

**УНИВЕРЗИТЕТ У ПРИШТИНИ  
СА ПРИВРЕМЕНИМ СЕДИШТЕМ  
У КОСОВСКОЈ МИТРОВИЦИ  
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ**

**Радован Р. Јовановић**

**ПРОЦЕНА ЕФИКАСНОСТИ ДОПУНСКИХ  
АНТИМИКРОБНИХ ЕНДОДОНТСКИХ ПОСТУПАКА У  
ЕЛИМИНАЦИЈИ ИНФЕКЦИЈЕ КАНАЛА КОРЕНА ЗУБА  
БАКТЕРИЈОМ ENTEROCOCCUS FAECALIS**

**Докторска дисертација**

**UNIVERSITY OF PRISTINA**  
**TEMPORARY SETTLED IN KOSOVSKA MITROVICA**  
**FACULTY OF MEDICINE**

**Радован Р. Јовановић**

**ASSESSMENT OF THE EFFICIENCY OF SUPPLEMENTARY  
ANTIMICROBAL ENDODONTIC PROCEDURES IN THE  
ELIMINATION OF INFECTIONS OF THE ROOT CANAL  
BY BACTERIA ENTEROCOCCUS FAECALIS**

**DOCTORAL DISSERTATION**

## **Ментори**

Проф. др Југослав Илић

ванредни професор Стоматолошког Факултета Универзитета у Београду

Проф. др Зоран Влаховић

ванредни професор Медицинског Факултета Универзитета у Косовској Митровици

## **Комисија за оцену и одбрану завршене докторске дисертације**

Проф. др Љиљана Шубарић (председник) – Медицински факултет Приштина;

Проф. др Југослав Илић (ментор) – Стоматолошки факултет Београд;

Проф. др Зоран Влаховић (ментор) - Медицински факултет Приштина;

Доц. др Милена Радуновић (члан) – Стоматолошки факултет Београд;

Проф. др Душан Живковић (члан) – Медицински факултет Приштина;

## **Датум одбране**



*Ову докторску дисертацију посвећујем својој супрузи Сањи, ћерки Николини  
и сину Петру за њихову безрезервну љубав и подршку.*

Приликом израде ове докторске дисертације имао сам несебичну стручну помоћ и подршку многих. Овом приликом желео бих да се захвалим:

Проф. др Југославу Илићу, изузетном ментору, пре свега племенитој личности, на разумевању, пожртвованости и спремности да помогне у превазилажењу свих проблема на које сам наилазио у току писања ове дисертације.

Проф. др Зорану Влаховићу на подршци и подстицању којим ме је пратио од почетка мог истраживачког пута.

Проф. др Душану Павлици са института за Микробиологију и имунологију, на коришћењу ресурса њихове установе.

Проф. др Бранки Поповић са института за Хуману генетику, за увођење у свет Хумане генетике и помоћ при извођењу истраживања.

Доц. др Милени Радуновић за срдчан пријем и стручну помоћ при извођењу микробиолошког дела истраживања.

Доц. др Ђорђу Вељовићу са Технолошко-металуршког факултета Универзитета у Београду на изради скенинг електронске микроскопије

Проф. др Љиљани Шубарић на подстицају и сугестијама.

Члановима колектива Клинике за Стоматологију који су ми својим разумевањем и подршком помогли у извођењу овог истраживања.

# ПРОЦЕНА ЕФИКАСНОСТИ ДОПУНСКИХ АНТИМИКРОБНИХ ЕНДОДОНТСКИХ ПОСТУПАКА У ЕЛИМИНАЦИЈИ ИНФЕКЦИЈЕ КАНАЛА КОРЕНА ЗУБА БАКТЕРИЈОМ ENTEROCOCCUS FAECALIS

## САЖЕТАК

Насељавање бактерија у каналном систему зуба доводи до стварања бактеријског биофилма на зидовима канала, у анатомским сужењима, унутар дентинских каналића и припадајућем периапикалном ткиву. Успех ендодонтског третмана директно зависи од ефикасности елиминације овог биофилама богатог функционално повезаним бројним врстама микроорганизама. Грам позитивни микроорганизам *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) се сматра одговорним за неуспех највећег броја ендодонтских третмана зуба, пре свега због резистентности коју показује на стандардне методе обескличавања канала корена зуба.

Циљ овог истраживања је да се утврди степен антимикубног дејства на бактерију *E. faecalis* антимикубне фотодинамске терапије (АФДТ), диодног ласера, ултразвучно агитоване иригације (ПУИ), ендодонтског инструмента XP Endo finisher (XPF) и стандардног протокола иригације канала корена 0,5% NaOCl. Ужи циљеви су били: 1. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене АФДТ; 2. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене диодног ласера; 3. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене ултразвучно агитоване иригације; 4. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене XPF; 5. Одредити присуство, број

генома као и број формираних колонија микроорганизама *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене стандардног протокола иригације канала корена; 6. Упоредити ефикасност пет наведених антимикуробних метода; 7. Утврдити слагање броја генома и броја бактеријских колонија након примене наведених антимикуробних протокола; 8. Потврдити присуство бактеријског бофилма на зидовима канала корена зуба са индукованом инфекцијом бактеријом *E. faecalis*; 9. Испитати изглед површине канала корена након примене пет испитиваних протокола обескличења; 10. Испитати присуство *E. faecalis*-а у дентинским тубулима након примене пет испитиваних протокола обескличења.

Студија је изведена на 65 свеже екстрахирана, интактна, једнокорена зуба одраслих особа са завршеним растом корена, који су екстрахирани из ортодонтских или пародонтолошких разлога на Клиници за оралну хирургију Медицинског Факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици. Зуби су након екстракције убацивани у раствор 5.25% NaOCl а потом чувани у 0.9% физиолошком раствору на собној температури до употребе у експерименту. Зуби су подељени у 5 експерименталних и једну контролну групу. У групи I је спроведена ПУИ Tigon W&H (*W&H Dentalwerk Bürmoos GmbH, Postfach 1,5111 Bürmoos, Austria*). У групи II је изведен стандардан протокол иригације зуба шприцем и иглом. У групи III је спроведено обескличавање канала корена АФДТ по протоколима датим од стране произвођача и података из литературе. У групи IV је примењен диодни ласер Elixion pico. У групи V је спроведена иригација раствором 0.5% NaOCl и канал је финално третиран инструментом XPF. У контролној групи зуби су испирани 0.9 раствором NaCl.

За испитивање антимикуробне ефикасности коришћене су методе култивације и одређивања броја бактеријских колонија по милилитру узорка (CFU/ml), ланчане реакције полимеразе у реалном времену (RT-PCR) и скенинг електронске микрографије (SEM).



Резултати нашег истраживања показују да је дошло до статистички значајног умањења броја бактерија *E. faecalis* након примењених третмана у свим експерименталним групама у односу на контролну групу.

Испитујући антибактеријску ефикасност пасивне ултразвучне иригације раствором 0,5% NaOCl на бактерију *E. faecalis*, у својој студији смо доказали да употреба ове терапијске процедуре доводи до статистички значајног смањења броја бактерија у узорцима. Вредности CFU/ml које смо добили након примењених третмана указују да је АФДТ најефикаснија у елиминацији бактерије *E. faecalis* и доводи до смањења броја бактерија за 99,6%. Постоји статистички значајна разлика у ефикасности АФДТ у односу на конвенционалну иригацију раствором 0,5% NaOCl(87,1%) као и у односу на ПУИ(78,8%). Употреба диодног ласера у нашој студији довела је до статистички значајног умањења броја бактерија након примењеног третмана. Међутим, у нашој студији смо добили резултате који указују да постоји статистички значајна разлика у медијанама процентуалних разлика вредности броја копија генома после третмана диодним ласером у односу на остале примењене терапијске процедуре. Употреба XPF у нашем истраживању доводи до статистички значајног умањења броја бактерија *E. faecalis* након примењеног третмана. Анализом вредности процентуалних промена CFU/ml после третмана у нашој студији након примене XPF регистровали смо умањење броја бактерија за 99,3%. Након индукције инфекције у свим експерименталним групама дошло је до формирања биофилма бактерије *E. faecalis*. Након употребе XPF утврђене су изразите ерозије површине дентина унутар канала корена. Међутим, једино у овој групи нису идентификовани микроорганизми унутар дентинских тубула.

Испитивани антимикробни поступци значајно доприносе елиминацији инфекције канала корена бактеријом *E. faecalis*.

**КЉУЧНЕ РЕЧИ:** Ендодонтска терапија, бактеријска инфекција, *E. faecalis*, Антимикробна фотодинамска терапија, Ласер, CFU, PCR.

**НАУЧНА ОБЛАСТ:**Стоматолошке науке

**УЖА НАУЧНА ОБЛАСТ:** Базичне стоматолошке науке

# Садржај

## **1. УВОД**

## **2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ**

### *2.1. Патологија зубне пулпе*

#### *2.1.1 Структура зубне пулпе и дентина*

#### *2.1.2. Етиологија обољења пулпе*

#### *2.1.3. Микрофлора инффицираног канала корена зуба*

#### *2.1.4. Састав ендодонтске микрофлоре*

#### *2.1.5. Карактеристике бактеријског рода *Enterococcus**

#### *2.1.6. Грађа бактеријске ћелија и особине бактерије *E. faecalis**

#### *2.1.7. Улога бактерије *E. faecalis* у ендодонтским инфекцијама*

### *2.2. Терапија инффицираног канала корена*

#### *2.2.1. Антимикробне процедуре у ендодонцији*

#### *2.2.2. Поступци у терапији инффицираног канала корена*

#### *2.2.3. Значај инструментације у терапији инфекције канала*

#### *2.2.4. Значај иригације канала у терапији ендодонтских инфекција*

##### *2.2.4.1. Раствори натријум хипохлорита у иригацији канала корена*

##### *2.2.4.2 Раствори хлорхексидина у иригацији канала корена*

##### *2.2.4.3. Улога и значај ЕДТА у иригацији канала корена*

##### *2.2.4.4. Употреба других антибактеријских раствора у иригацији канала корена*

#### *2.2.5. Системи за агитацију поступка иригације*

##### *2.2.5.1. Ултразвук у поступку агитације иригације*

#### *2.2.6. Употреба ласера у ендодонтској процедури*

#### *2.2.7. Антимикробна фотодинамска терапија*

#### *2.2.8. Ендодонтски системи посебног дизајна намењени агитацији иригације*

## **3. РАДНА ХИПОТЕЗА**

## **4. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА**

## **5. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ**

5.1. *Формирање експерименталних група*

5.2. *Припрема узорака*

5.3. *Култивација микроорганизама*

5.4. *Антимикробни протоколи*

5.5. *Узорковање, молекуларна и микробиолошка анализа*

5.6. *СЕМ*

5.7. *Статистичка обрада података*

## **6. РЕЗУЛТАТИ**

6.1. *Број копија генома*

6.2. *Број ћелија*

6.3. *Налаз CFU/ml*

6.4. *СЕМ*

## **7. ДИСКУСИЈА**

## **8. ЗАКЉУЧЦИ**

## **9. ЛИТЕРАТУРА**

## 1. УВОД

Пулпа зуба представља ткиво које често оболи или буде повређено, што представља индикацију за извођење ендодонтског третмана. Успешна ендодонтска терапија представља комбинацију правилне инструментације, иригације и оптурације канала корена зуба у све три димензије. Од ова три основна корака у терапији канала корена зависи интегритет и здравље периапексног ткива.

Повезаност базичних наука и праксе испољава се у пуној мери кроз узрочно-последичну везу микробиологије и успеха ендодонтске терапије.

Здрава усна дупља у себи садржи сложени микробиолошки систем, променљив у броју и типу бактерија, гљивица, вируса и протозоа. На зубном органу се разликују отворени и затворени еко системи или поља зуба које карактерише различита бактеријска флора. У одређеним околностима микроорганизми који чине нормалну флору усне дупље могу постати патогени и узроковати настанак болести. Настанак болести почиње њиховим масовним продором у примарно стерилна подручја оралне средине као што су зубна пулпа или периапексно ткиво. Микроорганизми имају кључну улогу у настанку и развоју обољења пулпе и периапикалног ткива, а исход лечења значајно зависи од чињенице да ли се микроорганизми налазе у каналу корена зуба непосредно пре оптурације. Инфекција канала корена зуба је комплексна и обухвата главни канал, споредне канале, апексну делту и дентинске тубуле. Микроорганизми доспевају у канални систем директно, најчешће из каријесне лезије, пукотина глеђи и дентина, или индиректно, услед микропропустљивости споја рестаурације и тврдих зубних ткива, порозних каналних пуњења и путем крви.

Познато је да насељавање бактерија у каналном систему зуба доводи до стварања бактеријског биофилма на зидовима канала, у анатомским сужењима, унутар дентинских каналића и припадајућем периапикалном ткиву.

Успех ендодонтског третмана директно зависи од ефикасности елиминације овог биофилама богатог функционално повезаним бројним врстама микроорганизама. Грам позитивни микроорганизам *E. faecalis* се сматра одговорним за неуспех највећег броја ендодонтских третмана зуба, пре свега због резистентности коју показује на стандардне методе обескличавања канала корена зуба.

Стога значајна фаза ендодонтског лечења инфицираног канала корена, елиминација бактерија, захтева увођење додатних поступака како би се повећала ефикасност поступка и осигурало периапикално оздрављење и регенерација ткива. Доказано је да процедуре које додатно обескличавају канале након хемомеханичке обраде, повећавају могућност успешног ендодонтског лечења.

Механичка обрада канала ендодонтским инструментима током ендодонтске терапије не може потпуно очистити канал и уклонити остатке пулног ткива и размазни слој са зидова канала корена, па је у циљу њиховог уклањања неопходно испирање или иригација канала различитим иригансима. Савремена истраживања показују да је готово 30% простора каналног система недоступно каналним инструментима током обраде, те је улога иригације у ендодонцији од великог значаја. И поред свега наведеног доказано је да правилна техника хемомеханичке обраде канала корена зуба уз примену ириганаса по устаљеном протоколу не доводи до потпуне елиминације микроорганизама у току ендодонтске терапије.

Имајући у виду да се елиминација микроорганизама из простора канала корена сматра кључним фактором од кога зависи успешност ендодонтског третмана зуба, последњих година се у свакодневну стоматолошку праксу уводи све више допунских антимикробних поступака који за циљ имају што ефикаснију елиминацију заосталих микроорганизама из каналног система корена зуба.

Као један од првих поступака којим се повећава ефикасност конвенционалних ириганаса почиње се са њиховом активацијом ултразвуком. Термин пасивна

ултразвучна иригација (ПУИ) први пут почео је да се користи 80-тих година прошлог века.

Фотодинамска терапија (ФДТ) подразумева употребу светлосно-активирајућих супстанци (фотосензитизера) у третману обољења. Први корак у овом процесу јесте апликација фотосензитивне супстанце у организам пацијента (локално или системски). Након периода биодистрибуције фотосензитивне супстанце третирано подручје се излаже дејству светла које припада спектру видљивог или приближно инфрацрвеног светла.

Диодни ласери (ДЛ) емитују зрачење различитих таласних дужина, најчешће видљиви део спектра од 660 nm те инфрацрвени од 810 nm или 980 nm. Антибактеријско деловање диодног ласера у коренском каналу, се заснива на фототермалном ефекту, чиме се уклања највећи део бактерија у коренском каналу.

Питање степена ефикасности различитих допунских поступака обескличавања као и њиховог утицаја на успешност ендодонтског третмана врло је актуелно у области ендодонтских истраживања и још увек недовољно познато.

## **2. ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ**

### **2.1. Патологија зубне пулпе**

#### **2.1.1 Структура зубне пулпе и дентина**

Зубна пулпа представља везивно-ткивну структуру смештену у средини зуба која је са свих страна окружена чврстим зубним ткивима. Границе пулпе одговарају спољашњој контури круне, нарочито код тек изниклих зуба. Пулпа се састоји од ћелија, влакана и основне супстанце. У основној међућелијској супстанци налазе се колагена и еластична влакна, крвни и лимфни судови, нервна влакна и мали број ћелија (одонтобласти, фибробласти, фиброцити, хистиоцити, лимфоцити, мастоцити и мезенхималне ћелије)<sup>1</sup>. Ћелијски елементи нису равномерно распоређени, па се у структури пулпе разликује неколико слојева.

На површини се налази слој одонтобласта, високоспецијализованих ћелија које стварају органски матрикс дентина (предентин). Одонтобласти су високо цилиндричне ћелије, постављене једна до друге у епителоидном низу. Са њиховог апикалног пола полазе продужеци (тзв. Томасова влакна) која улазе у дентинске каналиће (микротубуле) и испоручују предентин. Од њега каснијом минерализацијом настаје прави дентин, а стварањем нових слојева дентина одонтобласти се повлаче ка пулпи и њихови цитоплазматски продужеци постају све дужи.

Испод одонтобласта налази се Вејлова безћелијска зона, у којој је смештен сплет немијелизованих нервних влакана. Ова влакна садрже рецепторе за бол. Трећи слој се назива Хоелова мултицелуларна зона, која садржи велики број различитих ћелија, везивна и еластична влакна, бројне капиларе и нерве.

Дентин даје основни облик зубу и пружа се целом његовом дужином, од крунице, преко врата, кроз цео корен зуба. Дентин представља минерализовано везивно ткиво и по свом саставу је веома сличан коштаном ткиву, али не садржи комплетне ћелије и крвне судове.<sup>1</sup> Органске материје и вода чине око 30%, а неорганске материје око 70% садржаја дентина. Кроз дентин пролазе дентински каналићи, промера 2-5 $\mu$ m управљени од зубне пулпе ка глеђи. У овим каналићима су смештена Томес-ова влакна као цитоплазматични продужеци одонтобласта. Палисадно распоређен слој одонтобласта смештен је на периферији пулпе а у дентину се од ћелијских елемената налазе само њихови цитоплазматични продужеци. Органски део дентина(предентин) се ствара у одонтобластима. Колагена влакана и аморфна интрацелуларна сустанца се потом минерализују и на тај начин се предентин трансформише у дентин. Дентиногенеза је континуирани процес и обавља се током читавог живота у таласима, тако да постоје активне фазе и фазе мировања у процесу његовог депоновања. Услед тога се у структури дентина појављују таласасте пруге које се називају инкрементне линије. У дентину не постоје крвни судови. Како не поседује сопствене ћелијске елементе васкуларизација дентина не представља неопходан услов за његово одржавање. Инервација дентина је пореклом из пулпе. Нервна влакна пулпе, након што изгубе мијелинску овојницу, пролазе између одонтобласта и формирају нервни сплет у предентину. Нека од влакана улазе у дентинске каналиће и долазе у блиски контакт за одонтобласним продужецима. Имајући у виду наведено јако је битно не посматрати физиолошке али и патолошке промене у дентину и пулпи као одвојене већ као промене пулпо-дентинског комплекса.

### **2.1.2. Етиологија обољења пулпе**

Етиолошки фактори који доводе до обољења пулпе су бројни. Патолошки процес или стање који доводе до микробилошког, физичког или хемијског нарушавања



интегритета зубне пулпе се може сматрати етиолошким фактором обољења пулпе зуба.

Каријес представља доминантни етиолошки фактор у настанку обољења пулпе зуба. Инфламаторна реакција пулпног ткива почиње много пре него што бактерије продру у њега. Доказано је да је примарана инфламаторна реакција иницирана интеракцијом бактеријских агенаса са ћелијама локалног имуног система<sup>2</sup>. Све док каријесна лезија не допре до саме пулпе инфламаторна реакција обично је ограничена и реверзibilна. Код узнапредовале каријесне лезије долази до пробијања баријере од чврстог зубног ткива. Међутим, и овој фази је већи део пулпног ткива неконтаминиран. Стога би ендодонтску терапију запаљенских стања пулпе требало усмерити у правцу лечења инфламације као и превенције инфекције канала корена<sup>3</sup>. Код апикалних периодонтитиса бактерије колонизују читав простор канала корена зуба што доводи до инфламаторне реакције перирадикуларног ткива узрокованог микроорганизмима и њиховим продуктима. Имајући ово у виду терапија која има за циљ зацељење периапикалног ткива мора да буде усмерена ка елиминацији микроорганизама из простора канала корена зуба. Показано је да прогноза терапије апикалног периодонтитиса зависи од присуства бактерија у простору канала корена у тренутку оптурације<sup>4</sup>.

Међутим, у литератури има података који показују да нема статистички значајне разлике у зарастању периапикалног ткива између зуба напуњених након позитивног или негативног налаза култивације микроорганизама, као и између третмана завршеног у једној или две посете<sup>5</sup>.

Ипак постоји општи консензус међу истраживачима да је ефикасно уклањање узрочних агенаса (микроорганизама) из простора канала корена кључ доброг зарастања и зацељења периапикалног ткива.<sup>6</sup>

### 2.1.3. Микрофлора инфицираног канала корена зуба

Канали корена зуба су нормално стерилне средине и постојање бактерија у њима зависи од слабљења одбрамбених механизма пулног ткива и вируленције микроорганизама. Некротично ткиво зубне пулпе, настало као последица губитка њених одбрамбених механизма, је идеална подлога за раст и размножавање микроорганизама.

Инфекција канала корена започиње и одржава запаљенску реакцију ткива периодонцијума и на тај начин доводи до развоја апексног периодонтитиса. Прво посматрање микроорганизама који насељавају некротично ткиво пулпе обавио је Antony van Leuwenhoek 1683 године на микроскопу кућне израде. Он му је омогућио да направи прве цртеже бактерија денталног плака. Требало је више од 200 година да буду спроведена прва биолошка истраживања микроорганизама из канала корена. Vilubi D. Miler (1853-1907), отац модерне оралне микробиологије, описао је клиничке ефекте гангренозне пулпе као седишта инфекције. Он је на експерименталним животињама узгајао и описао бактерије некротичне пулпе и изучавао њихов патогени потенцијал<sup>7</sup>.

Витална пулпа представља прву линију одбране од микроорганизама и њихов продор бива обично заустављен посебно када пулно ткиво није директно изложено ка усној дупљи. С друге стране, напредовањем каријеса долази до слабљења одбрамбених снага пулпе, што бактеријама из каријесне лезије омогућава да населе пулни простор. Сличан пут уласка бактерија се дешава и код траума и повреда зуба, фрактура, јатрогених повреда и током рестауративних процедура. Директан пут у простор канала корена може да се нађе код зуба са обољењем периодонцијума. Из субгингивалног биофилма бактерије могу да уђу кроз акцесорне канале и канале у фуркацијама као и кроз апексни отвор код терминалних пародонталних разарања. Директан пут из спољашње средине није неопходан за насељавање бактерија.

Постоје докази о насељавању пулпе кроз дентинске каналиће и пукотине у цементу корена. Чак и код наизглед интактних зуба током распадања пулпе у случају трауме микроорганизми могу проћи баријеру од чврстог ткива<sup>8</sup>. Анохореза се такође помиње као један од начина продора микроорганизама у простор канала корена зуба.<sup>9</sup>

Микроорганизми који насељавају простор канала корена могу да буду планктонски („слободно лебдећи“) или међусобно повезани у сложеној структури и спојени за зид канала корена. Када бактерије постану густо збијене и уложене у екстацелуларни матрикс користи се термин микробни биофилм. Изузетна сазнања о биофилму постала су доступна током претходне деценије. Применом нових микроскопских и молекуларних метода, истраживачи су доказали да биофилмови нису просте бактеријске насlage на различитим површинама, већ да су у питању биолошки системи са високим степеном организованости, у којима микроорганизми граде координисане и функционалне заједнице.<sup>10</sup>

Последњих година истраживање биофилмова окупира пажњу бројних истраживача. Док је планктонске микроорганизме лако уклонити, један од главних изазова у ендодонтској терапији јесте уклонити микроорганизме који се налазе у формираним биофилмовима који су адхерирани на зид канала корена зуба.<sup>11</sup>

Најдиректнији доказ о биофилмовима који се налазе у каналима коренова јесу *in situ* студије спроведене светлосним, трансмисионим електронским или скенинг електронским микроскопом на извађеним зубима са дијагнозом апексног периодонтитиса<sup>12</sup>.

*Nair* и сарадници у својој студији налазе да биофилмови, најчешће састављени од неколико морфолошких типова, расту у више слојева и то као агрегати на дентинским зидовима канала корена или као густе агрегати у некротичном ткиву<sup>13</sup>.

Бактерије из простора главног канала лако прелазе у латерални канални систем и канале апикалне делте. Још 1964 *Shovelton* доказује присуство бактерија у

денталним тубулима корена зуба. Хистолошким испитивањем 97 узорака екстархираних зуба са предходно некротичном пулпом, *Shovelton* проналази бактерије у дентину корена зуба код 63% узорака<sup>14</sup>. *Peters* и сар. код зуба становника Ирске и Холандије екстархираних због дијагносткованог апексног периодонтитиса проналазе бактерије у дентину корена зуба у 77% односно 87% узорака<sup>15</sup>.

Симбиоза микроорганизама који настањују простор канала корена зуба је доказана у бројним научним студијама. Тако *Fabricius* и сар. у серији класичних експеримената инокулацијом стерилних некротичних канала корена зуба микстуром осам бактеријских врста посматрају краткорочне и дугорочне промене у флори канала узорковањем из истих<sup>16</sup>. У 12 канала корена зуба је инокулирана микстура од свих осам бактеријских врста у једнакој пропорцији. Паралелно са овим у 63 канала је инокулирано више различитих комбинација микроорганизама или чисте културе појединих микроорганизама. На крају експерименталног периода је доказана преминација бактерија соја *Bacteroides oralis* (посебно *Prevotella oralis*) у узорцима са мешовитом флором. Међутим *Bacteroides oralis* није преживео у узорцима у којима је инокулиран као чиста култура. Насупрот томе ентерококе показују способност преживљавања и као чиста култура. У истој студији је доказано да мешовите инфекције канала корена зуба имају већи потенцијал да индукују запаљење периапикалног ткива што је верификовано ренгенографским снимцима. Запаљење је најизраженије код узорака у којима је инокулирано свих осам микроорганизама у комбинацији.

#### **2.1.4. Састав ендодонтске микрофлоре**

Примена молекуларних метода идентификације оралних бактерија има за последицу уочавање и идентификацију великог броја нових врста, некултивисаних или култивисаних али неидентификованих бактерија.

Процењено је да је на основу анализе секвенце нуклеотида 16S rRNA идентификовано око 700 врста бактерија, од којих је мање од 50% не може бити култивисано у лабораторији<sup>17</sup>.

Редокс потенцијал некротичне пулпе је веома низак, нижи од редокс потенцијала пародонталног џепа, што фаворизује доминацију анаеробних бактерија. Различите идентификационе технике доказују да око 70% бактерија које насељавају простор канала корена зуба припада стриктним анаеробима или микроаерофилима. Микроорганизми из узорака канала корена претежно су исти као они у денталном плаку, периодонцијуским џеповима или каријесној лезији. Већина изолованих врста из иницијалних култура су стриктни-облигациони анаероби. У култури бактерија узетих из зуба са секундарном инфекцијом, најчешће након неуспешног ендодонтског третмана, овај однос се мења у корист факултативних анаероба<sup>18</sup>.

Полимикробна природа инфекције у каналу корена је потврђена многобројним студијама. *Siqueira JF.* анаеробном техником култивације узорака, узетих из зуба са клинички дијагностикованим апексним периодонтитисом, налази просечно 3.1 таксономску групу бактерија по каналу корена<sup>19</sup>. Број ових група добијених култивацијом варира у опсегу од 2 до 8. У истој студији добијен је просечан број бактеријских ћелија од  $4.2 \times 10^5$ . Број бактеријских ћелија по узорку се кретао од  $2.8 \times 10^3$  до  $3.3 \times 10^7$ .

Низак ниво кисеоника у каналима корена зуба са некрозом пулпе, доступност нутритијената као и бактеријски међуодноси су важни еколошки фактори који детерминишу колонизацију простора канала корена зуба, посебно бактеријама из групе стриктних анаероба<sup>20</sup>.

Тако *Lana* и сар. у свом истраживању спроведеном на 27 узорака некротичне пулпе налазе стриктне анаеробе у 22 од 27 узорака (88.9%). Факултативни анаероби изоловани су из 14 узорака (51.8%), микроаерофили из 5 узорака (18.5%) и гљивице

из 2 (7.4%). Најчешће изоловане бактеријске врсте су: *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium* и *Peptostreptococcus*<sup>21</sup>.

Култивацијом микроорганизама из узорака узетих из апикалне трећине корена зуба са дијагностикованим апексним пародонтитисом *Baumgartner* и сар. налазе да су најчешће култивисане бактерије: *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Peptostreptococcus*, *Veillonella parvula*, *Bacteroides buccae*, *E. faecalis*, *Fusobacterium nucleatum* и *Streptococcus mutans*<sup>22</sup>.

Резултати великог броја студија које се баве микрофлором инфицираног канала корена зуба указују да строго анаеробне бактерије доминирају микробном популацијом нетретираних некротичних коренских канала, са приближно 5–12 родова укључујући: *Peptostreptococcus*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Eubacterium* и *Actinomyces*<sup>23</sup>.

Број бактеријских врста детектованих култивисањем или молекуларним методама, код зуба код којих је неопходан ендодонтски ретретман најчешће је око 30, и тај број је сличан броју бактеријских врста код нетретираних канала. Број бактерија је у опсегу од  $10^3$  до  $10^7$  бактеријских ћелија<sup>24</sup>.

Анализом података добијених из студија изведених у периоду од 1970 године до марта 2008 године а који се односе на микрофлору канала корена зуба са секундарном инфекцијом *Siqueira* са сар. проналази 52. бактеријске врсте као и две врсте гљивица. Као најчешће бактеријске врсте се помињу: *Propionibacterium acnes*, *Propionibacterium propionicum*, *Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces odontolyticus*, *Prevotella intermedia*, *Anaerococcus prevotii*, *Eggerthella lenta*, *E. faecalis*, *Gamella morbillorum*, *Parvimonas micra*, *Pseudoramibacter alactolyticus*, *Streptococcus anginosus*, *Streptococcus mitis*, *Fusobacterium nucleatum* и *Candida albicans*. Ради се о микроорганизмима узоркованим пре саме оптурације канала корена као и у процесу ретретмана канала корена зуба<sup>25</sup>.

Бактеријске врсте детектоване у узорцима узетим у току ретретмана канала корена зуба су из 7 различитих раздела и чини их 58 бактеријски врста. Најучесталије бактеријске врсте припадају разделу *Firmicutes*, кога у прате *Actinobacteria* и *Proteobacteria*<sup>30</sup>.

Техником култивације као и молекуларним техникама откривено је да је најчешће изолована бактерија, из узорака канала корена код којих је неопходан ендодонтски ретретман, *E. faecalis* са учесталашћу већом од 90% свих узорака<sup>26</sup>.

Вероватноћа да ће зуби у својим каналима поседовати *E. faecalis* је око 9 пута већа код ендодонтски третираних зуба него код зуба са примарном ендодонтском инфекцијом<sup>27</sup>.

### **2.1.5. Карактеристике бактеријског рода *Enterococcus***

Ентерококе припадају групи тзв. бактерија млечне киселине, и настањују гастроинтестинални тракт код широког спектра живих организама, од инсеката до човека. Однос ентерокока и домаћина, животиње или човека, је углавном у виду неке врсте коменсализма(симбиозе).

Коменсално-пробиотичка улога ентерокока је еволуирала стотинама година у заједничком суживоту са организмом домаћина. Ентерококе имају читав низ битних улога у конзервирању и ферментацији хране. За разлику од лактобцила који је кроз еволуцију постао јако битна пробиотичка бактерија са бројним позитивним особинама по људско здравље, ентерококе су годинама уназад све више препознате као чест патоген задужен за велики број обољења.

*Mac Callum* и *Hastings* су 1899 код леталног случаја ендокардитиса изоловали и окарактерисали бактерију која је данас позната као *E. faecalis*. Овај извештај је први детаљан опис њених патогених капацитета. Последњих неколико деценија мултирезистентни сојеви ентерокока су постали значајан патоген као и доминантан узрочник инфекција резистентних на лекове. Модеран начин живота који укључује широку употребу антибиотика како у медицинским установама тако и у кућним условима, наметнуо је два соја ентерокока, *E. faecium* и *E. Faecalis*, као најчешће патогене из ове групе микроорганизама. Развој модерне медицинске неге која укључује бројне интензивне и инвазивне терапијске процедуре као и све већи број имуно компромитованих пацијената у болницама довело је до све већег броја опортунистичких инфекција проузрокованих овим микроорганизмом.

### **2.1.6. Грађа бактеријске ћелија и особине бактерије *E. faecalis***

*E. faecalis* је грам позитивна бактерија, распоређена у виду парова(диплококе) или кратких ланаца, која настањује претежно црева човека и животиња. Слична је стрептококама и раније је дефинисана као стрептокока Д групе (класификација по Ленсфилду), али се данас сматра посебном фамилијом.

*E. faecalis* је факултативно анаеробна бактерија што значи да јој је кисеоник потребан, али може опстати и у средини без присуства кисеоника. Непокретна је и каталаза негативна.

*E. faecalis* има способност да хидролизује ескулин након инкубације и додавања гвожђа, на овај начин мења боју течне подлоге у црно. Стрептококе немају способност хидролизе ескулина.



Микробиолошка дијагностика бактерије *E. faecalis* се заснива на способности да расте при високим концентрацијама 6.5% NaCl, на температури од 45°C и 40% жучи. За разлику од стрептокока може да расте у јако базној средини (рН вредности 9)

Фактори вируленције откривени код бактерије *E. faecalis* изоловане из назокомијалних инфекција су: отпорност на антибиотике, способност продукције екстрацелуларних протеина (токсина), формирање биофилма, продукцију адхезијских и колонизационих фактора као што је бактериоцин.

### **2.1.7. Улога бактерије *E. faecalis* у ендодонтским инфекцијама**

Помињање бактерије *E. faecalis* као патогена заслужног за највећи број неуспеха у току ендодонтске терапије у литератури почиње развојем молекуларних техника детектовања микроорганизама. Постоји велики број студија који говори у прилог наведеној тези. Тако *Siqueira J.* и *Rôças, I. N.* у студији изведеној на 22 узорка узетих из канала корена зуба са перзистентном периапикалном лезијом, а који су били индиковани за ендодонтски ретретман, техником мултиплификације бактеријске DNA (PCR) добијају следеће резултате: *E. faecalis* је изолован из 77% узорака. Прате га *Pseudoramibacter alactolyticus* у 52% узорака, *Propionibacterium propionicum* у 52%, *Dialister pneumosintes* у 48% и *Filifactor alocis* у 48% узорака. *Candida albicans* је нађена у 9% узорака<sup>28</sup>.

Присуство бактерије *E. faecalis* у каналу ендодонтски третираног зуба објашњава се на два начина. По првом бактеријске ћелије заостају у каналном простору у току самог третмана, пре свега захваљујући њиховој способности да населе простор дентинских тубула, што им омогућава да остану недоступни већини стандардних техника инструментације и иригације канала корена зуба<sup>29</sup>.

Такође се у литератури помиње резистентност бактерије *E. faecalis* на калцијум хидроксид које је се најчешће користи као интерсеансни медикамент, као и његова способност да преживи у окружењу са ниском расположивошћу хранљивих материја а да се након тога обнови када се извор хранљивих материја поново успостави<sup>30</sup>.

Друга теорија присуство бактерије *E. faecalis* у каналу корена ендодонтски третираних зуба објашњава секундарном контаминацијом канала корена код неадекватно рестаурираних зуба( коронарно цурење) када као последица постојања микропростора долази до инвазије микроорганизама из оралне средине.

## **2.2. ТЕРАПИЈА ИНФИЦИРАНОГ КАНАЛА КОРЕНА**

### **2.2.1. Антимикробне процедуре у ендодонцији**

У већини делова људског организма елиминација опортунистичких инфекција се постиже акцијом имуног система домаћина. Ову активност је понекада потребно потпомогнути антибиотском терапијом. Елиминација инфекције канала корена, међутим, прилично се разликује у односу на друге делове људског тела.

Мере домаћина које су обично довољне да елиминишу микроорганизме из других делова људског тела, нису довољне за елиминацију инфективних агенаса из простора канала корена зуба. Разлог је пре свега специфична анатомија и физиологија овог простора коју карактерише недовољна повезаност са централном циркулацијом околних ткива услед одсуства колатералних крвних судова.

Због тога се борба против ендодонтских инфекција ослања првенствено на специфичне терапијске процедуре које имају за циљ обескличавање простора канала корена зуба, а мање на имунолошку активност домаћина. Међутим, успешна елиминација инфекције канала корена као и зарастање апикалне лезије зависе директно од координације оба механизма.

*Naapasalo* и сар. неопходним факторима у контроли ендодонтске инфекције сматрају: одбрамбени систем домаћина, систематску примену антибиотика (само повремено и у јасно дефинисаним индикацијама), инструментацију и иригацију, интерсеансну медијацију, оптурацију канала корена и коронарну рестаурацију<sup>31</sup>.

Одбрамбени систем домаћина представља кључни фактор који спречава ширење инфекције из простора канала корена у периапикалну регију. Недостатак циркулације у некротичном ткиву пулпе онемогућава фагоците и остале ћелије имуног система да продру у простор канала корена зуба дубље од неколико стотина микрометара.

Због тога, иако је од пресудног значаја у одржавању општег здравља људског организма, имуни систем домаћина је ограничен у постизању равнотеже између микробиолошких агенаса и организма и не може да елиминира инфекцију из канала корена зуба.

Системска примена антибиотика не представља стандардни терапијски протокол у случају ендодонтске инфекције, те се антибиотици ретко употребљавају у ендодонцији. Заговорници употребе антибиотика у ендодонцији, као разлог њихове примене наводе минимизирање ризика за појаву постоперативних симптома. Међутим, подаци из литературе указују на то да системска употреба антибиотика не умањује вероватноћу акутне егзецербације и других акутних компликација у току и након лечења<sup>32</sup>. Такође не постоји подаци у научној литератури који доказују да системска примена антибиотика утиче на дугорочну прогнозу и успех ендодонтске терапије. Постоји сагласност у стручној јавности да би антибиотике требало употребљавати у тачно дефинисаним индикацијама<sup>33</sup>. Ширење инфекције у суседне просторе је једна од индикација. Код пацијената са присутном грозницом и лошим општим стањем треба размислити о системској примени антибиотика, као и код имунокомпромитованих пацијента и пацијента са тешким систематским обољењима. Системску употребу антибиотика у ендодонцији треба ограничити на специфичне случајеве.

Антибиотици треба преписивати код апикалних пародонтитиса у фази акутног апикалног апцеса да би се спречило ширење инфекције у околна ткива и просторе као и код прогресивних и перзистентних инфекција. Антибиотици треба узети у обзир и код пацијената са урођеним или стеченим измењеним одбрамбеним капацитетом, као што су пацијенти са инфективним ендокардитисом, вештачким срчаним залисцима као и код пацијената који су недавно подвргнутим уградњи вештачких зглобова<sup>34</sup>.

### **2.2.2. Поступци у терапији инфицираног канала корена**

Препарација канала корена зуба као микрохируршка интервенција подразумева чишћење и обликовање каналног система при чему треба обезбедити конусну форму, глатке зидове без интерпонираног органског остатка пулпе и без микроорганизама у параканалном слоју дентина, са крајњим циљем, тродимензионалне, херметичке оптурације канала корена.

Препарација канала корена има свој механички(инструментација) и хемијски аспект(иригација). У клиничкој пракси инструментација са иригацијом је временски најдужа и најзахтевнија фаза лечења. Механичка обрада зидова канала, који својим радним делом остварују ефекат сечења, дробљења, сабијања и глачања површине, доводи до стварања танког микрослоја који је познат као размазни слој. Употребом ириганаса у току инструментације постиже се елиминација размазног слоја и органских остатака ткива пулпе.

Крајем шездесетих година прошлог века *Schilder* је поставио основне принципе биомеханичке обраде канала корена али они и данас представљају основ савременог схватања препарације канала.

Основни принципи којих се треба придржавати у поступку препарације канала по *Schilder*-у јесу: коничан облик препарисаног канала од круничног ка апикалном делу, попречни пресек канала корена треба да се смањује ка апикалној трећини, облик прпарације треба да прати изворни облик канала корена, апикални отвор мора бити сачуван, величина апикалне препарације треба бити најмања могућа<sup>35</sup>.

Важан фактор у редукцији микроорганизама јесте величина апикалне препарације. Велики број аутора је сагласан са овом тврдњом. Тако *Rollison* са сар. у својој студији доказује да повећање апикалне препарације са величине #35 на #50 доводи до значајног смањења бактерија у каналу корена зуба. У овој студији аутори такође закључују да је јако тешко постићи обескличење канала корена искључиво инструментацијом без обзира да ли се она спроводи ручно или се користе машински ротирајући инструменти.<sup>36</sup>

### **2.2.3. Значај инструментације у терапији инфекције канала**

Правилно препарирани канал корена зуба, који омогућава ефикасну елиминацију меких и тврди остатака, затим дезинфекцију и оптурацију каналног система, означава основу успеха ендодонтског третмана. Процедура која се означава као инструментација је увек компликован и временски захтеван поступак. Из тог разлога инструментација канала корена захтева систематичан приступ како би се избегле јатрогене повреде, екстезивна препарација као и грешке и компликације током рада које доводе до лоше прогнозе ендодонтског лечења. Инструментација канла корена зуба може бити ручна или машинска. Иако се инструментацијом канала корена зуба елиминише параканални дентин који је контаминиран микроорганизмима и њиховим продуктима, постоји велики део каналног система који је недоступан механичкој елиминацији ручним или машинским инструментима као што су латерални канали и апикална делта канала корена.

Комплексност каналног система корена зуба у многоме утиче на ефикасност инструментације у елиминацији инфицираног садржаја канала корена зуба. Имајући у виду све наведено није зачуђујућа чињеница да је у последњих неколико деценија публикован велики број радова у којима је испитиван значај различитих аспеката инструментације у поступку ендодонтског лечења инфицираног канала корена зуба.

Значај и улога инструментације у контроли инфекције посебно су дошли до изражаја увођењем концепта једносеансне ендодонтске терапије која захтева максималну редукцију броја микроорганизама у простору канала корена зуба у току терапије. Јасно је показано да сама инструментација канала корена зуба не показује способност елиминације микроорганизама из простора канала корена зуба.

*Byström* и *Sundqvist* су у својој студији мерили редукцију микроорганизама из канала корена некротичног зуба након инструментације ручним челичним ендодонтским инструментима уз употребу физиолошког раствора као ириганса<sup>37</sup>. Петнаест канала корена зуба са некротичном пулпом и присутним периапикалним лезијама је инструментирано ручним ендодонтским инструментима у пет одвојених посета. Овом процедуром су добили значајно смањење броја бактеријских колонија (CFU), али је напредовање ка дефинисаном циљу, каналу корена зуба без бактерија било јако споро. Чак и након пет тремана један део узорака из канала корена зуба је показивао бактријски раст.

У складу са овиме су и резултати *Ørstavik* и *cap*<sup>38</sup> који су утврдили да употреба ручних ендодонтских инструмента уз иригацију физиолошким раствором доводи до статистички значајног смањења броја бактерија али је немогуће постићи стерилан канал. Испитивањем антимикробне ефикасности различитих техника ручне инструментације бавили су се и *Pataky* и *cap*<sup>39</sup>. 40 првих максиларних премолара, екстрахираних из ортодонтских разлога, је стерилисано и након ендодонтског третмана инфицирано бактеријом *E. faecalis*. Зуби су инструментирани ручним инструментима уз употребу физиолошког раствора као ириганса, а узорци за култивацију су узимани пре и након инструментације.

Забележено је значајно смањење броја бактерија након препарације али ниједан од узорака није био стерилан на крају експеримента.

Савремену ендодонтску процедуру карактерише увођење машинских техника препарације канала корена применом ротирајућих NiTi инструмената. Иако је ручна инструментација и даље затупљена као начин препарације канала корена, све већи број стоматолога у своју праксу уводи машинску препарацију канала корена. Као основни разлог за увођење машинске инструментације често се наводи скраћивање времена потребног за извођење ендодонтског третмана. Међутим, постоје и друге предности ове процедуре које значајно превазилазе брзину извођења. Једна од основних предности је предвидљивост облика препарације канала корена која се постиже.

Предност машинске препарације јесте и квалитет апикалне препарације код употребе ротирајућих инструмената. Међутим, машинска инструментација не показује увек и у свим ситуацијама супериорност у односу на ручну. Тако је доказано да су зидови канала корена зуба значајно чистији након ручне у односу на машинску препарацију.<sup>40</sup> Насупрот томе машинска инструментација ротирајућим NiTi инструментима доприноси очувању природног облика канала корена зуба са свим својим кривинама, посебно у апикалном делу, у односу на инструментацију ручним ендодонтским инструментима израђеним од челичних легура.<sup>41</sup>

*Sonntag* и сар. у својој студији спроведеној на групи студената који су тестирали упоредо машинску и инструментацију ручним инструментима, доказују да је постизање коректне радне дужине једноставније и чешће код употребе машинских инструмената. У истој студији је доказано да је време инструментације значајно краће код употребе ротирајућих инструмената док је учесталост фрактуре инструмента подједнака код обе технике и износи 1,3%<sup>42</sup>.

Испитујући антимикуробну ефикасност ручних и машинских инструмената уз употребу физиолошког раствора као ириганса *Dalton* са сар. наводи да је само једна трећина канала након инструментације стерилна и да нема значајније разлике између узорака у којима је спроведена ручна инструментација и оних који су машински инструметирани<sup>43</sup>.

Очигледно је да механичка инструментација канала корена уз примену ириганса који немају антимикуробни потенцијал не представља пут којим се долази до канала корена без микоорганизама, и да је за успешно обескличење канала корена неопходна комбинована примена инструментације и ириганаса са антимикуробним особинама.

#### **2.2.4. Значај иригације канала у терапији ендодонтских инфекција**

Употреба ириганаса представља важан део ефикасне хемомеханичке обраде инфицираног канала корена зуба. Њоме се побољшава бактеријска елиминација и уклањање некротичног ткива и дентинских чепова из канала у току ендодонтске терапије. Употреба ириганаса у току ендодонтске терапије такође доприноси смањењу преваленције пребацавања некротичног инфицираног ткива из простора канала корена у периапикални простор.

##### **2.2.4.1. Раствори натријум хипохлорита у иригацији канала корена**

Најчешће коришћен ириганс у ендодонцији је натријум хипохлорит (NaOCl), који представља снажно антисептично средство са способношћу растварања органског дела дентина, разградње како виталног тако и некротичног ткива, неутрализације



токсичних продуката и лубрикације. Своје антимикубно дејство NaOCl остварује преко хипохлорне киселине, која раствара органско ткиво и ослобађа хлор.

Реакцијом између хлора и амино-група формирају се хлорамини који ремете ћелијски метаболизам. Хлор испољава антимикубно дејство тако што доводи до ирверзибилне оксидације SH група есенцијалних бактеријских ензима. Иако се у литератури срећу подаци да се NaOCl у ендодонтској терапији може користити у концентрацијама од 0,5%, 1%, 1,25%, 2,6% и 5,25%, прецизан став о томе која је концентрација најпогоднија за ендодонтску употребу још увек није дефинисан.

Тако *Waltimo* и сар.<sup>44</sup> испитивањем антимикубног потенцијала раствора NaOCl у *in vitro* условима на *Candida albicans* долазе до закључка да су обе коцентрације од 0,5% и 5% подједнако ефикасне у временском периоду експозиције од 30 sec. Насупрот томе раствори у концентрацији од 0.05% и 0,005% су недовољно активни да униште микроорганизме и након 24h.

Изражена осетљивост *Candida albicans* на раствор NaOCl верификована је и у раду *Radcliffe* и сар.<sup>48</sup>. Међутим *Vianna* и сар. су добили делимично супростављене резултате који указују да је раствору концентрације 0,5% потребно 30 min. да уништи ћелије *Candida albicans*, док раствор у концентрацији од 5,25% испољава токсично дејство на организме гљивица у току 15 s<sup>45</sup>. Антибактеријска ефикасност раствора NaOCl на бактерију *E. faecalis* се разликује у односу на гљивицу *Candida albicans*.

*Gomes* и сар.<sup>46</sup> су испитивали осетљивост бактерије *E. faecalis* у *in vitro* условима на раствор NaOCl. Микроорганизми су уништени за мање од 30 s раствором концентрације 5,25%, док је раствору концентрације 2,5% и 0,5% требало 10 односно 30 min. да испољи антибактеријски ефекат. Познато је да раствор NaOCl за иригацију канала корена може бити непуферисан (PH 11) у концентрацији од 0,5% до 5,25% или пуферисан бикарбонатним пуфером (PH 9) обично у концентрацији од 0,5%(Dankin-ov раствор).

*Zehnder* и сар. доказују да пуферисан раствор NaOCl-a (Dankin-ov раствор) не показује већу моћ растварања органског ткива некротичне или виталне пулпе у односу на непуферисан раствор NaOCl-a.

Већина *in vitro* експеримента којима се испитује ефикасност NaOCl раствора се изводи у експерименталним тубама, на екстрахираним зубима или специјално препарисаним дентинским дисковима у које се инокулирају чисте културе појединачних микроорганизама или комбинација више различитих микроорганизама.<sup>49 50 51</sup>

Антибактеријска ефикасност NaOCl раствора се битно разликује у *in vitro* и *in vivo* експериментима. Тако *Peciuliene* и сар.<sup>47</sup> испитују *in vivo* ефикасност иригације NaCl раствором код ендодонтски третираних зуба са дијагнозом апексног периодонтитиса, где је препарација канала корена изведена ручним K-File и *Hedström* турпијама до величине апекса #40 или више и уз иригацију 2.5% NaOCl (10mL по каналу) и 17% пуферисаном EDTA (pH7,5 mL). Након инструментације и иригације гљивица и грам негативних бактерија није било, а *E. faecalis* је био присутан код 6 зуба.

Налази ове студије су у корелацији са налазима *in vitro* студија које су спровели *Radcliffe* и сар.<sup>48</sup> и *Waltimo* и сар.<sup>44</sup> које такође показују релативно високу резистентност бактерије *E. faecalis* на раствор NaOCl за разлику од *Actinomyces naeslundii* и *Candida albicans*.

Треба напоменути да постоје три значајне разлике које утичу на ефикасност раствора NaOCl у *in vitro* експериментима у односу на оне спроведене *in vivo*. То су: велики волумен ириганса, директано дејство ириганаса на све микроорганизме и одсуство деловања других фактора који потенцијално штите бактерије у *in vivo* условима (неадекватан површински напон раствора NaOCl, ограничен приступ латералним и апексним рамификацијама и уским акцесорним каналићима, остаци ткива, запаљенски ексудат, дентински колаген, микробна биомаса)<sup>49</sup>.

Чињеница је да антибактеријски ефекат NaOCl расте са повећањем концентрације, тако да је највећа концентрација (5,25%) изузетно ефикасна против микроорганизама али, истовремено и веома токсична. Имајући у виду токсичност високих концентрација раствора овог ириганса, немогућност приступа свим деловима каналног система, редукцију активности у *in vivo* условима, често се закључује да не постоји оправдање за коришћење раствора NaOCl као ендодонтског ириганса у концентрацији вишој од 1%. Тако *Pashley* и сар. у свом експерименту упоређујући биолошке ефекте средње и јако концентрованих раствора NaOCl доказују значајно већу цитотоксичност и каустични ефекат на здраво ткиво код 5,25% раствора NaOCl у односу на 0,5% и 1% раствор. Експериментално су доказане промене у механичким особинама дентина као што су смањена микрочврстоћа и повећана хрупавост радикуларног дентина након излагања раствору NaOCl у концентрацијама од 2,5% и 5,25%.<sup>50</sup>

С обзиром да је активност NaOCl везана за количину слободног хлоридног анјона, смањење концентрације може се компензовати повећавањем волумена. То значи да је за редукцију бактерија у каналном систему много важнија количина раствора NaOCl него његова концентрација. *Arias-Moliz* и сар. су показали да је ефикасност различитих концентрација раствора NaOCl, на бактерију *E. faecalis*, у обрнутој корелацији са временом њиховог деловања<sup>51</sup>. Резултати ове студије указују да би продужавањем времена иригације било могуће користити раствор NaOCl ниже концентрације.

Загревање и примена апарата са ултразвуком могу повећати активност раствора NaOCl. Иако је јако мало публикованих радова на ову тему, постоји општи консензус да повећање температуре значајно повећава ефикасност раствора NaOCl.<sup>52</sup> Иако механизми којима се ултразвуком повећава ефикасност раствора NaOCl нису у потпуности разјашњени, *Moorer* и *Wesselink* су утврдили да ултразвучна агитација раствора NaOCl повећава његову способност растварања органског ткива<sup>53</sup>.

Иако NaOCl веома ефикасно убија бактерије, његове лоше особине, као што су изражена каустичност и цитотоксичност при вишим концентрацијама, наметнули су потребу да се раствору NaOCl као иригансу пронађе алтернатива.

#### **2.2.4.2 Раствори хлорхексидина у иригацији канала корена**

Хлорхексидин (CHX) има сличан антибактеријски спектар деловања као и NaOCl, с тим што може испољити активност и према NaOCl резистентним сојевима бактерија. Антимикробни механизам дејства CHX је везан за катјонску структуру његових молекула, због чега овај ириганс има јак афинитет према негативно наелектрисаним фосфатним групама ћелијског зида, повећавајући пермеабилност и могућност продирања средства у бактерију. Хлорхексидин на ниским концентрацијама (0,2%) има бактериостатски ефекат. Више концентрације (2%) су бактерицидне и условљавају губитак ћелијских елемената, преципитацију и коагулацију цитоплазме, а промене које настају на ћелијском зиду бактерије имају иреверзибилан карактер. Иако има велики број предности као ириганс CHX има и један јако велики недостатак. Наиме раствор CHX је рН завистан и његова антибактеријска активност је знатно смањена у присуству органских материја<sup>54</sup>.

У *in vivo* студијама које се баве упоредним испитивањем ефикасности раствора NaOCl и CHX постоји слагање да су оба раствора у истим концентрацијама приближно једнако ефикасна<sup>55</sup>. Међутим, у *in vitro* студији *Gomes* и сар. демонстрирају значајну разлику између NaOCl и CHX у ефикасности елиминације *E. faecalis*<sup>56</sup>.

Резултати ове студије показују да је 5,25% раствор NaOCl у потпуности елиминисао *E. faecalis* у периоду од 30 s. док је раствору концентрације 2,5% и 0,5% требало 10 односно 30 min. да испољи антибактеријски ефекат. Насупрот томе раствор CHX у потпуности уништава све ћелије бактерије *E. faecalis* за мање од 30 s. при концентрацијама од 0.2–2%.

*Heling* и *Chandler*<sup>57</sup> у свом експерименту, испитујући способност елиминације бактерије *E. faecalis*, употребом различитих комбинација ириганаса и *in vitro* условима долазе до сазнања да раствор СНХ у комбинацији са 3% раствором H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> показује супериорну могућност убијања бактерије у односу на све друге комбинације или иригансе појединачно.

Овакав резултат приписује се способности СНХ да дезинтегрише ћелијску мембрану бактерије или створи поре на њој и на тај начин омогући продирање молекулима H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> који уништавају ћелијске органеле бактерије<sup>58</sup>.

### **2.2.4.3. Улога и значај ЕДТА у иригацији канала корена**

Етилен диамин тетра сирћетна киселина (ЕДТА) у концентрацији од 17%, и рН вредности 7 представља хелатни агенс који се широко употребљава у ендодонцији. Користи се у концентрацијама од 15-20%. Ово органско једињење са металним катјонима (калцијум, магнезијум) из дентина ствара хелатне комплексе и тиме деминерализује дентин. Иако ЕДТА нема никакав или јако мали антимикуробни потенцијал, успешно елиминише размазни слој у току терапије захваљујући свом хелатном потенцијалу. На тај начин индиректно учествује у елиминацији микроорганизама побољшавајући антимикуробни ефекат основних ириганаса који дубље продиру у инфицирани дентин.

Стандардни протокол употребе ЕДТА у ендодонцији подразумева апликацију препарата у временском интервалу од 1 min<sup>59</sup>. Деловање препарата на бази ЕДТА у дужем временском интервалу доводи до ерозија са значајним уклањањем перитубуларног и интратубуларног дентина. Испитујући ефикасност ЕДТА у елиминацији размазног слоја *Niu* и сар. показују да се комбинованом употребом NaOCl и ЕДТА уклања статистички значајно више размазног слоја у односу на самосталну примену ЕДТА<sup>60</sup>.

Као алтернатива препаратима на бази EDTA који се користе за уклањање размазног слоја у ендодонцији се користи раствор лимунске киселине. Лимунска киселина као ириганс се користи у концентрацији од 10% до 50%. Резултати великог броја студија који се баве упоредном анализом ефикасности уклањања размазног слоја препаратима на бази EDTA и лимунске киселине су врло опречни. Тако *Gutmann* и сар.<sup>61</sup> доказују да је 10% раствор лимунске киселине ефикаснији у уклањању размазног слоја у односу на EDTA.

Насупрот томе, *Liolios* и сар.<sup>62</sup> у својој студији налазе већу ефикасност комерцијалних препарата EDTA у уклањању размазног слоја из апикалне трећине корена зуба, у односу на 10% лимунску киселину. *Di Lenarda* и сар.<sup>63</sup> као и *Scelza* и сар.<sup>64</sup> проналазе јако малу разлику у степену уклањања размазног слоја између препарата EDTA и лимунске киселине.

#### **2.2.4.4. Употреба других антибактеријских раствора у иригацији канала корена**

Једињења јода се деценијама користе за дезинфекцију површина, коже и оперативних поља. Иако су једињења јода мање реактивна од једињења хлора показују изражене бактерицидне, фунгицидне, туберкулоцидне, вируцидне и спороцидне особине. Водени раствор јода је јако нестабилан са великим бројем различитих врста јода укључујући молекуларни јод ( $I_2$ ) који је углавном одговоран за његову антимикуробну активност. Ово је разлог за развој једињења јода у виду такозваних јодофора (носача јода) и то повидон јода и полуксамер јода. Јодофори су комплекси јода и солубилних средстава која служе као резервоар активног (слободног) јода<sup>65</sup>.

У ендодонцији се сребро јодид (PI) користи као финална компонента протокола дезинфекције површине зуба описаног од стране Möller-a<sup>66</sup>.

*Ng* и сар. не налазе разлику у ефикасности 2.5% NaOCl и 10% јода на деконтаминацију оперативног поља (зуба, кофердама и квачица), методом култивације микроорганизама. Насупрот томе, у истом експерименту је молекуларном техником ланчане реакције полимеразе(PCR) детектована значајно учесталија бактеријска DNK код узорака узетих са површине зуб третиране јодом (45%) у односу на ону третирану NaOCl раствором(1,3%)<sup>67</sup>. *Molander* и сар. испитујући ефикасност 5% сребро јодида(IPI), као ириганса који претходи интерсеансној медијацији CaOH<sub>2</sub>, закључују да иако не повећава антимикуробну ефикасност препарата на бази CaOH<sub>2</sub> претретман сребро јодидом доводи до ефикасније елиминације бактерије *E. faecalis*<sup>68</sup>.

Водоник пероксид (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) представља широко употребљавани биоцид у поступку дезинфекције и стерилизације пре свега површина. Ради се о безбојној течности без мириса која се као дезифинцијенс употребљава у концентрацији од 1% до 30%. Антимикуробна ефикасност H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> заснива се на способности да отпушта негативне хидроксилне јоне (-OH) који се понашају као слободни радикали и нападају неколико ћелијских компоненти као што су протеини и бактеријска DNK. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> се у ендодонцији јако дуго користи као дезифицијенс пре свега у поступку припреме оперативног поља. Не постоји велики број радова о употреби H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> као ириганса. Један од ретких који је испитивао ефикасност је *Siqueira* са сар. који у свом експерименту доказује да је комбинација H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и NaOCl мање ефикасна у убијању бактерије *E. faecalis* у односу на самосталну примену NaOCl.<sup>69</sup>

У својој студији изведеној на зубима мајмуна који су контаминирани комбинацијом различитих микроорганизама између осталог и бактеријом *E. faecalis*, *Möller* и сар. након иригације пуферисаним 1% NaOCl и 10% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, долазе до закључка да овакав протокол иригације смањује број микроорганизама у каналу али не може довести канал корена зуба у стање стерилне средине<sup>70</sup>. Иако се H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> јако дуго користи у ендодонцији као дезифицијенс и ириганс не постоји реалан разлог за његову употребу посебно не пре других ефикаснијих ириганаса.

Међутим свакако треба узети у обзир његову употребу као дезифицијенса у припреми оперативног поља као и даља истраживања усмерити у правцу испитивања његовог синергичног деловања са СНХ.

MTAD(Tulsa Dentsply, Tulsa OK, USA) је ириганс новије генерације настао из потребе комбиновања различитих хемијских једињења како би добили ириганс са што мање недостатака. По свом саставу MTAD представља мешавину изомера тетрациклина (доксциклин), лимунска киселине и детенрџента(Tween-80) чији је рН 2,15. Иако већина ириганаса који се данас користе има доста позитивних својстава, већина њих има и неке недостатке. Управо ова чињеница је разлог комбиновања више различитих ириганаса у циљу постизања ефикасније иригације. Антимикробно дејство раствора MTAD заснива се на бактериостатском ефекту доксциклина. Уклањање размазног слоја остварује лимунска киселина, а детерџент Tween-80, који има низак површински напон, обезбеђује продор раствора дубоко у микроканални систем.

Као најбитнија позитивна особина раствора MTAD се помиње његова способност ефикасног уклањања размазног слоја. Испитујући управо ову особину MTAD, у експерименту спроведеном на 48 екстрахирана једнокорена зуба, *Torabinejad* и сар.<sup>71</sup> долазе до закључка да је раствор MTAD ефикаснији у елиминацији размазног слоја у односу на раствор EDTA. Анализирајући ефикасност ових раствора скенинг електронском микроскопијом, аутори запажају да је разлика евидентна пре свега у апикалној трећини канала корена зуба. Аутори такође запажају да раствор EDTA доводи до ерозија површине дентина која је израженија у односу на раствор MTAD, посебно у коронарној и средњој трећини корена зуба. Иста група аутора је испитивала ефикасност уклањања размазног слоја раствором 1,3% и 2,5% NaOCl након чега је канал финално испиран раствором MTAD.

Дошли су до закључка да не постоји статистички значајна разлика у елиминацији размазног слоја у зависности од концентрације раствора NaOCl, због чега се



препоручује употреба раствора NaOCl ниже концентрације уз финалну иригацију раствором MTAD<sup>72</sup>.

Испитујући способност растварања ткива раствором MTAD у односу на растворе NaOCl и EDTA, *Beltz* и сар. доказују значајно већу ефикасност растварања дентина код раствора MTAD док је његова способност растварања ткива пулпе занемарива<sup>73</sup>.

Имајући у виду да MTAD у свом саставу има антибиотик и детерџент као и да има јако низак рН, од овог ириганса се очекује да има јако изражен антимикуробни потенцијал. *Shabahang* и сар.<sup>74</sup> као и *Shabahang* и *Torabinejad*<sup>75</sup> су испитујући антимикуробну ефикасност MTAD у каналима корена екстархираних зуба контаминираним читавом пљувачком или само бактеријом *E. faecalis* дошли до закључка да раствор MTAD има добар антимикуробни потенцијал.

### **2.2.5. Системи за агитацију поступка иригације**

Раствори за иригацију имају вишеструку улогу у ендодонтској процедури препарације канала корена. Они су лубриканти, средства за чишћење у току биомеханичке обраде канала корена и антимикуробна средства средства значајна за елиминацију микроорганизама и органских и неорганских остатака ткива која настају током распадања пулпе. Ово доприноси елиминацији инфицираног садржаја канала корена.

Ефикасна акција ириганаса се постиже директним контактом са свим зидовима канала корена, посебно у његовом апикалном делу. Чињеница је да не постоји ириганс који поседује идеалне особине, чак иако се користи са јако ниском вредношћу рН, загрева се или му се додају хемијске супстанце које му мењају површински напон и на тај начин повећавају моћ квашења зидова канала корена. Такође, не постоји ни један ириганс који показује способност да истовремено раствара органско ткиво и деминерализује неоргански део пре свега размазног слоја дентина.

Због тога се појавила потреба за развијање система за убацивање и потенцирање дејства (агитирање) иригантнаса у каналу корена зуба. Ови системи се могу поделити у две велике групе: системи за ручну и системи за машинску агитацију. Системи за машинску агитацију укључују употребу ротирајућих четкица, истовремену машинску инструментацију и иригацију, технике промене притиска, звучне и ултразвучне агитације. Постоје наводи да они побољшавају чишћење канала корена у односу на класичну иригацију употребом шприца и игле<sup>76</sup>.

### **2.2.5.1. Ултразвук у поступку агитације иригације**

Ултразвук је вибрациони или акустички талас исте природе као и звук, али на фреквенцији која је већа од највише фреквенције која је уочљива за људско ухо (приближно 20.000 Hz).

Постоје две основне методе за производњу ултразвука. Прво, магнетострикцијом која претвара електромагнетну енергију у механичку енергију. Различите траке магнетостриктивног метала у ручном делу спојене су са стабилним, изменичним магнетним пољем које производи вибрације. Друга метода, заснована на пиезоелектричном принципу, користи кристал који мења величину када се примењује електрично пуњење. Када се кристал деформише, пређе у механичко осциловање без производње топлоте. Магнетостриктивне јединице у функцији стварају фигуре облика осмице (елиптични покрет), што није идеално за ендодонтску употребу. Озбиљан недостатак са овим јединицама је чињеница да се при раду ствара топлота, па је потребно адекватно хлађење. Пиезоелектричне јединице имају предности у односу на магнетостриктивне јединице код апарата који се користе у ендодонцији јер производе више циклуса у секунди, 40 kHz у односу на 24 kHz. Радни наставак ових апарата ради у линијском кретању од задњег ка предњем дела, као клип, што је идеално за ендодонтски третман<sup>77</sup>.

Ултразвук је први пут употребљен у стоматологији за препарацију кавитета. Концепт "Минимално инвазивне стоматологије" и жеља за препарацијама малих димензија значила је нову примену ултразвука. Међутим, његова употреба није постала популарна све до 1955. године, када је уведена употреба ултразвука како би се уклонили конкременти и наслаге са површина зуба. *Richman* је први пут увео ултразвучну инструментацију у ендодонцију 1957 године. Међутим ултразвучно активирани ендодонтски инструменти нису широко употребљавани у ендодонцији све до студије *Martin и сар.*<sup>78</sup> у којој је доказана ефикасност овакве инструментације. Употреба ултразвука у ендодонтској терапији побољшава квалитет третмана у многим аспектима укључујући: приступ улазима у канале корена зуба, чишћење, обликовање, елиминисање интраканалних препрека и садржаја канала као и ендодонтске хирургије.

У литератури се описују две врсте ултразвучне иригације. Прва је истовремена комбинација ултразвучне иригације и инструментације. Други тип функционише без истовремене инструментације и познат је као пасивна ултразвучна иригација(ПУИ). Прва техника је готово избачена из употребе пре свега због немогућности адекватне контроле сечења(турпијања) зидова канала корена посебно код јако закривљених коренова. Овом техником је јако тешко контролисати коначни облик канала и постоји велика вероватноћа настанка компликација, на првом месту аберантних комуникација. Из наведених разлога се ултразвучна инструментација не може сматрати одговарајућом алтернативом ручној инструментацији<sup>79</sup>.

Термин пасивна ултразвучна иригација(ПУИ) је први употребио *Weller* 1980. године описујући технику иригације потпомогнуту ултразвуком при чему се инструментација и иригација не врше истовремено<sup>80</sup>. С обзиром да се не заснива на примени активних инструмената, ова техника иригације смањује могућност настанка аберантних облика канала током иригације.

Током ПУИ, енергија се преноси са ендодонтског инструмента или глатке осцилирајуће жице (ендодонтске сонде) до ириганса помоћу ултразвучних таласа који индукују два физичка феномена: струјање и кавитација раствора за иригацију.

Акустични ток може се дефинисати као брзо кретање течности у кружном или реципрочном облику око вибрирајућег ендодонтског инструмента. Кавитација се дефинише као стварање мехурића паре, односно експанзија, контракција или изобличење већ постојећих мехурића у течности. У последњој деценији конструисан је велики број уређаја који се могу користити за ултразвучну агитацију ириганаса.

У поређењу са звучно потпомогнутом иригацијом, ултразвучна иригација се показала ефикаснијом да елиминише више размазног слоја, па се тврди да је ПУИ знатно ефикаснија од звучне активације<sup>81</sup>. Међутим обе технике показују подједнак ниво ефикасности у уклањању размазног слоја уколико се звучна агитација спроводи у дужем временском интервалу<sup>82</sup>. Способност ириганаса да растварају ткиво се може побољшати ултразвуком уколико се ткиво пулпе или размазни слој претходно обилно утопе у ириганс, а потом изложе дејству ултразвука<sup>83</sup>.

Постоје две технике у току пасивне ултразвучне иригације. Прва је техника континуиране (непрекидне) иригације, а друга техника повременог испирања.

Код прве технике се канал у току пасивне ултразвучне иригацији континуирано снабдева новим количинама свежег ириганса. У једном броју студија је доказано да ова техника пасивне ултразвучне иригације показује већу ефикасност у уклањању размазног слоја и растварању органског ткива пулпе, пре свега због сталног дотока свежег ириганса<sup>84</sup>. Код технике повременог испирања ириганс се једном или више пута уноси у канал корена а потом активира ултразвуком. Предност ове технике је могућност контроле дубине продирања ириганса и мања вероватноћа његовог пребацавања преко апекса корена, што није случај код технике континуираног испирања. Такође опрема која се користи у току технике повременог испирања је економски прихватљивија и једноставнија за употребу што се свакако мора узети у обзир приликом одабира.

Ефикасност пасивне ултразвучне иригације такође зависи и од ширине третираног канала и његове закривљености. Доказано је од групе аутора да је ПУИ ефикаснија у широким и правим каналима<sup>85</sup>.

Овакав резултат студија се објашњава чињеницом да се код уских и закривљених канала инструмент заглављује дуж канала чиме се онемогућава његово слободно осцилирање а тиме и пун ефекат ултразвучне активације ириганса. Постоји сагласност да је ПУИ ефикаснији од уобичајене технике иригације помоћу шприца и игле, пре свега у уклањању размазног слоја и раставарању органског ткива пулпе<sup>86</sup>.

Бројни истраживачи су испитивали и показали да употреба пасивне ултразвучне иригације након машинске или ручне инструментације канала корена значајно смањује број микроорганизама у односу на конвенционалну технику иригације иглом и шприцем<sup>87</sup>. Овакав резултат истраживања аутори објашњавају прво чињеницом да енергија ултразвука доводи до дисагломерације бактеријских биофилмова унутар канала корена. На тај начин се велики број бактеријских ћелија из биофилма преводи у планконску форму, која је осетљивија на дејство раствора NaOCl или другог ириганса. Кавитација такође може довести до привременог слабљења ћелијске мембране чинећи бактерије пропустљивијим за NaOCl<sup>88</sup>.

*Weber* и сар. у својој студији испитујући антимикуробну ефикасност на полимикуробну флору канала корена зуба употребом раствора NaOCl и СНХ, са или без употребе пасивне ултразвучне иригације, долазе до закључка да ПУИ значајно повећава антимикуробну активност испитиваних ириганаса уколико се они агитирају ултразвуком<sup>89</sup>.

Насупрот томе, један број аутора у својим студијама тврди да не постоји статистички значајна разлика у броју микроорганизама након пасивне ултразвучне иригације и иригације изведене класичном иглом и шприцем<sup>90</sup>.

## 2.2.6. Употреба ласера у ендодонтској процедури

Увођењем ласера у стоматологију раних 60-их година прошлог века почиње и истаживање његове примене у ендодонцији. Прве податке о употреби ласера у стоматологији реферишу *Stern* и *Sognaes*<sup>91</sup> као и *Goldmen* и сар.<sup>92</sup> који су испитивали потенцијалну употребу рубин ласера.

Након иницијалних експеримената са рубин ласером, уводи се употреба других ласера, као што су: аргон (Ar), угљен диоксидни (CO<sub>2</sub>), неодимијум: итријум-алуминијум-гранат (Nd:YAG), и ербијум (Er):YAG ласери.

Ефекат ласерске ирадиације на биолошка ткива зависи од више фактора, који су од стране *Gutknecht*-а<sup>93</sup> подељени на следећи начин:

### 1. Особине ласера

- Таласна дужина ласера
- Оперативни мод(пулсно, континуирано)
- Енергија или излазна снага
- Активно време ирадиације
- Брзина понављања импулса(Hz)
- Начин апликације ласера(контактно/безконтактно)
- Време апликације

### 2. Особине медија

- Ваздух
- Вода
- Крв

### 3. Особине ткива

- Коефицијент апсорпције који одговара ласерској таласној дужини
- Коефицијент термалне проводљивости

Прву употребу ласера у ендодонцији су описали *Weichman* и *Johnson* који су у *in vitro* условима покушали затварање апикалног форамена помоћу инфра-црвеног (CO<sub>2</sub>) ласера велике снаге<sup>94</sup>. Иако циљ експеримента није постигнут, добијени су многи релевантни и интересантни подаци који су охрабрили будуће истраживаче да наставе да се баве испитивањем употребе ласера у ендодонцији.

Ласери се данас у ендодонцији углавном користе за испитивање виталитета зуба, у терапији дубоког каријеса, пулпотомији, чишћењу и обликовању канала корена, дезинфекцији канала, оптурацији канала и ендодонтској хирургији<sup>95</sup>.

Имајући у виду карактеристике ласерског светла (монохромно, кохерентно, директно) и чињеницу да није неопходан директан контакт између оптичког влакна и циљаног ткива, ласери свакако могу представљати начин дезинфекције канала корена посебно дубљих слојева дентина<sup>96</sup>. *Moshonov* са сар. компарирајући ефикасност Nd:YAG ласера и 1% раствора NaOCl у поступку дезинфекције канала корена зуба долазе до резултата који показују да употреба Nd:YAG ласера статистички значајно смањује број микоорганизама али да је NaOCl ефикаснији у дезинфекцији канала корена<sup>97</sup>.

*Klinke* и сар. испитујући бактерицидни ефекат Nd:YAG ласера у *in vitro* условима на различитим дубинама дентина долазе до података да употреба Nd:YAG ласера доводи до значајне редукције микроорганизама у свим слојевима дентина. Аутори закључују да, иако интензитет ласерске ирадиације опада након продирања у дентин дубље од 1,000µm, бактерицидни ефекат ласера је и даље присутан на тој дубини<sup>98</sup>.

*Pirnat* и сар. су у својој студији испитивали антимикуробну ефикасност Nd:YAG ласера (1064 nm) и диодног ласера (810 nm) на бактерије: *Porphyromonas gingivalis* (*P. Gingivalis*), *Escherichia coli* (*E. coli*) и *E. faecalis*. Полазећи од две теорије антибактеријског дејства овог типа ласера: прве да загревање медијума доводи до уништења бактерија, и друге да долази до директне апсорпције енергије ласера од

стране микроорганизама аутори су дизајнирали студију тако да искључе утицај окружења и испитају директан утицај на бактерије. Аутори закључују да оба типа ласера имају минималан директан бактерицидан ефекат на непигментисане бактерије као што су *E. coli* и *E. faecalis*. Међутим, овакви услови се битно разликују од микро окружења у коме бактерије функционишу<sup>99</sup>.

Испитујући антимикуробну ефикасност диодног ласера са две различите таласне дужине *Beer* са сар. долази до података да употреба диодног ласера таласне дужине 810nm као и ласера таласне дужине 940nm доводи до значајног смањења броја бактерија *E. coli* и *E. faecalis* у каналу корена зуба<sup>100</sup>. Аутори наглашавају значај излагања приступног кавитета ласерској ирадијацији јер налазе значајан пад броја посматраних бактеријских врста у односу на групе у којима приступни кавитет није ирадиран ласером. Антимикуробна ефикасност диодног ласера самостално без додатне иригације раствором NaOCl уз иригацију само физиолошким раствором испитивана је од *Mehrvarzfar* и сар. који реферишу да долази до проценталног смањења броја бактерија за 80% употребом диодног ласера снаге 2W<sup>101</sup>. Аутори сматрају да је ова делимична елиминација бактерија, употребом диодног ласера велике снаге, постигнута порастом температуре унутар канала у току третмана.

*Cretella* са сар. у својој студији испитујући антимикуробну ефикасност диодног ласера таласне дужине 810 nm на *E. faecalis*, показују да не постоји статистички значајна разлика у антимикуробној ефикасности између иригације раствором 5,25% NaOCl и иригације раствором 5,25% NaOCl потпомогнуте диодним ласером, закључујући да употреба диодног ласера не може бити одговарајућа замена конвенционалној иригацији раствором NaOCl већ само допуна поменутој процедури<sup>102</sup>.



## 2.2.7. Антимикробна фотодинамска терапија

Антимикробна фотодинамска терапија (АФДТ) представља процедуру која се изводи у два корака и подразумева апликацију фотосензитивне супстанце, која је праћена њеним просветљавањем, што доводи до генерисања фототоксичних молекула који делују бактерицидно. АФДТ се сматра додатком традиционалним протоколима за дезинфекцију канала.

Покушавајући да се прилагоди и побољша антимикробна ефикасност АФДТ у ендодонцији, новија истраживања су фокусирана на проналажење нове формулације фотосензибилизатора који би показали ефикасну пенетрацију у дентинске тубуле, анатомски комплексне делове канала корена као и способност продирања у бактеријски биофилм.

Први подаци о томе да светло може имати антимикробни ефекат датирају још из прошлог века. Давне 1900. године су Оскар Раб и Херман Вон Тапеинер приметили да црвени ацридин може да апсорбује видљиво светло и искаже токсичан ефекат на колонију протозоа<sup>103</sup>.

Употреба ласера високе снаге у циљу потпуне дезинфекције канала корена зуба доводи до елиминације 99% бактерија<sup>104</sup>, али истовремено ова процедура доприноси значајном повећању температуре које је праћено оштећењем зубних и околних ткива као што су: анкилоза зуба, топљење цемента и дентина и њихова карбонификација као и ресорпције корена и перирадикуларне некрозе<sup>105</sup>.

Управо из овог разлога у употребу се уводе ласери мале снаге који незнатно повећавају температуру  $\sim 5^{\circ}\text{C}$ , чиме се поменуте промене код употребе ласера високе снаге избегавају али је уједно и ефекат дезинфекције занемарив уколико се употребљавају самостално<sup>106</sup>. Истовремена употреба фотосензибилизатора уз активацију ласерима мале снаге покреће фотохемијску реакцију која резултује продукцијом различитих врста реактивног кисеоника са израженим антимикробним ефектом.

Многе *in vitro* али и *in vivo* студије последњих година доказују изврстан антимикробни потенцијал АФДТ у каналу корена зуба, посебно у борби против бактерије *E. faecalis*. Светлосни извори који се користе за активацију фотосензибилизатора су последњих година еволуирали од Аргонских ласера и Nd:Yag ласера до диодних ласера који данас имају примат у већини система за АФДТ. Неки од аутора у својим студијама доказују подједнако добре резултате постигнуте употребом ЛЕД и Халогених лампи који се користе у свакодневној стоматолошкој пракси<sup>107</sup>. Калибрација светлосних извора као и употреба оптичких влакана за дистрибуцију светла до циљног подручја такође игра значајну улогу у ефикасности фотодинамске терапије.

Жељене особине оптималне фотосензитивне супстанце (фотосензибилизатора) укључују: фотофизичке, хемијске и биолошке карактеристике, као ниску цитотоксичност, краткотрајна фотосензитивност, апсорпцијски врхови при ниским трансферским губицима, једноставност у формулацији, репродуктивност, висока стабилност и висок афинитет за пенетрацију у бактеријске ћелије уместо у ћелије здравих ткива (селективност)<sup>106</sup>. Већина система за АФДТ који се употребљавају у ендодонтској терапији као фотосензибилизатор користе Фенотиазин (*Phenothiazin*) или његове деривате<sup>108</sup>. Фенотиазин показује висок ниво апсорпције светла при таласној дужини од 600-660nm(црвено светло). Светло ове таласне дужине припада такозваном “терапеутском прозору“ потребном за ефикасну пенетрацију у билошка ткива<sup>109</sup>.

Време преирадиације(*Pre-irradiation time*) представља време које протекне између аликовања фотосензибилизатора и његове активације светлом. Различите групе аутора препоручују да ово време буде у опсегу од 1 до 5 min. *Fumes* и *car*.<sup>110</sup> Испитујући различита времена преирадиације долазе до закључка да нема значајније статистичке разлике уколико је ово време 1,2 или 5 min. закључујући да је оптимално време преирадиације 1 min.

Постоји фундаментална разлика у осетљивости Gram + и Gram – бактерија на АФДТ. Генерално G+ бактерије су осетљивије на дејство АФДТ, али је неопходно у обзир узети структурне карактеристике бактеријских врста појединачно<sup>111</sup>.

Већа осетљивост G+ на АФДТ се објашњава њиховом физиологијом. Цитоплазматска мембрана G+ бактерија је окружена релативно порозним слојем састављеним од пептидогликана и липотеичне киселине који дозвољавају пролаз фотосензибилизатора.

G- бактерије поседују унутрашњу и спољашњу цитоплазматску мембрану између којих је уметнут слој пептидоглюкана и периплазме. Оваква структура представља функционалну и физичку баријеру између бактеријске ћелије и њеног окружења. За инактивирање бактеријске ћелије, фотосензибилизатор мора бити апсорбован од стране ћелијске мембране и бити пренешен у цитоплазму, што доводи до даље инхибиције синтеза протеина и ДНК и РНК.

Антимикробни потенцијал АФДТ је испитиван и доказан у великом броју студија.

*Bonsor* са сар. међу првима у својој студији, употребом метиленског плавог као фотосензибилизатора и његовом активацијом диодним ласером снаге 100 mW у временском интервалу од 120 секунди, извештава да је АФДТ као допунски поступак у дезинфекцији канала корена веома ефикасна код пацијената са клиничком сликом иреверзибилног пулпитиса и апикалног периодонтитиса<sup>112</sup>.

*Ng* и сар. у својој студији спроведеној на екстархираним зубима са дијагнозом некротичне пулпе долазе до резултата који показују да употреба АФДТ као допунског поступка конвенционалном хемомеханичком третману уз иригацију 6% NaOCl доводи до тоталне елиминације микроорганизама код 86,5% канала у односу на 49% када се не употребљава АФДТ<sup>113</sup>.

Ефикасност АФДТ у елиминацији бактерије *E. faecalis*, као једног од најчешћих патогена у инфицираном каналу корена, је јако често испитивана од стране великог броја аутора.

*Vaziri* са сар. у свом истраживању постиже тоталну елиминацију бактерије *E. faecalis* употребом 2,5% NaOCl уз допунску АФДТ, користећи толуидин плаво концентрације

15 µg/mL као фотосензибилизатор. Као извор светла у поменутој студији аутори су употребили диодни ласер таласне дужине 625nm и снаге 200 mW/cm<sup>2</sup>.<sup>114</sup>

*Komine* и *Tsujimoto* испитујући утицај различите концентрације фотосензибилизатора на способност АФДТ да елиминише бактерију *E. faecalis* као и однос између количине слободног кисеоника генерисаног различитим концентрацијама активираниог метиленског плавог долазе до закључка да употреба метиленског плавог у концентрацији 0.01% уз активацију диодним ласером таласне дужине 660nm и снаге 200mW генерише највећу количину слободног кисеоника и тиме резултира значајним смањењем вредности CFU<sup>115</sup>.

Стојичић и сар. су у својој студији компарирали ефикасност конвенционалне АФДТ (метиленско плаво 15 µmol/L, диодни ласер 40 mW - 660 nm) и модификоване АФДТ (метиленско плаво 100 µmol/L, водоник пероксид 0,05%, EDTA 0,5%, СНХ 0,05%, диодни ласер 40 mW - 660 nm) у елиминацији бактерије *E. faecalis* и мешовитог бактеријског плака и биофилма. Резултати студије показују да је модификована АФДТ ефикаснија у елиминацији бактеријских биофилмова чак двадесет пута.<sup>116</sup>

Испитујући цитотоксичност АФДТ, на колоније гингивалних фибробласта и остеобласта, *Хи* са сар. долази до закључка да се овај вид терапије у ендодонцији може користити без ризика да ће доћи до оштећења ћелија периапикалне регије<sup>117</sup>.

### **2.2.8. Ендодонтски системи посебног дизајна намењени агитацији иригације**

У циљу постизања елиминације микроорганизама из простора инфицираног канала корена зуба или бар њихове редукције на ниво компатибилан за зарастањем периапикалног ткива последњих година је представљен низ ендодонтских система, посебног дизајна, намењених повећању ефикасности иригације.

EndoVac (Discus Dental-Smart Endodontics, Culver City, CA) је ендодонтски иригациони систем базиран на принципу негативног притиска. Састоји се из три компоненте: Главног наставка(каниле) који истовремено испоручује и евакуише ириганс; Макроканиле, која је направљена од пластике, има отворен врх и пречника је 0,55mm са коничношћу 0,02. Користи се за аспирирање садржаја до нивоа средње трећине канала корена; Микроканиле, направљене од челика са затвореним врхом и 12 микро перфорација са стране. Дијаметар микроканиле је 0,32mm и њеним убацивањем на радну дужину се аспирира садржај из апикалне трећине канала корена. Када се макро и микроканила обаце у канал негативан притисак у њима доводи ириганс којим је испуњен коронарни део пулпне коморе низ канилу дуж канала и врше његову аспирирацију заједно са садржајем канала. Brito и сар. испитујући ефикасност EndoVac система у елиминацији бактерије *E. faecalis* долазе до података који указују да постоји статистички значајна разлика у ефикасности EndoVac система и контролне групе.<sup>118</sup> Као предност EndoVac система Desai са сар. наводи мањи ризик од екструзије ириганса у простор периапекса.<sup>119</sup>

EndoActivator (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK) је бежични апарат чија се ефикасност агитације иригације заснива на вибрацији(звучног опсега) наставка израђеног од полимера у каналу корена зуба. Наставци за EndoActivator су доступни у три величине (жути 15/02, црвени 25/04, плави 35/04) и они могу бити активирани са три брзине: 2.000, 6.000, 10.000 cpm. Ruddle са сар.<sup>120</sup> препоручује употребу EndoActivator система након завршене хемомеханичке обраде канала корена као завршног корака у овом поступку. Као основну предност EndoActivator система аутори наводе ефикасну елиминацију размазног слоја у односу на друге системе за агитацију иригације.<sup>121</sup> У *in vitro* експерименту Rödиг и сар доказују да агитација 1% NaOCl раствора, EndoActivator системом, не повећава антибактеријску ефикасност овог ириганса на *E. faecalis*.<sup>122</sup>

PIPS(Photon-induced photoacoustic streaming, Fotona, LLC, USA ) је један од нових система за агитацију иригације. Дејство овог система базира се на технологији која

искоришћава снагу Er:YAG ласера како би се креирали фото-акустични ударни таласи унутар раствора за иригацију који су претходно убачени у канал корена зуба без пораста температуре. Систем се користи како у току хемо-механичке обраде канала, тако и као финални корак пре оптурације канала корена. За разлику од ласера код којих је неопходно оптичко влакно или наставак апликовати у канал корена, код система PIPS је довољно да наставак буде у коронарном делу пулпне коморе. Овакав начин употребе је једноставнији зато што не захтева предимензионирање канала зарад убацивања наставка у њега. SEM посматрањем заосталог размазног слоја Zhu и сар. доказују да постоји статистички значајна разлика у ефикасности елиминације размазног слоја и корист PIPS систему односу на друге испитиване технике<sup>123</sup>. Peters са сар. у својој студији доказује да PIPS систем не може у потпуности елиминисати бактерије из инфицираног канала корена, али ефикаснији је у уклањању биофилма у односу на PUI. Ефикасност PIPS система у елиминацији испитивали су између осталих и Jaramillo и сар. који закључују да употреба PIPS система трајању од 20s у комбинацији са 6% NaOCl раствором доводи до ефикасне елиминације бактерије *E. faecalis*<sup>124</sup>.

Група система који имају функцију у поспешивању ефекта иригације су посебно дизајнирани ендодонтски инструменти. XP-Endo Finisher (XPF-FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) је недавно представљен инструмент из групе инструмената који за циљ има повећање ефикасности конвенционалне иригације. ISO промер XPF је 25/00 и произведен је од патентиране MaxWire (Martensite-Austenite Electropolish-FleX, FKG) NiTi легуре, и у мартензит фази (охлађен) је прав, а након излагања температури тела прелази у аустенит фазу и поприма специфичан “облик кашике” дужине 10mm од врха инструмента и дубине 1,5mm. Термичка обрада ендодонтских NiTi инструмената значајно утиче на њихове механичке катактеристике, на првом месту на њихову отпорност на циклични замор. Управо зато последњих година развијено је неколико нових термичких поступака у производњи како би се оптимизовала микроструктура NiTi легура које се користе у производњи ендодонтских инструмената<sup>125</sup>.

Тако је све већи број произвођача који користи термички третиране NiTi легуре за израду ендодонтских инструмената. Већина је оних који се користе за машинску инструментацију канала корена, али постоје и они које можемо назвати финални ендодонтски инструменти (финишери) за које се сматра да својом акцијом обухватају највећи део површине зидова канала корена зуба и на тај начин ефикасно уклањају размазни слој и бактеријске биофилмове са њих. NiTi легура која се користи у производњи ендодонтских инструмената се састоји од оквирно 56% Ni и 44% Ti и може се налазити у три микроструктурне фазе: аустенит, мартензит и R-фази. Од односа ове три фазе и њихове релативне пропорције у легури зависе њене механичке карактеристике. Супереластичност NiTi легуре дозвољава надокнаду деформације од чак 8%, што представља јако пуно у односу на мање од 1% код легуре челика. Ова необична особина NiTi легуре је последица трансформације мартензит фазе индуковане напрезањем. Спољашњи напон доводи до трансформације унутар легуре из аустенит у мартензит кристалну форму који има способност да прими већи стрес.

Препорука је да се XPF користи при брзини од 800гpm у претходно препарисаном каналу до промера ISO 25 и присуству ириганса у каналу.<sup>126</sup>

Испитујући антибактеријску ефикасност четири различите технике дезинфекције канала корена зуба (конвенционална иригација шприцем и иглом, EndoActivator, XPF, PIPS) *Adham A. Azim* и сар. закључују да постоји статистички значајана разлика у ефикасности између XPF и EndoActivator система као и између XPF и PIPS-а док нема разлике у ефикасности између конвенционалне иригације, EndoActivator система и PIPS-а<sup>127</sup>. Употребом технике конфокалне ласерске скенинг микроскопије (CLSM) у циљу детекције и разликовања мртвих и живих бактерија исти аутори реферишу да је XPF најефикаснији у убијању бактерија на дубини дентина од 50μm у све три трећине корена зуба, док је ефикасност система PIPS значајно већа на дубини дентина од 100μm и 150μm.

Способност уклањања мешовитог бактеријског биофилма са зидова канала корена употребом стандардног протокола иригације, пасивном ултразвучном иригацијом (ПУИ) или ХРФ, испитивана у *in vitro* условима, била је предмет интересовања *Vao* и сар. који у својој студији долазе до резултата који недвосмислено указују да ХРФ уклања највећи део бактеријског биофилма са зидова канала корена. Подаци који аутори износе говоре да процентално ХРФ елиминише 99,2% бактеријског биофилма из простора главног канала корена и 98,96% из артефицијално направљених жлебова који симулирају тешко доступна места приликом иригације<sup>128</sup>.



### 3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Имајући у виду податке да је *E. faecalis* доминантни узрочник неуспеха код ендодонтског третмана инфицираних канала корена и чињеницу да се стандардним поступком иригације не може постићи његова потпуна елиминација из канала корена, постављена је хипотеза да допунски протоколи који укључују АФДТ, ПУИ, интраканалну примену диодних ласера и механичко дејство посебно дизајнираног ендодонтског инструмента ХРФ значајно и у подједнакој мери доприносе повећању антимикуробног ефекта стандардног протокола иригације на овај микроорганизам.

## 4. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Основни циљ овог истраживања је да утврди степен антимикуробног дејства на бактерију *E. faecalis*: антимикуробне фотодинамске терапије, диодног ласера, ултразвучно агитоване иригације, ендодонтског инструмента XPF и стандардног протокола иригације канала корена. Да би се ово остварило дефинисани су ужи циљеви:

1. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене АФДТ.
2. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене диодног ласера.
3. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене ПУИ.
4. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене XPF.
5. Одредити присуство, број генома као и број формираних колонија микроорганизма *E. faecalis* у индукованој инфекцији канала корена зуба пре и након примене стандардног протокола иригације канала корена.
6. Упоредити ефикасност пет наведених метода.
7. Утврдити слагање броја генома и броја бактеријских колонија након примене наведених антимикуробних протокола.

8. Утврдити присуство бактеријског бофилма на зидовима канала корена зуба са индукованом инфекцијом бактеријом *E. faecalis*.
9. Испитати изглед површине канала корена након примене пет испитиваних протокола обескличења.
10. Испитати присуство *E. faecalis*-а у дентинским тубулима након примене пет испитиваних протокола обескличења.

## 5. МАТЕРИЈАЛИ И МЕТОДЕ

У сврху добијања што потпунијих података о ефикасности изабраних антимикробних поступака у елиминацији *E. faecalis*-а, спроведен је комплексан методолошки концепт.

### 5.1. Формирање експерименталних група

Студија је изведена на 65 свеже екстрахирана, интактна, једнокорена зуба одраслих особа са завршеним растом корена, који су екстрахирани из ортодонтских или пародонтолошких разлога на Клиници за оралну хирургију Медицинског Факултета у Приштини са седиштем у Косовској Митровици. Зуби су након екстракције убацивани у раствор 5.25% NaOCl а потом чувани у 0.9% физиолошком раствору на собној температури до употребе у експерименту. Зуби су подељени у 5 експерименталних и једну контролну групу. Збирни приказ примењених експерименталних група и експерименталних протокола дат је у Табели 1.

Табела 1. Експерименталне групе и примењени протоколи обескличавања канала корена зуба

Група	I	II	III	IV	V	VI
Број зуба	12	12	12	12	12	5
Протокол обескличења	Пасивна ултразвучна иригација	NaOCl	Антимикробна фотодинамска терапија	Диодни Ласер	XPF	Позитивна контрола

## 5.2. Припрема узорака

Зуби су пре него што су декоронаризовани очишћени од остатака пародонцијума и наслага ултразвучним апаратом. Круна зуба је након тога одсечена дијамантском шајбном тако да корен сваког зуба буде дугачак 13 mm. (Слика 1)

Радна дужина зуба је установљена убацавањем ендодонтског инструмента K-file #10 (Dentsply/Maillefer /Tulsa/UK) све до визуализације врха инструмента на форамену.(Слика 2)



Слика 1.



Слика 2.

Припрема канала корена је изведена до 0.5мм од установљене дужине crown-down техником применом машинских инструмената (iRace Sequence Kit/ FKG Dentaire SA/ Switzerland) и ендомотора X Smart(Dentsply Sirona Canada).(Слика 3)

Иригација у току припреме узорака је вршена 2.25% раствором NaOCl.



Слика 3.

Ради елиминације размазног слоја који компромитује накнадну контаминацију тубула бактеријом *E. faecalis* узорци су потапани у раствор 17% EDTA (D line OU Kauplus Tallinn, Estonia) у вортекс апарату у трајању од 4 мин. Након тога узорци су испирани 0.9% NaCl па третирани у вортекс апарату у раствору 2.25% NaOCl још 4 мин. и финално испирани 0,9%NaCl. На овај начин је размазни слој у потпуности елиминисан.

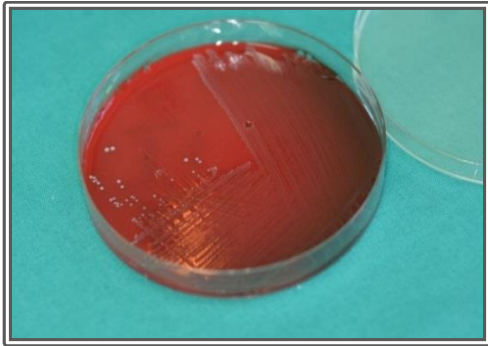
Апикални отвор зуба је затваран рестауративним материјалом на бази глас јономер цемента (Fuji IX, GC, Токуо, Јапан).

Зуби су појединачно упаковани у омотач за аутоклавирање а затим подвргнути стерилизацији. Стерилизација узорака је извршена у аутоклаву на температури од 121°C у трајању од 15 мин. Након тога зуби су одлагани у лабораторијске Erendorf епрувете са раствором крвно-можданог агара (Brain heart infusion, Merck KgaA, Darmstadt, Germany). Лабораторијске тубе су затим запечаћене и инкубиране у термостату на 37°C, 48h. Као негативна контролна група, 5 зуба је изабрано случајним узорковањем. Ови узорци су убацивани у раствор крвно-можданог агара (Brain heart infusion, Merck KgaA, Darmstadt, Germany) и инкубирани 24 часа на температури од 37 ° C. Недостатак бактеријског раста је доказ одсуства бактерије *E. faecalis*.

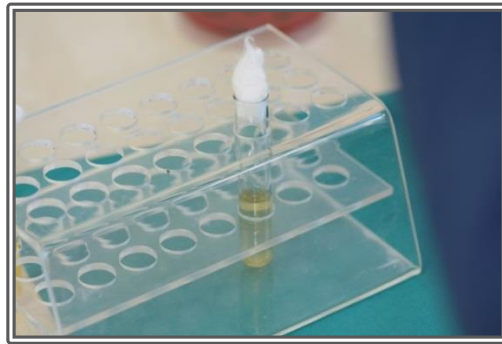
### 5.3. Култивација микроорганизама

Бактерија која *E. faecalis* (ATCC 29212) (ATCC LGC Standards GmbH Mercator str.51 46485 Wesel Germany) у замрзутном стању је засејана на Broth Hewitt Todd агар плоче у трајању од 24h на температури од 37°C. Колоније појединачно су након тога пресејаване у 10ml декстрозног бујона и инкубиране на 37°C у трајању од 24h. (Слика 4) Након тога је припремљена суспензија микроорганизама у декстрозном бујону са концентрацијом микроорганизама  $1.5 \times 10^8$ CFU/mL, густине 0.5 McFarland-a.(Слика 5)

По 20  $\mu$ l ове суспензије је микропипетором убацивано у сваки канал појединачно. Узорци са инокулисаним микроорганизмима инкубирани су на 37°C како би се обезбедило везивање бактерија за површину дентина. Сваких 48 часова додавано је по 20  $\mu$ l декстрозног бујона да би се обезбедио експоненцијални раст бактерија, после чега су узорци враћани у термостат на инкубацију. Након 14 дана инкубација је прекинута.



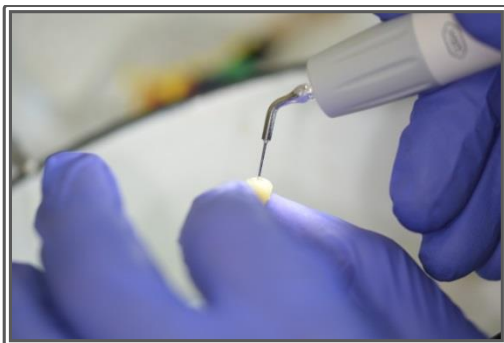
Слика 4.



Слика 5.

#### 5.4. Антимикробни протоколи

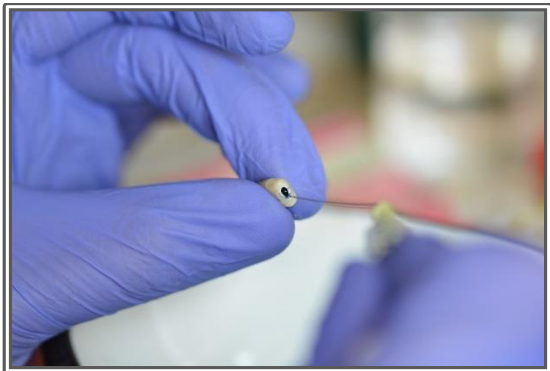
У групи I је спроведена ПУИ апаратом Tigon W&H (*W&H Dentalwerk Bürmoos GmbH, Postfach 1,5111 Bürmoos, Austria*). Након убацивања 0.5% NaOCl (pH12) у канал његова активација је изведена ендодонтским наставком TIP 1E у трајању од 60 секунди. (Слика 6) Инактивација заосталог NaOCl је извршена са 1 ml 5% натријум тиосулфата а потом канали испрани физиолошким раствором (1ml).



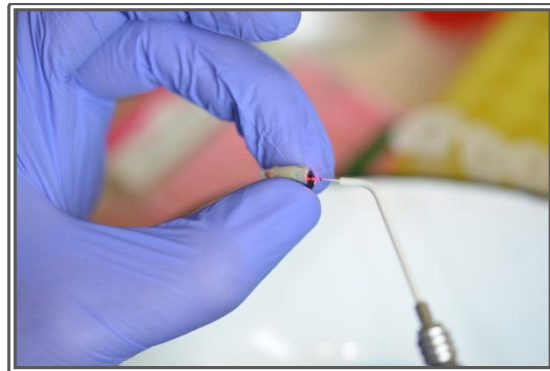
Слика 6.

У групи II је изведен стандардан протокол иригације зуба шприцем и иглом (30G, бочно перфорирана) раствором 0.5% -NaOCl (pH 12), на собној температури (21°C), у запремини од 5-10 ml. Након финалне иригације инактивација заосталог NaOCl је извршена са 1 ml 5% натријум тиосулата, а потом канали испрани физиолошким раствором (1 ml).

У групи III је спроведен протокол обескличавања канала корена АФДТ у потпуности поштујући упутство произвођача. У канал корена је апликована фотоактивна материја (Фенотијазин хлорид 10 mgmL<sup>-1</sup>/Helbo Endo Blue, Grieskirchen,Austria) до нивоа улаза, а потом додатно активирана потискивањем К турпијом #15.(Слика 7) Након апликације фотоактивна материја је држана у каналу 1 минут, а након тога је излагана ирадијацији диодним ласером (Helbo, Bredent, Senden,Germany, k=660 nm, укупна снага = 100 mW). Као светлосни проводник је употребљено оптичко влакно 3D EndoProbe (Helbo, Bredent, Senden,Germany) које је апликовано на радну дужину а потом канал излаган дејству светла спиралним покретима у трајању од 60 sec.(Слика 8)



Слика 7.

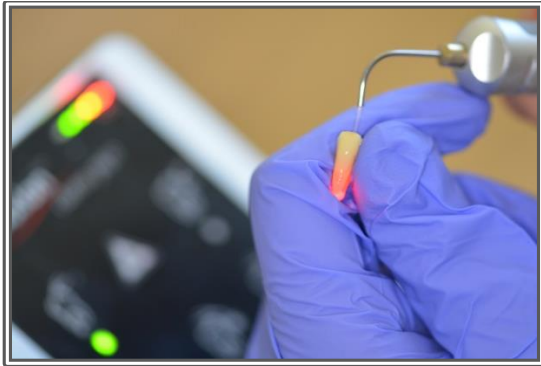


Слика 8.

У групи IV је примењен диодни ласер Elixion pico (elexxion AG/Otto-Nahn Straße 778224 Singen/ Deutschland). Ласер је снаге 5 W са таласном дужином од 808 nm и фреквенцијом од 12.000-20.000 Hz. Време укључивања и време искључивања је подешено на 26 µs.



У току експеримента је употребљено оптичко влакно дијаметра 200  $\mu\text{m}$  које је убацивано у претходно напуњен физиолошким раствором, спиралним покретима, до дужине која је 0,5 mm краћа од радне дужине канала.(Слика 9) Време експозиције канала дејству ласера износило је 10 секунди на сваком зиду и понављано је у четири циклуса.

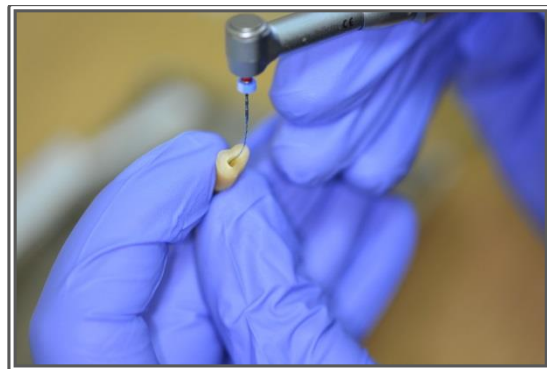


Слика 9.

У групи V је спроведена иригација раствором 0.5% NaOCl и канал је финално третиран инструментом XPF (FKG Dentaire SA/ Switzerland)(Слика 10), брзином од 1.000 обртаја по минути и обртним моментом од 1 Ncm у трајању од 1 минута.(Слика 11) Инактивација заосталог NaOCl је извршена са 1 ml 5% натријум тиосульфата, а потом канали испрани физиолошким раствором (1 ml).



Слика 10.



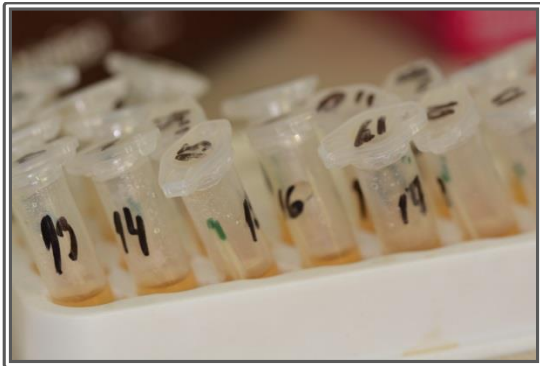
Слика 11.

У контролној групи 5 зуба је испирано физиолошким раствором (0.9% NaCl/Немofarm/Сrbија) у запремини од 5 ml.

Збирни приказ примењених експерименталних протокола дат је у табели 1

### 5.5. Узорковање, молекуларна и микробиолошка анализа

Пре сваког антимикубног протокола, канали су испирани са 2,5 ml 0.9% физиолошког раствора који је додатно активиран у каналу убацавањем инструмента Н турпије #25. Након тога папирни поени су убацивани у канал, серијски два поена, до радне дужине и задржавани у каналу 10 секунди. Папирни поени су потом пребачени у стерилне Eppendorf епрувете са 1 ml RTF (Reduced Transport Fluid ) раствора до микробиолошких анализа.(Слика 12) Зуби су подвргнути одговарајућем третману након чега су поново узети узорци на исти начин.



Слика 12.

Квантификација броја микроорганизама обављена је применом квантитативне методе ланчане реакције полимеразе у реалном времену (RT-PCR) као и методом утврђивања броја формираних бактеријских колонија на хранљивој подлози (CFU). RT-PCR је коришћен и за проверу поступка узорковања и садржаја инокулата (садржај искључиво бактерија *E. Faecalis*).

Errendorf епрувете са папирним поенима пре и после третмана су вортексиране 30 секунди, након чега је одвојено 100  $\mu$ l за квантификацију бактерија RT-PCR методом. Методом RT-PCR је одређен укупан број бактерија у узорцима, пре и после третмана. Узорци су чувани на -70  $^{\circ}$ C. Пре изолације бактеријске ДНК, узорци су одмрзавани на собној температури, вортексовани по један минут, а затим је 0.5 ml суспензије бактерија у транспортном медијуму узето за добијање бактеријске ДНК. Изолација бактеријске ДНК је урађена китом за изолацију бактеријске ДНК (PureLink Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies) по упутству произвођача. Процена бактеријске ДНК изражена је у броју копија гена за 16S rRNA по ml узорка (генске копије по/ml узорка). Овај вид квантификације базира се на чињеници, да различите бактеријске врсте могу да имају различит број гена за 16S rRNA, а који се налазе у склопу генских јединица-оперона (16S, 23S, 5S rRNA). Према подацима из литературе, број оперона са генима за rRNA по бактерији, може да се креће од 1 до 15 <sup>129</sup>. Број оперона са генима по бактеријској ћелији код бактерије *E. Faecalis* је 4. Прајмери који су коришћени у овој квантитативној анализи хибридизују са конзервираном секвенцом гена за 16S rRNA (rDNA гени), и дају PCR продукте 466bp. Секвенца прајмера и температура хибридизације за бактерију *E. Faecalis* приказане су у Табели 2.

Табела 2. Секвенца прајмера и температура хибридизације за бактерију *E. Faecalis*

Микроорганизам	Секвенца прајмера	bp	T ( $^{\circ}$ C)
Enterococcus Faecalis	Fwd GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG	310	58
	Rv CCGTCAGGGGACGTTCAG		

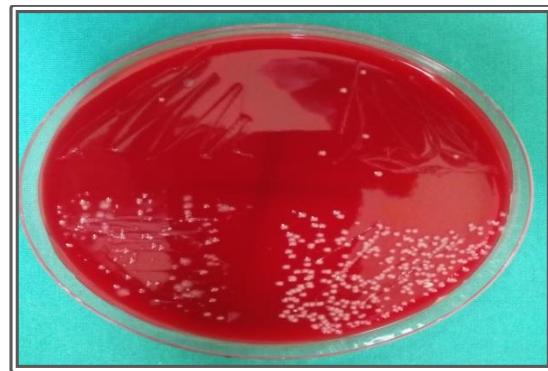
За квантитативну анализу бактерије *E. faecalis*, коришћен је референтни сој *E. faecalis*(ATCC 29212) (ATCC LGC Standards GmbH Mercator str.51 46485 Wesel Germany). На основу базе података о величини генома *E. faecalis*, одговарајућом конверзијом добијена је тежина генома једне ћелије од од 3.3fg ДНК. На основу ове вредности, направљена је серија разблажења стандарда од 3,3fg/ $\mu$ l ДНК( $10^2$  копија генома) до 3,3ng/ $\mu$ l ДНК( $10^7$  копија генома).

Међутим, пошто је qPCR реакцијом амплификована специфична секвенца 16S rDNK, а којих у геному бактерије *E. faecalis* има 4 коришћене вредности стандарда биле су у распону од ( $4 \times 10^2$  копија генома 16rDNK) до ( $4 \times 10^7$  копија генома 16SrDNK). Добијен број генских копија након реакције подељен је са 4, да би се добио укупан број генома ове врсте (копије генома/ml узорка или бр. ћелија/ml). PCR реакција је урађена у апарату за умножавање DNK (Pеqlab PеqSTAR2X, Ерлангер, Немачка) (Слика 13) Температурни профили qPCR реакција били су: 95 °C 10min.; 35 циклуса, 95 °C 45s, 55-60 °C 1min, и 72 °C 1min; 72 °C 5min.

Од остатка течности направљена су 2 десетострука разблажења, па је 20 µl раствора бактерија разблажења 1:100 засејано на крвни агар (Hiimedia, Индија). Засејане хранљиве подлоге су инкубиране 24 часа на 37°C. После инкубације пребројаван је број формираних колонија за сваки узорак. Добијени број колонија множен је са фактором разблажења (5000) да би се добио број бактеријских ћелија по узорку (CFU). (Слика 14)



Слика 13.



Слика 14.

## 5.6. СЕМ

Из сваке групе је по један узорак зуба случајним узорковањем одабран, пре и после третмана ради СЕМ анализе. Зуби су уздужно засечени фисурним турбинским сврдлом а затим распопућени српастим инструментом. Узорак је затим фиксиран у 8% формалдехиду на 4 степени целзијуса и чуван седам дана. Дехидратација је обављена серијским потапањем у растворе етил алкохол растућих концентрација (25%, 50%, 75%, 95% и два пута у апсолутном алкохолу), током 1 сата. Узорци су затим припремљени напаривањем у Au-Pd напаривачу и изложени скенинг електронској микроскопији при увеличању од 10.000 и 20.000 пута. Анализа је урађена скенинг електронским микроскопом TESCAN FE-SEM Mira #XMU, Brno Češka Republika. На узорцима пре третмана СЕМ анализом је верификовано формирање биофилма, а на узорцима након третмана изглед дентина и постојање заосталих бактерија на површини дентина и у дентинским тубулима.

## 5.7. Статистичка обрада података

Број копија генома као и број бактерија представљен је у експоненцијалном облику, с тим да је израз типа  $a \cdot 10^b$  записан као  $a,e+0b$ . За анализу добијених података коришћене су дескриптивне статистичке методе, методе за тестирање статистичких хипотеза и методе за оцену слагања мерења.

Од дескриптивних статистичких метода коришћене су мере централне тенденције аритметичка средина ( $A_s$ ) и медијана ( $Med$ ), мере варијабилитета (стандардна девијација и интервал) и релативни бројеви (показатељи структуре).

Од метода за тестирање статистичких хипотеза коришћени су: Wilcoxonov тест, ANOVA са Тукеу пост-хок тестом, Kruskal-Wallis тест са Mann-Whitney пост-хок тестом.

Од метода за оцену слагања мерења коришћен је Spearmanов коефицијент. Статистичке хипотезе су тестиране на нивоу статистичке значајности (алфа ниво) од 0,05. Резултати су приказани табеларно и графички. Сви подаци су обрађени у IBM SPSS Statistics 22 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)софтверском пакету.

## 6. РЕЗУЛТАТИ

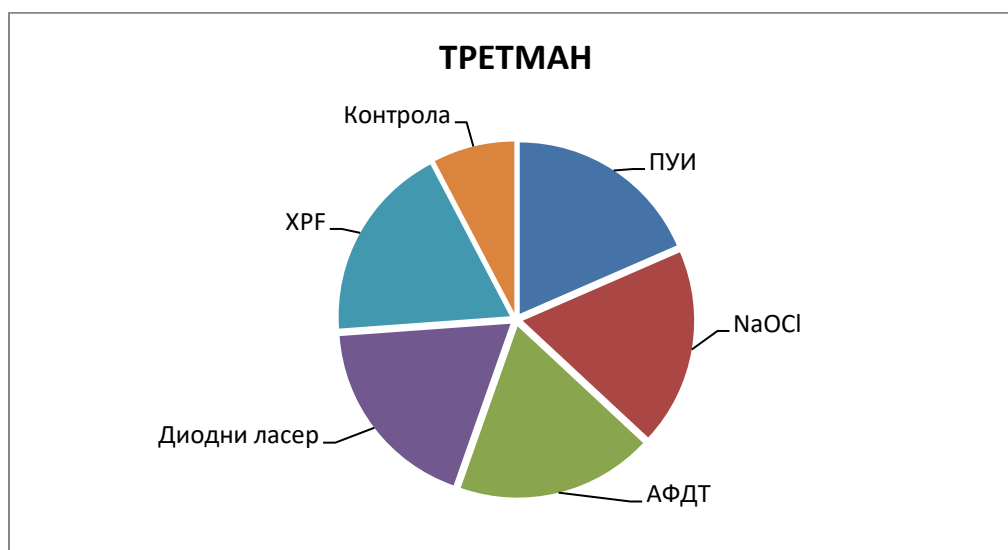
### Испитиване групе

У истраживању је употребљено 65 зуба. По 12 зуба (по 18,7%) је било изложено различитим третманима у оквиру експерименталних група, а 5 зуба (7,7%) је чинило контролну групу.(Табела 3)

Табела 3. Дистрибуција зуба према примењеним третманима

Третман	n	%
ПУИ	12	18,5
NaOCl	12	18,5
АФДТ	12	18,5
Диодни ласер	12	18,5
ХРФ	12	18,5
Контрола	5	7,7

Графикон 1. Дистрибуција зуба према примењеном третману



## 6.1. БРОЈ КОПИЈА ГЕНОМА

У свим испитиваним групама потврђена је инфекција бактеријом врсте *E. faecalis* спроведеном RT-PCR техником.

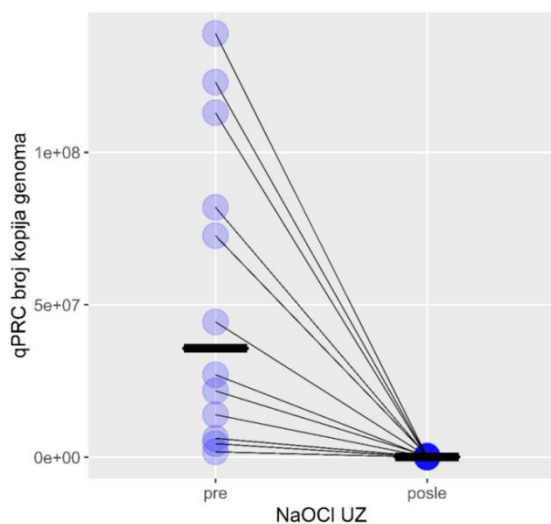
Код примене ПУИ, медијана **qPCR** броја копија генома пре третмана износила је  $3,58, \text{e}+07$  (опсег,  $1,80, \text{e}+06$  -  $1,39, \text{e}+08$ ), док је после примене третмана износила  $1,66, \text{e}+05$  (опсег,  $4,45, \text{e}+04$  -  $5,85, \text{e}+05$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 4)

Табела 4. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене протокола са NaOCl+УЗ.

Третман	As	Sd	Med	Min	Max	P	
ПУИ	Пре	$5,41, \text{e}+07$	$5,00, \text{e}+07$	$3,58, \text{e}+07$	$1,80, \text{e}+06$	$1,39, \text{e}+08$	0,002
	после	$2,34, \text{e}+05$	$1,76, \text{e}+05$	$1,66, \text{e}+05$	$4,45, \text{e}+04$	$5,85, \text{e}+05$	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 2)

Графикон 2. Број копија генома пре и после примене ПУИ





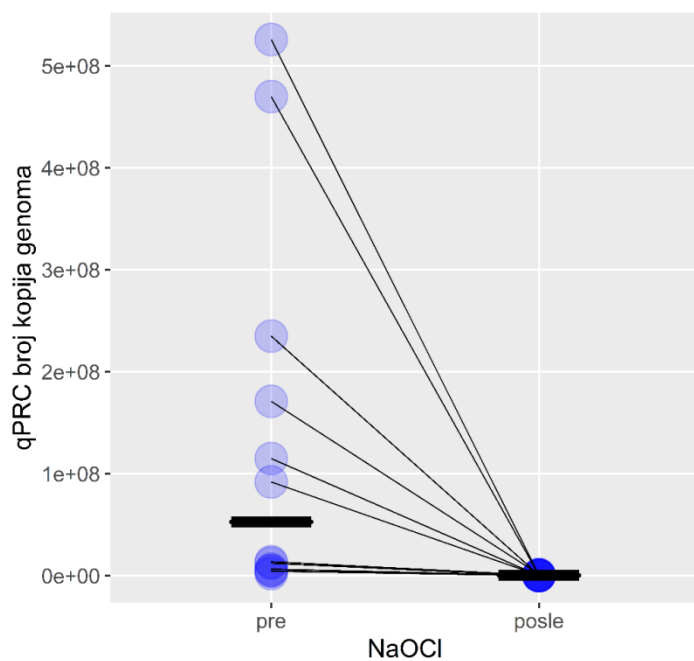
Код примене **NaOCl**, медијана **qPCR** број копија генома пре третмана износила је  $5,28, e + 07$  (опсег,  $2,06, e + 06 - 5,26, e + 08$ ), док је после примена третмана износила  $3,35, e + 05$  (опсег,  $2,68, e + 04 - 1,38, e + 06$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z = 2,934$ ;  $p = 0,003$ ). (Табела 5)

Табела 5. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене протокола са NaOCl

Третман		As	Sd	med	Min	max	P
NaOCl	Пре	1,38,e+08	1,85,e+08	5,28,e+07	2,06,e+06	5,26,e+08	0,003
	После	3,93,e+05	3,92,e+05	3,35,e+05	2,68,e+04	1,38,e+06	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 3)

Графикон 3 – Број копија генома пре и после примене NaOCl



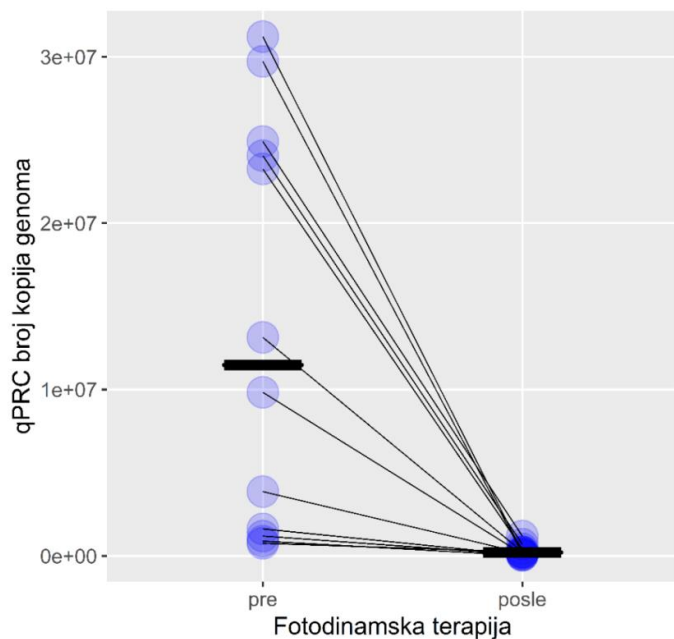
Код примене **АФДТ**, медијана **qPCR** броја копија генома пре третмана износила је 1,15, e + 07 (опсег, 7,52, e + 05 - 3,12, e + 07), док је после примене третмана износила 2,04 , e + 05 (опсег, 2,45, e + 04 - 1,19, e + 06), што је статистички значајна разлика ( $Z = 3,059$ ;  $p = 0,002$ ). (Табела 6)

Табела 6. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене протокола са АФДТ

Третман		As	Sd	med	min	max	P
<b>АФДТ</b>	Пре	1,37,e+07	1,22,e+07	1,15,e+07	7,52,e+05	3,12,e+07	0,002
	После	3,02,e+05	3,37,e+05	2,04,e+05	2,45,e+04	1,19,e+06	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 4)

Графикон 4 . Број копија генома пре и после примене АФДТ



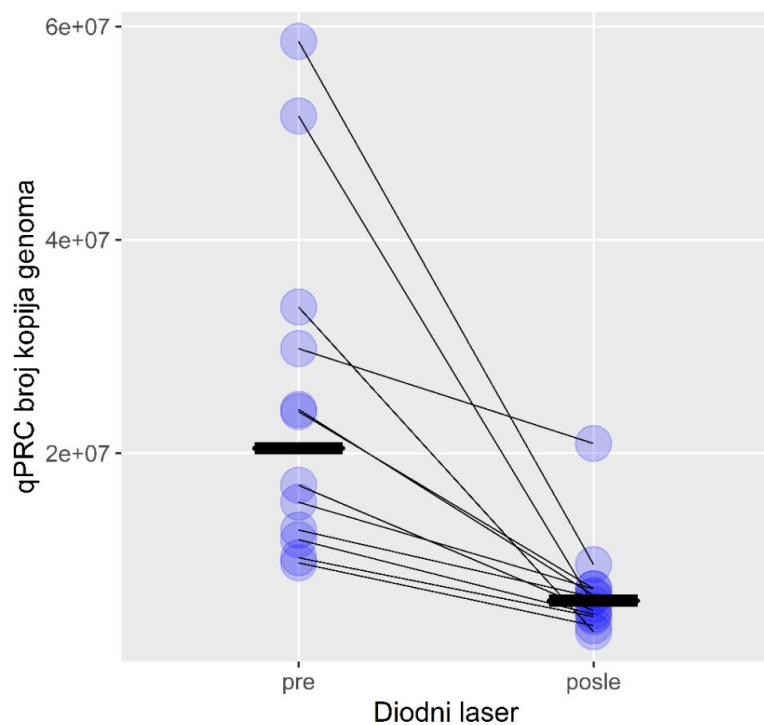
Код примене **Диодног ласера**, медијана **qPCR** броја копија генома пре третмана износила је 2,05, е + 07 (опсег, 9,72, е + 06 - 5,86, е + 07), док је после примене третмана износила 6,17 , е + 06 (опсег, 3,26, е + 06 - 2,09, е + 07), што је статистички значајна разлика ( $Z = 3,059$ ;  $p = 0,002$ ). (Табела 7)

Табела 7. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене протокола са диодним ласером

Третман		as	Sd	Med	Min	Max	p
<b>Диодни ласер</b>	Пре	2,49,е+07	1,61,е+07	2,05,е+07	9,72,е+06	5,86,е+07	0,002
	После	7,16,е+06	4,65,е+06	6,17,е+06	3,26,е+06	2,09,е+07	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 5)

Графикон 5. Број копија генома пре и после примене диодног ласера



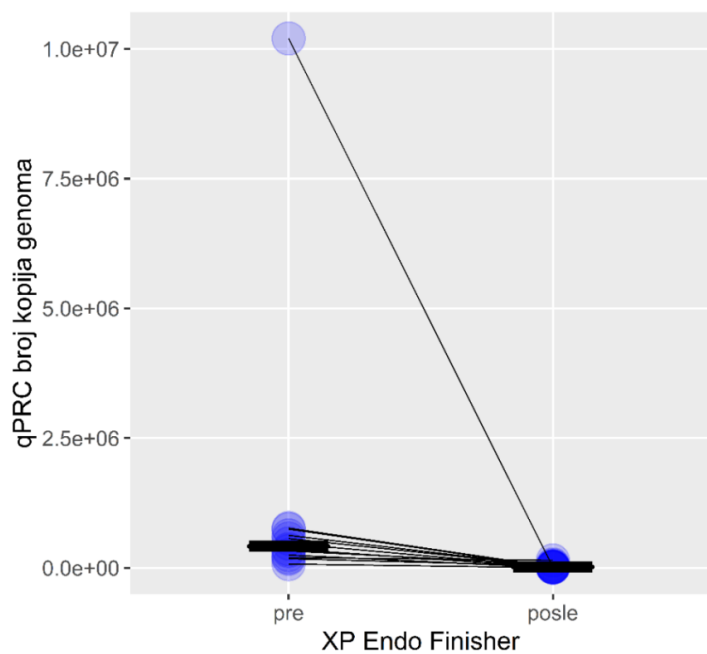
Код примене **XPF** медијана **qPCR** број копија генома пре третмана износила је 4,13, е + 05 (опсег, 7,27, е + 04 - 1,02, е + 07), док је после примена третмана износила 1, 57, е + 04 (опсег, 3,16, е + 03 - 1,43, е + 05), што је статистички значајна разлика ( $Z = 3,059$ ;  $p = 0,002$ ). (Табела 8)

Табела 8. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене протокола са XPF

Третман		As	Sd	med	Min	Max	p
<b>XPF</b>	Пре	1,23,e+06	2,83,e+06	4,13,e+05	7,27,e+04	1,02,e+07	0,002
	После	3,13,e+04	3,92,e+04	1,57,e+04	3,16,e+03	1,43,e+05	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 6)

Графикон 6. Број копија генома пре и после примене XPF



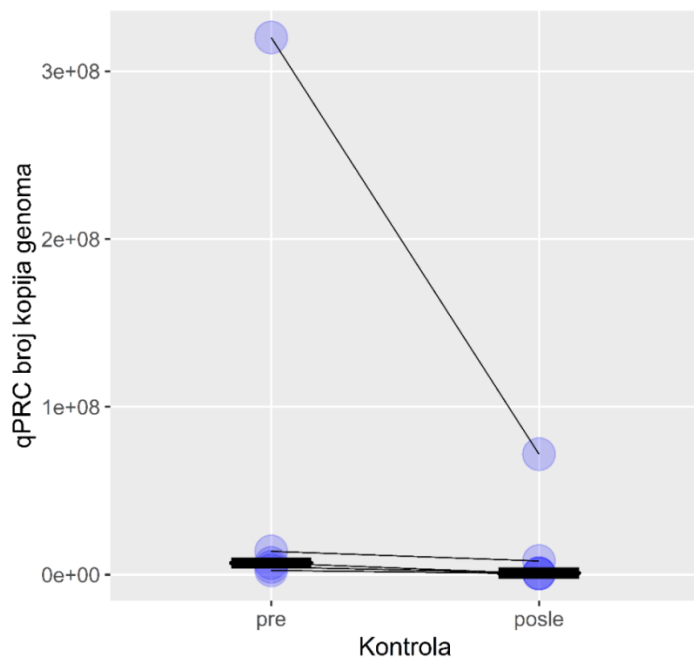
Код **контролне групе**, медијана, **qPCR** број копија генома пре третмана износила је 6,89, e + 06 (опсег, 2,52, e + 06 - 3,20, e + 08), док је после примене третмана износила 9,05, e + 05 (опсег, 5,61, e + 05 - 7,18, e + 07), што је статистички значајна разлика ( $Z = 2,023$ ;  $p = 0,043$ ). (Табела 9)

Табела 9. Статистички показатељи у вези са бројем копија генома пре и након примене 0,9% NaCl.

Третман		As	Sd	Med	min	max	P
<b>Контрола</b>	Пре	6,96,e+07	1,40,e+08	6,89,e+06	2,52,e+06	3,20,e+08	0,043
	После	1,64,e+07	3,11,e+07	9,05,e+05	5,61,e+05	7,18,e+07	

Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја копија генома после примењеног третмана. (Графикон 7)

Графикон 7. Број копија генома пре и после примене 0,9% NaCl



## 6.2. БРОЈ ЋЕЛИЈА

Статистичком анализом добијених података о броју ћелија бактерије *E. faecalis* у зависности од примењеног терапијског поступка добијени су следећи резултати:(Табела 10)

Табела 10. Статистички показатељи у вези са бројем ћелија пре и након примене испитиваних третмана

Третман		As	sd	med	min	max	P
<b>ПУИ</b>	Пре	1,35,e+07	1,25,e+07	8,94,e+06	4,50,e+05	3,48,e+07	0,001
	После	5,86,e+04	4,39,e+04	4,15,e+04	1,11,e+04	1,46,e+05	
<b>NaOCI</b>	Пре	3,75e+07	4,72e+07	2,30e+07	1,13e+06	1,32e+08	0,001
	После	9,82e+04	9,80e+04	8,38e+04	6,70e+03	3,45e+05	
<b>АФДТ</b>	Пре	3,43e+06	3,05e+06	2,87e+06	1,88e+05	7,80e+06	0,001
	После	7,55e+04	8,42e+04	5,11e+04	6,11e+03	2,99e+05	
<b>Диодни ласер</b>	Пре	6,22e+06	4,04e+06	5,11e+06	2,43e+06	1,47e+07	0,001
	После	1,79e+06	1,16e+06	1,54e+06	8,15e+05	5,23e+06	
<b>ХРФ</b>	Пре	3,07e+05	7,09e+05	1,03e+05	1,82e+04	2,55e+06	0,001
	После	7,82e+03	9,81e+03	3,93e+03	7,90e+02	3,58e+04	
<b>Контрола</b>	Пре	1,74e+07	3,50e+07	1,72e+06	6,30e+05	8,00e+07	0,001
	После	4,10e+06	7,78e+06	2,26e+05	1,40e+05	1,80e+07	

Код примене **ПУИ**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је 8,94,e+06 (опсег, 4,50,e+05 - 3,48,e+07), док је после примене третмана износила 4,15,e+04 (опсег, 1,11,e+04 - 1,46,e+05), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

Код примене **NaOCl**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је  $2,30e+07$  (опсег,  $1,13e+06$  -  $1,32e+08$ ), док је после примене третмана износила  $8,38e+04$  (опсег,  $6,70e+03$  -  $3,45e+05$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=2,934$ ;  $p=0,003$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

Код примене **АФДТ**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је  $2,87e+06$  (опсег,  $1,88e+05$  -  $7,80e+06$ ), док је после примене третмана износила  $5,11e+04$  (опсег,  $6,11e+03$  -  $2,99e+05$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

Код примене **Диодног ласера**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је  $5,11e+06$  (опсег,  $2,43e+06$  -  $1,47e+07$ ), док је после примене третмана износила  $1,54e+06$  (опсег,  $8,15e+05$  -  $5,23e+06$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

Код примене **XPF**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је  $1,03e+05$  (опсег,  $1,82e+04$  -  $2,55e+06$ ), док је после примене третмана износила  $3,93e+03$  (опсег,  $7,90e+02$  -  $3,58e+04$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

Код примене **0,9% NaCl**, медијана **qPCR** броја ћелија пре третмана износила је  $1,72e+06$  (опсег,  $6,30e+05$  -  $8,00e+07$ ), док је после примене третмана износила  $2,26e+05$  (опсег,  $1,40e+05$  -  $1,80e+07$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=2,023$ ;  $p=0,043$ ). Дошло је до значајног смањења медијана **qPCR** броја ћелија после примењеног третмана.

### 6.3. НАЛАЗ CFU/ml

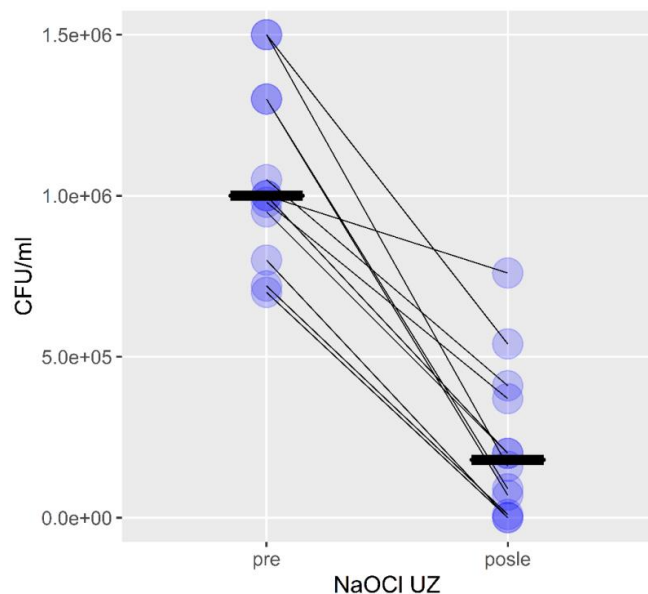
Код примене ПУИ, медијана CFU/ml пре третмана износила је 1,00,е+06 (опсег, 7,00,е+05-1,50,е+06), док је после примене третмана износила 1,80,е+05 (опсег, 8,00,е+01- 7,60,е+05), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 11)

Табела 11. Статистички показатељи у вези са вредношћу CFU/ml пре и након примене протокола са ПУИ.

Третман		As	sd	Med	min	max	P
ПУИ	Пре	1,07,е+06	2,76,е+05	1,00,е+06	7,00,е+05	1,50,е+06	0,002
	После	2,34,е+05	2,40,е+05	1,80,е+05	8,00,е+01	7,60,е+05	

Дошло је до значајног смањења медијана CFU/ml после примењеног третмана. (Графикон 8)

Графикон 8 – Вредности CFU/ml пре и после примене ПУИ





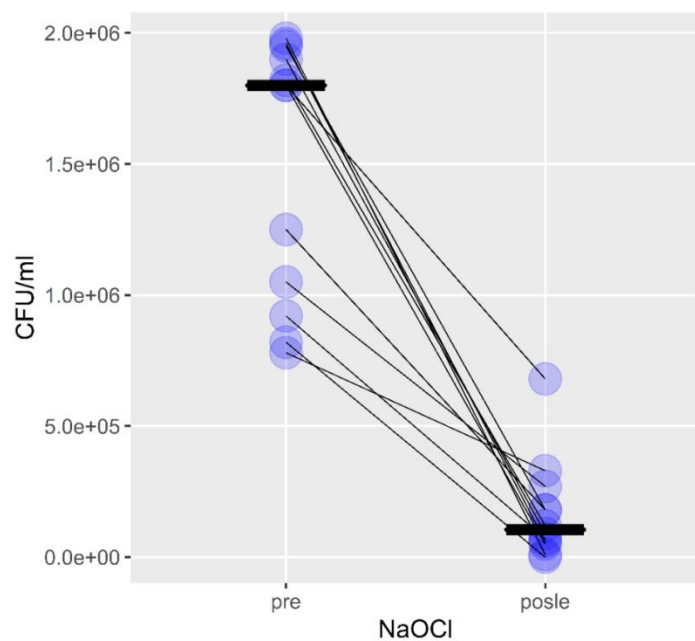
Код примене **NaOCl**, медијана **CFU/ml** пре третмана износила је  $1,80,е+06$  (опсег,  $7,80,е+05-1,98,е+06$ ), док је после примене третмана износила  $1,05,е+05$  (опсег,  $5,00,е+01- 6,80,е+05$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 12)

Табела 12. Статистички показатељи у вези са вредношћу **CFU/ml** пре и након примене протокола са **NaOCl**

Третман		As	sd	Med	Min	max	P
<b>NaOCl</b>	Пре	$1,50,е+06$	$4,93,е+05$	$1,80,е+06$	$7,80,е+05$	$1,98,е+06$	0,002
	После	$1,70,е+05$	$1,90,е+05$	$1,05,е+05$	$5,00,е+01$	$6,80,е+05$	

Дошло је до значајног смањења медијана **CFU/ml** после примењеног третмана. (Графикон 9)

Графикон 9 – Вредности **CFU/ml** пре и после примене **NaOCl**



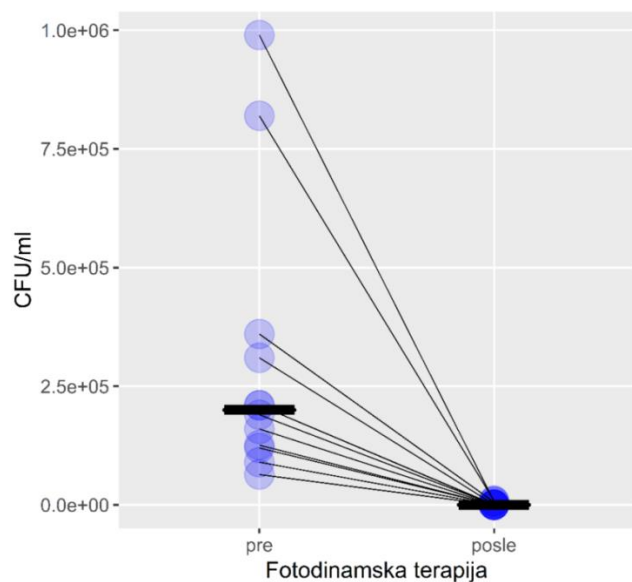
Код примене **АФДТ**, медијана **CFU/ml** пре третмана износила је  $2,00,е+05$  (опсег,  $6,40,е+04$  -  $9,90,е+05$ ), док је после примене третмана износила  $3,00,е+02$  (опсег,  $0,00,е+00$  -  $9,10,е+03$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 13) Код два узорка након примењеног третмана нису пронађене бактерије.

Табела 13. Статистички показатељи у вези са вредношћу CFU/ml пре и након примене протокола са АФДТ

Третман		As	sd	Med	Min	max	P
<b>АФДТ</b>	Пре	$3,04,е+05$	$2,95,е+05$	$2,00,е+05$	$6,40,е+04$	$9,90,е+05$	0,002
	После	$2,12,е+03$	$3,34,е+03$	$3,00,е+02$	$0,00,е+00$	$9,10,е+03$	

Дошло је до значајног смањења медијана **CFU/ml** после примењеног третмана. (Графикон 10)

Графикон 10 – Вредности CFU/ml пре и после примене АФДТ



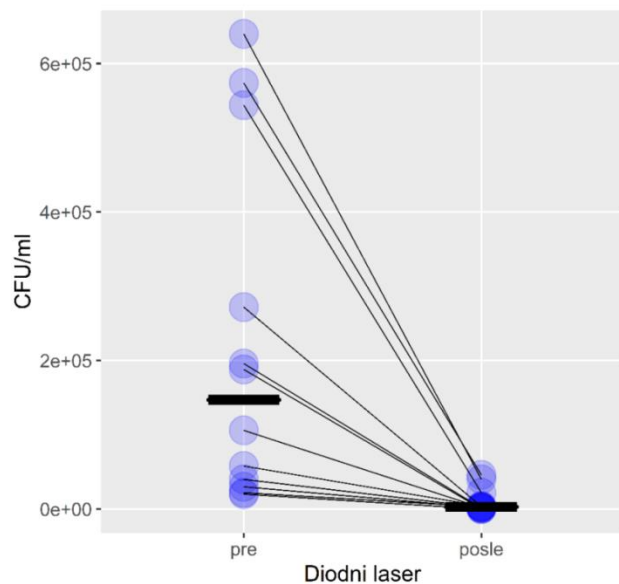
Код примене **Диодног ласера**, медијана **CFU/ml** пре третмана износила је  $1,47, e+05$  (опсег,  $2,00, e+04 - 6,40, e+05$ ), док је после примене третмана износила  $2,80, e+03$  (опсег,  $0,00, e+00 - 4,60, e+04$ ), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 14) У једном узорку након примењеног третмана нису пронађене бактерије.

Табела 14. Статистички показатељи у вези са вредношћу CFU/ml пре и након примене протокола са Диодним ласером

Третман		As	sd	med	Min	max	P
Диодни Ласер	Пре	$2,24, e+05$	$2,33, e+05$	$1,47, e+05$	$2,00, e+04$	$6,40, e+05$	0,002
	После	$1,05, e+04$	$1,63, e+04$	$2,80, e+03$	$0,00, e+00$	$4,60, e+04$	

Дошло је до значајног смањења медијана **CFU/ml** после примењеног третмана. (Графикон 11)

Графикон 11 – Вредности CFU/ml пре и после примене Диодног ласера



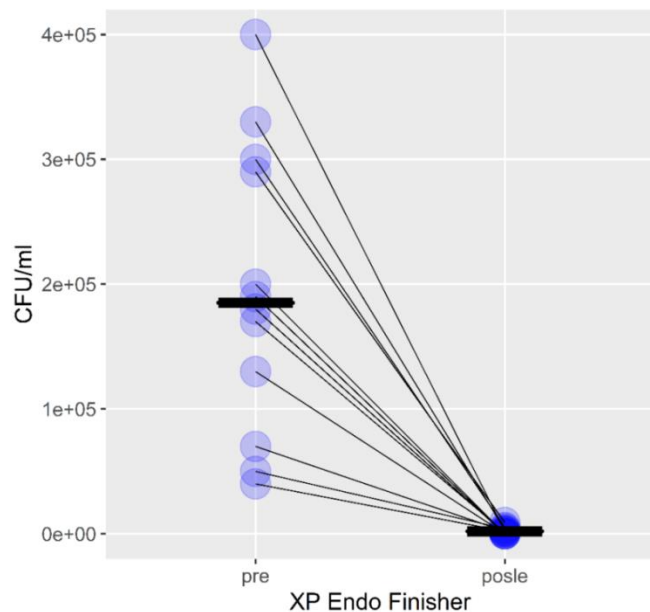
Код примене **XPF**, медијана **CFU/ml** пре третмана износила је 1,85,e+05 (опсег, 4,00,e+04 - 4,00,e+05), док је после примене третмана износила 2,00,e+03 (опсег, 0,00,e+00 - 9,00,e+03), што је статистички значајна разлика ( $Z=3,059$ ;  $p=0,002$ ). (Табела 15) Код четири узорка након примењеног третмана нису пронађене бактерије.

Табела 15. Статистички показатељи у вези са вредношћу CFU/ml пре и након примене протокола са XPF

Третман	As	sd	med	Min	Max	p	
XPF	Пре	1,96,e+05	1,15,e+05	1,85,e+05	4,00,e+04	4,00,e+05	0,002
	После	2,33,e+03	2,67,e+03	2,00,e+03	0,00,e+00	9,00,e+03	

Дошло је до значајног смањења медијана **CFU/ml** после примењеног третмана. (Графикон 12)

Графикон 12 – Вредности CFU/ml пре и после примене XPF



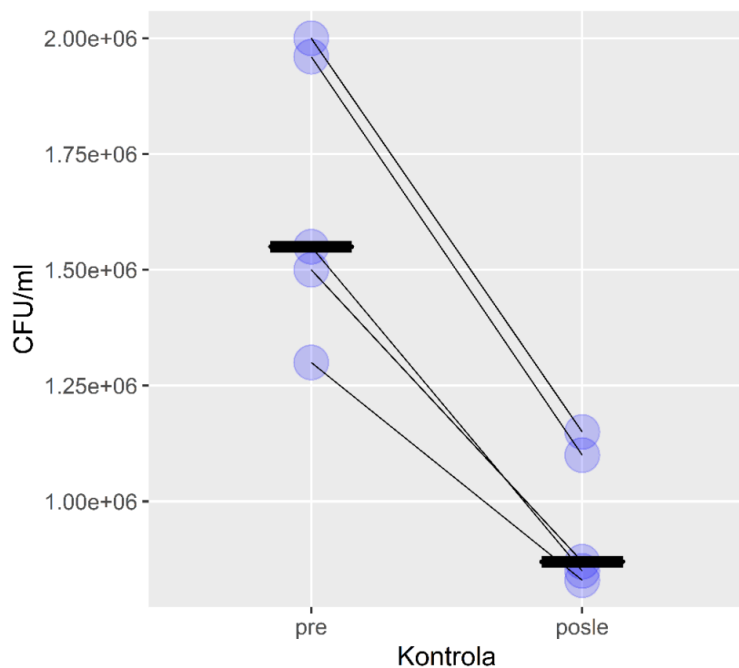
Код примене **0,9% NaCl**, медијана **CFU/ml** пре третмана износила је 1,55,e+06 (опсег, 1,30,e+06 - 2,00,e+06), док је после примене третмана износила 8,70,e+05 (опсег, 8,30,e+05 - 1,15,e+06), што је статистички значајна разлика ( $Z=2,023$ ;  $p=0,043$ ). (Табела 16)

Третман		As	Sd	med	min	Max	P
Контрола	Пре	1,66,e+06	3,05,e+05	1,55,e+06	1,30,e+06	2,00,e+06	0,043
	После	9,60,e+05	1,52,e+05	8,70,e+05	8,30,e+05	1,15,e+06	

Табела 16. Статистички показатељи у вези са вредношћу CFU/ml пре и након примене протокола са 0,9% NaCl

Дошло је до значајног смањења медијана **CFU/ml** после примењеног третмана. (Графикон 13)

Графикон 13 – Вредности CFU/ml пре и после примене 0,9% NaCl



## Процентуалне промене броја копија генома

Мере централне тенденције и варијабилитет процентуалних промена броја копија генома насталих као последица третмана показују да су највеће редукције броја копија генома настале као последица примене NaOCl, ПУИ као и АФДТ. Ове промене су и статистички значајно веће у односу на контролну групу. Када се посматрају експерименталне групе међусобно статистички је највећа разлика између протокола са диодним ласером, код кога је уочено најнижа редукција броја копија генома, и оног са NaOCl самостално или уз примену ПУИ. (Табела 17 и 18). Постоји статистички значајна разлика у медијанама процентуалних разлика после третмана у односу на врсту примењеног средства ( $hi\text{-}kvadrat=40,596; df=5; p<0,001$ ).

Табела 17. Статистички показатељи у вези са вредношћу процентуалних промена броја копија генома након примењених третмана

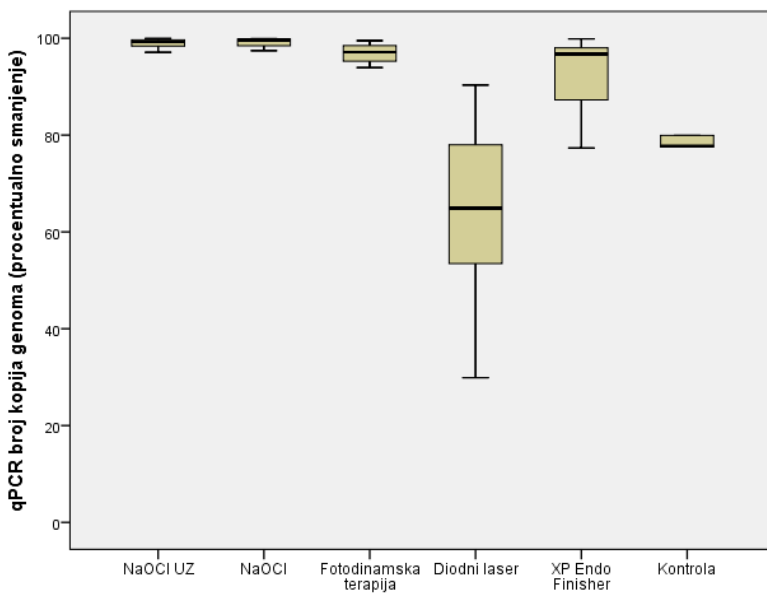
Третман	As	sd	Med	Min	Max	P
ПУИ	98,8	1,3	99,2	95,5	100,0	
NaOCl	98,9	1,4	99,6	95,3	99,9	
АФДТ	94,8	8,3	97,2	69,0	99,5	
Диодни ласер	64,9	17,7	64,9	29,9	90,3	0,001
ХРФ	88,3	20,6	96,7	27,0	99,9	
Контрола	73,7	18,7	77,7	41,7	91,3	

Табела 18. Статистичка значајност процентуалних разлика медијана после примењеног третмана

Tretman	Kontrola	ПУИ	NaOCl	АФДТ	Diodni laser
ПУИ	0,001				
NaOCl	<0,001	0,840			
АФДТ	0,045	0,056	0,038		
Дидни ласер	0,714	<0,001	<0,001	0,002	
ХРФ	0,104	0,016	0,011	0,622	0,009

Процентално смањење **qPCR** копија генома након примењених третмана приказано је на графикону 14

Графикон 14.



## Процентуалне промене вредности CFU/ml

Сви експериментални третмани довели су до значајног смањења вредности **CFU/ml** у односу на контролну групу и постоји статистички значајна разлика у аритметичким срединама процентуалних разлика после третмана у односу на врсту примењеног средства ( $F=21,473$ ;  $df=5,59$ ;  $p<0,001$ ). Анализирајући међусобне разлике експерименталних третмана уочена је значајна разлика у процентуалном смањењу **CFU/ml** између групе у којој је примењен ПУИ и група где је примењена АФДТ, диодни ласер и ХРФ. Наиме, процентуално смањење **CFU/ml** у поменуте три групе је било веће него у групи у којој је примењен ПУИ. Средње вредности и варијабилитет процентуалних промена **CFU/ml** после третмана приказане су у табели 19.

Табела 19. Средње вредности и варијабилитет процентуалних промена **CFU/ml** после третмана

Третман	As	Sd	med	Min	Max	P
ПУИ	78,8	22,7	84,7	24,0	100,0	
NaOCl	87,1	14,5	92,9	57,7	100,0	
АФДТ	99,6	0,5	99,8	98,3	100,0	
Диодни ласер	95,3	4,3	95,0	85,5	100,0	0,001
ХРФ	98,1	2,5	99,3	92,0	100,0	
Контрола	41,9	3,5	42,5	36,2	45,2	



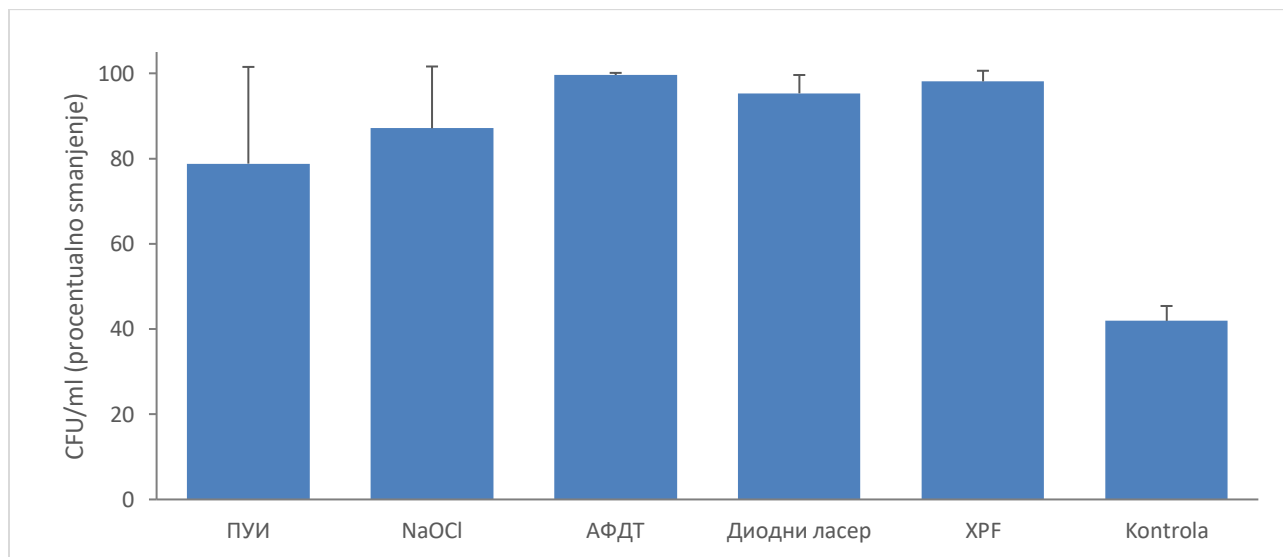
Статистичка значајност између примењених третмана приказана је у Табели 20:

Табела 20. Статистичка значајност процентуалних разлика после примењеног третмана

Третман	Kontrola	ПУИ	NaOCl	АФДТ	Диодни ласер
ПУИ	<0,001				
NaOCl	<0,001	0,528			
АФДТ	<0,001	0,001	0,119		
Диодни ласер	<0,001	0,014	0,540	0,950	
ХРФ	<0,001	0,002	0,222	1,000	0,992

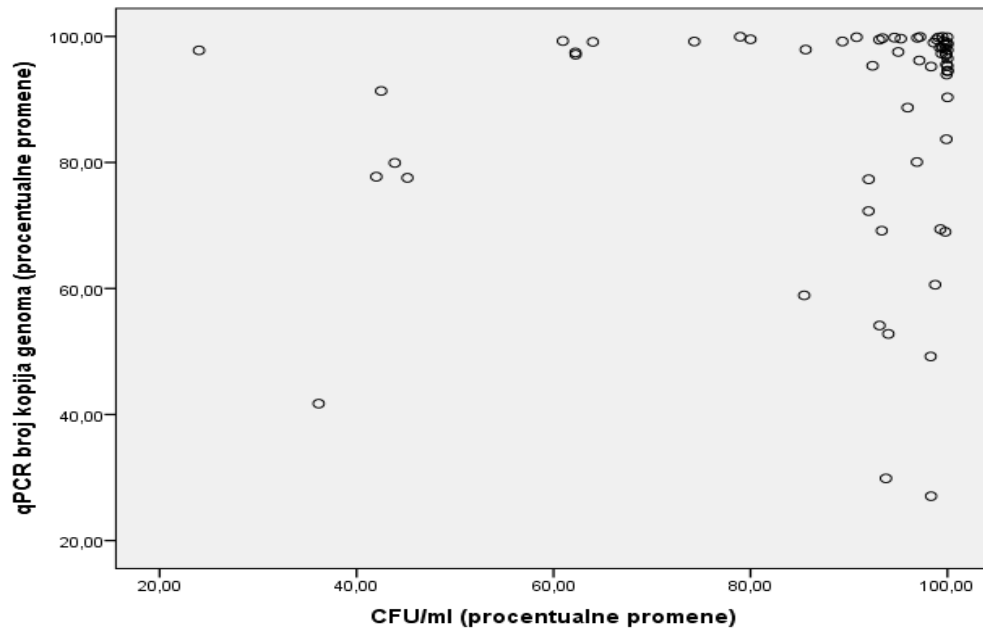
Процентуално смањење вредности **CFU/ml** након примењених третмана приказано је на Графикону 15:

Графикон 15. Процентуално смањење вредности **CFU/ml** након примењених третмана



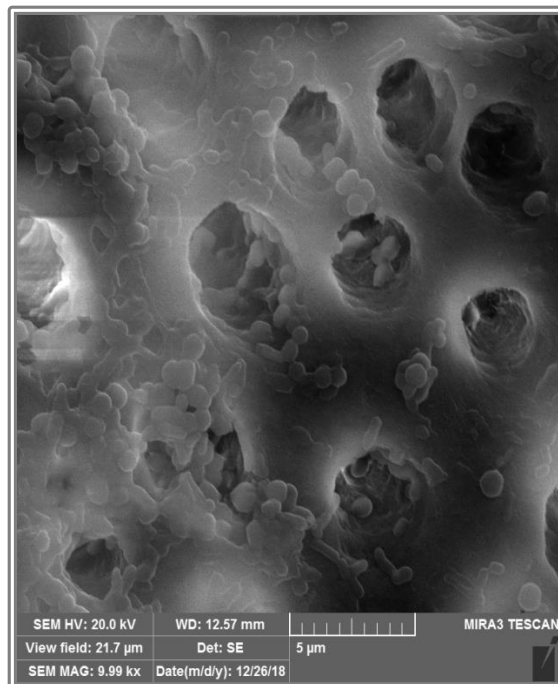
Анализом промена процентуалних вредности qPCR копија генома и CFU/ml, налазимо да не постоји слагање вредности процентуалних промена qPCR броја копија генома и процентуалних промена CFU/ml( $r_s=0,054$ ). (Графикон 16)

Графикон 16. Слагање вредности процентуалних промена qPCR броја копија генома и процентуалних промена CFU/ml



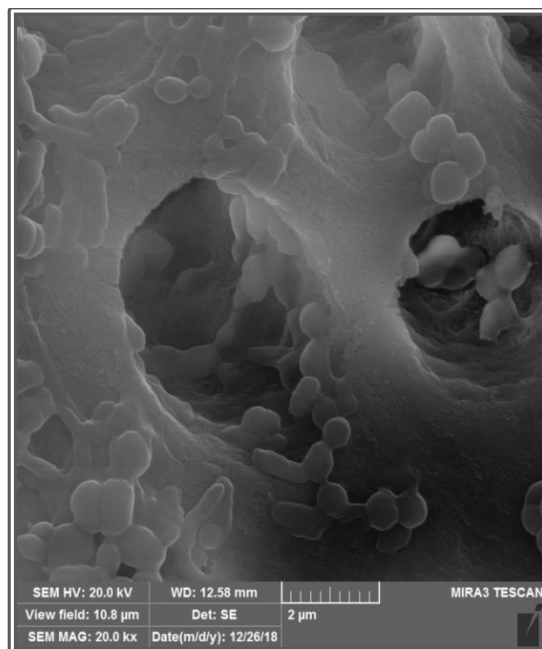
## 6.4. SEM

На слици 15, при увеличању 10.000 пута, приказан је изглед дентинске површине канала корена зуба након индуковане инфекције канала бактеријом *E. faecalis*. Евидентно је присуство великог броја бактеријских ћелија лоптастог облика, у међусобно блиском контакту на целој дентинској површини. На слици су јасно уочљиви дентински канали са масом микроорганизама који улазе у видљиву дубину њиховог лумена, а местимично га и потпуно испуњавају.



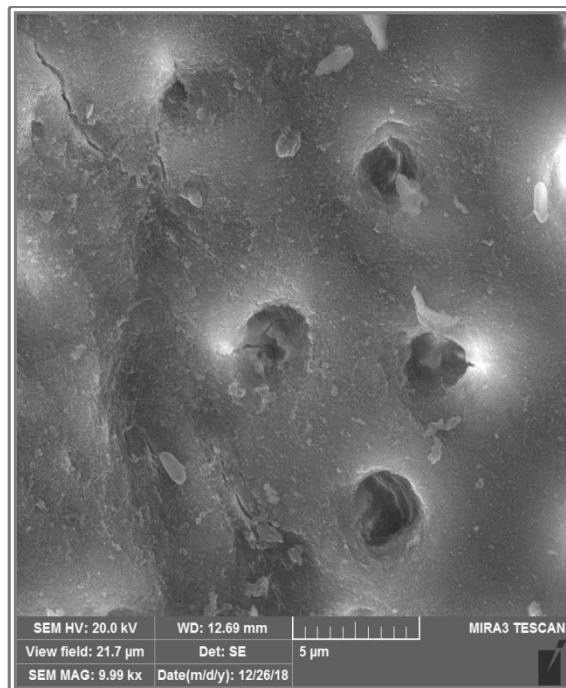
Слика 15

На SEM узорка након индуковане инфекције бактеријом *E. faecalis*, при увеличању 20.000 пута, уочљив је велики број бактеријских ћелија. Бактеријске ћелије су приметне на површини канала корена али се на овом увеличању боље уочава бактеријска пенетрација унутар дентинских каналића. Иако је уочљив један број слободних бактеријских ћелија, највећи број бактерија *E. faecalis* је међусобно повезан у парове или краће бактеријске ланце. (Слика 16)



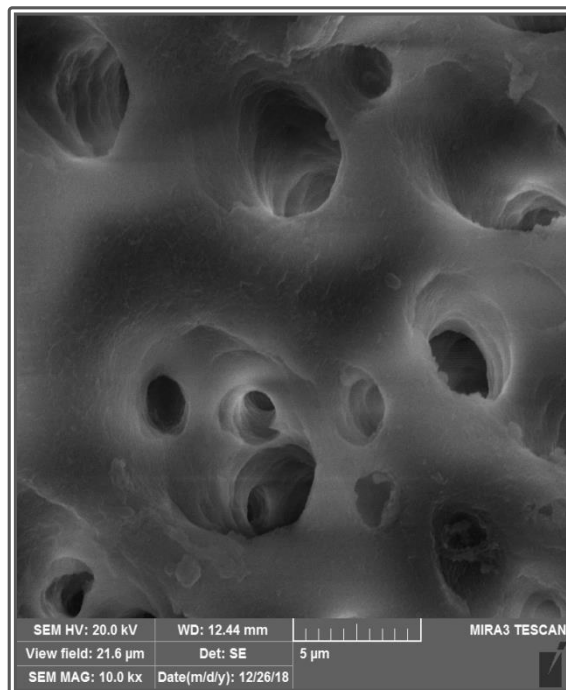
Слика 16

SEM површине канала корена зуба након ПУИ показује мали број бактеријских ћелија. Уочава се местимично еродирана дентинска површина са дентинским фрагментима као и пукотине перитубуларног дентина. (Слика 17)



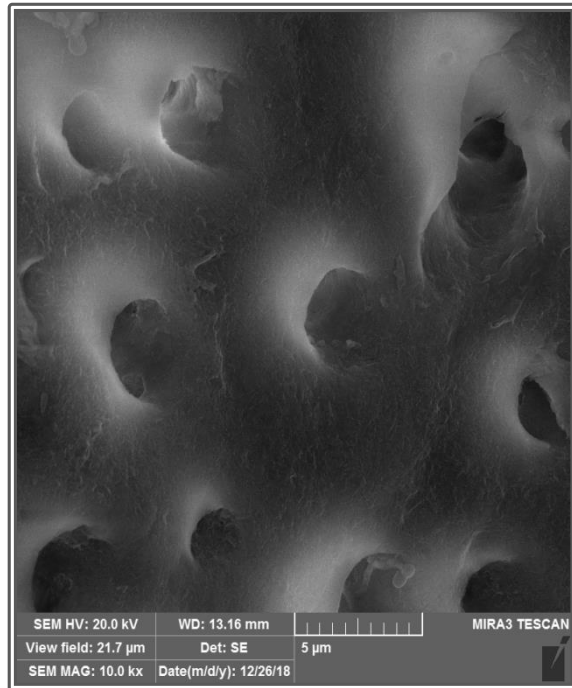
Слика 17

SEM површине канала корена зуба након иригације раствором 0.5% NaOCl показује врло мали број бактеријских ћелија. Заостале бактерије су локализоване пре свега унутар дентинских каналића и лакунама тешко доступним конвенционалном начину иригације. Дентинска површина је глатка и без знакова ерозије са јако мало детритуса на себи. (Слика 18)



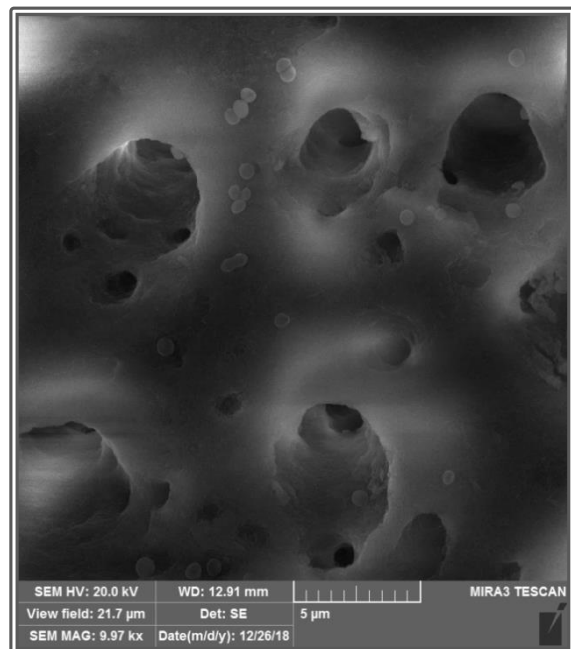
Слика 18

На слици 19 је приказан SEM изглед дентинске површине након третмана АФДТ. Приметно је неколико бактеријских ћелија углавном у појединим широко отвореним дентинским каналићима. Површина дентина је глатка без еродираних површина са веома мало детритуса. (Слика 19)



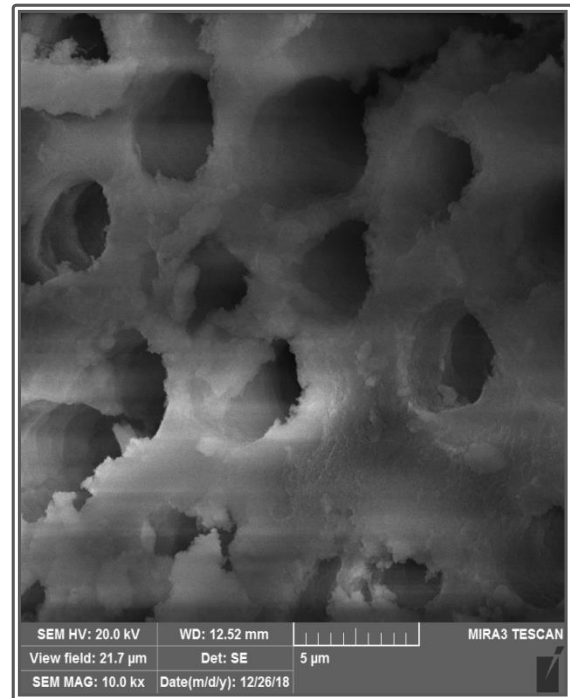
Слика 19

SEM површине дентина након третмана диодним ласером показује присуство бактеријских ћелија. Присуство бактеријских ћелија је евидентно на површини дентина и нешто мање унутар дентинских канала. Површина дентина је глатка без еродираних делова. Детритус је присутан у траговима. (Слика 20)



Слика 20

На слици 21 је приказана дентинска површина након третмана ХРФ. Присутан је мали број заосталих бактеријских ћелија. Уочава се изражена ерозија дентинске површине са делимично или потпуно уништеном морфологијом почетног дела дентинских тубула . Приметна је велика количина детритуса. (Слика 21)



Слика 21

## 7. ДИСКУСИЈА

Ова студија је спроведена да би се испитала ефикасност различитих антимикуробних процедура у елиминацији бактерије *E. faecalis* као једног од најчешће изолованих патогена из простора канала корена зуба. Због своје способности да пенетрира у дентинске тубуле и формира биофилм као и отпорности на велике распоне рН вредности<sup>130</sup>, ова бактерија је позната по израженој отпорности на дејство уобичајних антимикуробних поступака. Изабраним методолошким концептом у својој студији имали смо за циљ да што веродостојније симулирамо услове који су присутни код *in vivo* инфекције канала корена бактеријом *E. faecalis*, са намером да добијемо резултате значајне клинички релевантности.

Највећи значај у обескличењу канала корена даје се хемо-механичкој обради у којој посебно место припада избору ириганаса. Наиме, механичком обрадом канала велики део површине остаје необрађен без обзира на врсту технике препарације што као последицу има заостајање значајне количине инфицираног садржаја. Раствори који се користе за иригацију канала корена у ендодонцији поседују антибактеријске карактеристике и могу значајно да умање број микроорганизама из простора канала корена. Међутим, већина ових раствора показује и неке недостатке као што су: непријатан укус и мирис, цитотоксичност, немогућност уклањања размазног слоја као и умањена антимикуробна ефикасност у присуству органског ткива, ексудата и бактеријских плакова<sup>131</sup>. Овакве карактеристике ириганаса довеле су до развоја нових протокола дезинфекције који за циљ имају повећање ефикасности конвенционалне иригације. У својој студији смо желели да покажемо да АФДТ, ПУИ, употреба диодног ласера и ХРФ повећава ефикасност конвенционалне процедуре иригације раствором NaOCl у елиминацији *E. faecalis* из канала корена.

Постоји преко 700 различитих микроорганизама изолованих из простора канала корена<sup>17</sup>. Многи од њих су још неидентификовани и неименовани.

*E. faecalis* је микроорганизам који је део нормалне флоре људског организма, пре свега гастроинтестиналног тракта али и других делова тела рачунајући и усну дупљу. У ендодонтским инфекцијама *E. faecalis* је доказан у примарним инфекцијама са учесталашћу од 4% до 40%. Међутим најчешће је изолован код асимптоматских и перзистентних ендодонтских инфекција, у којима његова учесталост варира између 24% и 70% и као такав игра доминанту улогу у настанку перирадикуларних лезија након ендодонтског третмана зуба<sup>132</sup>. Овакви налази се објашњавају бројним факторима преживљавања и вируленције које *E. faecalis* поседује, пре свега његову способност да се такмичи са другим микроорганизмима, дубоко продре у дентинске канале и преживи у условима нутритивног дефицита<sup>133</sup>. Због поменутих особина *E. faecalis* које доводе до изразите отпорности на уобичајни антимикуробни ендодонтски протокол, одабрали смо ову бактерију као сигурног показатеља степена антимикуробне активности испитиваних процедура.

Потреба да се у потпуности елиминишу микроорганизми у току ендодонтске терапије зуба са инфичираним каналом корена довела је до развоја великог броја допунских терапијских процедура(техника) које повећавају ефикасност конвенционалне иригације. У студији смо тестирали и међусобно упоредили ефикасност четири допунске антимикуробне процедуре. Одабрали смо их јер се последњих година све чешће користе у циљу повећања антимикуробне ефикасности конвенционалне иригације. С друге стране, иако подаци у литератури указују на њихову ефикасност, међусобне разлике у степену антимикуробног дејства нису довољно прецизно показане.

Дубина продирања ириганса унутар дентинских канала је један од доминантних фактора који детерминише ефикасност елиминације микоорганизама из простора канала корена зуба у току ендодонтске терапије. ПУИ има за циљ повећање ефикасности ириганса тако што повећава дубину његовог продирања унутар



дентинских канала<sup>80</sup>. *Gu Y. И сар* у својој студији испитујући дубину продирања ириганса у дентинске тубуле, бојењем раствора NaOCl флуорохроматским бојама и посматрањем конфокалним ласер микроскопом, закључују да ПУИ значајно повећава дубину продирања ириганса након његове агитације ултразвуком. Резултати ове студије међутим показују да не постоји статистички значајана разлика у дубини продирања ириганса након ПУИ и мануелне динамичке агитације ириганса ручним ендодонтским инструментом<sup>134</sup>.

У експерименту смо тестирали ефикасност АФДТ која се захваљујући свом селективном антимикуробном потенцијалу, све чешће наводи као техника која при ниским концентрацијама фотоактивних супстанци и њиховој активацији ласером мале снаге показује изузетан антимикуробни потенцијал без проузроковања оштећења здравих људских ћелија.

Предност АФДТ у поређењу са традиционалним антимикуробним процедурама јесте да интеракција високо реактивног кисеоника са органским молекулима није специфична, сваки макромолекул унутар бактеријске ћелије може постати потенцијални циљ, чиме се отежава развој механизма микробиолошке резистентности. Тако се поступак може поновити неколико пута без кумулативног ефекта<sup>135</sup>. АФДТ поседује особине за које се наводи да ову процедуру чине одличним алатом за редукцију микроорганизама у каналу корена зуба: безбедна је за људска ткива, способна је да елиминише бактерије које су интегрисане у бактеријске биофилмове, лако се користи, безболна је и значајно јефтинија у односу на терапију ласерима високог интензитета<sup>136</sup>.

Иако је употреба диодног ласера у ендодонцији позната деценијама, и даље су присутна неслагања око основних параметара при његовом коришћењу у поступку обескличавања канала корена зуба (снага, таласна дужина, време излагања) као и ефекта који ови параметри имају на ефикасност антимикуробног дејства. Ефекат који би свакако требало узети у обзир при избору параметара код употребе диодног ласера у ендодонтском поступку јесте штетно термичко дејство код диодних ласера веће снаге у продуженом временском интервалу.

Ови подаци као и чињеница да се ласер мале снаге користи и током АФДТ навела су нас да тестирамо управо антимикуробну ефикасност диодног ласера мале снаге у поступку елиминације бактерије *E. faecalis*. Тиме се постиже и већа поузданост у поређењу резултата између ове две процедуре.

Чињеница да велики део површине зидова канала остане нетретираним механичком препаратацијом канала без обзира на дизајн и коничност инструмената, због чега велики део микроорганизама унутар канала остане неизложен директном дејству иригације без обзира на врсту и концентрацију коју употребимо, довела је до развоја инструмената и система, какав је и XPF, који својим механичким дејством поспешују иригациону антимикуробну активност. Неки од ових система су интензивно тестирани. Тако је Balić са сар. испитивао и упоредио антимикуробну ефикасност EndoActivator система и система PIPS (Photon-induced photoacoustic streaming)<sup>137</sup>. Подаци о ефикасности XPF инструмента у елиминацији *E. faecalis*, као и поређења са АФДТ оскудни су. То је и разлог увођења ове експерименталне групе.

Висок проценат неуспешности ендодонтских третмана проузрокован заосталим микроорганизама у каналу корена зуба доводи до развоја све већег броја система и поступака који за циљ имају што ефикаснију елиминацију бактерија.

Вредно је помена да је убрзан развој нанотехнологије довео до примене наночестица у свим биомедицинским наукама па тако и у антимикуробним поступцима у стоматологији. Последњих пар година се у стручној литератури све чешће срећемо са термином “наностоматологија”. Употреба наночестица у поступку обескличавања канала корена зуба је стара неколико година. Shrestha са сар. је тестирао антимикуробну активност наночестица chitosan (CS-np) и zinc oxid (ZnO-np) на бактерију *E. faecalis* и показао да наночестице chitosan (CS-np) и zinc oxid (ZnO-np) показују изражену антибактеријску ефикасност као и способност нарушавања структуре вишеслојних биофилмова. Антибактеријско својство ових наночестица задржано је и након 90 дана<sup>138</sup>.

Ово отвара могућности нових истраживања у смислу поређења антимикробне ефикасности, али и евентуалних споредних дејстава ових процедура.

Број бактеријских колонија по милилитру (CFU) смо употребили као поуздану методу за одређивање броја бактеријских ћелија пре и након антимикробних поступака, имајући у виду једноставност и прецизност ове методе. Велики број аутора у својим студијама, испитујући антимикробну ефикасност одређених процедура и техника, је користио CFU, као методу у поступку израчунавања броја бактерија пре и након примењеног антимикробног третмана.<sup>139,140</sup>

Конвенционалне технике култивације и квантификације микроорганизама поред свих својих предности имају и одређен број недостатака као што су: потреба за очувањем виталности бактерија, отежана идентификација микроорганизама који се појављују у малом броју, услови транспорта и одржавања микобиолошког материјала, обучено особље, дугачак временски интервал између узорковања и резултата. Не треба заборавити и могућност погрешне интерпретације налаза код бактеријских сојева који граде колоније врло сличног изгледа. Имајући у виду наведено, као допунску процедуру квантификације али и идентификације односно потврде инфекције микроорганизмом *E. faecalis* у студији коју смо спровели употребили смо RT-PCR. Предности RT-PCR јесу: једноставна квантификација, висока сензитивност технике, тачност, доступност резултата у кратком временском интервалу, репродуктивност, контролисан квалитет, минимална могућност контаминације. У великом броју студија у којима је испитивана ефикасност одређених антимикробних поступака у ендодонцији за идентификацију и квантификацију бактерија примењен је RT-PCR<sup>141,142</sup>.

Из сваке експерименталне групе, случајним узорковањем, након примењеног терапијског протокола смо изабрали по један узорак и подвргли га СЕМ у циљу визуелизације изгледа површине дентина након третмана.

СЕМ анализом смо желели да прикажемо изглед површине дентина након третмана али и визуелизујемо бактерије *E. faecalis* и одредимо њихову локализацију пре и након антимикуробних поступака.

На фотографијама направљеним СЕМ је евидентиран и преостали, новонастали размазни слој у току примењеног третмана, што се може сматрати јако битним параметром успеха терапије имајући у виду да је у поступку припреме узорака размазни слој у потпуности елиминисан.

Анализом добијених резултата уочена је статистички значајна разлика у броју бактерија у узорцима иницијално након фазе контаминације између експерименталних група. Стандардизацијом концентрације суспензије бактерија у хранљивој подлози на  $1.5 \times 10^8$  CFU/mL, густине 0.5 McFarland-а и инокулацијом узорака запремином од 20  $\mu$ l суспензије, у узорке је иницијално убациван једнак број бактерија. Иако су услови култивације и реинокулације били подједнаки за све групе и узорке, разлика у иницијалном броју бактерија могла би делимично бити изазвана старошћу културе коју смо користили у експерименту имајући у виду да је бактеријска култура активирана на почетку експеримента. Експерименталне групе су, због комплексности методологије (инокулација, узорковање, третман, анализа), контаминирани и третиране у више временских сегмената. На овај начин је активирана колонија бактерија *E. faecalis* вероватно умањила степен потентности. *Batinić* и сар. су у својој студији спроведеној на 68 зуба, након истовремене контаминације и култивације свих узорака, методом случајног одабира поделили узорке на четири експерименталне (n 15) и једну контролну (n 8) групу<sup>143</sup>. Оваква истовремена контаминација и култивација микроорганизама би могла да допринесе приближно једнаком броју микроорганизама у узорцима иницијално. Време између две реинокулације као и укупно време инкубације би такође могли да буду фактори који детерминишу број бактерија у узорцима иницијално. У истој студији аутори су време инкубације продужили на 17 дана а реинокулација је вршена сваког трећег дана.

*Dumani* са сар.у свом истраживању *E. faecalis* инкубира чак 21 дан<sup>144</sup>. Иако се број микроорганизама у узорцима иницијално након контаминације и инкубације разликује, степен умањења CFU, броја бактерија и копија генома након примењеног третмана је приказан процентуално. Овиме је на референтан начин приказана ефикасности примењеног поступка.

Резултати нашег истраживања показују да долази до статистички значајног умањења броја бактерија *E. faecalis* након примењених третмана у свим експерименталним групама у односу на контролну групу код оба методолошка поступка оцене антимикуробне ефикасности. Податак да допунски антимикуробни поступци повећавају ефикасност елиминације бактерија из канала корена очекиван је и показан у више других студија<sup>78,101,106</sup>. Међутим подаци о ефикасности појединачних поступака у елиминацији микроорганизама добијени методом RT-PCR и CFU/ml нису у међусобној сагласности. Утврђивањем броја бактеријских генома показано је да су најефикасније технике иригације са NaOCl самостално и ПУИ, док анализа налаза CFU/ml показује да је најефикаснија АФДТ. Ово би могло бити резултат чињенице да је NaOCl органолитичко средство које ефикасно врши и лизу наследног материјала<sup>145</sup>, а познато је да се техником RT-PCR одређује укупан број одабраних сегмената ДНК или РНК. RT-PCR дакле даје податак о укупном броју заосталих елемената наследног материјала док се одређивањем CFU/ml оцењује количина живих бактерија које могу да формирају колоније. Статистичка анализа потврђује да између ова два начина процене нема корелације. Ово указује да налазе студија о антимикуробној ефикасности треба тумачити узимајући у обзир и методу процене.

Испитујући антибактеријску ефикасност ПУИ раствором 0,5% NaOCl на бактерију *E. faecalis*, у својој студији смо доказали да употреба ове терапијске процедуре доводи до статистички значајног смањења броја бактерија у узорцима.

Наши резултати су у корелацији са резултатима *Guerreiro-Tanomaru* и сар.<sup>146</sup> који испитујући ефикасност пасивне ултразвучне иригације, користећи у поступку

утврђивања преосталих бактерија CFU/ml, такође доказују да ова процедура значајно умањује број бактерија *E. faecalis*.

Корелацију са поменутом студијом проналасимо и у чињеници да наши резултати не указују на статистички значајну разлику у вредности и варијабилитету процентуалних промена **qPCR** броја копија између конвенционалне иригације раствором NaOCl и ПУИ.

Међутим, анализирајући вредности и варијабилитет процентуалних промена **CFU/ml** после третмана пронашли смо да постоји статистички значајана разлика између примене конвенционалне иригације раствором 0,5% NaOCl и ПУИ. Овакав резултат би могао да буде последица методолошког концепта који смо применили, а који подразумева једнократно убацивање раствора NaOCl у канал и његову агитацију ултразвуком без континуираног додавања свежег раствора. На овај начин долази до заостајања једног броја угинулих бактерија и њиховог генетског материјала. Овај налаз указује на потребу да се испита и утицај континуиране иригације уз ПУИ што би потенцијално могло остварити већи антимикроби ефекат од поступка који смо користили у овом истраживању.

Насупрот нашим резултатима, постоје радови који показују да је ПУИ ефикаснија од конвенционалне иригације раствором NaOCl. *Weber* са сар. доказује већу ефикасност пасивне ултразвучне иригације у односу на конвенционалну иригацију. Разлике у односу на нашу студију могле би бити последица тестирања ефикасности на микроорганизму *Streptococcus sanguinis* који је осетљивији на терапијску процедуру али и краћем времену инкубације у поменутој студији<sup>89</sup>. Резултати студије *Tardivo* и сар. међутим, доказују да не постоји статистички значајана разлика у ефикасности између конвенционалне иригације раствором NaOCl и ПУИ уколико се користи раствор NaOCl концентрације 5.25%<sup>147</sup>. Узимајући ово у обзир, а имајући у виду и налазе наше студије, може се закључити да је у протоколу уз примену ПУИ потребно користити растворе NaOCl виших концентрација.

Употребом раствора NaOCl ниске концентарције у нашем истраживању желели смо да што боље симулирамо његову употребу у свакодневној клиничкој пракси.

Вредности **CFU/ml** које смо добили након примењених третмана указују да је АФДТ најефикаснија у елиминацији бактерије *E. faecalis* и и доводи до смањења броја бактеријских колонија за 99,6%. Треба нагласити да постоји статистички значајна разлика у ефикасности АФДТ у односу на конвенционалну иригацију раствором 0,5% NaOCl(87,1%) као и у односу на ПУИ(78,8%).

Овакви резултати су у корелацији са резултатима студије I. Vago и сар.<sup>148</sup> који у свом истраживању проналазе да је АФДТ ефикаснија у елиминацији бактерије *E. faecalis* у односу на иригацију раствором NaOCl. Fonescasa и сар.<sup>149</sup> као и Bergmans и сар.<sup>150</sup> такође у својим студијама проналазе пад броја бактерија након АФДТ за 99,9%.

Занимљив податак даје и анализа броја узорка у којима након третмана нису идентификоване бактерије. Једино примена АФДТ, ДЛ и XPF у нашем истраживању довеле су до овог резултата и то код два узорка у групи у којој је примењена АФДТ, једног узорка у групи где је примењен диодни ласер и четири узорка у групи са XPF након узорковања за микробиолошку анализу(CFU/ml). Овакав резултат у нашој студији је у корелацији са резултатом *Aguinaldo* и сар. који у својој *in vivo* студији испитујући ефикасност АФДТ на полимикробну флору канала корена зуба код 11 узорка након АФДТ добијају стерилан налаз.<sup>151</sup> Позитиван PCR налаз у наведеним узорцима говори да су у њима присутне мртве бактерије или оне које су значајно оштећеног потенцијала за колонизацију.

Насупрот нашим резултатима неки аутори у својим студијама проналазе да АФДТ није ефикаснија у односу на конвенционалну иригацију. *Gergova* са сар. упоређујући антибактеријску ефикасност АФДТ и конвенционалне иригације проналази да су 2,5% раствор NaOCl и СНХ ефикаснији у односу на АФДТ. Овакав резултат би могао да се препише употреби раствора NaOCl више концентрације од оне употребљене у нашој студији као и употреби друге фотосензитивне супстанце(Fotosan).

Разлика у методолошком концепту у овој студији који не предвиђа време преирадиације, које је доказано битан фактор ефикасности АФДТ, такође може бити разлог оваквог резултата<sup>152</sup>.

Ефикасност АФДТ зависи од врсте фотосензитивне супстанце која је употребљена у току третмана. У нашој студији користили смо Фенотијазин хлорид  $10 \text{ mg mL}^{-1}$  (Helbo Endo Blue, Grieskirchen, Austria) који је по својој структури јако сличан Метиленско плавом (МВ) или Толуидин плавом (ТВ).

*Nasim C.* са сар. у свом ревијалном раду у вези ефикасности АФДТ закључује да је у студијама у којима је у току АФДТ употребљена фотосензитивна супстанца на бази МВ или ТВ, постигнут знатно бољи антибактеријски ефекат у односу на студије где је употребљен Индокаин зелена (ICG) као фотосензитивна супстанца.<sup>153</sup>

Употреба диодног ласера у нашој студији довела је до статистички значајног умањења CFU/ml након примењеног третмана (99,6%). Овакви подаци су у корелацији са резултатима студије коју су спровели *Beer* и сар. у којој су након примене диодног ласера таласне дужине 810nm постигли елиминацију 99,8% бактерије *E. faecalis*<sup>100</sup>. Занимљиво је поменути да је у нашој студији антимикробни ефекат мерен процентним разликама **qPCR** броја копија генома после третмана овим поступком је значајно слабији у односу на остале примењене терапијске процедуре. Поређење налаза два поступка која смо применили за испитивање антибактеријске ефикасности, указује да ласер иако не изазива уништавање бактеријског наследног материјала у степену као остале антимикробне методе, доводи до смрти бактеријских ћелија што се манифестује значајним смањењем броја бактеријских колонија након третмана. Повећање снаге и времена ирадијације би можда довело до мањег броја копија генома бактерија, али би ово имало појачан штетни термички ефекат на периапексна ткива<sup>154</sup>.

Добијени налаз методом **qPCR** након употребе диодног ласера у нашој студији може се преписати и методолошком концепту који је подразумевао употребу ласера у каналима претходно напуњеним физиолошким раствором.



*Romeo* са сар. испитујући ефикасност диодног ласера таласне дужине 980nm у елиминацији бактерије *E. faecalis* проналази већу редукцију броја бактерија након истовремене употребе диодног ласера и раствора NaOCl у односу на усамљену примену ласера <sup>155</sup>.

Резултати наше студије указују да употреба XPF доводи до статистички значајног умањења броја бактерија *E. faecalis* након примењеног третмана. Анализом вредности процентуалних промена **CFU/ml** после третмана у нашој студији након примене XPF регистровали смо умањење броја бактерија за 99,3%, што овај поступак поставља на друго место по ефикасности одмах иза АФДТ чија је ефикасност 99,8%.

У доступној литератури постоји јако мали број података о антибактеријској ефикасности инструмената посебног дизајна, какав је и XPF, који за циљ имају повећање ефикасности иригације. Према до сада доступној литератури, ово је прво истраживање које пореди антибактеријски ефекат на *E. faecalis* инструмента XPF и ласерске односно АФДТ. Утврдили смо да XPF има изузетан ефекат на елиминацију *E. faecalis* који је готово идентичан оном који показује АФДТ. Резултати наше студије додатно добијају на значају када се у обзир узме једноставност употребе и приступачност XPF. Оваква тврдња је у корелацији са резултатима које су добили *Sasanakul* и сар. који на основу свог истраживања закључују да употреба XPF као допунске процедуре доводи до повећања ефикасности конвенционалне иригације раствором NaOCl<sup>156</sup>. Поменути аутори међутим, напомињу да употреба XPF, иако неинвазивна доводи до стварања турбулентног струјања ириганса унутар канала што може довести до екструзије ириганса у предео периапекса. Дизајн наше студије је подразумевао затварање апекса зуба материјалом на бази GJC(Fuji IX, GC, Токуо, Јапан) те током експерименталног поступка није могла бити забележена екструзија ириганса кроз апексни отвор. Посебно дизајнирана истраживања у циљу испитивања овог феномена имала би клинички значај.

Насупрот нашим резултатима *Marwa* са сар. испитујући ефикасност XPF у елиминацији бактерије *E. faecalis* не проналази статистички значајно већу антимикробну ефикасност уколико се XPF користи након употребе посебног инструмента XP-endo Shaper (XPS, FKG Dentaire, La Chaux-de-Fonds, Switzerland) у односу на експерименталну групу у којој је примењен само XPS<sup>157</sup>.

Овакав резултат студије би могао да буде последица дизајна и начина употребе(велики број обртаја) инструмента XPS који се користи за механичку инструментацију а захвљујући коме и сам елиминише велики број бактерија из канала корена. Такође, као разлог разлике у резултатима наше и студије ових аутора може се узети техника детекције преосталих микроорганизама која је у поменутој студији подразумевала конфокалну ласер скенинг микроскопију (CLSM) којом је мерен број преосталих микроорганизама на дубини од 50µm. Методолошки концепт наше студије је подразумевао детекцију броја преосталих микроорганизама у лумену главног канала корена зуба.

Анализа налаза СЕМ показује слагање са налазима две претходно примењене методе за оцену ефикасности антимикробних поступака. Добијена микроскопска слика *E. faecalis* одговара изгледу ове ћелије који је описан у литератури<sup>158</sup>. Ово указује да је одабрана адекватна методологија припреме узорака за СЕМ. Тако се код микрографије површине након деловања АФДТ, за коју је утврђено да показује највећи антимикробни ефекат, види површина дентина са тек неколико бактеријских ћелија. При томе она има очувану морфологију, што додатно сврстава ову технику у веома прихватљиве. СЕМ површине дентина након дејства диодног ласера показује значајан број солитарних бактерија, што је у сагласности са налазом **qPCR** који показује већи број копија генома након ове процедуре у односу на друге. Мали број развијених бактеријских колонија, што је показано култивисањем и израчунавањем **CFU/ml**, указује да су визуелизоване бактеријске ћелије нађене након третмана мртве. Значајно је указати и на микрографију након примене XPF, која указује на изразито еродирану површину дентина након дејства овог инструмента.

Ово показује да ова техника, иако врло ефикасна у подизању антимикуробне ефикасности иригације, има агресивно механичко дејство на површину дентина.

Иако резултати наше студије недвосмислено указују да примењене ендодонтске процедуре доводе до статистички значајног умањења броја микроорганизама након примењених третмана, мали број стерилних узорака унутар експерименталних група доказује да је канал корена зуба у коме нема бактерија након ендодонтског третмана и даље циљ који је веома тешко остварити.

Развој поступака за потпуну елиминацију микроорганизама из инфицираног канала корена и даље остаје значајан правац ендодонтских истраживања. Испитивање ефикасности нових система, материјала и поступака, њихова међусобна поређења, као и анализа њиховог дејства на различите групе микроорганизме ће помоћи разумевању ендодонтских инфекција, које су по својој природи полимикробне. Испитивање споредних али и штетних дејстава нових антимикуробних поступака ће уз анализу њихове ефикасности допринети успешнијој и предвидљивијој терапији инфицираних канала корена. Неопходно је да се ова врста истраживања усмери у правцу јасно утемељених контролисаних клиничких студија. Ова студија је отворила методолошко питање разлика између налаза који се добијају различитим поступцима за евалуацију антимикуробне ефикасности. Будући правци истраживања свакако треба да укључе испитивање корелација између налаза већег броја поступака за евалуацију антимикуробног дејства (нпр. конфокалне микроскопије, испитивања експресије бактеријских протеина). Ово ће имати значај за сврсисходније поређење налаза различитих студија и ефикаснију промоцију на доказима засноване терапије инфицираног канала корена. Своју студију смо спровели са намером да њени резултати допринесу напорима за развој ефикасних антимикуробних техника које ће ендодонтски третман учинити успешним и предвидљивим.

## 8. ЗАКЉУЧЦИ

1. Све испитиване антимикуробне процедуре показују статистички значајну антимикуробну ефикасност на бактеријску врсту *E. faecalis*.
2. Најизразитије смањење броја бактеријских колонија утврђено је након дејства АФДТ и ХРФ.
3. Најизразитије смањење броја копија бактеријских генома утврђено је након употребе техника са NaOCl (иригација NaOCl, ПУИ, и ХРФ).
4. Нема корелације између налаза броја бактеријских колонија и броја копија бактеријских генома.
5. Након индуквања инфекције канала корена у свим групама је утврђено формирање биофилма бактерије *E. faecalis* на површини лумена канала корена.
6. Након спровођења антимикуробних поступака није утврђено постојање биофилма ни у једној испитиваној групи на површини лумена канала корена.
7. Након примене ХРФ утврђено је присуство изразито еродираних површине дентина, док примена других протокола није довела до значајних промена на дентинској површини.
8. Присуство бактеријских ћелија унутар видљивих делова дентинских тубула није уочено само у групи након примене ХРФ. Иако у малом броју, у осталим групама су идентификоване бактерије унутар дентинских тубула.

## 9. ЛИТЕРАТУРА

---

- <sup>1</sup> Z. Anđelković, LJ. Somer, M. Perović, V. Avramović, LJ. Milenkova, N. Kostovska, A. Petrović: „Histološka građa organa“ TextBook "Bonafides" Niš. 2001.
- <sup>2</sup> Bergenholtz G. Pathogenic mechanisms in pulpal disease. J Endod 1990: 16: 98–101.
- <sup>3</sup> Haapasalo M., Endal U., Zandi H., & Coil, J. M. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. Endodontic Topics.2005: 10(1): 77–102.
- <sup>4</sup> Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. Int Endod J 1997: 30: 297–306.
- <sup>5</sup> Peters LB, Wesselink PR. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. Int Endod J 2002: 35: 660–667.
- <sup>6</sup> Chugal NM, Clive JM, Spangberg LS. A prognostic model for assessment of the outcome of endodontic treatment: effect of biologic and diagnostic variables. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 2001: 91: 342–352.
- <sup>7</sup> Miller WD. The Micro-organisms of the Human Mouth. Basel: S Karger, 1973: 96-9, 285-95.
- <sup>8</sup> Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. Odontol Revy. 1974:25(4):347-58.

---

<sup>9</sup>Gutmann JL, Manjarrés V. Historical and Contemporary Perspectives on the Microbiological Aspects of Endodontics. *Dent J (Basel)*. 2018; Sep 22;6(4).

<sup>10</sup> Scheie AA, Petersen FC: The biofilm concept: Consequences for future prophylaxis of oral diseases? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15(1): 4-12

<sup>11</sup> Jhajharia K, Parolia A, Shetty KV, Mehta LK. Biofilm in endodontics: A review. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015; Jan-Feb;5(1):1-12

<sup>12</sup> Lomçali G, Sen BH, Cankaya H. Scanning electron microscopic observations of apical root surfaces of teeth with apical periodontitis. *Endod Dent Traumatol*. 1996 Apr;12(2):70-6.

<sup>13</sup> Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. B. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Feb;99(2):231-52.

<sup>14</sup> Shovelton DH. The presence and distribution of microorganisms within non-vital teeth. *Br Dent J* 1964; 117: 101–107.

<sup>15</sup> Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, Van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001; 27: 76–81.

<sup>16</sup> Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982; 90: 200–206.

<sup>17</sup> Wade W. Unculturable bacteria in oral biofilms. Cardiff: BioLine, 1999; 313-22

---

<sup>18</sup> PD Marsh, MV Martin, MAO Lewis, D Williams. Oral Microbiology, 5th edn. Oxford: Wright,2009;74-98, 128-32.

<sup>19</sup> Siqueira, J. F., Rôças, I. N., Paiva, S. S. M., Magalhães, K. M., & Guimarães-Pinto, T. (2007). Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. Oral Microbiology and Immunology, 22(4), 266–271.

<sup>20</sup> Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. J Endod 1992: 18: 427–430

<sup>21</sup> Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R, Garcia GD, Silva BKC, Hamdan JS, Nicoli JR, Carvalho MAR, de M. Farias L. Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their drug susceptibility in vitro. Oral Microbiol Immunol 2001: 16: 100–105.

<sup>22</sup> Craig Baumgartner, J., & Falkler, W. A. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. Journal of Endodontics, 1999: 17(8), 380–383.

<sup>23</sup> Bouillaguet S, Manoil D, Girard M, Louis J, Gaïa N, Leo S, Schrenzel J, Lazarevic V. Root Microbiota in Primary and Secondary Apical Periodontitis. Front Microbiol. 2018 Oct 9;9:2374.

<sup>24</sup> Sedgley C, Buck G, Appelbe O. Prevalence of E. faecalis at multiple oral sites in endodontic patients using culture and PCR. J Endod. 2006 Feb;32(2):104-9.

<sup>25</sup> J.F. Siqueira Jr. and I.N. Rôças Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. J Dent Res. 2009: 88(11):969–981

---

<sup>26</sup> Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol*. 2003 Apr;18(2):100-3.

<sup>27</sup> Rôças IN, Jung IY, Lee CY, Siqueira JF Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. *J Endod*. 2004 Jul;30(7):504-8.

<sup>28</sup> Siqueira, J. F., & Rôças, I. N. Polymerase chain reaction–based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2004; 97(1), 85–94.

<sup>29</sup> Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.

<sup>30</sup> Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22:674-6.

<sup>31</sup> Haapasalo M, Udnæs T, Endal U. Persistent, recurrent and acquired infection of the root canal system posttreatment. *Endodontic Topics* 2003; 6: 29–56.

<sup>32</sup> Fouad AF. Are antibiotics effective for endodontic pain? An evidence-based review. *Endod Topics* 2002; 3:52–66.

<sup>33</sup> Siqueira JF Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002; 94: 281–293.



---

<sup>34</sup> Segura-Egea, J. J., Gould, K., Şen, B. H., Jonasson, P., Cotti, E., Mazzone, A. Dummer, P. M. H. Antibiotics in Endodontics: a review. *International Endodontic Journal*, 2017;50(12), 1169–1184.

<sup>35</sup> Schilder H. Cleaning and shaping the root canal. *Dent Clin North Am.* 1974 Apr;18(2):269-96.

<sup>36</sup> Rollison S, Barnett F, Stevens RH. Efficacy of bacterial removal from instrumented root canals in vitro related to instrumentation technique and size. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2002; 94: 366–371.

<sup>37</sup> Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89: 321–328.

<sup>38</sup> Ørstavik D, Kerekes K, Molven O. Effects of extensive apical reaming and calcium hydroxide dressing on bacterial infection during treatment of apical periodontitis: a pilot study. *Int Endod J* 1991; 24: 1–7.

<sup>39</sup> Pataky L, Ivanyi I, Grigar A, Fazekas A. Antimicrobial efficacy of various root canal preparation techniques: an in vitro comparative study. *J Endod* 2002; 28: 603–605.

<sup>40</sup> Schäfer E, Lohmann D. Efficiency of rotary nickel-titanium FlexMaster instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile – Part 1. Shaping ability in simulated curved canals. *Int Endod J* 2002; 35: 505–513.

---

<sup>41</sup> Schäfer E, Lohmann D. Efficiency of rotary nickeltitanium FlexMaster instruments compared with stainless steel hand K-Flexofile – Part 2. Cleaning effectiveness and instrumentation results in severely curved root canals of extracted teeth. *Int Endod J* 2002; 35: 514–521.

<sup>42</sup> Sonntag D, Delschen S, Stachniss V. Root-canal shaping with manual and rotary Ni–Ti files performed by students. *Int Endod J* 2003; 36: 715–723.

<sup>43</sup> Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998; 24: 763–767.

<sup>44</sup> Waltimo TM, Ørstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32: 421–429.

<sup>45</sup> Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 79–84.

<sup>46</sup> Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *E. faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424–428.

<sup>47</sup> Peciuliene V, Reynaud A, Balciuniene I, Haapasalo M. Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filledteeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 2001; 34: 429–434.

---

<sup>48</sup> Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Hababbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *E. faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37: 438–446

<sup>49</sup> Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54:291-312.

<sup>50</sup> Ari H, Erdemir A, Belli S. Evaluation of the effect of endodontic irrigation solutions on the microhardness and the roughness of root canal dentin. *J Endod* 2004;30:792–5.

<sup>51</sup> Arias-Moliz, M. T., Ferrer-Luque, C. M., Espigares-García, M., & Baca, P. E. *faecalis* Biofilms Eradication by Root Canal Irrigants. *Journal of Endodontics*, 2009: 35(5), 711–714.

<sup>52</sup> Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, et al. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005;31:669–71.

<sup>53</sup> Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15:187–96.

<sup>54</sup> Russell AD, Day MJ. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J Hosp Infect* 1993: 25: 229–238.

<sup>55</sup> Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod* 2001: 27: 206–208.

---

<sup>56</sup> Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *E. faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424–428.

<sup>57</sup> Heling I, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J* 1998; 31: 8–14.

<sup>58</sup> Steinberg D, Heling I, Daniel I, Ginsburg I. Antibacterial synergistic effect of chlorhexidine and hydrogen peroxide against *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus faecalis* and *Staphylococcus aureus*. *J Oral Rehabil* 1999; 26: 151–156.

<sup>59</sup> Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod*. 2002;28:17- 19.

<sup>60</sup> Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 2002; 35: 934–939.

<sup>61</sup> Gutmann JL, Saunders WP, Nguyen L, Guo IY, Saunders EM. Ultrasonic root-end preparation. Part 1. SEM analysis. *Int Endod J* 1994; 27: 318–324.

<sup>62</sup> Liolios E, Economides N, Parissis-Messimeris S, Boutsoukis A. The effectiveness of three irrigating solutions on root canal cleaning after hand and mechanical preparation. *Int Endod J* 1997; 30: 51–57.

<sup>63</sup> Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L<sup>-1</sup> citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J* 2000; 33: 46–52.

---

<sup>64</sup> Scelza MF, Teixeira AM, Scelza P. Decalcifying effect of EDTA-T, 10% citric acid, and 17% EDTA on root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 95: 234–236.

<sup>65</sup> Gottardi W. Iodine and iodine compounds. In: Block SS, ed. *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4<sup>th</sup> edn. Philadelphia, PA: Lea & Febiger, 1991: 152–166.

<sup>66</sup> Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth Methodological studies (thesis). *Odontol Tidskr* 1966; 74: 1–380.

<sup>67</sup> Ng YL, Spratt D, Sriskantharajah S, Gulabivala K. Evaluation of protocols for field decontamination before bacterial sampling of root canals for contemporary microbiology techniques. *J Endod* 2003; 29: 317–320.

<sup>68</sup> Molander, A., Reit, C., & Dahlén, G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide in root canals pretreated with 5% iodine potassium iodide. *Dental Traumatology* 1999; 15(5), 205–209.

<sup>69</sup> Siqueira Jr JF, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *E. faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J* 1997; 30: 279–282.

<sup>70</sup> Möller AJ, Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, Happonen RP. Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. *Eur J Oral Sci* 2004; 112: 207–215.

<sup>71</sup> Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, Kim J, Shabahang S. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod* 2003; 29: 170–175.

---

<sup>72</sup> Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod* 2003; 29: 233–239.

<sup>73</sup> Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003; 29: 334–337.

<sup>74</sup> Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. In vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium. *J Endod* 2003; 29: 450–452.

<sup>75</sup> Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *E. faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod* 2003; 29: 576–579.

<sup>76</sup> Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod*. 2009;35:791–804.

<sup>77</sup> Plotino G, Pameijer CH, Grande NM, Somma F. Ultrasonics in endodontics: a review of the literature. *J Endod*. 2007;33:81–95.

<sup>78</sup> Martin H. Ultrasonic disinfection of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1976;42:92–9.

<sup>79</sup> Abbott PV, Heijkoop PS, Cardaci SC, Hume WR, Heithersay GS. An SEM study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. *Int Endod J*. 1991;24:308–16.

<sup>80</sup> Weller RN, Brady JM, Bernier WE. Efficacy of ultrasonic cleaning. *J Endod*. 1980;6:740–3.

---

<sup>81</sup> Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J.* 2009;42:59–65.

<sup>82</sup> Desai P, Himel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod.* 2009;35:545–9.

<sup>83</sup> Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod.* 2009;35:1408–11.

<sup>84</sup> Gu LS, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35:791–804.

<sup>85</sup> Huque J, Kota K, Yamaga M, Iwaku M, Hoshino E. Bacterial eradication from root dentine by ultrasonic irrigation with sodium hypochlorite. *Int Endod J.* 1998;31:242–50.

<sup>86</sup> Stock CJ. Current status of the use of ultrasound in endodontics. *Int Dent J.* 1991;41:175–82.

<sup>87</sup> Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J.* 2000;33:186–93.

<sup>88</sup> Carver K, Nusstein J, Al Reader, Beck M, Al Reader, Beck M. In vivo antibacterial efficacy of ultrasound after hand and rotatory instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2007;33:1038–43.

<sup>89</sup> Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *Journal of Endodontics.* 2003; 29, 562–4.

---

<sup>90</sup> Grundling GL, Zechin JG, Jardim WM, de Oliveira SD, de Figueiredo JA. Effect of ultrasonics on *Enterococcus faecalis* biofilm in a bovine tooth model. *J Endod* 2011;37:1128-1133.

<sup>91</sup> Stern RH, Sognaes RF. Laser beam effect on dental hard tissues. *J Dent Res* 1964 43:873.

<sup>92</sup> Goldman L, Hornby P, Meyer R et al. Impact of the laser on dental caries. *Nature* 1964 203:417

<sup>93</sup> N. Gutknecht, *Lasertherapie in der Zahnärztlichen Praxis*, Quintessenz, Berlin, Germany, 1999.

<sup>94</sup> Weichman JA Johnson FM. Laser use in endodontics. A preliminary investigation. *Oral Surg* 1971 31: 416-420.

<sup>95</sup> Mohammadi Z. Laser applications in endodontics: an update review. *Int Dent J*. 2009 Feb;59(1):35-46.

<sup>96</sup> Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W et al. Bactericidal effect of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. *Int Endod J* 2006 39: 547-557.

<sup>97</sup> Moshonov J, Orstavik D, Yamauchi S et al. Nd:YAG laser irradiation in root canal disinfection. *Endod Dent Traumatol* 1995 11: 220-224.



---

<sup>98</sup> Klinke T, Klimm W, Gutknecht N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. *J Clin Laser Med Surg* 1997 15: 29-31.

<sup>99</sup> S. Pirnat, M. Lukac, and A. Ihan, "Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria," *Lasers in Medical Science*, 2011:vol. 26, no. 6, pp. 755–761.

<sup>100</sup> Beer, F., Buchmair, A., Wernisch, J., Georgopoulos, A., & Moritz, A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals—an in vitro study. *Lasers in Medical Science*, 2011:27(2), 361–364.

<sup>101</sup> Mehrvarzfar P, Saghiri MA, Asatourian A, et al. Additive effect of a diode laser on the antibacterial activity of 2.5% NaOCl, 2% CHX and MTAD against *Enterococcus faecalis* contaminating root canals: an in vitro study. *J Oral Sci* 2011;53:355–360.

<sup>102</sup> Cretella, G., Lajolo, C., Castagnola, R., Somma, F., Inchingolo, M., & Marigo, L. The Effect of Diode Laser on Planktonic *Enterococcus faecalis* in Infected Root Canals in an Ex Vivo Model. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2017:35(4), 190–194.

<sup>103</sup> Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M. The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001;74:656-69.

<sup>104</sup> Gutknecht N, Moritz A, Conrads G, Sievert T, Lampert F. Bactericidal effect of the Nd:YAG laser in in vitro root canals. *J Clin Laser Med Surg* 1996;14:77–80.

<sup>105</sup> Koba K, Kimura Y, Matsumoto K, Takeuchi T, Ikarugi T, Shimizu T. A histopathological study of the effects of pulsed NdYAG laser irradiation on infected root canals in dogs. *J Endod* 1999;25:151–154.

- 
- <sup>106</sup> Konopka KE, Goslinski T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res* 2007;86:694–707.
- <sup>107</sup> Bouillaguet S, Wataha JC, Zapata O, Campo M, Lange N, Schrenzel J. Production of reactive oxygen species from photosensitizers activated with visible light sources available in dental offices. *Photomed Laser Surg* 2010;28:519– 525.
- <sup>108</sup> Soukos NS, Chen PS, Morris JT, et al. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *J Endod* 2006;32:979– 984.
- <sup>109</sup> Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemother* 1998;42:13–28.
- <sup>110</sup> Fumes, A. C., Romualdo, P. C., Monteiro, R. M., Watanabe, E., Corona, S. A. M., & Borsatto, M. C. Influence of pre-irradiation time employed in antimicrobial photodynamic therapy with diode laser. *Lasers in Medical Science* 2017, 33(1), 67–73.
- <sup>111</sup> Usacheva MN, Teichert MC, Biel MA. Comparison of the methylene blue and toluidine blue photobactericidal efficacy against gram-positive and gram-negative microorganisms. *Lasers Surg Med* 2001;29:165–173.
- <sup>112</sup> Bonsor SJ, Nichol R, Reid TM, Pearson GJ. Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (an *in vivo* study) *Br Dent J.* 2006;200:337–41.
- <sup>113</sup> Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, et al. Endodontic photodynamic therapy *ex vivo*. *J Endod.* 2011;37:217–22.

---

<sup>114</sup> Vaziri S, Kangarlou A, Shahbazi R, Nazari Nasab A, Naseri M. Comparison of the bactericidal efficacy of photodynamic therapy, 2.5% sodium hypochlorite, and 2% chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in root canals; an *in vitro* study. *Dent Res J (Isfahan)* 2012;9:613–8.

<sup>115</sup> Komine C, Tsujimoto Y. A small amount of singlet oxygen generated via excited methylene blue by photodynamic therapy induces the sterilization of *E. faecalis*. *J Endod.* 2013;39:411–4.

<sup>116</sup> Stojicic S, Amorim H, Shen Y, Haapasalo M. *Ex vivo* killing of *E. faecalis* and mixed plaque bacteria in planktonic and biofilm culture by modified photoactivated disinfection. *Int Endod J.* 2013;46:649–59.

<sup>117</sup> Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: Safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009;35:1567–72.

<sup>118</sup> Brito, P. R. R., Souza, L. C., Machado de Oliveira, J. C., Alves, F. R. F., De-Deus, G., Lopes, H. P., & Siqueira, J. F. Comparison of the Effectiveness of Three Irrigation Techniques in Reducing Intracanal *Enterococcus faecalis* Populations: An In Vitro Study. *Journal of Endodontics*, 2009;35(10), 1422–1427.

<sup>119</sup> Desai P, Himel V. Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 2009;35:545–9.

<sup>120</sup> Ruddle C. Endodontic disinfection - tsunami irrigation. *Endod Practice* 2008;11:7–15.

---

<sup>121</sup> Mancini, M., Cerroni, L., Iorio, L., Dall'Asta, L., & Cianconi, L. FESEM evaluation of smear layer removal using different irrigant activation methods (EndoActivator, EndoVac, PUI and LAI). An in vitro study. *Clinical Oral Investigations*. 2017;22(2), 993–999.

<sup>122</sup> Rödiger T, Zimmermann F, Konietschke F, Sydow HG, Wiegand A. Comparison of the antibacterial efficacy of sonic- and two ultrasonic-activated irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations. *Quintessence Int*. 2018;49(9):689-697.

<sup>123</sup> Zhu, X., Yin, X., Chang, J. W. W., Wang, Y., Cheung, G. S. P., & Zhang, C. Comparison of the Antibacterial Effect and Smear Layer Removal Using Photon-Initiated Photoacoustic Streaming Aided Irrigation Versus a Conventional Irrigation in Single-Rooted Canals: An In Vitro Study. *Photomedicine and Laser Surgery*, 2013: 31(8), 371–377.

<sup>124</sup> Jaramillo DE, Aprecio R, Angelov N, Divito E, McClammy TV. Efficacy of photon induced photoacoustic streaming (PIPS) on the root canals infected with *Enterococcus faecalis*: a pilot study. *Endod Pract*. 2012;7:28–32.

<sup>125</sup> Gutmann JL, Gao Y. Alteration in the inherent metallic and surface properties of nickel-titanium root canal instruments to enhance performance, durability and safety: a focused review. *Int Endod J* 2012;45:113–28.

<sup>126</sup> FKG Dentaire SA The XP-endo Finisher file brochure. Available at: <http://www.fkg.ch/products/endodontics/final-preparation/xp-endo-finisher>. Accessed December 1, 2016.

<sup>127</sup> Azim AA, Aksel H, Zhuang T, Mashtare T, Babu JP, Huang GT. Efficacy of 4 Irrigation Protocols in Killing Bacteria Colonized in Dentinal Tubules Examined by a Novel Confocal Laser Scanning Microscope Analysis. *J Endod*. 2016 Jun;42(6):928-34.

---

<sup>128</sup> Bao, P., Shen, Y., Lin, J., & Haapasalo, M. In Vitro Efficacy of XP-endo Finisher with 2 Different Protocols on Biofilm Removal from Apical Root Canals. *Journal of Endodontics*, 2017;43(2), 321–325.

<sup>129</sup> Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J*. 2006 Jun;39(6):484-92.

<sup>130</sup> Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*- the root canal survivor and 'star' in post-treatment disease. *Endod Top*. 2003;6(1):135–59

<sup>131</sup> Dioguardi M, Di Gioia G, Illuzzi G, Laneve E, Cocco A, Troiano G. Endodontic irrigants: Different methods to improve efficacy and related problems. *Eur J Dent*. 2018 Jul-Sep;12(3):459-466.

<sup>132</sup> 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 Feb;32(2):93-8.

<sup>133</sup> Matthew Ramsey, Axel Hartke and Mark Huycke. *The Physiology and Metabolism of Enterococci*. Created: February 15, 2014.

<sup>134</sup> Gu Y, Perinpanayagam H, Kum DJ, Yoo YJ, Jeong JS, Lim SM, Chang SW, Baek SH, Zhu Q, Kum KY. Effect of different agitation techniques on the penetration of irrigant and sealer into dentinal tubules. *Photomed Laser Surg*. 2017;35:71–7.

<sup>135</sup> Singh S, Nagpal R, Manuja N, Tyagi SP. Photodynamic therapy: An adjunct to conventional root canal disinfection strategies. *Aust Endod J*. 2015 Aug;41(2):54-71.

---

<sup>136</sup> Mahmoudi H, Bahador A, Pourhajibagher M, Alikhani MY. Antimicrobial Photodynamic Therapy: An Effective Alternative Approach to Control Bacterial Infections. *J Lasers Med Sci.* 2018 Summer;9(3):154-160.

<sup>137</sup> Balić, M., Lucić, R., Mehadžić, K., Bago, I., Anić, I., Jakovljević, S., & Plečko, V. The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic-activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal *E. faecalis* biofilm. *Lasers in Medical Science.* 2016;31(2), 335–342.

<sup>138</sup> Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod.* 2010 Jun;36(6):1030-5.

<sup>139</sup> Valverde ME, Baca P, Ceballos L, Fuentes MV, Ruiz-Linares M, Ferrer-Luque CM. Antibacterial efficacy of several intracanal medicaments for endodontic therapy. *Dent Mater J.* 2017 May 31;36(3):319-324

<sup>140</sup> Üreyen Kaya B, Erik CE, Sesli Çetin E, Köle M, Maden M. Mechanical reduction in intracanal *Enterococcus faecalis* when using three different single-file systems: an ex vivo comparative study. *Int Endod J.* 2019 Jan;52(1):77-85.

<sup>141</sup> C. Sedgley, A. Nagel, G. Dahlén, C. Reit, A. Molander, Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals, *Journal of endodontics.* 2006, 32(3), 173-177.

---

<sup>142</sup> M. Janani, F. Jafari, M. Samiei, F. Lotfipour, A. Nakhband, N. Ghasemi, T. Salari, Evaluation of Antibacterial Efficacy of Photodynamic Therapy vs. 2.5% NaOCl against *E. faecalis*-infected Root Canals Using Real-time PCR Technique, *Journal of clinical and experimental dentistry*. 2017. 9(4) e539.

<sup>143</sup> Batinić, M., Ročana, M., Budimir, A., Anić, I., & Bago, I. Comparison of final disinfection protocols using antimicrobial photodynamic therapy and different irrigants after single-file reciprocating instrumentation against intracanal bacterial biofilm - an in vitro study. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2018. 24. 153–157

<sup>144</sup> A Dumani, D Tanrisever , D Sihay , SB Kuzu , S Yilmaz, HK Guvenmez. Efficacy of Calcium Hypochlorite with and without Er,Cr: Yttrium, Scandium, Gallium, Garnet Laser Activation on *Enterococcus faecalis* in Experimentally Infected Root Canals. *Niger J Clin Pract*. 2019 Feb;22(2):215-220.

<sup>145</sup> Janani M, Jafari F, Samiei M, Lotfipour F, Nakhband A, Ghasemi N, Salari T. Evaluation of Antibacterial Efficacy of Photodynamic Therapy vs. 2.5% NaOCl against *E. faecalis*-infected Root Canals Using Real-time PCR Technique. *J Clin Exp Dent*. 2017 Apr 1;9(4)

<sup>146</sup> Guerreiro-Tanomaru, J. M., Chávez-Andrade, G. M., Faria-Júnior, N. B. de, Watanabe, E., & Tanomaru-Filho, M. Effect of Passive Ultrasonic Irrigation on *Enterococcus faecalis* from Root Canals: An Ex Vivo Study. *Brazilian Dental Journal*, 2015, 26(4), 342–346.

<sup>147</sup> Tardivo D, Pommel L, La Scola B, About I, Camps J. Antibacterial efficiency of passive ultrasonic versus sonic irrigation. *Ultrasonic root canal irrigation. Odontostomatol Trop* 2010; 33:29-35.

---

<sup>148</sup>Bago I, Plečko V, Gabrić Pandurić D, Schauperl Z, Baraba A, Anić I. Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J*. 2013;46(4):339-347.

<sup>149</sup>Fonesca MB, Tessare PO Jr, Pallota RC, et al. Photodynamic therapy for root canals infected with *Enterococcus faecalis*. *Photomedicine and Lasers Surgery* 2008. 26, 209–13.

<sup>150</sup>Bergmans L, Moisiadis P, Huybrechts B, et al. Effect of photo-activated disinfection on endodontic pathogens ex vivo. *International Endodontic Journal* 2008. 41, 227–39.

<sup>151</sup>Aguinaldo S. Garcez, Silvia C. Nuñez, Michael R. Hamblim, Hideo Suzuki, Martha S. Ribeiro. Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment in Patients with Antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report *Journal of Endodontics*, 2010, Volume 36, Issue 9, September, Pages 1463-1466

<sup>152</sup>Gergova RT, Gueorgieva T, Dencheva-Garova MS, et al. Antimicrobial activity of different disinfection methods against biofilms in root canals. *J Investig Clin Dent*. 2015 30.

<sup>153</sup>Nasim Chiniforush, Maryam Pourhajibagher, Sima Shahabi, Emad Kosarieh, Abbas Bahador. Can Antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT) Enhance the Endodontic Treatment?, *J Lasers Med Sci*, 2016 Spring;7(2):76-85

<sup>154</sup>Beer F, Farmakis ET, Kopic J, Kurzmann C, Moritz A. Temperature Development on the External Root Surface During Laser-Assisted Endodontic Treatment Applying a Microchopped Mode of a 980 nm Diode Laser. *Photomed Laser Surg*. 2017 Apr;35(4):206-212.



---

<sup>155</sup>U. Romeo, G. Palaia, A. Nardo, G. Tenore, V. Telesca, R. Kornblit, A. Del Vecchio, A. Frioni, P. Valenti, F. Berlutti, Effectiveness of KTP laser versus 980 nm diode laser to kill *Enterococcus faecalis* in biofilms developed in experimentally infected root canals, *Aust. Endod. J.* 41 (2015) 17–23.

<sup>156</sup>Sasanakul P, Ampornaramveth RS, Chivatxaranukul P. Influence of Adjuncts to Irrigation in the Disinfection of Large Root Canals. *J Endod.* 2019 Mar;45(3):332-337.

<sup>157</sup> Marwa M. Bedier , Ahmed Abdel Rahman Hashem , Yosra M. Hassan. Improved dentin disinfection by combining different-geometry rotary nickel-titanium files in preparing root canals. *Restor Dent Endod.* 2018 Nov;43(4):e46

<sup>158</sup> Michael S. Gilmore, Don B. Clewell, *The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotic Resistance. TextBook.* ASM Press, 2002

## Изјава о ауторству

Потписани-а \_\_\_\_\_ Радован Јовановић \_\_\_\_\_  
број индекса 18/08 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**ПРОЦЕНА ЕФИКАСНОСТИ ДОПУНСКИХ АНТИМИКРОБНИХ  
ЕНДОДОНТСКИХ ПОСТУПАКА У ЕЛИМИНАЦИЈИ ИНФЕКЦИЈЕ КАНАЛА КОРЕНА ЗУБА  
БАКТЕРИЈОМ ENTEROCOCCUS FAECALIS**

- 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.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије  
докторског рада**

Име и презиме аутора Радован Јовановић

Број индекса 18/08

Студијски програм Докторске студије

Наслов рада **ПРОЦЕНА ЕФИКАСНОСТИ ДОПУНСКИХ  
АНТИМИКРОБНИХ ЕНДОДОНТСКИХ ПОСТУПАКА У  
ЕЛИМИНАЦИЈИ ИНФЕКЦИЈЕ КАНАЛА КОРЕНА ЗУБА  
БАКТЕРИЈОМ ENTEROCOCCUS FAECALIS**

Ментор Проф. др Југослав Илић

Потписани/а Радован Јовановић

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.**

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 Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици.

У Косовској Митровици, 04.04.2019

Потпис докторанда

Овлашћујем Универзитетску библиотеку да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини, са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација унесе моју докторску дисертацију/ писани део докторског уметничког пројекта под насловом:

**ПРОЦЕНА ЕФИКАСНОСТИ ДОПУНСКИХ АНТИМИКРОБНИХ  
ЕНДОДОНТСКИХ ПОСТУПАКА  
У ЕЛИМИНАЦИЈИ ИНФЕКЦИЈЕ КАНАЛА КОРЕНА  
ЗУБА БАКТЕРИЈОМ ENTEROCOCCUS FAECALIS**

која је моје ауторско дело.

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

Моју докторску дисертацију/ писани део уметничког пројекта похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Приштини са привременим седиштем у Косовској Митровици и Национални репозиторијум докторских дисертација могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. 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).

У Косовској Митровици, 04.04.2019