$ -terpineol >  $\alpha$ -pinen (**Tabela 9**). Pomenute četiri glavne komponente pripadale su ili grupi oksigenovanih monoterpena ili monoterpenskih ugljovodonika (**Figura 4**). U svojim istraživanjima, Guo i saradnici (2016) prikazuju etarsko ulje lista *Cinananomum camphora* kako obiluje kamforom (40,5%), dok je sadržaj 1,8-cineola bio značajno niži

(11,3%) u poređenju sa uljem u našim istraživanjima (59,9%). Međutim, u našim istraživanjima je korišćeno ulje Ravintsare, koje vodi poreklo od japanskog kamfora (*Cinnamomum camphora*), drvenaste biljke koja je na Madagaskar introdukovana početkom 18. veka, a čije je ulje iz lista vremenom i pod uticajem madagaskarske klime promenilo svoj sastav na način da je kamfor iz njega potpuno iščezao, a sadržaj 1,8- cineola je porastao na oko 60%, koliko ga ima i u ulju koje smo mi koristili (**Tabela 9**). Otuda se ovo ulje drugačije zove ulje lista kamfora cineolnog hemotipa (Marković, 2011).

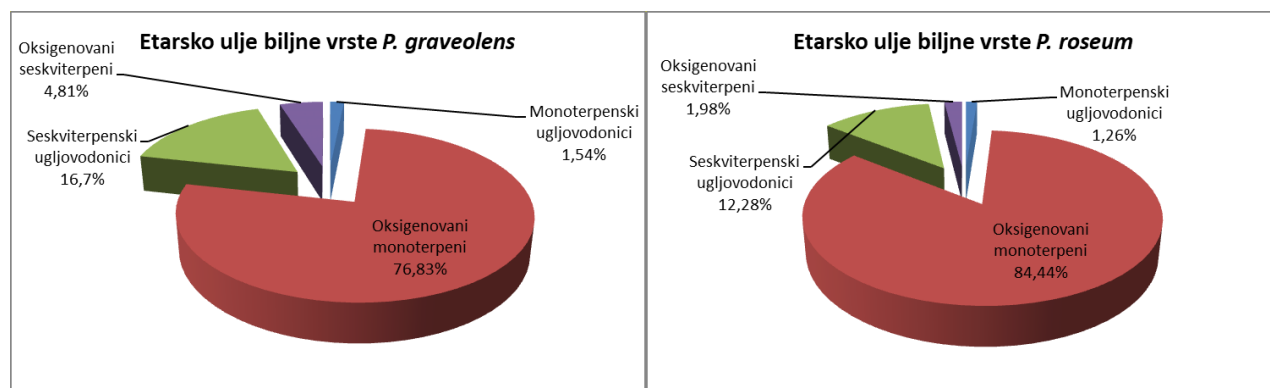
U **Tabeli 10** uporedno je prikazan hemijski sastav dva etarska ulja dobijenih iz listova i cvetnih grančica jedne iste biljne vrste, *Pelargonium graveolens*. Fina razlika u hemijskom sastavu ova dva etarska ulja posledica je činjenice da je *Pelargonium roseum* (sin. *Pelargonium graveolens* var. *roseum*) posebna sorta koja raste samo na ostrvu Reunion.

Analizom hemijskog sastava pomenuta dva ulja identifikovano je ukupno 46 odnosno 42 komponente, što je činilo 99,88% odnosno 99,96% ukupnog sastava redom navedenih ulja (**Tabela 10**). Dominantna hemijska klasa u oba ulja bila je klasa oksigenovanih monoterpena (**Figura 5**), dok su dominantne komponente (sadržaja >10%) u oba ulja bile redom, citronelol > geraniol > citronelil formijat, pri čemu su sadržaji ovih komponenti u ulju *P. roseum* bili uvek nešto viši (**Tabela 10**) i u skladu sa sadržajima koji propisuje važeći ISO standard koji definiše kvalitet oba ulja (ISO 4731:2006).

**Tabela 10.** Hemijski sastav etarskih ulja listova i cvjetnih drški *P. graveolens* i *P. roseum*.

RI	Komponente	Etarsko ulje biljne vrste	
		<i>P. graveolens</i>	<i>P. roseum</i>
		% (m/m)	
909	$\alpha$ -pinen	0,6	0,5
950	sabinen		0,2
969	mircen	0,1	
980	$\alpha$ -felandren	0,3	
1002	<i>p</i> -cimen		0,2
1004	limonen		0,3
1005	silvestren	0,4	
1007	1,8-cineol		0,1
1017	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen	0,2	
1046	<i>cis</i> -linalol oksid (furanoid)	0,3	0,1
1080	<b>linalool</b>	<b>5,6</b>	4,4
1088	<i>cis</i> -roze oksid	1,1	0,8
1104	<i>trans</i> -roze oksid	0,5	0,3
1129	menton	1,4	1,7
1139	<b>izo-menton</b>	<b>6,4</b>	1,8
1161	<i>izo</i> -mentol	0,2	
1170	$\alpha$ -terpineol	0,4	0,3
1209	<b>citronelol</b>	<b>26,4</b>	<b>30,7</b>
1219	neral	0,5	0,7
1235	<b>geraniol</b>	<b>14,6</b>	<b>16,3</b>
1252	<b>citronelil formijat</b>	<b>10,7</b>	<b>16,2</b>
1257	neril formijat	0,3	0,3
1278	<b>geranil formijat</b>	<b>5,4</b>	<b>8,1</b>
1325	$\alpha$ -kubeben	0,5	
1329	citronelil acetat	0,3	0,6
1346	$\alpha$ -kopaen	0,4	1,0
1350	geranil acetat		0,2
1354	$\beta$ -burbonen	1,6	0,7
1362	$\beta$ -elemen	0,3	
1387	<i>cis</i> -kariofilen	1,5	1,2
1397	$\beta$ -kopaen	0,1	0,1
1405	$\alpha$ - <i>trans</i> -bergamoten	0,3	
1407	$\alpha$ -guaien	0,9	0,9
1416	aromadendren	0,6	0,5
1418	<b>6,9-guaiadien</b>	<b>7,4</b>	<b>5,6</b>
1421	$\alpha$ -humulen		0,3
1445	<i>cis</i> -muurola-4(14),5-dien		0,1
1449	dauca-5,8-dien	1,0	
1450	$\gamma$ -gurjunen		0,3
1450	geranil propanoat	0,5	0,7
1451	$\gamma$ -muurolen		0,1
1473	$\alpha$ -muurolen	0,3	0,1
1482	$\gamma$ -kadinen	1,3	0,2
1486	geranil izobutanoat	0,3	0,1
1492	$\delta$ -kadinen	0,4	1,1
1499	citronelil butanoat	0,5	0,1
1510	furopelargon A	1,1	0,6
1511	$\alpha$ -kalakoren	0,1	
1532	geranil butanoat	1,4	0,8
1550	kariofilen oksid	0,2	0,2
1562	2-fenil etil tiglat	1,5	
1573	geranil izovalerat	0,2	
1635	<i>cis</i> -citronelil tiglat		0,3
1638	<i>trans</i> -citronelil tiglat	0,4	
1672	geranil tiglat	1,4	0,8
<i>Suma identifikovanih komponenti</i>		99,88	99,96





**Figura 5.** Pripadnost identifikovanih komponenti etarskih ulja iz vrsta *P. graveolens* i *P. roseum* određenim hemijskim klasama.

Sastav etarskog ulja biljne vrste *P. graveolens*, korišćenog u ovoj studiji, u skladu je sa rezultatima Sharopov i sar. (2014), a koji kao najzastupljenije komponente navode citronelol (37,5%) i geraniol (6,0%), dok su u istraživanju Szutt i sar. (2020) to bile citronelol (44,62%), citronelil formijat (14,42%) i geraniol (10,73%).

Analizom sastava etarskih ulja izolovanih iz listova biljnih vrsta *Leptospermum petersonii*, *Eucalyptus citriodora* i *Melaleuca ericifolia*, iz familije *Myrtaceae*, identifikovano je 26, 29, i ponovo 29 komponenti, koje su ukupno predstavljale 99,85%, 99,63% i 100% sadržaja redom navedenih ulja (**Tabela 11**).

Iako potiču iz listova biljnih vrsta iste familije i evidentno je da imaju značajan broj istih komponenti u svom sastavu, sadržaji ovih komponenti između ulja se dosta razlikuju.

Etarsko ulje lista biljne vrste *L. petersonii*, takođe poznato i kao ulje Limunskog čajevca, poreklom je iz Australije. Obzirom da kvalitet ovog ulja nije propisan međunarodnim ISO standardom, prema propisu Australijske agencije NOA (Native Oils Australia) sadržaj karakterističnih komponenti ovog ulja bi trebalo da iznosi: citral B + A (neral + geranial) (55-75%), citronelal (min. 12%), citronelol (do 4%) i geraniol (do 2%). Sa minimalnim odstupanjima (nešto viši sadržaji citronelola i geraniola) bilo je i ulje korišćeno u našim istraživanjima. Slično tome, bilo je i ulje korišćeno u istraživanju Van Vuuren i sar. (2014), u kome su sadržaji karakterističnih komponenti bili na donjoj granici (geranial  $34,1 \pm 3,3\%$  + neral  $19,7 \pm 1,6\%$ , citronelal  $11,4 \pm 4,3\%$ ).

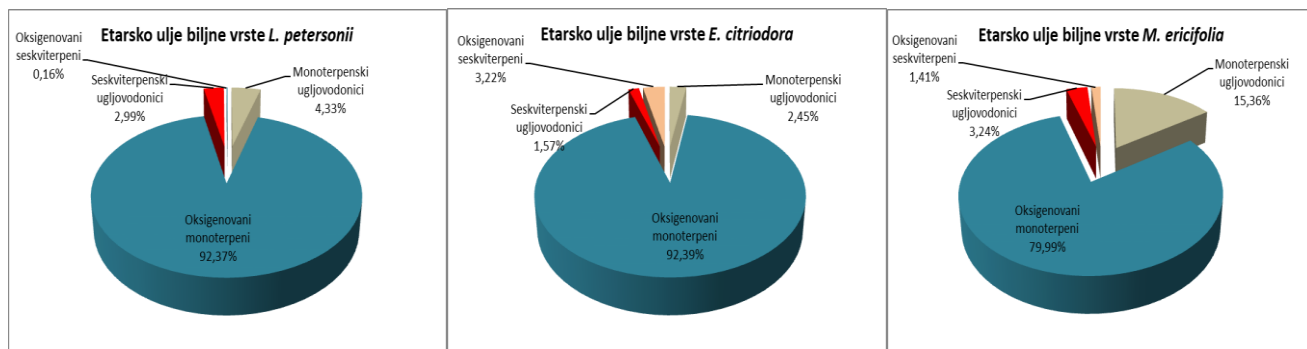
Međunarodni ISO standard (SO3044:1997) za ulje lista *E. citriodora* propisuje sledeći sadržaj karakterističnih komponenti: citronelal (min. 75%) i *neo*-izopulegol + izopulegol zajedno (max. 10%). Analiza hemijskog sastava ulja lista *E. citriodora*, korišćenog u našoj studiji, ukazuje da njegov kvalitet odgovara propisu (**Tabela 11**). U svom radu, Gbenou i sar. (2012) prikazali su da sadržaj citronelala u ovom ulju može biti i znatno viši (83,50%), dok je sadržaj *neo*-izopulegola + izopulegola bio u skladu sa standardom (1,90+4,40%).

**Tabela 11.** Hemijski sastav etarskih ulja listova biljnih vrsta *L. petersonii*, *E. citriodora* i *M. ericifolia*.

RI	Komponente	Etarsko ulje biljne vrste		
		<i>L. petersonii</i>	<i>E. citriodora</i> % (m/m)	<i>M. ericifolia</i>
904	$\alpha$ -tujen		0,2	0,1
909	$\alpha$ -pinen	1,5	0,8	<b>12,0</b>
922	kamfen			0,1
950	sabinen	0,2		
950	$\beta$ -pinen	1,6	0,1	0,5
966	dehidro-1,8-cineol	0,9		
969	mircen	0,5	0,1	0,1
1002	<i>p</i> -cimen	0,3	0,1	1,5
1004	limonen	0,1	0,3	1,1
1007	1,8-cineol	0,1	0,1	<b>26,0</b>
1017	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen		0,3	
1033	bergamal		0,2	
1035	$\gamma$ -terpinen	0,1	0,2	
1047	<i>p</i> -menta-3,8-dien		0,3	
1050	<i>cis</i> -linalol oksid (furanoid)		0,8	
1063	<i>p</i> -menta-2,4(8)-dien		0,1	
1066	<i>trans</i> -linalol oksid (furanoid)		0,7	
1080	linalool	4,3		<b>49,1</b>
1088	<i>cis</i> -roze oksid		0,1	
1104	<i>trans</i> -roze oksid	0,2		
1114	<i>dihidro</i> -linalol			0,2
1121	<b>izopulegol</b>	<b>5,2</b>	<b>6,1</b>	
1123	<i>trans</i> -verbenol			0,1
1130	<b>citronelal</b>	<b>15,3</b>	<b>74,1</b>	
1131	<i>izo</i> -izopulegol	0,3	4,1	
1142	borneol			0,1
1151	<i>neo</i> - <i>izo</i> izopulegol		0,2	
1154	terpinen-4-ol	2,2		0,3
1160	<i>trans</i> -izocitral	0,2		
1170	$\alpha$ -terpineol			2,5
1176	$\gamma$ -terpineol			0,2
1209	<b>citronelol</b>	<b>5,3</b>	4,6	
1219	<b>neral (citral-B)</b>	<b>23,5</b>		
1235	<b>geraniol</b>	2,7		
1248	<b>geranial (citral-A)</b>	<b>31,9</b>		
1315	<i>8</i> -hidroksi- <i>neo</i> -mentol		0,9	
1329	citronelil acetat	0,3	1,3	
1341	<i>10</i> -undekanol		0,6	
1362	$\beta$ -elemen	0,8		
1372	fenil etil izobutanoat			0,1
1379	$\alpha$ -gurjunen			0,1
1392	4,8- $\alpha$ -epoksi-kariofilen	0,2		
1390	<i>trans</i> -kariofilen	0,8	1,4	
1399	$\beta$ -gurjunen			0,1
1416	aromadendren			1,8
1421	$\alpha$ -humulen		0,1	
1450	$\gamma$ -gurjunen	1,3		0,5
1452	germakren D		0,1	
1464	viridifloren			0,2
1482	$\gamma$ -kadinen	0,1		
1529	germakren B			0,4
1548	spatulenol			0,6
1550	kariofilen oksid		3,2	
1554	palustrol			0,5
1561	viridiflorol			0,2
1592	rozifoliol			0,1
<i>Suma identifikovanih komponenti</i>		99,85	99,63	100

Etarsko ulje lista vrste *M. ericifolia*, poznato kao ulje Rosalina, takođe potiče iz Australije. Obzirom da ni njegov kvalitet nije propisan međunarodnim ISO standardom, propis Australijske agencije NOA navodi da bi sadržaji dominantnih komponenti ovog ulja trebalo da bude sledeći: linalol (40-43%), 1,8-cineol (17-19%) i  $\alpha$ -pinen (7-8%). Iste ove komponente su dominantne u ulju korišćenom u našim istraživanjima, mada su sadržaji sve tri navedene komponente bili nešto viši (**Tabela 11**), zajedno čineći 87,1% ulja. Viši sadržaj linalola (56,2%), a niži 1,8-cineola (13,3%) i  $\alpha$ -pinena (6,6%) u ulju *M. ericifolia*, u odnosu na standard, prikazali su i Brophy i Doran (2001).

Određene sličnosti su uočene u hemijskom sastavu ulja vrsta *E. citriodora* i *L. petersonii*. Oba ova ulja su obilovala aldehydima. Za poslednja tri ulja koja vode isto poreklo (Australija), primećuje se da su se glavne komponente u uljima *E. citriodora* i *L. petersonii* razlikovale od glavnih u ulju *M. ericifolia*, ali su sve pripadale hemijskoj klasi oksigenovani monoterpeni. Udeo pomenute hemijske klase kod ulja *L. petersonii* i *E. citriodora* bio je gotovo identičan, dok je kod *M. ericifolia* bio nešto niži (**Figura 6**).



**Figura 6.** Pripadnost identifikovanih komponenti etarskih ulja listova vrsta *L. petersonii*, *E. citriodora* i *M. ericifolia*, određenim hemijskim klasama.

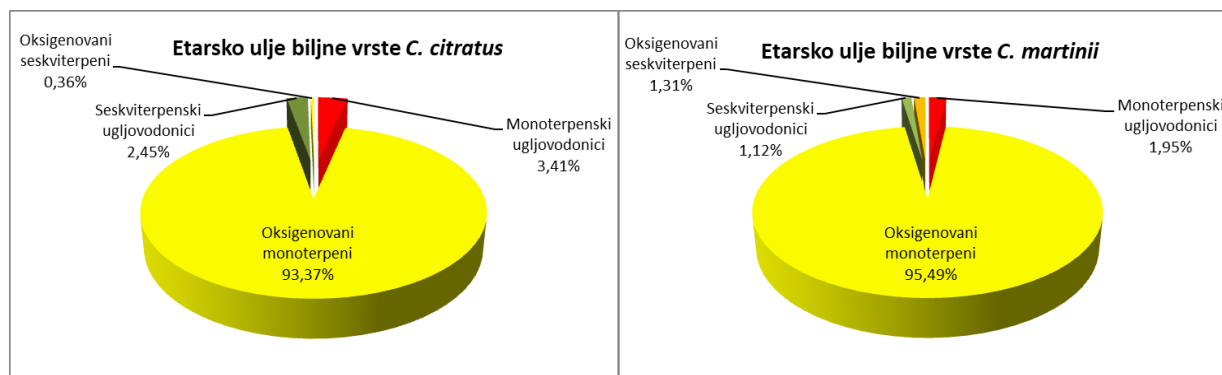
Hemijski sastav dva etarska ulja iz nadzemnog dela biljaka u cvetu, *Cymbopogon citratus* i *Cymbopogon martinii*, koje pripadaju familiji *Poaceae*, prikazan je uporedno u **Tabeli 12**. Analizom ulja *C. citratus* identifikovano je 19, a ulja *C. martinii* 15 komponenti, koje predstavljaju 99,59% odnosno 99,87% sadržaja redom navedenih ulja. Iako su poreklom iz istog roda i iste familije, sastav ova dva ulja se u velikoj meri razlikuje.

Međunarodni ISO standard za ulje iz listova biljne vrste *C. citratus* (ISO3217:1974), koje je takođe poznato i kao ulje Limunske trave, prepoznaje kao glavne komponente citrale A i B (geranial + neral), a njihov bi sadržaj trebalo da je u opsegu 65-85%. Ulje korišćeno u našim istraživanjima odgovara ovom propisu (**Tabela 12**). Međunarodni ISO standard (ISO4727:1988) za ulje nadzemnog dela biljke *C. martinii* u cvetu, poznato i kao ulje Palmaroze, ne propisuje normativ za opseg variranja komponenti koje su u njemu sadržane, već ulja ove biljne vrste razlikuje na osnovu njihovog porekla. Obzirom da je glavna komponenta ovog ulja uvek geraniol, a opseg njegovog sadržaja je 74-86%, konstatujemo da je ulje korišćeno u našim istraživanjima propisanog kvaliteta (**Tabela 12**). Osim geraniola, geranil acetat je bila druga glavna komponenta našeg ulja, a što je slično sastavu ulja u

istraživanjima Siddiqui i Garg (1990), i Raina i sar. (2003). Dalja analiza oba naša ulja *C. citratus* i *C. martinii* pokazala je da su oksigenovani monoterpeni bili visokozastupljena hemijska klasa (**Figura 7**).

**Tabela 12.** Hemijski sastav etarskih ulja nadzemnog dela biljke u cvetu vrsta *C. citratus* i *C. martinii*.

RI	Komponente	Etarsko ulje biljne vrste	
		<i>C. citratus</i>	<i>C. martinii</i>
		% (m/m)	
904	$\alpha$ -tujen	1,2	
923	kamfen	1,7	
968	mircen		0,2
1004	limonen	0,6	0,1
1007	1,8-cineol	0,9	
1017	<i>cis</i> - $\beta$ -ocimen		0,3
1027	<i>trans</i> - $\beta$ -ocimen		1,3
1080	linalool	1,6	1,5
1133	citronelal	0,5	
1142	izoborneol	0,5	
1163	<i>trans</i> -izocitral	1,7	
1170	$\alpha$ -terpineol	0,6	
1197	<i>cis</i> -karveol	0,7	
1210	citronelol	0,4	
1218	<b>neral</b> (citral-B)	<b>31,6</b>	0,4
1237	<b>geraniol</b>	<b>5,9</b>	<b>83,5</b>
1248	<b>geranial</b> (citral-A)	<b>45,7</b>	1,5
1279	geranil format		0,2
1360	<b>geranil acetat</b>	3,3	<b>8,4</b>
1387	<i>cis</i> -kariofilen	1,4	1,1
1422	$\alpha$ -humulen	0,4	
1482	$\gamma$ -kadinen	0,7	
1533	geranil butanoat		0,1
1551	kariofilen oksid	0,4	0,1
1721	<i>2Z,6E</i> -farnesol		0,7
1692	geranil tiglat		0,5
<i>Suma identifikovanih komponenti</i>		99,59	99,87



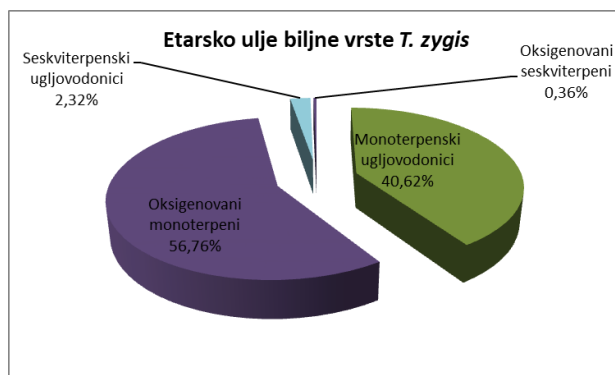
**Figura 7.** Pripadnost identifikovanih komponenti etarskih ulja biljnih vrsta *C. citratus* i *C. martinii*, određenim hemijskim klasama.

Etarsko ulje vršnih delova vrste *Thimus zygis* u cvetu, koja pripada familiji *Lamiaceae*, raste uglavnom u Španiji, pa je po tome poznato kao ulje španskog timijana. Kvalitet ovog ulja propisuje međunarodni ISO standard (ISO14715: 2010), po kome je glavna komponenta ovog ulja timol (37-55%), a među ostalim komponentama koje ga karakterišu su redom, *p*-cimen (14-28%),  $\gamma$ -terpinen (4-11%), linalool (3-6,5%) i karvakrol (0,5-5,5%). Iz utvrđenog hemijskog sastava ulja vrste *T. zygis*, kojeg smo koristili u našim istraživanjima (**Tabela 13**), vidi se da je ono bilo približno standardnog kvaliteta, iz razloga što je sadržaj timola bio neznatno niži od donje granice propisanog opsega ove komponente, dok su sadržaji ostalih propisanih komponenti bili zadovoljavajući. Slično, u istraživanju Rota i sar. (2008), sadržaj svih pomenutih komponenti je bio zadovoljavajuć, izuzev sadržaja *p*-cimena koji je bio nešto niži.

**Tabela 13.** Hemijski sastav etarskog ulja nadzemnog dela biljne vrste *T. zygis*.

Etarsko ulje biljne vrste <i>T. zygis</i>		
RI	Komponente	% (m/m)
904	$\alpha$ -tujen	0,4
909	$\alpha$ -pinen	1,9
923	kamfen	2,5
928	tuja-2,4(10)-dien	0,4
950	$\beta$ -pinen	0,2
968	mircen	2,5
980	$\alpha$ -felandren	0,1
985	$\delta$ -3-karen	0,2
985	<i>iso</i> -silvestren	0,1
993	$\alpha$ -terpinen	1,3
1002	<b><i>p</i>-cimen</b>	<b>24,1</b>
1004	limonen	0,8
1007	1,8-cineol	0,5
1035	<b><math>\alpha</math>-terpinen</b>	<b>5,8</b>
1045	<i>cis</i> -sabinen hidrat	0,3
1064	terpinolen	0,3
1077	<i>trans</i> -sabinen hidrat	0,4
1080	<b>linalol</b>	<b>5,5</b>
1119	kamfor	2,6
1143	borneol	4,5
1154	terpinen-4-ol	1,2
1170	$\alpha$ -terpineol	0,5
1174	<i>cis</i> -dihidro karvon	0,2
1186	verbenon	0,1
1211	timol, metil etar	0,2
1220	karvakrol, metil etar	0,4
1259	bornil acetat	0,1
1283	<b>timol</b>	<b>35,0</b>
1291	<b>karvakrol</b>	<b>5,2</b>
1329	timol acetat	0,1
1387	<i>cis</i> -kariofilen	1,8
1406	aromadendren	0,1
1422	$\alpha$ -humulen	0,1
1469	$\alpha$ -muurolen	0,1
1482	$\gamma$ -kadinen	0,1
1491	$\delta$ -kadinen	0,2
1551	kariofilen oksid	0,4
<i>Suma identifikovanih komponenti</i>		99,97

Dalja analiza ulja biljne vrste *T. zygis* pokazala je da su oksigenovani monoterpeni, a potom i monoterpeni ugljovodonici vodeće dve hemijske klase jedinjenja ovog ulja (**Figura 8**).



**Figura 8.** Pripadnost identifikovanih komponenti etarskog ulja nadzemnog dela biljne vrste *T. zygis* određenim hemijskim klasama.

Ulje biljne vrste *T. zygis* je, pored ulja vrste *C. camphora cineoliferum*, drugo od devet ispitivanih ulja koje je u svom sastavu pored oksigenovanih monoterpena u značajnoj meri sadržavalo i monoterpenke ugljovodonike. Sva ostala ulja testirana u ovoj studiji u najvećoj meri bila su sačinjena od komponenata koje dominantno pripadaju klasi oksigenovanih monoterpena, što nam je i bila namera prilikom odabira ulja sa kojima ćemo raditi istraživanja. Sa druge strane nisu sva ulja obilovala svim željenim komponentama. Komponenta 1,8-cineol je ulazila u sastav ulja vrsta *C. camphora cineoliferum* i *M. ericifolia*, komponenta geraniol u sastav ulja vrsta *P. graveolens*, *P. roseum* i *C. martinii*, dok je ulje vrste *T. zygis* obilovalo timolom. Preostala tri ulja (*E. citriodora*, *L. petersonii* i *C. citratus*) bila su bogata citronelalom i citralima A + B (geranialom + neralom).

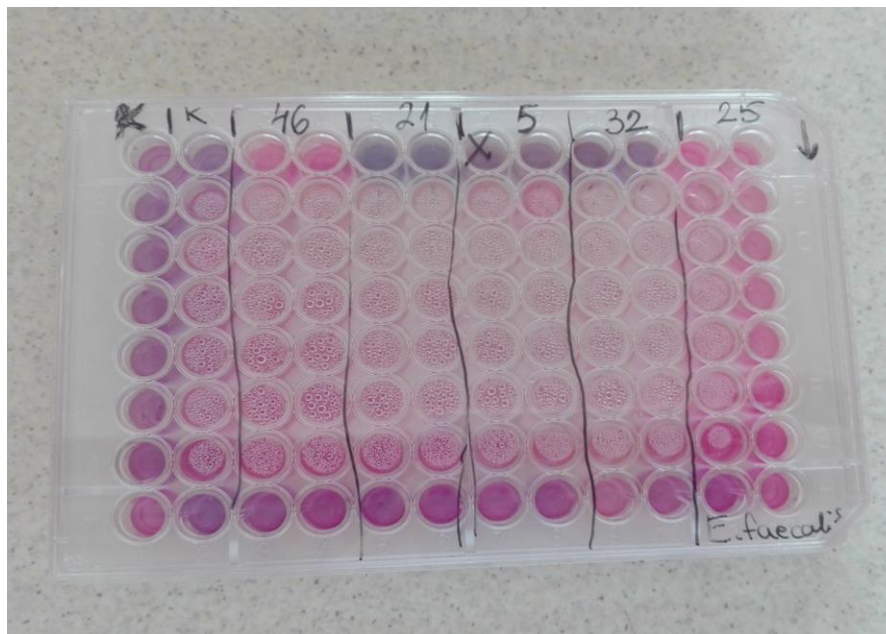
Sada kada smo se detaljno upoznali sa odabranim etarskim uljima i njihovim sastavom, naredni odeljak biće posvećen pregledu njihovog antibakterijskog potencijala, kroz prikaz ostvarenog cilja 3.

#### *Određivanje minimalnih inhibitornih (MIK) i baktericidnih koncentracija (MBK) etarskih ulja na predominantnim bakterijskim izolatima i ATCC sojevima*

U cilju inicijalne procene antibakterijske efikasnosti etarskih ulja, vršeno je mikrodiluciono određivanje MIK i MBK na predominantnim bakterijskim izolatima i referentnim ATCC sojevima. Na ovaj način je *in vitro* izvršena procena antibakterijskog efekta ispitivanih ulja na slobodno živeće bakterijske ćelije (planktonske bakterijske ćelije), nakon 24h tretmana (**Slika 12**). Vrednosti minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije etarskih ulja poređene su sa vrednostima ovih koncentracija dobijenim nakon izlaganja istih izolata pozitivnoj kontroli (TAP) u istom opservacionom periodu. Dobijeni rezultati prikazani su u **Tabeli 14 A-C**, i izraženi su u mg/mL

U **Tabeli 14A** date su vrednosti MIK i MBK za sva ulja i TAP, kada je njihovo dejstvo testirano na kliničkim izolatima fakultativnim anaerobima, i to predstavnicima vrsta *S. mitis/S. oralis*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. parasanguinis*, *S. anginosus*, *S. gordonii* i *E. faecalis*. Tabela **14B** prikazuje vrednosti MIK i MBK kada su delovanju ulja i pozitivne kontrole bili podvrgnuti ATCC sojevi (*S. salivarius*

ATCC 9222, *S. sanguinis* ATCC 10556, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. faecalis* ATCC 19433, *V. parvula* ATCC 10790 i *F. nucleatum* ATCC 25586), kao i klinički izolovani striktni anaerobi vrsta *P. denticola*, *P. buccae* i *P. oralis*. **Tabela 14C** prikazuje prosečne vrednosti za MIK i MBK za svako testirano ulje, sračunate iz ostvarenih MIK i MBK vrednosti na svim testiranim bakterijskim sojevima.



**Slika 12.** Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije testiranih ulja - izgled mikrotitracione ploče 96 sistem nakon 24h inkubacije (Marinković J.)

**Tabela 14A.** Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije etarskih ulja i TAP na izolatima - fakultativnim anaerobima (mg/mL (SR ± SD))

Ulje / izolat	<i>C. camphora cineoliferum</i>		<i>M. ericifolia</i>		<i>E. citriodora</i>		<i>P. roseum</i>		<i>P. graveolens</i>		<i>L. petersonii</i>		<i>C. citratus</i>		<i>C. martinii</i>		<i>T. zygis</i>		TAP	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<b>StM</b>	16.40 ±0.00	32.80±0.00	11.70 ±0.00	23.35±0.00	14.35±5.00	28.75 ±9.95	8.15±1.25	16.35±2.55	11.15±0.00	22.25±0.00	5.80±1.25	11.60±2.50	3.00±0.65	6.00±1.30	1.30±0.65	2.60±1.25	1.00±0.00	2.30±0.00	0.05±0.00	0.10±0.00
<b>StSI</b>	11.25 ±0.00	22.50±0.00	2.65±0.30	5.25±0.60	5.15±5.00	7.25±6.65	13.77±0.69	18.60±5.00	5.55±0.00	11.10±0.00	4.30±0.75	5.80±1.00	1.25±0.40	1.65±0.55	1.30±0.65	2.60±1.25	0.45±0.15	0.90±0.35	0.03±0.00	0.06±0.00
<b>StSI2</b>	18.45 ±5.00	37.50±10.00	3.80±0.90	4.10±1.75	1.80±1.35	2.60±1.75	9.30±3.20	18.60±6.40	5.55±0.00	11.10±0.00	1.80±0.55	3.00±0.25	1.65±0.00	2.20±0.00	1.55±0.50	3.10±1.00	0.60±0.05	0.85±0.30	0.03±0.00	0.06±0.00
<b>StSI3</b>	14.85 ±2.40	22.50±0.00	2.75±0.25	3.80±1.75	2.15±0.00	2.15±0.00	11.15±3.75	18.60±5.00	1.10±0.00	2.20±0.00	3.30±0.00	5.45±1.10	0.80±0.00	1.10±0.00	0.75±0.35	1.35±0.85	0.60±0.00	1.15±0.00	0.04±0.01	0.08±0.03
<b>StSI4</b>	0.95±0.50	1.75±0.75	4.00±1.80	7.30±4.40	1.00±0.00	4.30±0.00	2.25±0.00	4.45±0.00	0.50±0.00	1.10±0.00	1.15±0.80	2.30±1.60	2.20±0.00	4.40±0.00	4.45±0.00	8.90±0.00	0.45±0.15	0.90±0.35	0.10±0.03	0.20±0.06
<b>StSn1</b>	11.15 ±5.50	15.00±5.00	13.65 ±2.60	23.35 ±0.00	3.40±1.30	6.85±2.65	5.55±3.75	11.55±7.45	11.10±0.00	22.20±0.00	1.85±0.95	3.15±1.55	1.65±0.00	2.20±0.00	4.05±0.50	7.40±1.95	0.65±0.50	1.25±1.05	0.03±0.00	0.06 ±0.00
<b>StSn3</b>	22.50 ±0.00	37.50±10.00	23.35 ±7.80	38.95±1.04	9.35±0.95	18.70 ±1.90	11.15±0.00	22.30±0.00	11.10±0.00	22.20±0.00	4.70±1.30	9.40±2.65	0.15±0.10	0.35±0.10	2.95±0.95	5.90±1.95	0.75±0.25	1.55±0.15	0.03 ±0.00	0.06 ±0.00
<b>StSn4</b>	22.50 ±0.00	37.50±10.00	4.35±1.45	8.75±2.90	5.75±3.35	11.50 ±6.70	5.40±3.85	10.80±7.70	1.45±0.00	2.90±0.00	1.00±0.60	2.00±1.20	1.80 ±0.95	3.50±2.00	3.70±1.00	5.95±2.00	0.65±0.50	1.25±1.05	0.04 ±0.01	0.08 ±0.03
<b>StSn5</b>	15.95 ±8.75	31.90±17.50	23.35 ±7.80	38.95±1.04	9.35±0.95	18.70 ±1.90	7.55±1.25	11.15±0.00	22.25±0.00	44.50±0.00	5.25±0.85	10.50±1.70	2.40±0.70	4.80±0.50	3.70±1.00	7.40±2.00	0.45±0.15	0.90±0.30	0.03 ±0.00	0.06 ±0.00
<b>StPn</b>	16.40 ±0.00	32.80±0.00	11.70 ±0.00	23.40±0.00	17.25±0.00	34.50 ±0.00	8.20±1.30	16.35±2.55	11.10±0.00	22.25±0.00	5.80±1.25	11.60±2.50	4.05±2.30	8.10±4.60	4.45±0.00	8.90±0.00	1.55±0.65	3.10±1.35	0.05 ±0.00	0.10 ±0.00
<b>StAn</b>	16.40 ±0.00	32.80±0.00	11.70 ±0.00	23.40±0.00	17.25±0.00	34.50 ±0.00	8.20±1.30	16.35±2.55	11.10±0.00	22.25±0.00	5.80±1.25	11.60±2.50	4.80±1.20	9.60±2.45	1.30±0.65	2.60±1.25	0.95±0.35	1.95±0.65	0.05 ±0.00	0.10 ±0.00
<b>StGo</b>	16.40 ±0.00	32.80±0.00	9.75±3.35	19.50±6.65	17.25±0.00	34.50 ±0.00	8.20±1.30	16.35±2.55	11.10±0.00	22.25±0.00	5.80±1.25	11.60±2.50	3.70±1.25	6.35±2.30	4.45±0.00	8.90±0.00	1.95±0.65	3.85±1.35	0.05 ±0.00	0.10 ±0.00
<b>EF1</b>	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	0.50±0.00	1.00±0.00	0.12±0.00	0.25±0.00	0.06±0.00	0.12±0.00	0.08±0.00	0.16±0.00
<b>EF2</b>	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	0.06±0.00	0.12±0.00	0.12±0.00	0.25±0.00	0.08±0.00	0.16±0.00
<b>EF3</b>	8.00±0.00	16.00±0.00	4.00±0.00	8.00±0.00	8.00±0.00	16.00 ±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	2.00±0.00	4.00±0.00	0.25±0.00	0.50±0.00	1.00±0.00	2.00±0.00	0.08±0.00	0.16±0.00

Lista skraćena : StM-*S. mitis*/S. *oralis*, StSI-izolati vrste *S. salivarius*, StSn- izolati vrste *S. sanguinis*, StPn - *S. parasanguinis*, StAn- *S. anginosus*, StGo- *S. gordonii*, EF- *E. faecalis*,



**Tabela 14B.** Minimalne inhibitorne i baktericidne koncentracije etarskih ulja i TAP na ATCC sojeve - fakultativne anaerobe, kliničke izolate i ATCC sojeve- striktno anaerobe (mg/mL (SR ± SD))

Ulje/ izolat	<i>C. camphora cineoliferum</i>		<i>M. ericifolia</i>		<i>E. citriodora</i>		<i>P. roseum</i>		<i>P. graveolens</i>		<i>L. petersonii</i>		<i>C. citratus</i>		<i>C. martinii</i>		<i>T. zygis</i>		TAP	
	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
<i>Sl AT</i>	1.35± 0.00	2.80± 0.00	9.35± 0.00	18.70± 0.00	0.08 ±0.03	0.16± 0.05	1.50± 0.75	3.00± 1.50	0.35± 0.10	0.70± 0.20	0.50± 0.00	1.10± 0.00	0.20± 0.10	0.40± 0.20	0.55± 0.00	1.10± 0.00	0.10± 0.03	0.20± 0.05	0.05± 0.00	0.10 ±0.00
<i>Sn AT</i>	4.65± 1.25	9.35± 2.55	10.15 ±5.20	14.00± 6.25	1.60± 0.00	3.25± 0.00	1.35± 0.60	2.70± 1.15	2.20± 0.00	4.40± 0.00	1.10± 0.00	2.20± 0.00	0.90 ± 0.30	1.85± 0.50	1.10± 0.00	2.20± 0.00	0.30± 0.15	0.65± 0.32	0.04 ± 0.01	0.08 ± 0.03
<i>EF AT 29</i>	4.00± 0.00	8.00± 0.00	1.00± 0.00	2.00± 0.00	0.50± 0.00	1.00± 0.00	1.00± 0.00	2.00± 0.00	2.00± 0.00	4.00± 0.00	2.00± 0.00	4.00± 0.00	1.00± 0.00	2.00± 0.00	0.12± 0.00	0.25± 0.00	0.12± 0.00	0.25± 0.00	0.08± 0.00	0.16± 0.00
<i>EF AT 19</i>	4.00± 0.00	8.00± 0.00	2.00± 0.00	4.00± 0.00	2.00± 0.00	4.00± 0.00	1.00± 0.00	2.00± 0.00	1.00± 0.00	2.00± 0.00	2.00± 0.00	4.00± 0.00	0.50± 0.00	1.00± 0.00	0.12± 0.00	0.25± 0.00	0.12± 0.00	0.25± 0.00	0.04± 0.00	0.16± 0.00
<i>Pr.De</i>	16.15 ±0.00	32.30 ± 0.00	2.50± 0.00	5.00± 0.00	19.60 ± 0.00	39.20 ± 0.00	0.65± 0.00	1.25± 0.00	10.20 ± 0.00	20.40 ± 0.00	1.25± 0.00	2.50± 0.00	2.50± 0.00	5.00± 0.00	0.65± 0.00	1.25± 0.00	0.65± 0.00	1.30± 0.00	0.02± 0.00	0.04± 0.00
<i>Pr. Bu</i>	5.00± 0.00	10.00 ± 0.00	5.30± 0.00	10.60± 0.00	5.00± 0.00	10.10 ± 0.00	5.05± 0.00	10.10 ± 0.00	5.00± 0.00	10.00 ± 0.00	5.00± 0.00	10.00 ± 0.00	5.00± 0.00	10.00 ± 0.00	0.30± 0.00	0.60± 0.00	1.30± 0.00	2.60± 0.00	0.02± 0.00	0.04± 0.00
<i>Pr. Or</i>	4.55± 0.00	9.10± 0.00	5.30± 0.00	10.60± 0.00	4.90± 0.00	9.75± 0.00	1.25± 0.00	2.55± 0.00	2.55± 2.45	5.15± 4.90	10.00 ± 0.00	20.00 ± 0.00	3.35± 1.45	6.75± 2.90	0.60± 0.00	1.25± 0.00	2.60± 0.00	5.20± 0.00	0.03± 0.00	0.06± 0.00
<i>Ve. Pa AT</i>	4.55± 0.00	9.10± 0.00	0.65± 0.00	1.35± 0.00	4.90± 0.00	9.80± 0.00	1.25± 0.00	2.55± 0.00	2.55± 2.45	5.15± 4.90	0.62± 0.00	1.24± 0.00	0.70± 0.55	1.35± 1.00	0.30± 0.00	0.60± 0.00	0.35± 0.30	0.70± 0.55	0.02± 0.00	0.04± 0.00
<i>Fu.Nu AT</i>	1.25± 0.00	2.55± 0.00	0.65± 0.00	1.35± 0.00	1.20± 0.00	2.40± 0.00	0.30± 0.00	0.60± 0.00	0.65± 0.00	1.25± 0.00	1.00± 0.35	2.05± 0.75	1.25± 0.00	2.50± 0.00	0.65± 0.00	1.25± 0.00	0.65± 0.00	1.30± 0.00	0.03± 0.00	0.06± 0.00

Lista skraćenica : *Sl AT*- *S. salivarius* ATCC 9222, *SnAT*-*S. sanguinis* ATCC 10556, *EFAT29*- *E. faecalis* ATCC 29212, *EFAT19*- *E. faecalis* ATCC 19433, *Pr.De* - *P. denticola*, *Pr. Bu* - *P. buccae*, *Pr. Or* - *P. oralis*, *Ve. Pa AT*- *V. parvula* ATCC 10790, *Fu.NuAT*-*F. nucleatum* ATCC 25586.

**Tabela 14C.** Prosečne ostvarene vrednosti MIK i MBK za sva etarska ulja i pozitivnu kontrolu, na testiranim sojevima (mg/mL).

Ulje biljne vrste																		Pozitivna kontrola	
<i>C. camphora cineoliferum</i>		<i>M. ericifolia</i>		<i>E. citriodora</i>		<i>P. roseum</i>		<i>P. graveolens</i>		<i>L. petersonii</i>		<i>C. citratus</i>		<i>C. martinii</i>		<i>T. zygis</i>		TAP	
MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK	MIK	MBK
10,13	20,47	7,79	13,73	6,41	12,5	5,69	10,44	5,37	10,75	3,13	6,41	2,02	4,13	1,80	3,43	0,73	1,44	0,05	0,1

Rezultati antibakterijskog ispitivanja devet testiranih etarskih ulja pokazuju da se njihov antibakterijski potencijal može prikazati u sledećem rastućem nizu u odnosu na ostvarene prosečne vrednosti MIK: *C. camphora cineoliferum* (MIK= 10,13 mg/mL) < *M. ericifolia* (MIK= 7,79 mg/mL) < *E. citriodora* (MIK= 6,41 mg/mL) < *P. roseum* (MIK= 5,69 mg/mL) < *P. graveolens* (MIK= 5,37 mg/mL) < *L. petersonii* (MIK= 3,13 mg/mL) < *C. citratus* (MIK= 2,02 mg/mL) < *C. martinii* (MIK= 1,80 mg/mL) < *T. zygis* (MIK= 0,7 mg/mL). Dobijene vrednosti MBK su u proseku bile dvostruko više od izračunatih vrednosti MIK. Vrednosti MIK i MBK pozitivne kontrole bile su niže od MIK i MBK testiranih etarskih ulja (**Tabela 14C**).

Među svim ispitivanim uljima, etarska ulja vrsta *C. camphora cineoliferum*, *M. ericifolia*, *P. roseum* i *C. martinii* pokazala su sličnu aktivnost; njihov antibakterijski potencijal je bio bolji kada su delovali na kliničke izolate striktnih anaeroba u odnosu na kliničke izolate fakultativnih anaeroba. Ispitivani sojevi iz ATCC kolekcije, bilo da su oni fakultativni ili striktni anaerobi, bili su osetljiviji na delovanje etarskih ulja u odnosu na kliničke izolate, s tim što je ponovo osetljivost striktnih anaeroba bila veća u odnosu na osetljivost fakultativnih. Upravo suprotno delovanje ostvarilo je etarsko ulje vrste *E. citriodora* čiji je antibakterijski potencijal bio jači kada je ulje delovalo na kliničke izolate fakultativnih anaeroba. Takođe, ATCC sojevi striktnih anaeroba bili su manje osetljivi od ATCC sojeva fakultativnih anaeroba kada su bili podvrgnuti dejstvu ovog ulja. Inhibitorni (i baktericidni) efekat etarskih ulja vrsta *P. graveolens* i *C. citratus* bio je jači na kliničke izolate striktnih anaeroba u odnosu na kliničke izolate fakultativnih anaeroba, kao i na referentne sojeve fakultativnih anaeroba. Antibakterijski potencijal etarskog ulja biljne vrsta *L. petersonii* bio je suprotan u odnosu na potencijal ulja *P. graveolens* i *C. citratus*; bolji kada je ulje delovalo na kliničke izolate fakultativnih anaeroba i na striktno anaerobe ATCC kolekcije. Najefikasnije etarsko ulje biljne vrste *T. zygis*, pokazalo je uniformniji efekat u odnosu na aerotoleranciju sojeva, ali se može naglasiti da su referentni ATCC sojevi bili osetljiviji na dejstvo ovog ulja u odnosu na kliničke (**Tabele 14A i 14B**).

Uopšteno, može se primetiti da su sva ulja efikasnije delovala na referentne ATCC sojeve u odnosu na posmatrane kliničke izolate. Takođe se može primetiti da su ulja niže efikasnosti delovala bolje na kliničke izolate striktnih anaeroba, dok su ulja više antibakterijske efikasnosti pokazala viši potencijal inhibicije delujući na fakultativne kliničke anaerobe. Za razliku od ovoga najefikasnije ulje vrste *T. zygis* je ostvarilo gotovo uniforman efekat bez obzira da li su klinički izolati bili striktni ili fakultativni anaerobi. Uniforman efekat je imala i pozitivna kontrola - TAP (**Tabele 14A i 14B**).

Daljom analizom primećeno je da su dva etarska ulja vrsta *C. camphora cineoliferum* i *M. ericifolia* pokazala najlošiji antibakterijski potencijal (**Tabele 14A i 14B**). Antibakterijski potencijal oba ova ulja je po prvi put ispitivan u okviru ove doktorske teze. Nešto bolji antibakterijski učinak u odnosu na prethodno opisana dva ulja imalo je ulje vrste *E. citriodora* sa prosečnom minimalnom inhibitornom koncentracijom oko 6,50 mg/mL. Antibakterijsko dejstvo ulja *E. citriodora* testirali su Mulyaningsih i saradnici (2011), na referentnom soju *E. faecalis* (ATCC 51299), gde je MIK bio viši od 4 mg/mL. Osetljivost naših referentnih sojeva *E. faecalis* (ATCC 29212 i ATCC 19433) odgovara postignutoj MIK nižoj od 4 mg/mL. Kako je reč o različitim referentnim sojevima, razlika u njihovoj osetljivosti nije bila iznenađujuća. Takođe, poređenjem hemijskog sastava ulja koje su testirali Mulyaningsih i saradnici (2011) (citronelal 90,07% i citronelol 4.32% sadržaja ulja) i ulja testiranog u ovom radu (**Tabela 11**), možemo uočiti da su glavne komponente bile iste, ali ne i njihova zastupljenost u ulju. Razlika u prikazanim MIK vrednostima mogla bi se povezati i sa razlikama u sastavu dva ulja. Slično se može zaključiti i poređenjem antibakterijskog dejstva ulja vrste *E. citriodora* koji su prikazali Luqman i saradnici (2008) sa našim rezultatima. Autori su naveli da je MIK >10

mg/mL kada je dejstvu ulja vrste *E. citriodora* izložen klinički izolat *E. faecalis*. Osetljivost naših kliničkih izolata bila je 2mg/mL i 8mg/mL. Slabiji antimikrobni potencijal ulja bi se možda mogao pripisati činjenici da je ulje koje su Luqman i saradnici (2008) testirali imalo značajno manje citronelala (57%) a više citronelola (15,89%) od ulja testiranog u našim eksperimentima (**Tabela 11**).

Sledeće po antibakterijskom potencijalu bilo je etarsko ulje Bourbonskog geranijuma (*P. roseum*). Prosečna bakteriostatička vrednost ovog ulja iznosila je 5,69 mg/mL. Boukhris i saradnici (2012) su takođe ispitivali dejstvo ulja vrste *P. roseum*, sa sadržajem istih glavnih komponenti citronelol (21,93%), geraniol (11,07%), citronelil formijat (13,24%), geranil formijat (6,22%) koje je imalo i istoimeno ulje korišćeno u ovom radu (**Tabela 10**). Boukhris i saradnici (2012) su testirali efekat ulja na referentne ATCC sojeve, koji su po svojoj aerotoleranciji fakultativni anaerobi (*P. aeruginosa* ATCC 15442, *E. coli* ATCC 10536 i *S. aureus* ATCC 6538). Fakultativni anaerobi koje su ispitivali su pokazali nešto slabiju osetljivost na dejstvo etarskog ulja u odnosu na fakultativne anaerobe referentnih sojeva koji su prikazani u našim rezultatima; MIK opseg za navedene fakultativne anaerobe bio je između 1,76 i 3,52 mg/mL (Boukhris i sar., 2012), dok je kod nas bio između 1,35±0,60 i 1,50±0,75 mg/mL.

Ulje *P. graveolens* je bilo sličnog sastava etarskom ulju *P. roseum*, sa finim razlikama u zastupljenosti istih komponenata (**Tabela 11**). Poređenjem antibakterijske aktivnosti ova dva ulja možemo primetiti da je ulje vrste *P. graveolens* pokazalo bolje dejstvo na kliničke izolate striktnih anaeroba u odnosu na ulje *P. roseum*. Osetljivost ostalih razmatranih sojeva bila je poredbena između dva ulja. Lysakowska (2015) je testirala ulje *P. graveolens* na kliničke izolate i odgovarajuće referentne sojeve *E. faecalis*. Osetljivost sojeva *E. faecalis* je bila od velikog značaja i za naša istraživanja. Lysakowska (2015) je prikazala MIK 1,8-4,5 mg/mL za izolate i MIK 2,25 mg/mL za referentne sojeve *E. faecalis*. MIK vrednosti prikazane u našoj studiji bile su dva puta niže od onih koje je predstavila Lysakowska (2015). Interesantno je zapaziti da je i u našoj studiji i u studiji koju je sprovedla pomenuta autorka testirana osetljivost istog referentnog soja (*E. faecalis* ATCC 29212), a da se vrednosti MIK razlikuju. Ovo još jednom potvrđuje da čak i mala odstupanja u sastavu ulja imaju dalekosežne posledice na njegov antibakterijski učinak.

Sledeće po inhibitornom potencijalu bilo je etarsko ulje biljne vrste *L. petersonii*. Ovo etarsko ulje bilo je bogato komponentama geranial 31,9%, neral 23,5%, citronelal 15,3%, citronelol 5,3%, izopulegol 5,2% i linalol 4,3% i ostvarilo je prosečan bakteriostatički efekat u vrednosti od 3,16 mg/mL. Ulje sličnog sastava testirali su Van Vuuren i saradnici (2014) i prikazali MIK vrednosti 8 mg/mL kada je dejstvu tog ulja izlagan *E. faecalis* ATCC 29212. U našoj studiji MIK vrednost je bila četiri puta niža (2mg/mL), sugerišući još jednom uticaj razlike u sastavu ulja na antibakterijski efekat. Takođe, Nikolić (2015) u svom radu prikazuje osetljivost kliničkih oralnih izolata *S. salivarius*, *S. sanguinis* i *E. faecalis* na dejstvo ulja vrste *L. petersonii*. Dobijene MIK vrednosti iznosile su 0,06 mg/mL za *S. salivarius* i *S. sanguinis*, dok je osetljivost *E. faecalis* bila viša (MIK= 0,01mg/mL). Sve prikazane vrednosti bile su niže od predstavljenih u našoj studiji (**Tabela 14A**). Kako je sadržaj glavnih komponenti tog ulja bio vrlo sličan sadržaju u našem ulju (geranial 32,9%, neral 22,2%, citronelal 21,1% i citronelol 8,5%), razlika u dobijenim inhibitornim vrednostima bi se mogla objasniti različitom osetljivošću izolata dobijenih iz zubnog kanala i sa bukalne sluzokože.

Jedno od boljih ulja sa aspekta njegovog antibakterijskog učinka bilo je ulje vrste *C. citratus*, koje je obilovalo citralima A i B; sadržaj citrala A (geraniala) je bio 45,7% a citrala B (nerala) 31,6%. Geraniol je bio zastupljen sa 5,9%. Za ulje ovakvog hemijskog sastava prosečna minimalna inhibitorna koncentracija iznosila je oko 2 mg/mL. Osetljivost oralnih kliničkih izolata na dejstvo ulja vrste *C.*

*citratu* bilo je predmet izučavanja i Khongkhunthian i saradnika (2008), koji su pokazali da su ostvarene MIK vrednosti na *Actinomyces naeslundii* i *Porphyromonas gingivalis* bile redom 0,44 i 0,22 mg/ml, što ukazuje na veću osetljivost tih izolata u odnosu na naše (**Tabela 14A**).

Etarsko ulje visokog sadržaja geraniola (83,5%) i geranil acetata (8,4%) bilo je drugo testirano ulje poreklom iz familije *Cymbopogon*, *C. martinii*. Ujedno ovo je i bilo jedno od dva najefikasnija ulja testirana u našoj studiji. Etarsko ulje sastava sličnog našem testirali su Murbach Teles Andrade i saradnici (2018) na izolate striktnog anaeroba *P. acnes*, pri čemu je ono ostvarilo bakteriostatičku vrednost u opsegu od 0,7 mg/mL do 1,6 mg/mL. Naši anaerobi su generalno bili osetljiviji, sa MIK opsegom 0,30 - 0,65mg/mL.

Sa prosečnom inhibitornom vrednosti od 0,73 mg/mL, etarsko ulje biljne vrste *T. zygis*, bogato timolom (35%),  $\alpha$ -terpinenom (5,8%), linalolom (5,5%) i karvakrolom (5,2%), predstavljalo je najefikasnije etarsko ulje u ovoj studiji. Ballester-Costa i saradnici (2013) su takođe ispitivali ulje biljne vrste *T. zygis*, ali je ono bilo nešto drugačijeg hemijskog sastava. Konkretno, bilo je bogato timolom (48,59%), p-cimenom (18,79%) i  $\alpha$ -terpinenom (8,31%), i ispoljilo je efikasnost na fakultativne anaerobe u MIK opsegu 1,87-7,5  $\mu$ L/mL ( $\approx$ 1,87 mg/mL i 7,5 mg/mL). Etarsko ulje *T. zygis* ovako specifičnog sastava, kakvo je bilo naše, nije bilo testirano do sada.

Kada uzmemo u obzir sve gore navedeno možemo primetiti da na antibakterijski efekat etarskih ulja utiču dva parametra, osetljivost samih sojeva i hemijski sastav ulja. Iz ovog razloga u daljem tekstu ovog poglavlja ćemo se baviti hemijskim sastavom testiranih ulja kroz razmatranje sadržaja glavnih komponenata u njima kao i njihovim uticajem na ukupni antibakterijski potencijal ulja u kojima su te komponente sadržane.

Dva etarska ulja koja su pokazala najslabiji antibakterijski učinak bila su etarska ulja vrsta *C. camphora cineoliferum* i *M. ericifolia* i sadržavala su monoterpenke alkohole 1,8- cineol i linalol, kao svoje glavne komponente. Još dva monoterpenka alkohola, geraniol i citronelol bila su od značaja. Citronelol je činio 5,3% sadržaja ulja vrste *L. petersonii*, 26,4% ulja *P. graveolens* i 30,7% sadržaja ulja vrste *P. roseum*. Oba *Pelargonium* ulja su sadržavala i oko 15% geraniola, koji je bio i dominantna komponenta ulja *C. citratus* (5,9%). O značaju geraniola sugerise i podatak da je ulje vrste *C. martinii*, koje je obilovalo ovom komponentom (83,5%), obeleženo kao drugo najuspešnije ulje u ovoj studiji.

Etarska ulja koja su pokazala umerenu vrednost MIK-a kao što su ulja vrsta *E. citriodora*, *L. petersonii* i *C. citratus*, u svom sadržaju imala su dominantne aldehide. Etarsko ulje vrste *E. citriodora* obilovalo je citronelalom (74,1%), koji je bio i dominantna komponenta ulja vrste *L. petersonii* (15,3%). Druga dva monoterpenka aldehida, citrali A i B, bili su od značaja za sastav ulja vrsta *L. petersonii* i *C. citratus* (redom, 55,4% i 77,3%). Sadržaj ukupnih aldehida u pomenuta tri ulja bio je vrlo sličan i iznosio je oko 70%.

Najefikasnije etarsko ulje, sa prosečnom MIK vrednosti od 0,73 mg/mL, bilo je etarsko ulje vrste *T. zygis*. Ovo ulje je u svom sastavu sadržalo fenole kao svoje glavne komponente (timol 35% i karvakrol 5,2%), kao i monoterpenki alkohol linalol (5,5%).

Analiza prisustva opisanih monoterpenkih alkohola bi nam mogla ukazati na sledeće: monoterpenki alkohol 1,8-cineol, bio je dominantna komponenta ulja sa niskim antibakterijskim potencijalom, dok je citronelol bio dominantna komponenta u uljima umerenog antibakterijskog potencijala. Čist citronelol je bio ispitivan na kliničke izolate *E. faecalis* i ostvario je inhibiciju sa vrednošću MIK=0,69 mg/mL (Mileva i sar., 2014). Kako je vrednost MIK čistog citronelola uporediva

sa vrednošću MIK testiranih ulja koja su ga sadržala, može se sugerisati da je on odgovoran za postignutu umerenu aktivnost naših ulja. Uticaj druga dva alkohola, geraniola i linalola, na antibakterijski potencijal ulja, je takođe bio dosta interesantan za analizu. Linalol je bio dominantna komponenta u ulju niskog antibakterijskog potencijala čineći 49,1% sadržaja ulja. Međutim, ovaj isti alkohol je bio prisutan i u ulju sa umerenim antibakterijskim potencijalom, kao što je ulje vrste *P. graveolens*, kao i u najefikasnijem etarskom ulju vrste *T. zygis*, oba puta u iznosu od 5,5% sadržaja pomenutih ulja. Linalol je prethodno već bio testiran na oralne patogene, konkretno na referentne sojeve *F. nucleatum* ATCC 25568 i *S. sanguinis* ATCC 10556 i *Prevotella* spp. (Park, 2012, Wongsariya i sar., 2013) i pokazao 10-50 puta viši antibakterijski potencijal nego što je to imalo ulje vrste *M. ericifolia*. Ovakav rezultat upućuje na interakciju linalola sa drugim komponentama ulja tj. ističe dobro poznatu sinergističku aktivnost komponenti. Uloga geraniola u antibakterijskom efektu testiranih ulja se čini i očiglednijom u odnosu na ulogu linalola. Sa rastom njegove zastupljenosti u uljima rastao je i njihov antibakterijski potencijal. Dejstvo geraniola na kliničke izolate vrste *E. faecalis* (MIK 1,12 mg/mL) je takođe već bilo ispitivano (Mileva i sar., 2014). Vrednosti MIK 0,06-0,25 mg/mL koju je ostvarilo ulja vrste *C. martinii* (visokog sadržaja geraniola) na izolate *E. faecalis*, bile su niže od MIK čistog geraniola koje su prikazali Mileva i sar (2014). Ukoliko uzmemo u obzir i varijabilnost u patogenosti među testiranim izolatima, moglo bi se sugerisati da je i ovde od značaja bila interakcija geraniola sa drugim komponentama; moguće da je postojao sinergizam između geraniola i geranil acetata koji je doprineo nižim MIK koncentracijama ulja vrste *C. martinii* u odnosu na čist geraniol. Objašnjenje za antibakterijsko dejstvo monoterpenskih alkohola leži u činjenici da se oni ponašaju kao agensi koji uslovljavaju denaturaciju proteina, ili se ponašaju kao dehidratatori bakterijskih ćelija, uslovljavajući njihovu smrt (Dorman & Deans, 2000).

Analiza antibakterijskog potencijala aldehida, koji su bili dominantne komponente u uljima umerenog antibakterijskog potencijala, takođe nam je značajna. Antibakterijski učinak čiste komponente citronelala je ranije ispitivan na referentni soj *S. sanguinis* ATCC 10556 (MIK=0,64 mg/mL) (Wongsariya i sar., 2013). Naše etarsko ulje *E. citriodora* je sadržalo čak 74,1% citronelala, a njegov antimikrobni efekat iznosio je 1.6 mg/mL. Antibakterijska aktivnost citrala, kada je samostalno testiran, bila je u rangu sa učinkom ulja *C. citratus* (ukupno 77,3% citrala), dok je efekat ulja *L. petersonii* bio nešto niži od učinka čistih citrala (55,4%). Sva tri rezultata nedvosmisleno ukazuju na interakciju citrala sa drugim komponentama unutar analiziranih ulja *E. citriodora*, *C. citratus* i *L. petersonii*. Objašnjenje za antibakterijsko dejstvo aldehida leži u činjenici da aldehidna grupa konjuguje sa ugljeničnom dvostrukom vezom, čineći vezu izrazito elektronegativnom, što za posledicu vrlo verovatno pospešuje antimikrobni efekat, obzirom da elektronegativnost komponenti ometa neke biološke procese, poput transfera elektrona; takođe, moguće je da ovakve komponente interaguju sa proteinima i nukleinskim kiselinama (Dorman & Deans, 2000).

Finalno, iako ne tako visoki, sadržaji timola i karvakrola vrlo verovatno mogu biti odgovorni za postignuti najbolji antibakterijski efekat primenom ulja biljne vrste *T. zygis*. Naime, i timol i karvakrol su fenoli, poznati po svojim snažnim antibakterijskim svojstvima, za šta je osim njihove karakteristične strukture zaslužno i prisustvo hidroksilne grupe (Dorman & Deans, 2000).

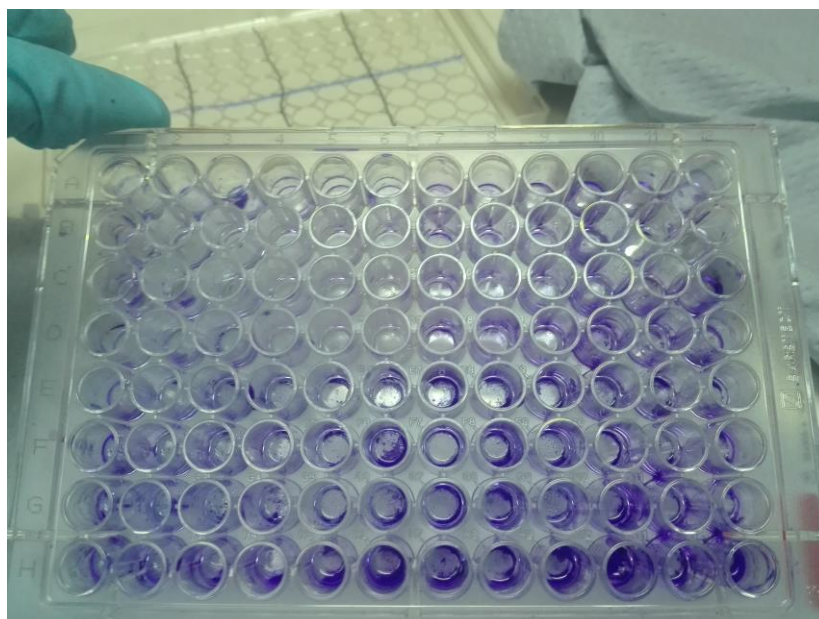
O izuzetnom učinku ulja vrste *T. zygis* svedoči i statistička analiza koja je pokazala da nema razlike u učinku u odnosu na primenu triantibiotske paste (TAP) ( $p>0,05$ ). TAP se koristi u medikamentoznoj endodontskoj terapiji, a sastoji se od tri dokazano efikasna antibiotika (metronidazole, ciprofloksacina i minociklina). Očekivano bi bilo da ima višestruko jaču efikasnost od efikasnosti etarskih ulja, u opsegu njihove bezbedne primene, na najveći broj bakterijskih sojeva koji se

mogu naći u nekrotičnom sadržaju korenskog kanala. Iako se TAP ne koristi kao sredstvo za irigaciju, već za medikaciju u kontroli intrakanalnih infekcija, za potrebe procene antibakterijskog potencijala etarskih ulja bilo je neophodno odabrati dentalni medikament čija je antibakterijska efikasnost u vremenu od 24h neupitna, kao referentna vrednost pozitivne kontrole. Sa kliničkog aspekta od važnosti je i poređenje antimikrobnog dejstva NaOCl i ispitivanih etarskih ulja. Tokom eksperimentalne procedure pojavio se limitirajući moment, a to je da efekat NaOCl nije mogao biti evaluiran primenom mikrodilucione metode. Razlog tome je činjenica da je utvrđeno da je efekat NaOCl kratkotrajan (Estrela i sar., 2002) i da testiranje antibakterijskog dejstva ovog oksidacionog sredstva u trajanju od 24h ne zadovoljava kriterijume verodostojnosti. Po gubitku njegovog kratkotrajnog dejstva dolazi do neometanog umnožavanja broja bakterija u narednih 24h, što uslovljava rezultat koji bi se pogrešno mogao tumačiti kao nepovoljan za NaOCl.

Ishod statističkih analiza bi mogao usmeriti razmišljanje u pravcu da je jedino ulje jednako efikasno kao pozitivna kontrola ulje *T. zygis* i da samo njega treba razmatrati za neku potencijalnu kliničku primenu. Ovakav stav nije u potpunosti ispravan i u skladu je sa gore navedenim očekivanim nižim vrednostima MIK koju ostvaruju pozitivne kontrole. Vrednosti MIK i MBK nisu jedini podatak od značaja za procenu efikasnosti dejstva nekog etarskog ulja. Poznato je i očekivano da se prirodni proizvodi mogu smatrati efikasnim i potencijalno razmatranim u terapiji infekcija, i sa višim MIK vrednostima od osvedočenih komercijalno dostupnih hemijskih supstanci. S tim u vezi, uporednom analizom MIK vrednosti, među testiranim uljima u ovoj studiji, možemo smatrati da su od prvobitnih 9 ulja, ulja *P. graveolens*, *L. petersonii*, *C. citratus*, *C. martinii* i *T. zygis*, svih 5 sa vrednostima MIK < 5,5 mg/mL, bila interesantna za nastavak istraživanja. Iz tog razloga su upravo ona podvrgnuta testiranju antibiofilmnog potencijala, čiji su rezultati detaljno prikazani u tekstu koji sledi.

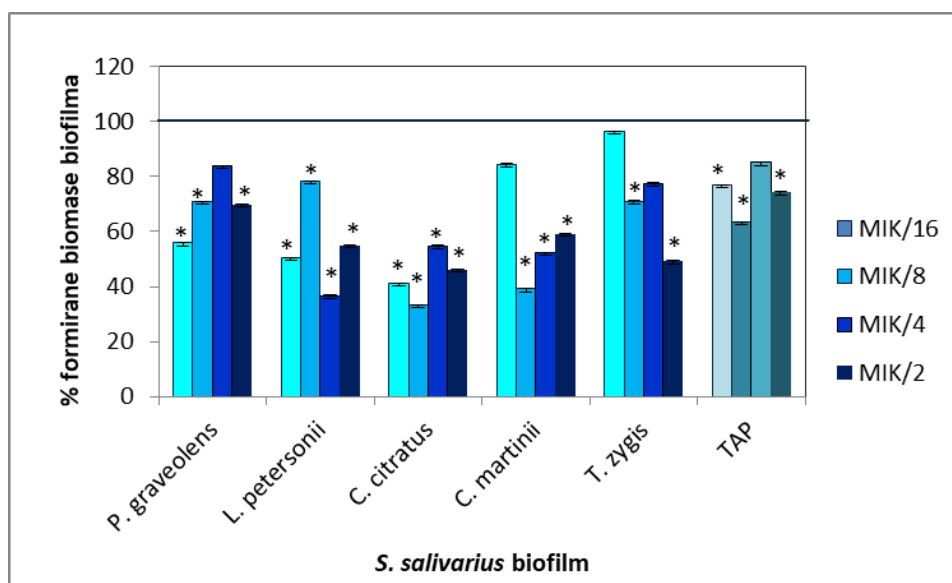
#### *Ispitivanje efekata etarskih ulja na biofilm*

Bakterije u inficiranom korenskom kanalu dominantno su organizovane u biofilmu, a manje prisutne u planktonskom stanju. Iz ovog razloga dobijene informacije o vrednostima MIK i MBK na planktonskim bakterijama predstavljaju samo inicijalni skrining za procenu efikasnosti etarskih ulja. Sa kliničkog aspekta mnogo je važnija procena antibiofilmnog potencijala etarskih ulja (Nair, 2004). Zato će antibiofilmnom učinku etarskih ulja na jednospecijske i multispecijske biofilme biti posvećen ovaj odeljak doktorata. Procena antibiofilmne efikasnosti etarskih ulja uključivala je procenu njihovog uticaja na celokupni biofilm (**Slika 13**), ali i na ćelije odgovorne za produkciju istog.



**Slika 13.** Mikrotitraciona ploča sa formiranim biofilmovima koji su obojeni cristal-violet (ljubičastom) bojom (Marinković J).

Klinička procedura obrade inficiranog korenskog kanala podrazumeva, između ostalog, instrumentaciju i irigaciju kanala, sa ciljem eliminacije patogenih agenasa. Činjenica da kanal nakon instrumentacije i irigacije ne može biti apsolutno obeskičen, dovodi do kliničke potrebe da se dodatnim antimikrobnim sredstvom ometa ponovno stvaranje neželjenog biofilma između faza lečenja. Da bi se *in vitro* ispitao uticaj etarskih ulja na inicijalno/ ponovno uspostavljanje biofilma, kao supstrat korišćen je bunarić sa ravnim dnom mikrotitracione ploče (**Slika 13**). Modelna bakterija u ovim testovima bio je inicijalni kolonizator *S. salivarius*. Uticaj ispitivanih etarskih ulja na inicijalnu fazu uspostavljanja biofilma prikazan je na **Figuri 9**.



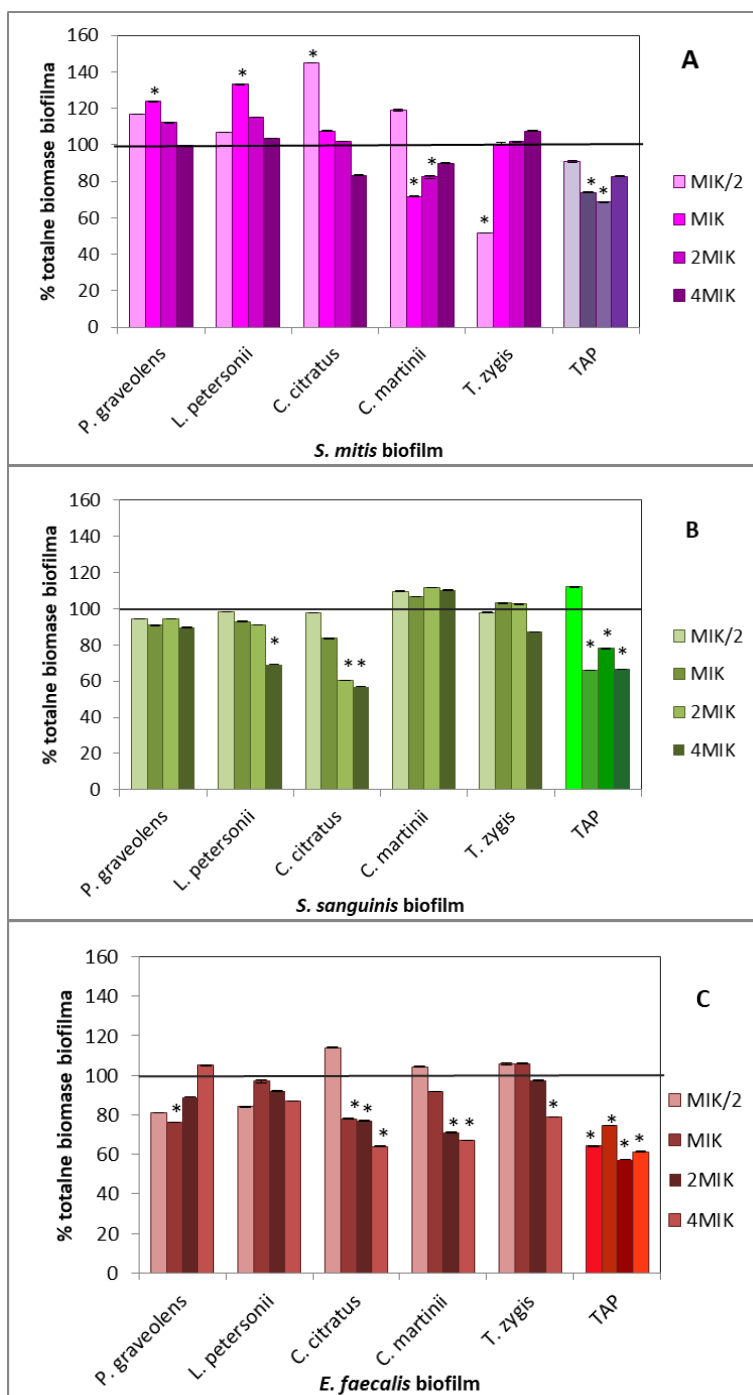
**Figura 9.** Efekat ulja i pozitivne kontrole na inicijalnu fazu formiranja biofilma  
\*statistički značajna razlika u odnosu na 100% formirane biomase biofilma ( $p < 0,05$ )

Dobijeni rezultati su pokazali da su sva testirana etarska ulja imala značajan uticaj na inicijalnu fazu formiranja biofilma ( $p < 0,05$ ). Ovaj učinak nije bio linearno koncentraciono zavistan i uporediv je sa učinkom pozitivne kontrole. Među posmatranim etarskim uljima, najbolju aktivnost su pokazala ulja vrsta *C. citratus* i *C. martinii*, sa inhibicijom u opsegu od približno 50 -70% za ulje vrste *C. citratus*, odnosno 42% - 62% za ulje vrste *C. martinii* (**Figura 9**).

Kao što procena uticaja etarskih ulja na inicijalnu fazu formiranja biofilma ima svoj klinički značaj, tako i procena uticaja na već formirani biofilm ima svoje kliničko opravdanje. Zaostale biofilmne strukture, koje su preživele i instrumentaciju i irigaciju, mogu uslovljavati perzistentnu infekciju u kanalu zuba, u čemu je značaj njihove eliminacije. Iz ovog razloga izvršeno je ispitivanje potencijala etarskih ulja u redukciji već formiranih biofilmova sojeva *S. sanguinis*, *S. mitis* i *E. faecalis*. Ove tri vrste su odabrane tako što je pored inicijalnih kolonizatora, *S. mitis* i *S. sanguinis*, u studiju uključen i najpoznatiji endodontski patogen.

Rezultati testiranja efekta etarskih ulja vrsta *P. graveolens*, *L. petersonii*, *C. citratus*, *C. martinii* i *T. zygis*, na već formirane monospecijske biofilmove predstavljeni su na **Figuri 10**. Ulje vrste *P. graveolens* prikazalo je ambivalentni uticaj na posmatrane biofilmove; pospešilo je razrastanje preformiranog biofilma soja *S. mitis* (produkcija biofilma >100%), dok je na istoj koncentraciji (MIK) inhibiralo formiranje biofilma soja *E. faecalis* (24% inhibicije). Ulje *L. petersonii* nije redukovalo biofilm ni jednog soja. Etarsko ulje vrste *C. citratus* redukovalo je biofilmove sojeva *E. faecalis* i *S. sanguinis* (opseg redukcije 22-36% za biofilm *E. faecalis* i oko 40% za *S. sanguinis*), ali je na niskoj koncentraciji uslovalo i proliferaciju biofilma soja *S. mitis* (produkcija biofilma za 45% veća od netretirane kontrole). Ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* redukovala su jednospecijske biofilmove sojeva *S. mitis* i *E. faecalis*. Redukcija biofilmova oba soja, kada su bila izložena delovanju ulja *C. martinii*, bila je oko 30%. Redukcija biofilma koji je formirao *E. faecalis* (oko 50%) je bila viša od redukcije biofilma *S. mitis* (22%), kada su ovi biofilmovi podvrgnuti delovanju ulja vrste *T. zygis*. Etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* na biofilm *S. sanguinis* nisu imala ni proliferativnog ni redukcionog uticaja (**Figura 10**).



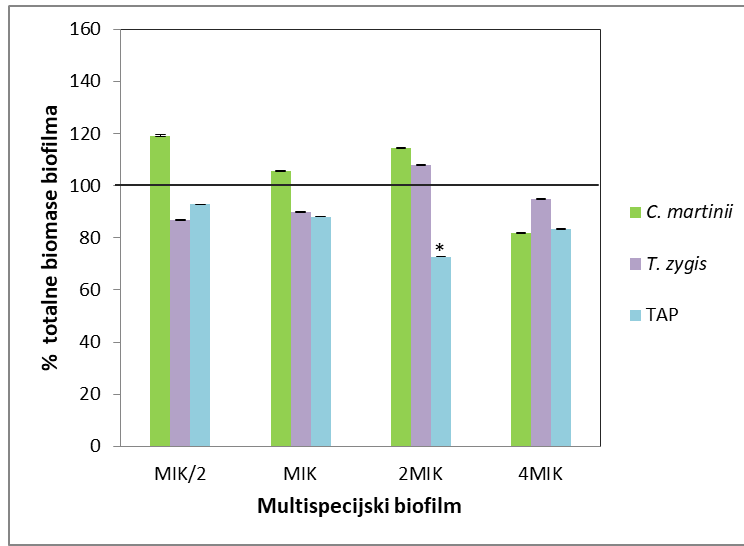


**Figura 10.** Uticaj etarskih ulja na već formirane jednospecijske biofilmove sojeva vrsta *S. mitis* (A), *S. sanguinis* (B) i *E. faecalis* (C).

\*statistički značajna razlika u odnosu na 100% formiranog biofilma ( $p < 0,05$ )

U cilju približavanja realnim kliničkim uslovima, koji se karakterišu multispecijskim biofilmom unutar inficiranog korenskog kanala, analiziran je potencijal delovanja etarskih ulja biljnih vrsta *C. martinii* i *T. zygis* na već formirani multispecijski biofilm u laboratorijskim uslovima. Ova ulja su odabrana jer su pokazala redukcionu, a ni jednom nisu imala proliferativni potencijal na jednospecijske biofilmove. Multispecijski biofilm formirali su klinički izolati *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis*.

Rezultati ispitivanja uticaja vrsta *T. zygis* i *C. martinii* na multispecijske biofilme pokazali su da oba posmatrana ulja nisu redukovala, niti uticala proliferativno na multispecijski biofilm (**Figura 11**).



**Figura 11.** Uticaj etarskih ulja na multispecijski biofilm;  
\* statistički značajna razlika u odnosu na 100% ( $p < 0,05$ )

Dodatnim testovima je analiziran uticaj pomenutih etarskih ulja na same ćelije (unutar biofilma i iznad njega). Uočena je visoka redukcija broja ćelija, bez obzira na njihovo poreklo (**Tabela 15**). Preživljavanje bakterijskih planktonskih ćelija je bilo najniže kada su bile izložene delovanju etarskog ulja vrste *T. zygis* ( $\Delta \log_{10} \text{CFU}$ , u odnosu na netretiranu kontrolu, bila je u opsegu 1,90 - 2,15), dok je redukcija planktonskih ćelija bila uporediva kada su podvrgnute delovanju etarskog ulja vrste *C. martini* EO (MIC/2,  $\Delta \log_{10} \text{CFU}$  1,94) i pozitivne kontrole (4MIC,  $\Delta \log_{10} \text{CFU}$  1,91). Analizom uticaja ispitivanih supstanci na ćelije unutar biofilma uočeno je da je baktericidni efekat oba ulja bio viši u odnosu na efekat TAP. Najefikasnija redukcija broja ćelija bila je na koncentraciji MIC/2 ( $\Delta \log_{10} \text{CFU}$  2,75) za etarsko ulje biljne vrste *C. martinii*, odnosno na 4MIC ( $\Delta \log_{10} \text{CFU}$  2,87) za ulje vrste *T. zygis*.

**Tabela 15.** Uticaj etarskih ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* na preživljavanje ćelija u planktonskom stanju i unutar biofilma.

		Planktonsko stanje		Ćelije unutar biofilma	
		log <sub>10</sub> CFU	Δ(log <sub>10</sub> CFU)	log <sub>10</sub> CFU	Δ(log <sub>10</sub> CFU)
Broj netretiranih ćelija		11,09±0,10		9,83±0,08	
<i>C. martini</i> ulje	MIC/2	9,15±0,08 <sup>*#</sup>	1,94	7,08±0,29 <sup>*#</sup>	2,75
	MIC	9,21±0,03 <sup>*#</sup>	1,88	7,58±0,10 <sup>*#</sup>	2,25
	2MIC	9,26±0,05 <sup>*</sup>	1,83	7,87±0,26 <sup>*</sup>	1,95
	4MIC	9,48±0,06 <sup>*#</sup>	1,61	7,76±0,14 <sup>*</sup>	2,06
<i>T. zygis</i> ulje	MIC/2	9,19±0,11 <sup>*#</sup>	1,90	8,19±0,10 <sup>*#</sup>	1,63
	MIC	9,10±0,12 <sup>*#</sup>	1,99	7,52±0,12 <sup>*#</sup>	2,30
	2MIC	8,94±0,16 <sup>*#</sup>	2,15	7,64±0,29 <sup>*#</sup>	2,19
	4MIC	9,12±0,19 <sup>*</sup>	1,97	6,95±0,23 <sup>*#</sup>	2,87
TAP	MIC/2	9,47±0,15 <sup>*</sup>	1,62	7,90±0,18 <sup>*</sup>	1,93
	MIC	9,32±0,05 <sup>*</sup>	1,77	8,50±0,12 <sup>*</sup>	1,32
	2MIC	9,79±0,16 <sup>*</sup>	1,30	8,00±0,13 <sup>*</sup>	1,83
	4MIC	9,18±0,08 <sup>*</sup>	1,91	7,93±0,18 <sup>*</sup>	1,90

Rezultati su prikazani kao srednja vrednost log<sub>10</sub>CFU ± standardna devijacija

\* statistička značajnost u poređenju sa netretiranim uzorkom, p<0,05

# statistička razlika u odnosu na redukciju koju je ostvarila pozitivna kontrola TAP, p<0,05

Uticaj ispitivanih etarskih ulja razlikovao se u odnosu na to da li su ona delovala na inicijalno formiranje ili na već formirani bakterijski biofilm. Etarska ulja biljnih vrsta *P. graveolens*, *L. petersonii* i *C. citratus* imala su reduktivni potencijal na inicijalnu fazu formiranja biofilma (Figura 9). Međutim, njihov efekat na već formirane biofilmove bio je neutralan ili čak proliferativan (Figura 10). Prema našim saznanjima antibiofilmni efekat etarskih ulja *P. graveolens* i *L. petersonii* nije bio do sada ispitivan, dok je antibiofilmni efekat etarskog ulja biljne vrste *C. citratus* bio predmet istraživanja i drugih autora (Leonard i sar., 2010, Ortega- Ramirez i sar., 2020). Ortega-Ramirez i saradnici (2020) navode visoki redukcionni potencijal ovog ulja kada deluje u inicijalnoj fazi formiranja biofilma, dok Leonard i saradnici (2010) navode da ovo ulje pospešuje produkciju biofilma kada deluje na već formirani biofilm. Pomenuti literaturni navodi samo potvrđuju ambivalentno ponašanje ovog ulja primećeno i u našoj studiji (Figura 9 i 10). Nasuprot ovome, etarska ulja biljnih vrsta *C. martinii* i *T. zygis* delovala su inhibitorno na sve posmatrane biofilmove.

Ispitujući simultano uticaj ulja i na inicijalno formiranje biofilma i na već formirane biofilmove kliničkih sojeva vrste *E. faecalis*, Correa (2019) razrešava dilemu ukazujući da je antibiofilmni potencijal ulja viši kada ona deluju na inicijalnu fazu formiranja biofilma u poređenju sa delovanjem na već formirani biofilm. Naši rezultati podržavaju ovu tvrdnju; sva testirana ulja su imala bolji redukcionni potencijal kada su delovala u inicijalnoj fazi formiranja biofilma u poređenju sa njihovim efektom na već formirane biofilmove. Ovakav rezultat bi se mogao objasniti na način da u inicijalnoj fazi formiranja biofilma ulje deluje samo na ćelije, sprečavajući novo, odnosno ponovno formiranje biofilma, dok kod dejstva na već formirani biofilm zadatak ulja je dvojak, obzirom da bi trebalo da deluju i na nivou ćelije i na međućelijski matriks, što je dosta zahtevnije.

Kako bismo dalje razdvojili uticaj etarskih ulja na same bakterijske ćelije od uticaja na celokupni biofilm (bakterijske ćelije + međućelijski matriks), formirali smo eksperiment koristeći

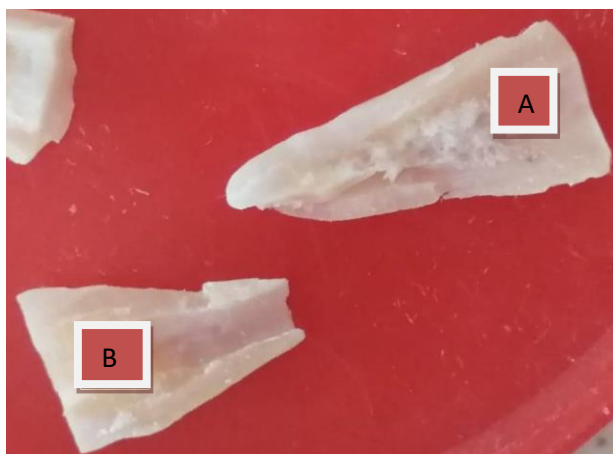
multispecijski model. Ovaj eksperiment je pokazao da kada najefikasnija ulja deluju na celokupan biofilm, njihov redukcionni potencijal izostaje (**Figura 11**), dok je on izuzetno visok kada deluju na same ćelije (**Tabela 15**). Odgovor na dobijene razlike treba tražiti u efektu ulja na matriks biofilma. Ono što smo saznali iz nedavne publikacije Ortega-Ramirez i saradnika (2020) je da je etarsko ulje biljne vrste *C. citratus*, hemijskog sastava sličnog našem ulju, sposobno da redukuje i ćelije unutar biofilma ali i da ometa enzimski put odgovoran za sintezu i produkciju glukana, koji kao polisaharid predstavlja vitalni deo biofilmnog matriksa i njegovom redukcijom, ćelije ostaju u planktonskom obliku, što ih čini dodatno osetljivijim na antimikrobna sredstva. Istraživanja o uticaju raznih etarskih ulja na matriks biofilma verovatno će biti u fokusu istraživača u dolazećem periodu.

Pitanje konkretnog uticaja etarskih ulja na bakterijske ćelije u zavisnosti od njihovog porekla (planktonske ili ćelije unutar biofilma), takođe je analizirano u ovoj studiji. Naši rezultati pokazuju da, iako je redukcija ćelija bila izuzetno visoka, etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* bila su nešto efikasnija u eliminaciji ćelija iz biofilma u odnosu na planktonske ćelije (**Tabela 15**). Slično su objavili i Budzyńska i saradnici (2011) navodeći da su planktonske ćelije i ćelije unutar biofilma u njihovoj studiji sa etarskim uljima bile ili jednako osetljive ili je osetljivost ćelija unutar biofilma bila malo viša u odnosu na osetljivost planktonskih ćelija. Ukoliko uzmemo u obzir da se u literaturi navodi da su ćelije u biofilmu 100-1000 puta otpornije na klasične antimikrobne agense, Budzyńska i saradnici (2011) dobijeni rezultat prikazuje kao veliki potencijal ulja, što je u skladu i sa zaključcima nakon naše studije. Detaljna distinkcija ovog uticaja će vrlo verovatno takođe biti u fokusu nekih budućih istraživanja.

Nakon sprovedenih testiranja utvrdili smo da etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* poseduju izuzetan antibakterijski i antibiofilmni potencijal. S tim u vezi razmišljalo se o formi u kojoj bi ova ulja mogla biti primenjena u endodontskoj terapiji mladih stalnih zuba, konkretno u fazi irigacije korenskih kanala. Naredno poglavlje biće posvećeno dizajnu iriganasa zasnovanih na etarskim uljima i njihovoj antibiofilmnoj aktivnosti.

#### *Irigansi zasnovani na etarskim uljima i njihova antibiofilmna aktivnost*

Odabrana etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* su u formi emulzija pripremljena za potrebe irigacije. Prvo su analizirani osnovni fizičko - hemijski parametri od značaja za karakterizaciju emulzija, a potom je *in vitro* ispitivan antibiofilmni potencijal emulzija i to na način da su korenski kanali vađenih zuba bili eksperimentalno inficirani i u njima je bio uspostavljen biofilm sojeva vrsta *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis* (**Slika 14**). Antibiofilmni potencijal je izražavan kroz redukciju broja bakterijskih ćelija.



**Slika 14.** Polovina korenskog kanala u kome se uočava biofilm (A) i ne-zasejani korenski kanal (B). Biofilm su formirali sojevi vrsta *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis* (Marinković J).

Pre početka testiranja irigansa su bili sveže pripremani. Irigans na bazi etarskog ulja *C. martinii* je bio bezbojan, dok je irigans koji je sadržao etarsko ulje *T. zygis* imao sedefasti odsjaj. Testovi procene osnovnih fizičko - hemijskih osobina iriganasa su pokazali da je srednji dijametar čestica iznosio  $100,7 \pm 2,88$  nm za irigans koji je sadržao etarsko ulje vrste *C. martinii*, dok je u slučaju *T. zygis* - irigansa ta vrednost bila  $332 \pm 9,48$  nm. Indeks polidisperzije za oba irigansa bio je  $0,36 \pm 0,06$  za *C. martinii* - irigans, odnosno  $1,00 \pm 0,00$  za *T. zygis* - irigans.

Kada su utvrđeni osnovni fizičko - hemijski parametri oba irigansa, pristupilo se mikrobiološkim testovima, čiji su rezultati prikazani u **Tabelama 16A i 16B**. Prikaz je tendenciozno dat u dve tabele, jer su testovi za procenu efikasnosti emulzija uključivali procenu efikasnosti na biofilmu koji je samostalno napravio izolat *E. faecalis*, i odvojeno na multispecijskom biofilmu (sačinjenom iz biofilmova izolata *E. faecalis*, *S. mitis* i *S. sanguinis*). U oba slučaja, na oba tipa biofilma, prvo je procenjena efikasnost samih iriganasa, a potom i reduktivni potencijal pri primeni u finalnoj irigaciji.

Samostalno primenjeni irigansa zasnovani na etarskim uljima prikazali su umerenu redukciju ćelija iz testiranih biofilmova; irigans zasnovan na ulju *C. martinii* redukovao je broj bakterija u jednospecijskom ( $\Delta\log_{10}$  CFU 0,76) i multispecijskom biofilmu ( $\Delta\log_{10}$  CFU 0,52) jednako kao pozitivna kontrola 1,5% NaOCl (redukcija broja ćelija iz jednospecijskog -  $\Delta\log_{10}$  CFU 0,88 i multispecijskog biofilma -  $\Delta\log_{10}$  CFU 0,51), dok je irigans koji je sadržao etarsko ulje *T. zygis* bio jednako efikasan u redukciji bakterija iz biofilma koji je formirao *E. faecalis* ( $\Delta\log_{10}$  CFU 0,82) ali i dva puta efikasniji u redukciji bakterija iz multispecijskog biofilma ( $\Delta\log_{10}$  CFU 0,98), u odnosu na istu pozitivnu kontrolu (**Tabele 16A i B**).

U testiranju iriganasa, kao finalno primenjenih nakon primene 1,5% NaOCl i fiziološkog rastvora, možemo primetiti da je u oba slučaja najbolja redukcija biofilmova, bez obzira da li su primenjeni na jednospecijski ili multispecijski biofilm, ostvarena kada je kao finalni irigans korišćen onaj koji je sadržao etarsko ulje *C. martinii*. Redukcija ćelija u jednospecijskom biofilmu za ovaj irigans iznosila je  $\Delta\log_{10}$ CFU 1,89, dok je u slučaju multispecijskog taj broj bio 1,69. Redukcija ćelija biofilma koji je formirao samostalno *E. faecalis* takođe je bila uspešnija kada je kao finalni irigans korišćeno etarsko ulje *T. zygis* ( $\Delta\log_{10}$ CFU 1,54) u odnosu na pozitivnu kontrolu, dok je u slučaju multispecijskog biofilma ona bila nešto niža od kontrolne (**Tabela 16B**).

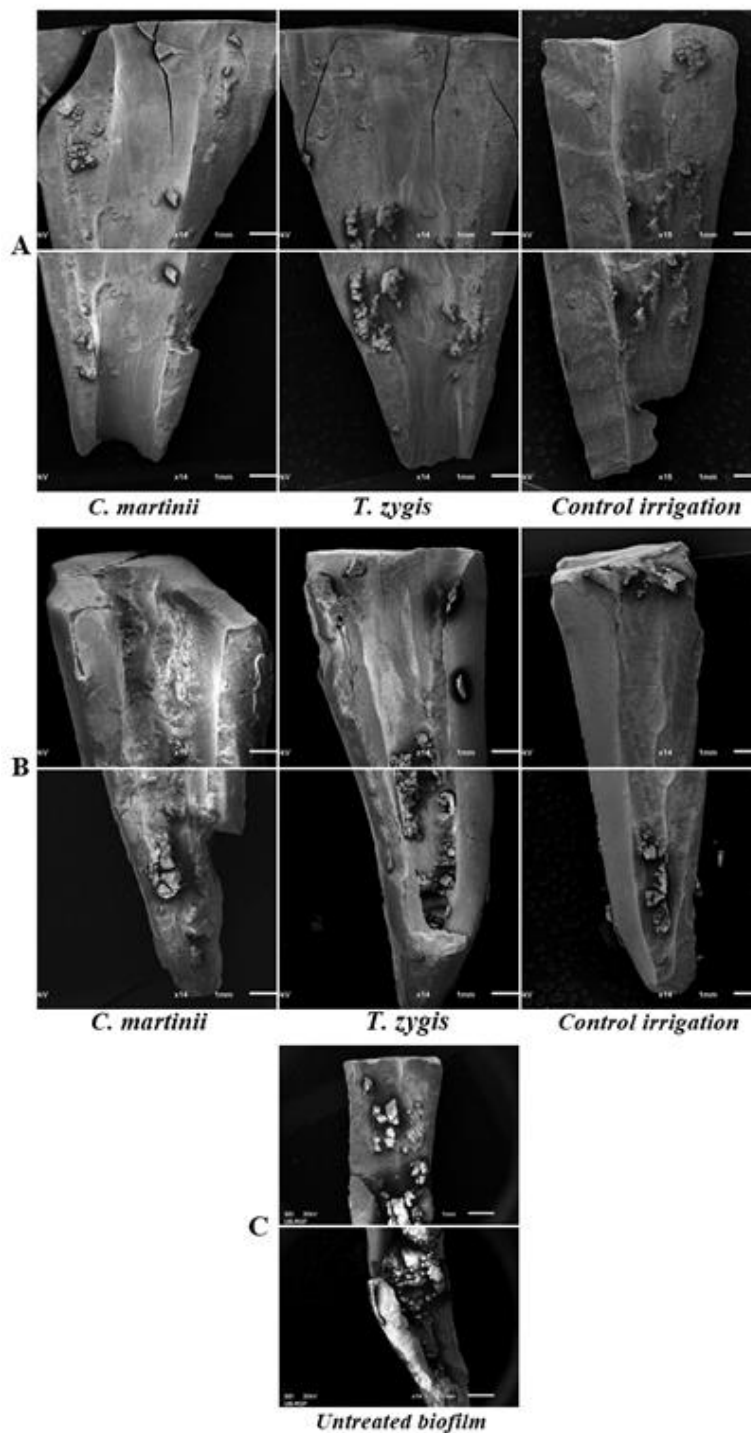
**Tabela 16A.** Testiranje potencijala redukcije broja bakterijskih ćelija iz biofilma izolata vrste *E. faecalis* od strane iriganasa zasnovanih na etarskim uljima

tip irigacije	<i>C. martinii</i> – irigans		<i>T. zygis</i> – irigans		Kontrola	
	pre	posle	pre	posle	pre	posle
<b>efikasnost samog irigansa</b>					<b>(1,5% NaOCl)</b>	
$\log_{10}\text{CFU}$	5,31±0,31	4,55±0,27	4,83±0,07	4,01±0,23	6,24±0,13	5,36±0,27
$\Delta(\log_{10}\text{CFU})$	0,76		0,82		0,88	
<b>efikasnost irigansa kao finalnog irigatora</b>					<b>(1,5% NaOCl+0,85% NaCl)</b>	
$\log_{10}\text{CFU}$	6,05±0,09	4,16±0,91	5,92±0,48	4,38±0,76	5,51±0,21	4,17±0,27
$\Delta(\log_{10}\text{CFU})$	1,89		1,54		1,34	

**Tabela 16B.** Testiranje potencijala redukcije broja bakterijskih ćelija iz multispecijskog biofilma od strane iriganasa zasnovanih na etarskim uljima

tip irigacije	<i>C. martinii</i> – irigans		<i>T. zygis</i> – irigans		Kontrola	
	pre	posle	pre	posle	pre	posle
<b>efikasnost samog irigansa</b>					<b>(1,5% NaOCl)</b>	
$\log_{10}\text{CFU}$	5,74±0,31	5,22±0,27	5,19±0,11	4,21±0,15	5,98±0,13	5,48±0,27
$\Delta(\log_{10}\text{CFU})$	0,52		0,98		0,51	
<b>efikasnost irigansa kao finalnog irigatora</b>					<b>(1,5% NaOCl+0,85% NaCl)</b>	
$\log_{10}\text{CFU}$	6,07±0,09	4,38±0,91	5,61±0,48	4,47±0,76	6,16±0,21	4,72±0,27
$\Delta(\log_{10}\text{CFU})$	1,69		1,14		1,44	

Na SEM mikroskopiji se takođe može uočiti jasna redukcija multispecijskog intrakanalnog biofilma, nakon izlaganja ovih biofilmova irigantsima koji su sadržali etarska ulja *C. martinii* i *T. zygis* (Figura 12).



**Figura 12.** SEM slike antibiofilmnog potencijala kada su ulja testirana samostalno (A), kao finalni irigansi (B) i slika netretiranog biofilma u kanalu (C). Biofilm je bio multispecijski, koji su formirali sojevi vrsta *S. mitis*, *S. sanguinis* i *E. faecalis*

Napraviti irigans koji će u sebi sadržati odabrana etarska ulja bio je pravi izazov, zbog poznate slabe rastvorljivosti etarskih ulja u vodi. Neophodno je bilo koncipirati tzv. efikasni sistem isporuke etarskih ulja u vodenoj fazi. Mikroemulzije i nanoemulzije su upravo takvi sistemi, gde je uljana faza predstavljena kroz uljane kapljice, dispergovane u vodenoj kontinualnoj fazi (Basak i sar., 2018). Napravivši dve emulzije preveli smo etarska ulja u formu pogodnu za irigaciju, istovremeno omogućivši i postizanje veće kontaktne površine između ulja i bakterija u kanalu, što nam je zapravo i bilo primarno. Tako smo prevenirali gubitak isparljivih komponenti i hemijsku degradaciju ulja (Basak i sar., 2018), omogućivši da sve komponente ulja učestvuju u ostvarivanju antibiofilmnog efekta. Irigans koji je sadržavao etarsko ulje biljne vrste *C. martinii* možemo posmatrati kao nanoemulziju, dok je irigans u čijem sastavu je bilo etarsko ulje *T. zygis* bio mikroemulzija. Objašnjenje za ovu klasifikaciju je u dimenzijama uljanih čestica; dok je veličina čestica za irigans koji je sadržava etarsko ulje vrste *C. martinii* bila 100 nm, u slučaju irigansa koji je sadržavao etarsko ulje *T. zygis* iznosila je više od 100 nm. Postoje različita mišljenja koja veličina čestica određuje da li je u pitanju nanoemulzija ili mikroemulzija. Mada neki autori smatraju da se nanoemulzijama mogu smatrati sve emulzije čiji dijametar čestica ne prelazi 500nm (Seibert i sar., 2018), ipak je većina onih koja je granicu povukla na 100 nm (Chang i sar., 2013, Pathania i sar., 2018, Lu i sar., 2018). Na veličinu čestica ima uticaja gustina ulja (Salvia-Trujillo i sar., 2015), pa je tako razlika u veličini čestica naših iriganasa posledica razlike u gustini primenjenih ulja. Niža gustina etarskog ulja biljne vrste *C. martinii* (0,84 mg/mL), u poređenju sa gustom ulja biljne vrste *T. zygis* (1,01 mg/mL), rezultirala je i manjom veličinom čestica emulzije koja je sadržala ulje *C. martinii*.

Značaj činjenice da li je neka emulzija nano ili mikro je u vezi sa stabilnošću ove emulzije. Postoje stavovi koji kažu da se nanoemulzije mogu smatrati stabilnijim sistemima od mikroemulzija, jer mala veličina čestica omogućava emulziji da bude manje podložna uticaju gravitacione separacije ali i agregaciji čestica (Basak i sar., 2018). Međutim, suprotno tome, nanoemulzije su termodinamički nestabilniji sistemi od mikroemulzija (Basak i sar., 2018) i sa temperaturnim varijacijama ovi sistemi mogu preći u mikroemulzije. Stabilnost emulzije, pored veličine čestice, oslikava još jedan parametar koji smo istraživali, a to je indeks polidisperzije (Liang i sar., 2012, Syed & Sarkar, 2018). Emulzija je stabilnija ukoliko je vrednost indeksa bliža 0 u rasponu između 0 i 1. Vrednost veličine čestica, kao i polidisperzionih indeksa, nam sugerišu da je u našem slučaju irigans koji je sadržavao etarsko ulje biljne vrste *C. martinii* bio stabilniji od drugo analiziranog irigansa. Problem nestabilnosti irigansa na bazi etarskog ulja *T. zygis* rešili smo tako što smo pre mikrobioloških testiranja pripremali sveže iriganse.

Veličina čestica iriganasa nam je bila od značaja i po drugom osnovu. Poznato je da veličina čestica ima uticaja na antibakterijski učinak emulzija, premda još uvek ne postoje jasne smernice u tom pravcu. Jedan broj autora favorizuje nanoemulzije (Liang i sar., 2012, Salvia-Trujillo i sar., 2015), ali isto tako postoje i autori koji daju prednost mikroemulzijama (Basak i sar., 2018, Terjung i sar., 2012). Prednost nanoemulzija objašnjava se činjenicom da upravo mala veličina čestica pospešuje transport aktivnih komponenti ulja kroz bakterijsku membranu (Salvia-Trujillo i sar., 2015). Suprotno tome, autori koji se zalažu za mikroemulzije (Terjung i sar., 2012), objašnjavaju da ukoliko je veličina čestice manja, veća će biti njihova koncentracija, što će zbog samog surfaktanta koji okružuje svaku pojedinačnu česticu umanjiti koncentraciju komponenti ulja u odnosu na ono što bi bilo dostupno sa većom pojedinačnom česticom ulja. Takođe, autori su navodili da redukcija veličine čestica u emulzijama koje sadrže timol i karvakrol zapravo dovodi do njihovog zarobljavanja, čime se smanjuje njihov antibakterijski potencijal (Li i sar., 2017, Terjung i sar., 2012). Očito da smo u našem istraživanju postigli pravi izbor, odabравši da irigans koji sadrži ulje *C. martinii* (sa visokim sadržajem geraniola) bude u formi nanoemulzije, a da irigans koji sadrži etarsko ulje *T. zygis* (timol i karvarol)



bude u formi mikroemulzije. Naši rezultati to potvrđuju, a dokaz tome su i priložene SEM fotografije (**Figura 12**).

Ne samo da su irigansi izuzetni kao samostalno primenjeni, gde su se pokazali kao jednako efikasni ili efikasniji od pozitivne kontrole, nego su ostvarili izuzetan potencijal i u redukciji biofilma *E. faecalis* primenjeni kao finalni irigansi. Kada je poznato da je najveći intrakanalni perzister upravo ovaj soj, postaje jasan značaj ovakvog rezultata. Verujemo da je dobar antibiofilmni potencijal nanoemulzije sa etarskim uljem *C. martinii* postignut zahvaljujući visokom sadržaju geraniola, kako sugerišu rezultati i drugih autora (Salvia-Trujillo i sar., 2015, Balta i sar., 2017). Takođe, pretpostavljamo da je rezultat ostvaren primenom irigansa koji je sadržao ulje *T. zygis* posledica činjenice da timol i karvakrol nismo zarobili, već smo dozvolili da ove komponente ostvare svoj uticaj kroz mikro veličinu čestica.

Kada smo kompletirali sve mikrobiološke testove, želeli smo da se uverimo u relevantnost istih i njihovu uporedivost sa literaturom. U poglavlju gde se bavimo antibakterijskim potencijalom etarskih ulja sugerisali smo sličnosti i razlike između naših rezultata i tuđih, sa posebnim osvrtom na poređenje rezultata o efikasnosti ulja dobijenim na kliničkim sojevima i ATCC referentnim sojevima. Tako je nastao naredni odeljak doktorata.

*Ispitivanje razlika u osetljivosti između kliničkih bakterijskih izolata i referentnih sojeva (ATCC kolekcije) na delovanje etarskih ulja.*

Pregledom dostupne literature koja istražuje mikrobiološki potencijal etarskih ulja primetili smo da veliki broj autora analizira antibakterijski i/ili antibiofilmni efekat etarskih ulja na referentne bakterijske sojeve, uglavnom ATCC kolekcije. Suprotno tome, pravac našeg istraživanja je bio usmeren na kliničke izolate, zbog njihove moguće kliničke primene. S tim u vezi, ovo poglavlje je posvećeno uporednoj analizi osetljivosti referentnih bakterijskih i kliničkih sojeva na odabrana etarska ulja. Kako bi analiza bila relevantnija, u nju smo uneli i poreklo svakog pojedinačnog izolata (**Tabela 17**).

**Tabela 17.** Poreklo kliničkih izolata

Vrsta izolata	Poreklo izolata
<i>S. salivarius</i>	
<i>S. salivarius STSL1</i>	Simptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. salivarius STSL2</i>	Simptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. salivarius STSL3</i>	Simptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. salivarius STSL4</i>	Asimptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. sanguinis</i>	
<i>S. sanguinis STSN1</i>	Asimptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. sanguinis STSN3</i>	Simptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. sanguinis STSN4</i>	Asimptomatska infekcija korenskog kanala zuba
<i>S. sanguinis STSN5</i>	Simptomatska infekcija korenskog kanala zuba

Prvi korak utvrđivanja da li postoji razlika u osetljivosti između referentnih i kliničkih sojeva podrazumevao je uporednu analizu osetljivosti samih bakterijskih ćelija. Testirane ćelije bile su u planktonskom – slobodno živećem stanju. Poređenje osetljivosti je izvršeno kroz poređenje ostvarenih MIK vrednosti po etarskom ulju, za svaku bakteriju. Odabrana etarska ulja bila su *L. petersonii*, *E. citriodora*, *P. graveolens* i *P. roseum*. Rezultati uporednog testiranja prikazani su u **Tabeli 18**.

Među posmatranim kliničkim izolatima, većina se razlikovala u osetljivosti na ispitivana ulja od svojih referentnih ATCC sojeva. Izuzetak je bio izolat vrste *S. salivarius* StS14 čija je osetljivost na sva 4 ispitana etarska ulja bila istovetna osetljivosti njegovog referentnog soja, *S. salivarius* ATCC 9222. Klinički izolati *S. sanguinis* (StSn1 i StSn4) su na dejstvo ulja *L. petersonii* i *E. citriodora* bili osetljivi kao i njihov referentni soj *S. sanguinis* ATCC 10556. Uočene su i međusobne razlike u osetljivosti između izolata iste bakterijske vrste (**Tabela 18**).

**Tabela 18.** Statistička značajnost razlika u osetljivosti planktonskih bakterijskih ćelija kliničkih sojeva *S. salivarius* i *S. sanguinis* međusobno, kao i sa odgovarajućim ćelijama referentnih sojeva *S. salivarius* ATCC 9222 i *S. sanguinis* ATCC 10556, na dejstvo 4 etarska ulja. Prikazane su vrednosti *p*.

Etarska ulja	Bakterijski soj	<i>S. salivarius</i>				<i>S. sanguinis</i>			
		StS11	StS12	StS13	StS14	StSn1	StSn3	StSn4	StSn5
<i>L. petersonii</i>	StS14		0.477						
	StS13		0.063		0.014*				
	StS11		0.003*	0.192	0.001*				
	StSn5	0.073	<0.001*	0.004*	<0.001*				
	StSn3	0.623	0.001*	0.079	<0.001*				0.179
	StSn4	0.001*	0.526	0.017*	0.937		<0.001*		<0.001*
	StSn1	0.005*	0.862	0.089	0.378		0.002*	0.421	<0.001*
	<b>Sn AT10056</b>	0.001*	0.433	0.012*	0.941	<u>0.34</u>	<0.001*	<u>0.878</u>	<0.001*
<b>SI AT9222</b>	<0.001*	0.145	0.002*	<u>0.438</u>	0.106	<0.001*	0.394	<0.001*	
<i>E. citriodora</i>	StS14		0.691						
	StS13		0.893		0.595				
	StS11		0.055	0.042*	0.118				
	StSn5	0.062	0.001*	<0.001*	0.002*				
	StSn3	0.062	0.001*	<0.001*	0.002*				1
	StSn4	0.162	0.565	0.479	0.858		0.003*		0.003*
	StSn1	0.329	0.313	0.255	0.535		0.007*	0.657	0.007*
	<b>Sn AT10056</b>	0.07	0.903	0.797	0.782	0.373	0.001*	0.649	0.001*
<b>SI AT9222</b>	0.015*	0.532	0.624	<u>0.311</u>	<u>0.11</u>	<0.001*	<u>0.236</u>	<0.001*	
<i>P. graveolens</i>	StS14		1						
	StS13		<0.001*		<0.001*				
	StS11		1	<0.001*	1				
	StSn5	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*				
	StSn3	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*				<0.001*
	StSn4	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*		<0.001*		<0.001*
	StSn1	<0.001*	<0.001*	1	<0.001*		<0.001*	<0.001*	<0.001*
	<b>Sn AT10056</b>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*
<b>SI AT9222</b>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<u>0.834</u>	<0.001*	<0.001*	<0.001*	<0.001*	
<i>P. roseum</i>	StS14		0.019*						
	StS13		0.511		0.004*				
	StS11		0.121	0.354	<0.001*				
	StSn5	0.033*	0.51	0.195	0.076				
	StSn3	0.354	0.511	1	0.004*				0.195
	StSn4	0.007*	0.175	0.051	0.269		0.051		0.47
	StSn1	0.008*	0.195	0.058	0.243		0.058	0.948	0.511
	<b>Sn AT10056</b>	<0.001*	0.010*	0.002*	0.753	0.144	0.002*	0.161	0.040*
<b>SI AT9222</b>	<0.001*	0.011*	0.002*	<u>0.795</u>	0.018*	0.002*	0.037*	0.045*	

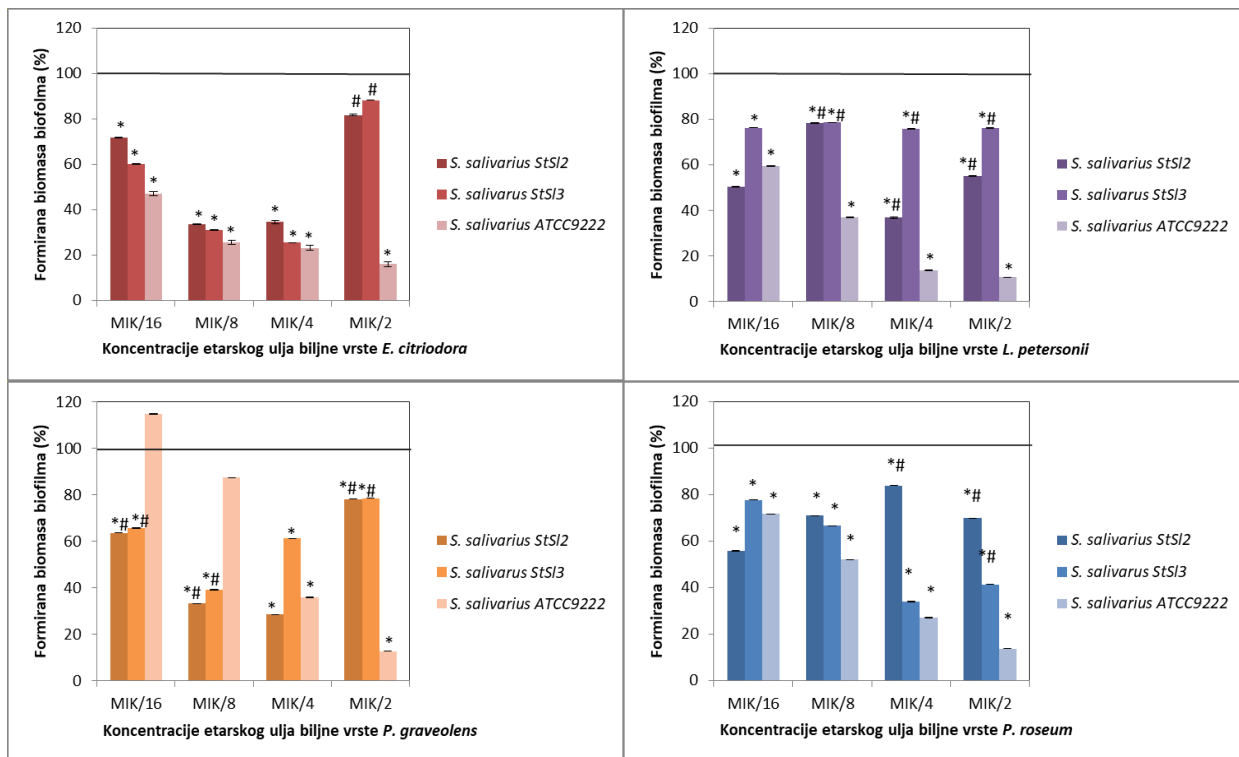
\*statistička razlika  $p < 0,05$

Objašnjenje skraćenica: SnAT10556- *S. sanguinis* ATCC 10556, SI AT9222 - *S. salivarius* ATCC 9222.

Drugi korak u uporednoj analizi osetljivosti kliničkih izolata i referentnih sojeva podrazumevao je analizu razlika u osetljivosti bakterijskih ćelija koje učestvuju u inicijalnom formiranju biofilma. Utvrđivanje ove razlike procenjeno je kroz sličnosti odnosno razlike u procentu formirane biomase biofilma između dva klinička izolata *S. salivarius* i njegovog referentnog soja. Ovi klinički izolati su

odabrani usled njihove sposobnosti da snažno produkuju biofilm, ali i činjenice da su izolovani iz kanala sa prisutnom pratećom kliničkom slikom.

Rezultati su pokazali da je produkcija kliničkog biofilma bila bolja u odnosu na produkciju biofilma referentnog soja, pri istoj koncentraciji etarskog ulja. Interesantno je primetiti da su najveće inhibicije formiranja biofilma referentnog soja etarska ulja ostvarivala na višim MIK koncentracijama (MIK/2 između 84% i 89% inhibicije), dok su za biofilme kliničkih izolata bile efikasnije niže MIK koncentracije ulja. Na koncentracijama MIK/16 - MIK/4 procenat inhibicije kliničkih biofilmova bio je između 24% i 75% (**Figura 13**).



**Figura 13.** Uticaj etarskih ulja biljnih vrsta *E.citriodora*, *L. petersonii*, *P. graveolens* i *P. roseum* na inicijalnu fazu formiranja biofilma

\*statistički značajna razlika u odnosu na 100% formiranog biofilma,  $p < 0,05$

#statistički značajna razlika u odnosu na procenat formiranog biofilma referentnog soja *S. salivarius* ATCC 9222

Kada analiziramo dobijene rezultate u našoj studiji možemo da primetimo da je osetljivost svega jednog soja *S. salivarius* i dva soja *S. sanguinis* odgovarala osetljivosti njihovih referentnih sojeva. Pomenuti klinički izolati, čija osetljivost na etarska ulja je bila uporediva sa osetljivošću referentnog soja, poreklom su iz asimptomatskih inficiranih korenskih kanala. Zbog malog uzorka, ne možemo sa sigurnošću tvrditi da bi osetljivost izolata iz asimptomatskih infekcija bila približnija osetljivosti referentnih sojeva, ali možemo sugerisati opsežnija istraživanja upravo u tom pravcu.

Ono što je proisteklo iz pomenute komparativne analize osetljivosti je saznanje da se za većinu kliničkih izolata odgovor na etarsko ulje razlikovao od odgovora referentnog soja. Ipak, razlog testiranja dejstva etarskih ulja na referentnim bakterijskim sojevima je neophodan, jer se jedino tako rezultati studija rađenih u različitim delovima sveta mogu uporediti. Pravo je pitanje, da li je uporedivost rezultata imperativ? Ako se osvrnemo na nastanak ATCC sojeva, možemo primetiti da do trenutka dok nisu postali referentni sojevi, klinički sojevi iz kojih su dobijeni su prošli niz subkultivacija (pasaža), koje su za neke sojeve trajale i decenijama. U toku ovih pasaža došlo je do

inaktivacije određenih gena, tj. do promena na genotipu koje su uslovile i promene fenotipa. Ovo je detaljno objašnjeno na primeru K12 soja vrste *Escherichia coli*, PAO1 soja vrste *Pseudomonas aeruginosa* i COL soja vrste *Staphylococcus aureus*, u publikaciji iz 2005 godine pod nazivom *Can laboratory reference strains mirror "real-world" pathogenesis?* Iz ovih razloga većina ATCC sojeva koje mi danas poznajemo su ne-patogeni sojevi (Fux i sar., 2005).

Čini se da bi ovo objašnjenje moglo da dâ odgovor i na naš drugi dobijeni rezultat. Naime, produkcija biofilma u našim rezultatima bila je više ometana kada je za nju bio odgovaran referentni soj. Ako uzmemo u obzir da je i ranije bilo sugerisano da većina laboratorijskih referentnih sojeva formira zanemarljive biofilme koji su prosto neuporedivi sa onima kakve ostvaruju klinički izolati iste vrste (Fux i sar., 2005), naš rezultat istovetan ovom navodu, bi se mogao objasniti činjenicom da je usled niza pasaža došlo do delimične inaktivacije gena odgovornih za formiranje ili interakciju u biofilmu kod referentnog soja koji smo koristili.

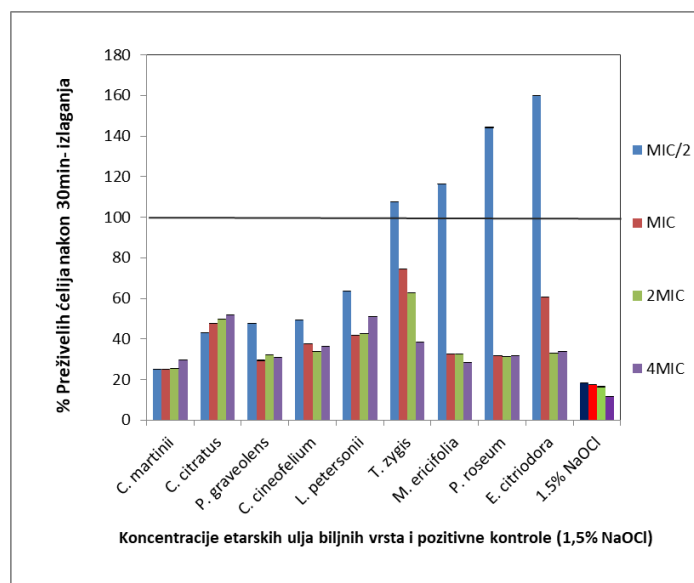
Paralelno sa ovom analizom trebalo bi se osvrnuti na razlike u osetljivosti među samim kliničkim izolatima. Nije nepoznanica da postoji izuzetna genetska varijabilnost među sojevima iste vrste (Fux et al., 2005) te je nepredvidiva i virulencija sojeva (Semedo i sar., 2003, Jarraud i sar., 2002). Mnogo puta smo u poglavlju doktorata u kome se bavimo tumačenjem antibakterijskog efekta analiziranih ulja, sugerisali da je poreklo testiranog soja jako bitno. Iz ovog razloga smatramo da bi za bolje zaključke bilo potrebno da studije budu sprovedene na velikom broju kliničkih izolata, poznatog porekla i iz prve pasaže.

Nakon što smo zaokružili sve mikrobiološke testove, razumeli koja ulja su najefikasnija i na koji način, kao i kako ubuduće treba da ih testiramo, preostalo je da pristupimo spoznavanju inicijalnih informacija o bezbednosti njihove primene. Iz ovog razloga sledeći odeljak biće posvećen ćelijskoj toksičnosti etarskih ulja, i naravno pozitivnih kontrola.

### *Ispitivanje citotoksičnosti etarskih ulja, natrijum-hipohlorita i triantibiotske paste*

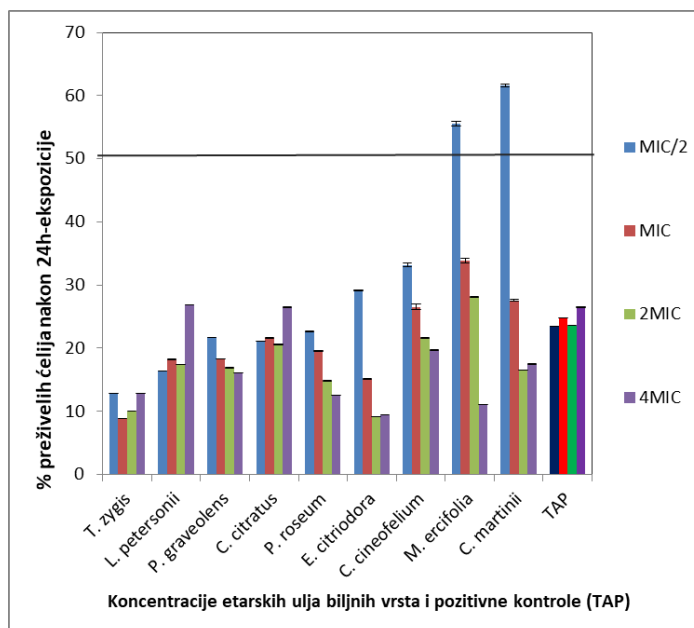
Procena citotoksičnosti etarskih ulja ispitivana je na ćelijskim linijama humanih fetalnih fibroblasta pluća (MRC-5) u opservacionom periodu od 30 min i 24 h. Na ovaj način se analiziralo akutno i produženo delovanje etarskih ulja, koje je poređeno sa odgovarajućim pozitivnim kontrolama.

Nakon 30 minutne ekspozicije ćelijske kulture za većinu etarskih ulja (izuzimajući ulje vrste *C. citratus*) na koncentracijama MIK i višoj od MIK, preživljavanje je bilo niže od 40%. Na najnižoj koncentraciji MIK/2 ulja vrsta *T. zygis*, *M. ericifolia*, *P. roseum* i *E. citridora* nisu delovala citotoksično. Toksičnost svih etarskih ulja prema ćelijama, u opservacionom periodu od 30 min, je bila niža u odnosu na toksičnost koju je prema ćelijama pokazala pozitivna kontrola (1,5% NaOCl, procenat preživljavanja ćelija ispod 20%), (**Figura 14**).



**Figura 14.** Poređenje citotoksičnosti etarskih ulja i pozitivne kontrole (NaOCl) nakon 30-minutne ćelijske ekspozicije

Toksičnost merena nakon 24h ekspozicije ćelija pokazala je nizak nivo ćelijskog preživljavanja. Preživljavanje ćelija nakon delovanja etarskih ulja na koncentracijama MIC i višoj od MIC je bilo ispod 30%. Preživljavanje ćelija nakon delovanja najnižih koncentracija etarskih ulja (MIC/2) bilo je približno isto kao i kada su ćelije bile izlagane višim koncentracijama tih ulja. Izuzetak su ulja vrsta *M. ericifolia* i *C. martinii*, nakon čijeg 24h kontakta sa ćelijama je preživelo oko 60% izlaganih ćelija. Citotoksičnost ulja bila je uporediva sa citotoksičnošću pozitivne kontrole (TAP), (**Figura 15**).



**Figura 15.** Procena citotoksičnosti etarskih ulja i pozitivne kontrole nakon 24h izlaganja

Prvi deo analize ćelijske toksičnosti u našoj studiji razmatrao je inicijalnu toksičnost ispitivanih ulja. Ona je poređena sa toksičnošću natrijum hipohlorita u vremenu od 30 min. Ovaj vremenski okvir odabran je kao približno vreme koje je potrebno da se završi irigacija u stomatološkoj praksi. Nije iznenađenje da su sva ulja bila manje toksična od najčešće primenjivanog irigansa. O toksičnosti natrijum-hipohlorita govore mnoge publikacije (Chang et al., 2011, Essner et al., 2011, Farhad Mollashahi, et al., 2016, Karkehabadi et al., 2018, Singh et al., 2018, Uğur Aydın et al., 2018), a neke posebno apostrofiraju preživljavanje ćelija ispod 30% (Ravinanthanan et al., 2018, Uğur Aydın et al., 2018, Satti et al., 2019). Autori takođe navode visoku toksičnost hipohlorita čak i u koncentracijama koje su izrazito niže od klinički primenjivanih (Chang et al., 2001, Essner et al., 2011).

Rezultati u našoj studiji pokazuju da je toksičnost etarskih ulja u vremenskom delovanju od 24 h uporediva sa toksičnošću pozitivne kontrole TAP. Citotoksičnost TAP je ispitivana i ranije (Yadlapati et al., 2013, Llerena et al., 2018, Khoshkhounejad et al., 2019), a istraživači sugerišu ćelijsko preživljavanje i ispod 30% (Yadlapati et al., 2013) i ispod 50% (Llerena et al., 2018), što se sve slaže sa rezultatima iz naše studije.

Fokus ove disertacije je na etarskim uljima, ali informacije o toksičnosti pozitivnih kontrola imaju veliki značaj, jer ih smatramo ključnim za pravilno tumačenje ostvarenih rezultata. Naime, oba testiranja su pokazala da su etarska ulja citotoksična, i da njihova toksičnost raste sa dužinom ćelijskog izlaganja. Međutim, u poređenju sa pozitivnim kontrolama koje su u širokoj primeni, toksičnost ulja je ipak bila manja.

Za procenu citotoksičnosti etarskih ulja korišćena je procena toksičnosti direktnim izlaganjem ćelija, konkretno humanih fetalnih fibroblasta. Ova metoda je jedna od često primenjivanih i u upotrebi je od 1980. godine, zbog svoje jednostavnosti, ponovljivosti, brzine i pristupačne cene. Međutim, nakon ovoliko godina primene ove metode, naučnoj zajednici je postalo jasno da se dobijeni rezultati ne mogu aproksimirati na realne kliničke situacije. Razlog ovome je činjenica da se u *in vivo* uslovima materijali razlažu u telesnim tečnostima, zbog čega im se smanjuje koncentracija. Takođe, zanemaruje se i uloga fagocita, krvnog i limfatičnog sistema, kao i inhibitorni uticaj dentina (Karkehabadi i sar., 2018). U ovome treba pronaći odgovor zbog čega autori dobijaju kao rezultat da su toksične koncentracije iriganasa i medikamenata, one koje su klinički prihvatljive.

Premda svesni ovih nedostataka, nismo eliminisali ovakvu metodu iz naše studije, jer nam ona daje mogućnost da bez osvrta na numeričku redukciju broja živih ćelija, analiziramo paralelno da li se razlikuje uticaj ulja u odnosu na uticaj onoga što je već prihvaćeno i široko primenjeno u stomatološkoj praksi. S tim u vezi, mi možemo smatrati da su primenjena etarska ulja toksična jednako ili manje od materijala koji su već u primeni, položila prvi ispit u kvalifikaciji za dalju analizu. Tek će naredni testovi na laboratorijskim životinjama, i u kliničkim uslovima, prikazati pravu biokompatibilnost etarskih ulja, kao i materijala zasnovanih na njima.

Sada, kada smo zaokružili celinu u našem opsežnom istraživanju u narednom odeljku ćemo se osvrnuti na buduće pravce istraživanja.

*Definisanje potencijalnih etarskih ulja ili njihovih aktivnih komponenti za dalja predklinička i klinička ispitivanja u cilju unapređenja efikasnosti endodontske terapije inficiranog korenskog kanala mladih stalnih zuba*

Zadatak ove disertacije bio je da izvrši jednu sveobuhvatnu analizu etarskih ulja kao mogućih antibakterijskih agenasa efikasnih u redukciji broja ili potpunoj eliminaciji bakterija iz inficiranih korenskih kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom. Na osnovu detaljnog pregleda literature načinjena je predikcija uspeha u tome. Tako su najefikasnija etarska ulja zapravo zaista i bila bogata geraniolom i timolom, kako je bilo i očekivano. Konkretno, ulja vrsta *Cymbopogon martinii* i *Thymus zygis* pokazala su se među ostalim uljima, kao superiornija u redukciji formiranog biofilma, u klasičnim *in vitro* testovima i u testovima koji su simulirali kliničke uslove. Pravi mehanizam njihovog delovanja koji je sugerisan, još uvek ostaje predmet nedovoljne istraženosti. Buduća istraživanja bi trebalo da razjasne na koji način nastupa smrt bakterijske ćelije, ali i kako ova ulja deluju na nivou polisaharidnog matriksa.

Pored izučavanja ovog mehanizma, naredni testovi će biti rađeni u cilju razumevanja antibakterijskog i antibiofilmnog efekta komponenti iz ovih ulja, pa će se testirati i interakcije među glavnim konstituentima, konkretno geraniolom i timolom.

Kada sve ovo bude razjašnjeno, doći ćemo do rezultata koji će ukazati kako da se načini odabir materijala za dizajn emulzija za irigaciju kanala. Dobijeni rezultati u doktoratu predstavljaju zapravo prve korake u ovom pravcu istraživanja. Tek pažljiv odabir favorizovanih ulja (*C. martinii* i *T. zygis*) i/ili njihovih komponenti (timol, geraniol i dr), i odgovarajućih surfaktanata otvoriće novo poglavlje u dizajnu samih iriganasa.

Iako je ovaj doktorat tek otvorio vrata novom svetu emulzija, rezultati su bili više nego ohrabrujući. Emulzije zasnovane na uljima *C. martinii* i *T. zygis* su se pokazale kao odlično rešenje u redukciji multispecijskog biofilma, a posebno biofilma soja *E. faecalis*. Stava smo da tek predstoje dalja istraživanja koja će nakon definisanja idealne formulacije irigansa zasnovanih na uljima, ponovo izvršiti procenu antibiofilmnog potencijala istih na eksperimentalnim životinjskim modelima, koje će istovremeno dati i uvid u procenu bezbednosti njihove primene. Potom, doći će vreme kliničkih studija, nakon kojih će se zasigurno promeniti endodoncija kakvu mi danas znamo. Želja autora je da svedoči, ako ne i učestvuje u tim kliničkim studijama, jer duboko veruje da je u eri rastuće rezistencije ne samo na antibiotike, već i na ostale komercijalno primenjene antimikrobike, budućnost načinila svoje prve korake u ovoj disertaciji.



## ZAKLJUČAK

Na osnovu postavljenih ciljeva, dobijenih rezultata i pregleda literature, zaključujemo sledeće:

- Nakon izolacije i identifikacije mikroorganizama dobijen je reprezentativni uzorak mikrobioma inficiranih korenskih kanala mladih stalnih zuba sa apikalnim periodontitisom, u kome su dominirali fakultativni anaerobi.
- Među fakultativnim anaerobima najčešće izolovani bili su predstavnici rodova *Streptococcus*, *Actinomyces* i *Enterococcus*. Među manje zastupljenim, striktnim anaerobima, dominantni su bili sojevi iz rodova *Veillonella*, *Prevotella* i *Fusobacterium*.
- *Prevotella bucae*, *Parvimonas micra* i *Streptococcus constellatus* bili su izolovani samo iz kanala sa prisutnom pratećom kliničkom slikom.
- Odabrana etarska ulja biljnih vrsta *Cinnamomum camphora cineoliferum*, *Pelargonium graveolens*, *Pelargonium roseum*, *Leptospermum petersonii*, *Eucalyptus citriodora*, *Melaleuca ericifolia*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon martinii* i *Thymus zygis*, koja su testirana u ovoj studiji, bila su bogata oksigenovanim monoterpenima.
- Komponenta 1,8-cineol je ulazila u sastav ulja vrsta *C. camphora cineoliferum* i *M. ericifolia*, geraniol u sastav ulja vrsta *P. graveolens*, *P. roseum* i *C. martinii*, dok je ulje vrste *T. zygis* obilovalo timolom. Preostala tri ulja vrsti (*E. citriodora*, *L. petersonii* i *C. citratus*) bila su bogata citronelalom, geranialom i neralom.
- Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti pokazali su sledeći poredak etarskih ulja po rastućoj efikasnosti: *C. camphora cineoliferum* (MIK= 10,13 mg/mL) < *M. ericifolia* (MIK= 7,79 mg/mL) < *E. citriodora* (MIK= 6,41 mg/mL) < *P. roseum* (MIK= 5,69 mg/mL) < *P. graveolens* (MIK= 5,37 mg/mL) < *L. petersonii* (MIK= 3,13 mg/mL) < *C. citratus* (MIK= 2,02 mg/mL) < *C. martinii* (MIK= 1,80 mg/mL) < *T. zygis* (MIK= 0,7 mg/mL).
- Uočeno je da su ulja imala veći inhibitorski potencijal kada su delovala na referentne sojeve ATCC kolekcije u odnosu na kliničke izolate.
- Ulja koja su ostvarila višu MIK delovala su efikasnije na striktno anaerobe, dok su ulja sa nižim MIK imala snažniji efekat na fakultativne anaerobe.
- Ulje sa najvišim antibakterijskim potencijalom (vrste *T. zygis*) bilo je jednako efikasno i u delovanju protiv striktnih i fakultativnih anaeroba.
- Etarska ulja vrsta *P. graveolens*, *L. petersonii* i *C. citratus* delovala su inhibitorno na inicijalnu fazu formiranja biofilma u *in vitro* uslovima, dok je njihov uticaj na već formirani biofilm izostao ili čak bio stimulativan. Suprotno od toga, etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* su delovala inhibitorno na sve posmatrane biofilmove.
- Etarska ulja vrsta *C. martinii* i *T. zygis* su izrazito baktericidno delovala na slobodno-živeće ćelije i ćelije unutar biofilma.

- Napravljen je novi način primene ulja u vodenoj fazi u formi nano-, odnosno mikroemulzije, a za potrebe irigacije korenskih kanala. Nanoemulzija koja je sadržala uljane kapljice etarskog ulja *C. martinii* bila je providna i stabilna, sa veličinom čestica od 100 nm. Mikroemulzija ulja *T. zygis* je imala sedefasti odsjaj i veličinu čestica veću od 100 nm.
- Irigansi (emulzije) zasnovani na uljima *C. martinii* i *T. zygis* pokazali su jednako ili bolje dejstvo u redukciji ćelija iz kanalnog biofilma u odnosu na 1,5% NaOCl.
- Irigans koji je sadržao ulje *C. martinii* je bio izuzetno uspešan primenjen u finalnoj irigaciji.
- SEM mikroskopija je potvrdila antibiofilmnu aktivnost iriganasa.
- Studija je potvrdila da ATCC sojevi ne mogu ni u kom slučaju oslikavati kliničke izolate, kao i da je u cilju veće relevantnosti rezultata istraživanja neophodno testirati veliki broj kliničkih izolata, poznatog porekla i iz prve pasaže.
- Ćelijska toksičnost ulja bila je uporediva ili niža od toksičnosti pozitivnih kontrola.

Najbolji antibakterijski i antibiofilmni potencijal imala su etarska ulja *T. zygis* i *C. martinii*. Prošla su prvi korak u proceni bezbedne primene i uspešno su integrisana, kao prirodni biološki aktivni sastojci, u emulzije namenjene primeni u korenskim kanalima. Možemo konstatovati da smo bili veoma uspešni u izboru ulja za datu vrstu istraživanja, kao i to da su karakteristične komponente ovih ulja, timol odnosno geraniol, vrlo verovatno okosnica njihove učinkovitosti.

## Literatura

- AAE, 2016: American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure [Internet]. [Chicago]: American Association of Endodontists; 2016. Available from: <https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2017/06/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf>
- Abbaszadegan A, Sahebi S, Gholami A, et al. Time-dependent antibacterial effects of *Aloe vera* and *Zataria multiflora* plant essential oils compared to calcium hydroxide in teeth infected with *Enterococcus faecalis*. *J Investig Clin Dent*. 2016;7(1):93-101.
- Adams RP. Identification of essential oil compounds by gas chromatography and mass spectrometry. (4th ed.). Carol Stream: Allured Publishing Corporation. 2009.
- Ahirwar P, Shashikiran ND, Sundarraj RK, Singhla S, Thakur RA, Maran S. A clinical trial comparing antimicrobial efficacy of "essential oil of *Ocimum sanctum*" with triple antibiotic paste as an intracanal medicament in primary molars. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2018;36(2):191-197.
- Alexa VT, Galuscan A, Popescu I, et al. Synergistic/Antagonistic Potential of Natural Preparations Based on Essential Oils Against *Streptococcus mutans* from the Oral Cavity. *Molecules*. 2019;24(22):4043.
- Almeida R, Akisue G, Cardoso L, Junqueira J, Jorge AC. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus mutans* and *Candida spp.* *Rev Bras Plantas Med*. 2013;15(4):474-482.
- Alnouri DMA, Kouchaji C, Nattouf AH, AlSayed Hasan, MMA. Effect of aloe vera mouthwash on dental plaque and gingivitis indices in children: A randomized controlled clinical trial. *Pediatr Dent J*. 2020;30(1):1-8.
- Al-Omari M and Al-Samahi S. Detection of bacteria in endodontic samples and its association with defined clinical signs and symptoms of endodontic infection. *Saudi J Oral Sci*. 2014;1(2):83.
- Araujo MWB, Charles CA, Weinstein RB, et al. Meta-analysis of the effect of an essential oil-containing mouthrinse on gingivitis and plaque. *J Am Dent Assoc*. 2015;146(8):610-622.
- Ballester-Costa C, Sendra E, Fernández-López J, Pérez-Álvarez JA, Viuda-Martos M. Chemical composition and in vitro antibacterial properties of essential oils of four *Thymus* species from organic growth. *Ind Crops Prod*. 2013;50:304–311.
- Balta I, Brinzan L, Stratakos AC, Linton M, Kelly C, Pinkerton L, Corcionivoschi N. Geraniol and linalool loaded nanoemulsions and their antimicrobial activity. *Bul Univ Agric Sci Vet Med Cluj-Napoca, Anim Sci Biotechnol*. 2017;74(2):157.
- Bammann LL and Estrela C. Microbiological aspects in endodontics: *Endodontic Science*. 2009;1:258–81.
- Banchs F and Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004;30:196–200.

- Basak S and Guha P. A review on antifungal activity and mode of action of essential oils and their delivery as nano-sized oil droplets in food system. *J Food Sci Technol*. 2018; 55(12):4701–4710.
- Benbelaid F, Khadir A, Bendahou M, Ben-Yelles I, Muselli A, Costa J. Eradication of *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilms by *Cinnamomum cassia* essential oil solution as a root canal irrigant. *Nat Prod J*. 2018;8(1):54–60.
- Berger D, Rakhmimova A, Pollack A, Loewy Z. Oral Biofilms: Development, Control, and Analysis. *High Throughput*. 2018;7(3):24.
- Berkiten M, Okar I, Berkiten R. In vitro study of the penetration of *Streptococcus sanguis* and *Prevotella intermedia* strains into human dentinal tubules. *J Endod*. 2000;26:236–239.
- Bogojević J, Nikolić M, Marković T, Ćirić A, Marković D. Analysis of chemical composition of the most efficient essential oils towards *Enterococcus faecalis* referent strain ATCC 29212 and clinical isolates. *Med Raw Mater*. 2016;36:3–25.
- Boukhris M, Simmonds MSJ, Sayadi S, Bouaziz M. Chemical composition and biological activities of polar extracts and essential oil of *Rose-scented Geranium*, *Pelargonium graveolens*. *Phytother Res*. 2012;27(8):1206–1213.
- Brophy JJ and Doran JC. Geographic Variation in Oil Characteristics in *Melaleuca ericifolia*. *J Essent Oil Res*. 2004;16(1):4–8.
- Budzyńska A, Wieckowska-Szakiel M, Sadowska B, Kalemba D, Różalska B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. *Pol J Microbiol*. 2011;60(1):35-41.
- Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(4):446–450.
- Chang Y, McLandsborough L, McClements DJ. Physicochemical properties and antimicrobial efficacy of carvacrol nanoemulsions formed by spontaneous emulsification. *J Agric Food Chem*. 2013;61(37):8906–8913.
- Charugundla BR, Anjum S, Mocherla M. Comparative effect of fluoride, essential oil and chlorhexidine mouth rinses on dental plaque and gingivitis in patients with and without dental caries: a randomized controlled trial. *Int J Dent Hyg*. 2015;13(2):104-109.
- Chouhan S, Sharma K, Guleria S. Antimicrobial activity of some essential oils-present status and future perspectives. *Medicines (Basel)*. 2017;4(3):58.
- Cimanga K, Kambu K, Tona L, et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. *J Ethnopharmacol*. 2002; 79(2): 213-220.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, CLSI publication M07-A8, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 8th ed. 2009.

- Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):443-9.
- Correa MS, Schwambach J, Mann MB, Frazzon J, Frazzon APG. Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. *Arq Inst Biol.* 2019;86
- Costerton JW, Lewandowski Z, DeBeer D, Caldwell D, Korber D, James G. Biofilms, the customized microniche. *J Bacteriol.* 1994;176(8):2137-42.
- Dahlen G, Moller A Jr. Microbiology of endodontic infection. In: Slots J, Taubman MA, ed. Contemporary Oral Microbiology and immunology. St. Louis Mosby year Book Inc; 1991; 444–55.
- Dar-Odeh NS, Abu-Hammad OA, Al-Omiri MK, Khraisat AS, Shehabi AA. Antibiotic prescribing practices by dentists: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2010;6:301-306.
- Darrag AM. Antimicrobial efficacy of endodontic irrigation solutions against planktonic microorganisms and dual-species biofilm. *Tanta Dental J.* 2013;10(3):129–137.
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N, Mnif W. Essential Oils’ chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines.* 2016;3(4):25.
- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15:167–93.
- Dorman HJ, Deans SG. Antibacterial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88:308–316.
- Ercan E, Dalli M, Yavuz I, Özekinci T. Investigation of microorganisms in infected dental root canals. *Biotechnol Biotechnol Equip.* 2014;20(2).
- Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(5):662-6.
- Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanó JCE, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113–117.
- Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of cytotoxic effects of various endodontic irrigation solutions on the survival of stem cell of human apical papilla. *Iran Endod J.* 2016;11(4):293–297.
- Frias-Lopez J and Duran-Pinedo A. Effect of periodontal pathogens on the metatranscriptome of a healthy multispecies biofilm model. *J Bacteriol.* 2012;194:2082–2095.
- Fuks A, Peretz B. Pediatric Endodontics: Current concepts in pulp therapy for primary and young permanent teeth. Switzerland: Springer International Publishing. 2016.
- Fux CA, Shirtliff M, Stoodley P, Costerton JW. *Can laboratory reference strains mirror “real-world” pathogenesis? Trends Microbiol.* 2005; 13(2):58–63.

Gbenou JD, Ahounou JF, Akakpo HB, et al. Phytochemical composition of *Cymbopogon citratus* and *Eucalyptus citriodora* essential oils and their anti-inflammatory and analgesic properties on Wistar rats. *Mol Biol Rep.* 2012;40(2):1127–1134.

Gomes BP, Rocas IN, Siqueira Jr JF. Endodontic infections and therapeutical approaches. In: Lamont RJ, Hajishengallis GN, Jenkinson HF, Koo H, ed. *Oral Microbiology and Immunology*. 3rd ed. Washington (DC): ASM Press; 2014.

Gomes BPFA and Herrera DR. Etiologic role of root canal infection in apical periodontitis and its relationship with clinical symptomatology. *Braz Oral Res.* 2018;18(32):e69

Gomes B, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filbo FJ. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34(5):537–540.

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):1058–1063.

Guimarães NL, Otoch HM, Andrade LC, Ferreira CM, Rocha MM, Gomes FD. Microbiological evaluation of infected root canals and their correlation with pain. *Revista RSBO Odonto.* 2012;9:31–7.

Guo S, Geng Z, Zhang W, et al. The chemical composition of essential oils from *Cinnamomum camphora* and their insecticidal activity against the stored product pests. *Int J Mol Sci.* 2016;17(11):1836.

Haas AN, Wagner TP, Muniz FWMG, Fiorini T, Cavagni J, Celeste RK. Essential oils-containing mouthwashes for gingivitis and plaque: Meta-analyses and meta-regression. *J Dent.* 2016;55:7-15.

Horváth B., Balázs VL, Varga A, et al. Preparation, characterisation and microbiological examination of Pickering nano-emulsions containing essential oils, and their effect on *Streptococcus mutans* biofilm treatment. *Sci Rep.* 2019, **9**: 16611.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996; 29(2):125-30.

ISO 3217:1974 Oil of lemongrass (*Cymbopogon citratus*)

ISO 4731:2006 Oil of geranium (*Pelargonium x ssp.*)

ISO14715:2010 Oil of thyme containing thymol, Spanish type [*Thymus zygis* (Loefl.) L.]

ISO3044:1997 Oil of *E. citriodora* Hook.

ISO4727:1988 Oil of Palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxburgh) W. Watson var. *motia*)

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185–7.

- Jacinto RC, Gomes BPFA, Ferraz CCR., Zaia AA, Filho FJS. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003;18(5):285-92.
- Jarraud S., Mougel C, Thioulouse J, et al. Relationships between *Staphylococcus aureus* genetic background, virulence factors, agr groups (alleles), and human disease. *Infect Immun.* 2002;70(2):631-641.
- Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2015;5(1):1–12.
- Jungermann GB, Burns K, Nandakumar R, Tolba M, Venezia RA, Fouad AF. Antibiotic resistance in primary and persistent endodontic infections [published correction appears in *J Endod.* 2012 Apr;38(4):535]. *J Endod.* 2011;37(10):1337-1344. doi:10.1016/j.joen.2011.06.028
- Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of endodontic irrigants on human periodontal ligament cells. *Iran Endod J.* 2018;13(3):390-394.
- Khongkhunthian S, Sookkhee S, Okonogi S. Antimicrobial activities against periodontopathogens of essential oil from lemon grass (*Cymbopogon citratus* (dc.) stapf.). *Chiang Mai Univ J Nat Sci.* 2009;8(1):11-22.
- Khoshkhounejad M, Sobhi Afshar M, Jabalameli F, Emaneini M, Sharifian M. Cytotoxicity evaluation of minimum antibacterial values of different medicaments used in endodontic regenerative procedures. *Eur J Dent.* 2019;13(04):514–520.
- Kolenbrander PE, Andersen RN, Blehert DS, Eglund PG, Foster JS, Palmer RJ Jr. Communication among Oral Bacteria. *MMBR.* 2002; 66(3): 486–505
- Lee LW, Lee YL, Hsiao SH, Lin HP. Bacteria in the apical root canals of teeth with apical periodontitis. *J Formos Med Assoc.* 2017; 116(6):448–456.
- Leonard CM, Virijevic S, Regnier T, Combrinck S. Bioactivity of selected essential oils and some components on *Listeria monocytogenes* biofilms. *S Afr J Bot.* 2010;76(4): 676–680
- Lew HP, Quah SY, Lui JN, Bergenholtz G, Hoon Yu VS, Tan KS. Isolation of alkaline-tolerant bacteria from primary infected root canals. *J Endod.* 2015; 41(4): 451–456.
- Li J, Chang JW, Saenger M, Deering A. Thymol nanoemulsions formed via spontaneous emulsification: Physical and antimicrobial properties. *Food Chem.* 2017;232:191–197.
- Liang R, Xu S, Shoemaker CF, Li Y, Zhong F, Huang Q. Physical and antimicrobial properties of peppermint oil nanoemulsions. *J Agric Food Chem.* 2012; 60(30):7548–7555.
- Llerena H, Gomes-Cornélio AL, Neto Angélico RR, Swerts Pereira MS, Tanomaru Filho M. Influence of the vehicle and antibiotic formulation on cytotoxicity of triple antibiotic paste. *J Endod.* 2018; 44(12):1812–1816.
- Lu WC, Huang DW, Wang CCR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, Li PH. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Drug Anal.* 2018; 26(1):82–89.

- Luqman S, Dwivedi SGR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Antimicrobial activity of Eucalyptus citriodora essential oil . *IJEOT*. 2008;2:69-75.
- Lysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J. The Sensitivity of Endodontic Enterococcus spp. Strains to Geranium Essential Oil. *Molecules*. 2015;20(12):22881-22889.
- Lysakowska ME, Ciebiada-Adamiec A, Sienkiewicz M, Sokolowski J, Banaszek K. The cultivable microbiota of primary and secondary infected root canals, their susceptibility to antibiotics and association with the signs and symptoms of infection. *Int Endod J*. 2016;49:422–430.
- Marinković J, Marković T, Miličić B, Soković M, Ćirić A, Marković D. Outstanding efficacy of essential oils against oral pathogens. In:Mailk S, ed. Essential oil research. Trends in biosynthesis, analytics, industrial applications and biotechnological production; Switzerland: Springer International Publishing. 2019; 211-232
- Marion JJC, Manhaes F, Bajo H, Dugue MH. Efficiency of different concentrations of sodium hypochlorite during endodontic treatment. Literature review. *Dental Press Endod*. 2012;2(4):32-7.
- Marković T. Etarska ulja i njihova bezbedna primena. Institut za proučavanje lekovitog bilja "Dr Josif Pančić" Beograd 2011.
- Martin DE, De Almeida JFA, Henry MA, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*. 2014;40:51–55.
- Martos J, Bassotto APS, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Dissolving efficacy of eucalyptus and orange oil, xylol and chloroform solvents on different root canal sealers. *Int Endod J* 2011;44: 1024–1028.
- Matsuo T, Shirakami T, Ozaki K, Nakanishi T, Yumoto H, Ebisu S. An immunohistological study of the localization of bacteria invading root pulpal walls of teeth with periapical lesions. *J Endod*. 2003;29:194–200
- Metzger Z, Abramovitz I, i Bergenholtz G. Apeksni periodontitisi. U: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C, ed. Endodontologija. ORION ART. 2011
- Mileva MM, Kusovski VK, Krastev DS , Dobрева AM, Galabov AS. Chemical composition, in vitro antiradical and antimicrobial activities of Bulgarian *Rosa alba L.* essential oil against some oral pathogens. *Int J Curr Microbiol App Sci* .2014;3(7):11-20.
- Miris-Brophy JJ, Goldsack RJ, Punruckvong A, et al. Leaf essential oils of the genus *Leptospermum* (Myrtaceae) in eastern Australia. Part 7. *Leptospermum petersonii*, *L. liversidgei* and allies. *Flavour Fragr J*. 2000;15:342-351.
- Mohamed Hanaa AR, Sallam YI, El-Leithy AS, Aly SE. Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as affected by drying methods. *Ann Agric Sci*.2012;57(2):113–116.
- Boukhatem MN, Ferhat MA, Kameli A, Saidi F, Kebir HT. Lemon grass (*Cymbopogon citratus*) essential oil as a potent anti-inflammatory and antifungal drugs. *Libyan J Med*. 2014;9:25431.
- Mohammadi Z, Iran Y. Sodium hypochlorite in endodontics:an update review *Int Dent J*. 2008;58: 329-341



- Mohammadi Z, Shalavi S, Yazdizadeh M. Antimicrobial activity of calcium hydroxide in endodontics: a review. *Chonnam Med J.* 2012;48(3):133–140.
- Mulyaningsih S, Sporer F, Reichling J, Wink M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol.* 2011;49(9):893-9.
- Murbach Teles Andrade BF, Nunes Barbosa L, Bérigamo Alves FC et al. The impact of *Cymbopogon martinii* essential oil on *Cutibacterium (formerly Propionibacterium) acnes* strains and its interaction with keratinocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2018.
- Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002. 35-47
- Naik MI, Fomda BA, Jaykumar E, Bhat JA. Antibacterial activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) oil against some selected pathogenic bacterias. *Asian Pac J Trop Med.* 2010; 3(7):535–538.
- Nair PN. Endodontic biofilm, technology and pulpal regenerative therapy: where do we go from here? *Int Endod J.* 2014;47(11):1003-11.
- Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15(6):348–381.
- Nakajo K, Nakazawa F, Iwaku M, Hoshino E. Alkali-resistant bacteria in root canal systems. *Oral Microbiol Immunol.* 2004; 19(6): 390–394.
- Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent.* 2010;13(4):233–239.
- Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, YAN A, Cheung GSP. Biofilms in endodontics—current status and future directions. *Int J Mol Sci.* 2017;18:1748.
- 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.* 2014; 48(6): 602–610.
- Nikolić M. Biološka aktivnost etarskih ulja odabranih aromatičnih biljaka na vrste rodova *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Pseudomonas*, *Enterococcus* i *Candida* izolovane iz usne duplje čoveka. Doktorska teza. Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu 2015.
- Nivens DE, Ohman DE, Williams J, Franklin MJ. Role of alginate and its O acetylation in formation of *Pseudomonas aeruginosa* microcolonies and biofilms. *J Bacteriol.* 2001;183:1047–57.
- Ortega-Ramirez LA, Gutiérrez-Pacheco MM, Vargas-Arispuro I, González-Aguilar GA, Martínez-Téllez MA, Ayala-Zavala JF. Inhibition of Glucosyltransferase Activity and Glucan Production as an Antibiofilm Mechanism of Lemongrass Essential Oil against *Escherichia coli* O157:H7. *Antibiotics (Basel).* 2020;9(3):102.
- Palmer RJ Jr, White DC. Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends Microbiol.* 1997;5(11):435-40.

- Park SN, Lim YK, Freire MO, Cho E, Jin D, Kook JK. Antimicrobial effect of linalool and  $\alpha$ -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. *Anaerobe*. 2012; 18(3):369–372.
- Pathania R, Khan H, Kaushik R, Khan MA. Essential oil nanoemulsions and their antimicrobial and food applications. *Curr Res Nutr Food Sci*. 2018;6(3).
- Perez F, Calas P, de Falguerolles A, Maurette A. Migration of a *Streptococcus sanguis* strain through the root dentinal tubules. *J Endod*. 1993;19:297–301
- Peters LB, van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR. Effects of instrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulpless teeth with periapical bone lesions. *Int Endod J*. 2002; 35(1):13–21.
- Petrino JA. Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent* 2007;86:33–5.
- Provenzano JC, Rocas IN, Tavares LFD, Neves BC, Siqueira JF. Short-chain fatty acids in infected root canals of teeth with apical periodontitis before and after treatment. *J Endod*. 2015;41:831–835
- Raina VK, Srivastava SK, Aggarwal KK, Syamasundar KV, Khanuja SPS. Essential oil composition of *Cymbopogon martinii* from different places in India. *Flavour Fragr J*. 2003;18(4):312–315.
- Ravinanthanan M, Hegde MN, Shetty V, Kumari S. Cytotoxicity effects of endodontic irrigants on permanent and primary cell lines. *Biomed Biotechnol Res J*. 2018;2:59-62.
- Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009;42:84–92.
- Rôças IN., Siqueira JF. Characterization of microbiota of root canal–treated teeth with posttreatment disease. *J Clin Microbiol*. 2012; 50(5):1721–1724
- Rôças IN, Siqueira JF, Debelian GJ. Analysis of symptomatic and asymptomatic primary root canal infections in adult norwegian patients. *J Endod*. 2011;37(9):1206-12.4
- Rolph HJ, Lennon A, Riggio MP, Saunders WP, MacKenzie D, Coldero L, Bagg J. Molecular identification of microorganisms from endodontic infections. *J Clin Microbiol*. 2001;39:3282–3289
- Rota MC, Herrera A, Martínez RM, Sotomayor JA, Jordán MJ. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis essential oils*. *Food Control*. 2008;19(7):681–687.
- Sakamoto M, Siqueira JF, Rôças IN, Benno Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(1):19–23.
- Salvia-Trujillo L, Rojas-Graü A, Soliva-Fortuny R, Martín-Belloso O. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oils. *Food Hydrocoll*. 2015;43:547–556.
- Sassone LM, Fidel RA, Faveri M, Guerra R, Figueiredo L, Fidel SR, Feres M. A microbiological profile of symptomatic teeth with primary endodontic infections. *J Endod*. 2008;34(5):541–545.

- Satti P, Kakarla P, Jogendra Avula SS, Muppa R, Kiran Rompicharla SV, Biswas S. Indigenous irrigants as potent antimicrobials in endodontic treatment: An *in vitro* study. *J Indian Soc Pedod Prev Dent* 2019;37:275-81
- Seibert JB, Rodrigues IV, Carneiro SP, et al. Seasonality study of essential oil from leaves of *Cymbopogon densiflorus* and nanoemulsion development with antioxidant activity. *Flavour Fragr J*. 2018.
- Semedo T, Santos MA, Lopes MF, Marques JJF, Crespo MT, Tenreiro R. Virulence factors in food, clinical and reference *Enterococci*: a common trait in the genus? *Syst Appl Microbiol*. 2003;26(1):13-22.
- Serbiak B, Fourre T, Geonnotti AR, Gambogi RJ. *In vitro* efficacy of essential oil mouthrinse versus dentifrices. *J Dent*. 2018;69:49–54.
- Shakya VK, Luqman S, Tikku AP, Chandra A, Singh DK. A relative assessment of essential oil of *Chrysopogon zizanioides* and *Matricaria chamomilla* along with calcium hydroxide and chlorhexidine gel against *Enterococcus faecalis* in *ex vivo* root canal models. *J Conserv Dent*. 2019;22(1):34-39.
- Sharopov FS, Zhang H, Setzer WN. Composition of geranium (*Pelargonium graveolens*) essential oil from Tajikistan. *Am J Essent Oil Na. Prod*. 2014;2(2):13-16
- Siddiqui N, Garg SC. Chemical Composition of *Cymbopogon martinii*(Roxb.) Wats. var.*martinii*. *J. Essent. Oil Res* 1990;2(2):93–94.
- Silveira CMM, Sebrão CCN, Vilanova LSR, Sánchez-Ayala A. Apexification of an Immature Permanent Incisor with the Use of Calcium Hydroxide: 16-Year Follow-Up of a Case. *Case Rep Dent*. 2015;1–6.
- Singh A, Kakkar P, Pant A B. Comparative evaluation of cytotoxic effects of MTAD and sodium hypochlorite using lactate dehydrogenase and trypan blue assays: An *in vitro* study. *Saudi Endod J*. 2018;8:189-95.
- Singh RK, Shakya VK, Khanna R, et al. Interventions for managing immature permanent teeth with necrotic pulps. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;2017(6):CD012709.
- Siqueira JF Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. *Actinomyces species*, *Streptococci* and *Enterococcus faecalis* in primary root canal infection. *J Endod*. 2002;28(3):168-72.
- Siqueira JF, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG. Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(5):721–726.
- Skaug N, Bakken V. Systemske komplikacije endodontskih infekcija. U: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C, ed. *Endodontologija*. Orion art. 2011.
- Souza MA, Tumelero Dias C, Zandoná J, et al. Antimicrobial activity of hypochlorite solutions and reciprocating instrumentation associated with photodynamic therapy on root canals infected with *Enterococcus faecalis* – An *in vitro* study. *Photodiag PhotodynTher*. 2018;23:347–352.

- Steininger C, Willinger B. Resistance patterns in clinical isolates of pathogenic *Actinomyces* species. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(2):422-427.
- Stepanović S, Vuković D, Dakić I, Savić B, Švabić-Vlahović M. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microb Methods.* 2000;40:175–179.
- Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.* 2006;32(2):93–98.
- Svensäter G, Bergenholtz G. Biofilms in endodontic infections. *Endod Topics.* 2004;9:27–36.
- Svensäter G, Chaves de Paz L, Theilade E. Mikrobiologija nekrotične pulpe. U: Bergenholtz G, Hørsted-Bindslev P, Reit C, ed. Endodontologija. ORION ART. 2011
- Syed I, Sarkar P. Ultrasonication-assisted formation and characterization of geraniol and carvacrol-loaded emulsions for enhanced antimicrobial activity against food-borne pathogens. *Chem Pap.* 2018; 72:2659–2672.
- Szutt A, Dołhańczuk-Śródka A, Sporek M. 1 Evaluation of chemical composition of essential oils derived from different Pelargonium species leaves. *Ecol Chem and Eng.* 2020; 26(4):807-816
- Takenaka S, Ohsumi T, Noiri Y. Evidence-based strategy for dental biofilms: Current evidence of mouthwashes on dental biofilm and gingivitis. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019;55(1):33-40.
- Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, et al. New Bacterial Composition in Primary and Persistent/Secondary Endodontic Infections with Respect to Clinical and Radiographic Findings. *J Endod.* 2014;40(5):670-7.
- Terjung N, Loffler M, Gibis M, Hinrichs J, Weiss J. Influence of droplet size on the efficacy of oil-in-water emulsions loaded with phenolic antimicrobials. *Food Funct.* 2012;3(3):290- 301
- Trope M. Treatment of immature teeth with non-vital pulps and apical periodontitis. *Endod Topics.* 2006;14(1):51–59.
- Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Noguchi K, Ishiyama M, Ezoe T, Matsumoto K. Comparison of the WST-8 colorimetric method and the CLSI broth microdilution method for susceptibility testing against drug-resistant bacteria. *J Microbiol Methods.* 2012;90:160–166.
- Uğur Aydın Z, Akpınar KE, Hepokur C, Erdönmez D. Assessment of toxicity and oxidative DNA damage of sodium hypochlorite, chitosan and propolis on fibroblast cells. *Braz oral res.* 2018;32
- Usha HL, Kaiwar A, Mehta D. Biofilm in endodontics: New understanding to an old problem. *Int J Contem Dent.* 2010;1:44–51.
- Van Vuuren SF, Docrat Y, Kamatou GPP, Viljoen AM. Essential oil composition and antimicrobial interactions of understudied tea tree species. *S Afr J Bot.* 2014 92, 7–14.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 2002;295:1487.

Wongsariya K, Phanthong P, Bunyaphatsara N, Srisukh V, Chomnawang MT. Synergistic interaction and mode of action of *Citrus hystrix* essential oil against bacteria causing periodontal diseases. *Pharm Biol.* 2013;52(3):273–280.

Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2013; 47(8):769–775.

Zhang K., Wang S, Zhou X, *et al.* (2015). Effect of antibacterial dental adhesive on multispecies biofilms formation. *J Dent Res.* 2015; 94:622-629.

Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT- tetrazolium method. *J. Endod.* 2003;29:654–657.

Zijngel V, Van Leeuwen MBM, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, *et al.* Oral Biofilm Architecture on Natural Teeth. *PLoS ONE.* 2010;5(2):e9321.

Živković S, Vujašković M, Pap K, Grga Đ, Lukić A, Teodorović N. Osnovi restaurativne stomatologije. Data status. 2009.

Živković S, Ivanović V. Vujašković M i sar. Praktikum endodontske terapije. Data status. 2017.

## BIOGRAFIJA KANDIDATA

Jelena (Mićo) Marinković, rođena je 26. juna 1989. godine u Paraćinu. Osnovnu i srednju školu završila je u Požarevcu. Stomatološki fakultet, Univerziteta u Beogradu, upisala je 2008. godine. Diplomirala je 2014. godine kao najbolji student u generaciji sa prosečnom ocenom 9,78. Upisuje doktorske studije, 2015. godine, na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U periodu od 2015 – 2017. bila je stipendista Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Od septembra 2018. radi kao istraživač pripravnik u Institutu za nuklearne nauke Vinča“ - Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. U februaru 2020. stiče zvanje istraživač saradnik u istom institutu.

Autor je sledećih publikacija, rezultata doktorske teze:

1. Marinković J, Čulafić DM, Nikolić B, Đukanović S, Marković T, Tasić G, Ćirić A, Marković, D. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. *Arch Oral Biol.* 2020;117:104842. (M22)
2. Marinković J, Marković T, Brkić S, Radunović M, Soldatović I, Ćirić A, Marković D. Microbiological analysis of primary infected root canals with symptomatic and asymptomatic apical periodontitis of young permanent teeth. *Balk J Dent Med.* 2020:24. (M51)
3. Bogojević J, Nikolić M, Marković T, Ćirić A, Marković D. Analysis of chemical composition of the most efficient essential oils towards *Enterococcus faecalis* referent strain ATCC 29212 and clinical isolates. *Med Raw Mater.* 2016;36:3–25. (M52)

Član je Srpskog lekarskog društva. Udata je i majka je jednog deteta.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а                     **Јелена Маринковић**                    

број индекса                     **4003/2015**                    

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**“Дејство етарских уља на бактерије инфицираног коренског канала младих сталних  
зуба”**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Јелена Маринковић

Број индекса 4003/2015

Студијски програм Докторске студије Стоматолошког факултета, Универзитета у Београду

Наслов рада Дејство етарских уља на бактерије инфицираног коренског канала младих сталних зуба

Ментор проф. др Дејан Марковић

др Ана Ћирић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**Дејство етарских уља на бактерије инфицираног коренског канала младих сталних зуба**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство

Ауторство - некомерцијално

3. Ауторство – некомерцијално – без прераде

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима

5. Ауторство – без прераде

6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.