



УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА

Љиљана З. Бјеловић

ПРОЦЕНА УТИЦАЈА СРЕДСТАВА ЗА ИРИГАЦИЈУ
КАНАЛА КОРЕНА НА ДЕНТИН И ТУБУЛЕ ДЕНТИНА
ЗУБА СА ЈЕДНИМ КОРЕНОМ

Докторска дисертација

Ментор: др сци. мед. Татјана Кањевац, ванредни професор

Крагујевац, 2019. Године

ИДЕНТИФИКАЦИОНА СТРАНИЦА ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

<i>I Аутор</i>	
Име и презиме: Љиљана Бјеловић	
Датум и место рођења: 10.05.1984. године. Фоча, Република Српска	
Садашње запослење: Виши асистент. Катедра за Денталну патологију. Медицински факултет. Универзитет у Источном Сарајеву.	
<i>II Докторска дисертација</i>	
Наслов: Процена утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина зуба са једним кореном	
Број страница: 106	
Број слика: 34	
Број библиографских података: 299	
Установа и место где је рад рађен: Факултет медицинских наука, Универзитет у Крагујевцу. Медицински факултет, Универзитет у Источном Сарајеву. Рударско-геолошки факултет, Универзитет у Београду. Институт за хемију Природно математичког факултета, Универзитет у Крагујевцу.	
Теза је урађена у склопу Јуниор пројекта финансираног од стране Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу (Број: 2016/06).	
Научна област (УДК): Медицина, Стоматологија	
Ментор: проф. др Тајјана Кањевац	
<i>III Оцена и одбрана</i>	
Датум пријаве теме: 28.10.2015.	
Број одлуке и датум прихватања докторске дисертације: IV-03-103/5 од 01.03.2016. године	
Комисија за оцену научне заснованости теме и испуњености услова кандидата: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Александра Лукић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Болести зуба и ендодонција, председник;2. Проф. др Дубравко Бокоњић, ванредни професор Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Фармакологија, члан;3. Доц. др Драган Газивода, доцент Медицинског факултета ВМА Универзитета одбране у Београду за ужу научну област Орална хирургија, члан.	
Комисија за оцену и одбрану докторске/уметничке дисертације: <ol style="list-style-type: none">1. Проф. др Ирена Танасковић, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;2. Доц. др Марија Живковић, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан;3. Доц. др Јелена Крунић, доцент Медицинског факултета Универзитета у Источном Сарајеву за ужу научну област Дентална патологија, члан;	
Датум одбране дисертације:	

ПРОЦЕНА УТИЦАЈА СРЕДСТАВА ЗА ИРИГАЦИЈУ КАНАЛА КОРЕНА НА ДЕНТИН И ТУБУЛЕ ДЕНТИНА ЗУБА СА ЈЕДНИМ КОРЕНОМ

РЕЗИМЕ

Увод; Иригација представља један од најзначајнијих поступака у дебридману каналног простора. Раствори који се користе за иригацију у току ендодонтске терапије долазе у контакт један са другим унутар коренског канала. Последица таквих интеракција може довести до стварања чврстих продуката, преципитата. Они имају клинички значај јер могу довести до оклузије дентинских тубула, смањења пермеабилности дентина, ометају пенетрацију интраканалних лекова у дентинске тубуле и компромитују адхезију силера за зидове канала. Хемијска структура и токсичност преципитата још увек није разјашњена.

Циљ овог истраживања је био да се прво испита имедијатно стварање преципитата на површини коренског дентина после иригације натријум хипохлоритом (NaOCl) и завршне иригације хлорхексидином (CHX), етилендиаминтетрасирћетном киселином (EDTA) + CHX, МТАД или QMiX и његов ефекат на дентинске тубуле, а затим да се одреди хемијски састав и присуство парахлоранилина (PCA) у преципитату. **Материјал и методе;** У студију је укључено 150 предњих максиларних хуманих зуба који су методом случајног узорка подељени у пет група (n=30) пре инструментације и испирања са NaOCl на основу финалног протокола иригације: CHX (2% CHX), EDTA + CHX (17% EDTA + 2% CHX), МТАД, QMiX и дестилована вода (контролна група).

Сто коренова зуба је анализирано скенинг електронском микроскопијом (*Scanning Electron Microscopy (SEM)*). По осамнаест из сваке групе је уздужно раздвојено ради одређивања присуства и количине преципитата и броја затворених дентинских тубула у коронарној, средњој и апексној трећини. Преостала два из сваке групе су хоризонтално пресечена да би се испитало формирање преципитата у дентинским тубулима. За испитивање пермеабилности дентина, педесет коренова је потопљено у 0,2% раствор *Rodamina B* у трајању од 24 часа. Након тога, коренови су хоризонтално пресечени и један део из сваке трећине је изабран методом случајног узорка. Сlike изабраних делова су скениране и софтверски анализирани ради одређивања процента пенетрације боје. Хемијски састав преципитата створеног на површини дентинског зида канала корена у коронарној и апексној трећини је одређен помоћу енергетско дисперговане спектроскопије (*Energy-dispersive spectroscopy (EDS)*). Додатно, 5,25% NaOCl раствор је

помешан са 2% CHX, 17% EDTA и QMiX као и 2% CHX са 17% EDTA. Раствори су помешани у односу 1:1 и присуство *PCA* је испитивано танкослојном хроматографијом, нуклеарно магнетно резонантном спектроскопијом и инфрацрвеном спектроскопијом.

Резултати; *SEM* анализом је показано формирање преципитата на површини дентина и у дентинским тубулима у свим терапијским групама, док у контролној групи преципитат није уочен. Највећа количина преципитата је забележена у CHX групи. Анализом података је показано да је количина преципитата у овој групи била значајно већа у односу на MTAD групу у коронарној ($p < 0,05$) односно QMiX групу у средњој трећини ($p < 0,05$). У апексној трећини, преципитат формиран у CHX групи био је значајно већи од оног у MTAD и QMiX групи ($p < 0,05$). Процент затворених дентинских тубула у CHX је био сличан као у EDTA+CHX групи, али се значајно разликовао од осталих група ($p < 0,05$). Пенетрација боје је била мања у свим трећинама у CHX групи у односу на контролу као и у односу на QMiX и MTAD групу ($p < 0,05$). *EDS* анализом преципитата у CHX групи је показано статистички значајно више хлора у поређењу са преципитатом формираним у другим групама ($p < 0,05$). Мешање 5,25% NaOCl и 2% CHX је било праћено стварањем браон преципитата; 5,25% NaOCl и QMiX наранцасто-браон, а мешање 2% CHX и 17% стварањем белог преципитата. Комбиновање 5,25% NaOCl са 17% EDTA је довело само до стварања мехурића. Резултатима ове студије није показано стварање *PCA* ни за једну од испитаних комбинација раствора. **Закључак;** Преципитат богат хлором је обилнији на површини дентинског зида канала корена после иригације 5,25% NaOCl и финалне иригације 2% CHX него после иригације са NaOCl и EDTA + CHX, QMiX или MTAD. Његово повећано присуство смањује број отворених дентинских тубула као и пермеабилност дентина у свим трећинама канала корена. Мешање NaOCl и CHX или QMiX и CHX са EDTA резултира стварањем талога без *PCA*

Кључне речи: преципитат, дентински тубули, иригација, пермеабилност, *PCA*, *SEM*

INFLUENCE OF DIFFERENT IRRIGATION SOLUTIONS ON DENTIN AND DENTIN TUBULES OF SINGLE-ROOTED TEETH

SUMMARY

Introduction; Canal irrigation represents one of the most important procedures in the debridement of the canal space. The solutions used for irrigation during endodontic therapy come into contact with each other within the root canal. The consequences of such interactions can be formed solid by-product, precipitate. They has a clinical significance as it can lead to the occlusion of dentinal tubules, a reduced permeability of dentine, impair penetration of intracranial medications into the dentine tubules and compromise adhesion of root canal sealers to the canal walls. Chemical nature and toxicity of the precipitate is still debated.

The aim of this study was to firstly to investigate immediate precipitate formation on root dentin surface irrigated with sodium hypochlorite (NaOCl) followed by the final rinse with chlorhexidine (CHX), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) + CHX, MTAD or QMiX and its effect on dentine tubules, and then to determine the chemical composition and presence of p-chloroaniline (*PCA*) in the precipitate. **Material and Methods;** The study included 150 maxillary anterior human teeth randomly divided into five groups (n=30) before instrumentation and irrigation with NaOCl according to final rinse regimen: CHX (2% CHX), EDTA + CHX (17% EDTA + 2% CHX), MTAD, QMiX and control group (distilled water). One hundred teeth roots were subjected to scanning electron microscopy (*SEM*). Eighteen of from each group were split longitudinally for evaluation the presence and amount of precipitate and number of closed dentinal tubules at the coronal, middle, and apical root thirds. Remaining two of each group were horizontally sectioned to evaluate precipitate formation in dentinal tubules. For the dentin permeability analysis, fifty roots were immersed in a 0.2% Rhodamine B solution for 24 hours. After that, roots were horizontally cut and one slice of each third was randomly selected. The obtained images of slices were scanned and analyzed using the software for the assessment of leakage in percentage. Chemical composition of precipitate formed on root dentin surface in coronal and apical thirds was analyzed by energy-dispersive spectroscopy (*EDS*). Additionally, 5.25% NaOCl solution was associated with 2% CHX, 17% EDTA and QMiX as well as 2% CHX was associated with 17% EDTA. The solutions were mixed in a 1:1 ratio and presence of *PCA* was determined by using thin-layer chromatography, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and infrared spectroscopy. Data were analyzed with Kruskal-Wallis/Dunn and ANOVA/Turkey's

tests. **Results;** *SEM* analysis showed formed precipitate on dentin surface and in the dentin tubules in all treatment groups, while the control group revealed root canals without precipitate formation. The highest amount of the precipitate was recorded in the CHX group. Data analysis showed that the amount of the precipitate in this group was significantly higher in relation to the MTAD group ($p < 0.05$) in the coronal third and compared to the QMiX group in the middle third ($p < 0.05$). In the apical third, the amount of the precipitate formed in the CHX group was significantly higher than that in the QMiX and MTAD group ($p < 0.05$). The percentage of closed dentin tubules in CHX group was similar to EDTA+CHX group, but significantly lower than in other groups ($p < 0.05$). Less dye penetration was found in CHX group compared with control as well as with QMiX and MTAD group in all thirds ($p < 0.05$). *EDS* analysis of the precipitate in the CHX group showed statistically significantly higher content of Cl in comparison with the precipitate formed in other groups ($p < 0.05$). Mixing 5.25% NaOCl and 2% CHX, 5.25% NaOCl and QMiX, and 2% CHX and 17% EDTA led to the formation of brown, orange-brown and white precipitate, respectively. Association between 5.25% NaOCl and 17% EDTA yielded the bubbles formation only. The results of the present study showed no formation of *PCA* for the none of the investigated combinations. **Conclusion;** The precipitate rich in chlorine is more abundant on the surface of the dentin wall of the root canal after irrigation with NaOCl and final rinse by CHX than after irrigation with NaOCl followed by EDTA + CHX, QMiX or MTAD. Its increased presence reduces the number of open dentin tubules as well as the dentin permeability at all root levels. Mixing of NaOCl with CHX or QMiX, and CHX with EDTA results in precipitate formation without *PCA*.

Key words: precipitate, dentinal tubules, permeability, irrigation, *PCA*, *SEM*

1. УВОД.....	1
1. ДЕНТИН	3
1.1. Састав	3
1.2. Структура	4
1.3. Дентински тубули.....	5
1.3.1. Течност дентинских тубула	6
1.3.2. Колонизација бактерија	7
2. ИРИГАНСИ	7
2.1. НАТРИЈУМ ХИПОХЛОРИТ	8
2.1.1. Хемијска структура и начин деловања	8
2.1.2. Антимикробни ефекат	8
2.1.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива	9
2.1.4. Цитотоксичност	10
2.1.5. Способност продирања у дентинске тубуле	11
2.1.6. Деактивирање	11
2.2. ХЛОРХЕКСИДИН	12
2.2.1. Хемијска структура и начин деловања	12
2.2.2. Антимикробни ефекат	13
2.2.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива	14
2.2.4. Цитотоксичност	14
2.2.5. Супстантивност	15
2.2.6. Способност продирања у дентинске тубуле	16
2.2.7. Деактивирање	16
2.3. ЕТИЛЕНДИАМИНТЕТРАСИРЋЕТНА КИСЕЛИНА.....	16
2.3.1. Хемијска структура и начин деловања	17
2.3.2. Антимикробни ефекат.....	17
2.3.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	18
2.3.4. Цитотоксичност	19
2.3.5. Способност продирања у дентинске тубуле	19
2.3.6. Деактивирање	20
2.4. КОМБИНАЦИЈЕ ИРИГАНАСА.....	20
2.4.1. ДЕТЕРЦЕНТИ	20
2.4.2. МТАД	21
2.4.2.1. Антимикробни ефекат	21
2.4.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива	22
2.4.2.3. Цитотоксичност	22
2.4.2.4. Способност продирања у дентинске тубуле	22
2.4.2.5. Деактивирање	23
2.4.3. QMiX	23
2.4.3.1. Антимикробни ефекат	23
2.4.3.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива	23
2.4.3.3. Цитотоксичност	24
2.4.3.4. Способност продирања у дентинске тубуле	24
2.4.3.5. Деактивирање	25
3. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ИРИГАНАСА.....	25
3.1. NAOCl и CHX	25
3.1.1. Преципитат и детекција парахлоранилина (para-chloroaniline) (PCA)	26
3.1.2. Хемијска структура PCA	27
3.1.3. Токсичност PCA и преципитата	28

3.1.4. Превенција	28
3.2. NaOCl и EDTA	29
3.2.1. Хемијска реакција	29
3.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	29
3.2.3. Превенција	29
3.3. CHX и EDTA	30
3.3.1. Хемијска реакција	30
3.4. NaOCl и MTAD	30
3.5. NaOCl и QMIX	31
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	32
3. РАДНА ХИПОТЕЗА	34
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	37
4.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ	37
4.2. ОДАБИР И ПРИПРЕМА УЗОРКА	37
4.2.1. Одабир узорка.....	37
4.2.2. Инструментација канала корена	39
4.3. SEM АНАЛИЗА УЗОРАКА	40
4.3.1. Припрема узорка	40
4.3.2. Одређивање количине преципитата на површини дентина канала корена.....	42
4.3.3. Одређивање броја потпуно затворених дентинских тубула канала корена	42
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ПЕРМЕАБИЛНОСТИ ДЕНТИНА	43
4.5. ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ПРЕЦИПИТАТА НА ПОВРШНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА	44
4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ РСА У ПРЕЦИПИТАТУ	44
4.6.1. Хемикалије и растварачи	44
4.6.2. Комбиновање и мешање ириганаса	44
4.6.3. Одређивање РСА	45
4.6.3.1. TLC анализа.....	45
4.6.3.2. ¹ H-NMR анализа.....	46
4.6.3.3. IR анализа	46
4.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА	46
4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА.....	46
5. РЕЗУЛТАТИ.....	48
5.1. КОЛИЧИНА ПРЕЦИПИТАТА ФОРМИРАНОГ НА ПОВРШНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА – SEM АНАЛИЗА .	49
5.2. ПРИСУСТВО ПРЕЦИПИТАТА УНУТАР ДЕНТИНСКИХ ТУБУЛА – SEM АНАЛИЗА.....	51
5.3. БРОЈ ЗАТВОРЕНИХ ДЕНТИНСКИХ ТУБУЛА КАНАЛА КОРЕНА – SEM АНАЛИЗА.....	51
5.4. УТИЦАЈ ПРЕЦИПИТАТА НА ПЕРМЕАБИЛНОСТ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА	52
5.5. ХЕМИЈСКИ САСТАВ ПРЕЦИПИТАТА ФОРМИРАНОГ НА ПОВРШНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА– EDS АНАЛИЗА	54
5.6. ПРИСУСТВО РСА У САСТАВУ ПРЕЦИПИТАТА.....	58
5.6.1. Резултати TLC анализе	58
5.6.2. Резултати ¹ H- NMR анализе	60
5.6.3. Резултати IR анализе	60
6. ДИСКУСИЈА.....	69
7. ЗАКЉУЧЦИ	82
8. ЛИТЕРАТУРА.....	86

1. УВОД

1. УВОД

Успех ендодонтског лечења зависи од квалитетне деконтаминације ендодонтског простора, уклањања заосталог пулпног ткива и дебриса, обтурације коренских канала (1, 2). Механичком инструментацијом уклања се већи део некротичног ткива заједно са бактеријским колонијама из главног канала и из дентинских тубула приликом ширења и обликовања коренског канала. У истраживањима је показано да без обзира на технику препарације, 35-40% површине канала остаје механички необрађено (3, 4). Сложена анатомија ендодонтског простора (истмуси, дивертикули, латерални и акцесорни канали, рамификације), полиинфекција и резистентност микроорганизама чине да само ендодонтска инструментација не може бити делотворна, па је неопходна додатна хемијска обрада (5) да би терапија била успешна.

Пожељна својства средстава за испирање коренских канала су: антимикуробно деловање, способност растварања органског и неорганског материјала, мали површински напон, нетоксичност, лубрикацијско деловање уз обавезну биокомпатибилност (6). Ни један ириганс сам не испуњава све ове захтеве, у ендодонтској терапији је потребно њихово међусобно комбиновање да би им се побољшала ефикасност (7).

У ендодонтском лечењу најчешће коришћени ириганси су NaOCl, EDTA и CHX (8-13). У последњих неколико година у клиничку праксу су уведена два нова ириганса: *BioPure MTAD (Mixture of Tetracycline, Acid and Detergent; Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA)*, који представља смешу изомера доксицилина, лимунске киселине и детерџента, и *QMiX (combination of EDTA, CHX and detergent; Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA)*, раствор CHX, EDTA и детерџента. Користе се као финални ириганси за уклањање размазног слоја, односно као супституција за EDTA (14, 15). Предност њихове примене у односу на EDTA је у томе што испољавају мањи ерозивни ефекат на дентин (16). Такође, због постојања антисептичке компоненте у њиховом саставу (тетрациклин или CHX), MTAD и QMiX, испољавају и изражено антимикуробно деловање (14, 15).

Познато је да раствори који се користе за иригацију у току ендодонтске терапије долазе у контакт један са другим унутар коренског канала (7, 17-20). Као последица

њихових интеракција може доћи до стварања преципитата који имају клинички значај јер се тешко уклањају, а могу бити и потиснути у периапексне структуре (21). У највећем броју *in vitro* истраживања показано је да се мешањем NaOCl и CHX ствара наранџасто-браон преципитат који може да промени боју зуба, изазове оклузију дентинских тубула као и да смањећи пермеабилност дентина (17, 20, 22, 23). Такође, према неким налазима преципитат садржи токсичну (24) и канцерогену супстанцу (25) познату као парахлоранилин (PCA). Уколико се CHX комбинује са EDTA долази до интеракције и стварања нетоксичног млечно белог преципитата (18) који смањује ефикасност EDTA раствора. Малобројна су истраживања о стварању преципитата између NaOCl и комбинованих раствора MTAD или QMiX. До данас постоји само једна студија (19) у којој је показано да комбинација резидуалног NaOCl и MTAD доводи до стварања жутог преципитата. Присуство преципитата у већим количинама на површини дентина може значајно и да утиче на адхезију силера за коренски дентин, посебно силера на бази смола (26). Количина и хемијски састав преципитата који се ствара у овим интеракцијама на дентинском зиду канала корена још увек нису испитани. Док је у појединим истраживањима показано да се преципитат ствара на површини дентина (20), у другим студијама преципитат није уочен на површини дентина ни у дентинским тубулима након испирања канала NaOCl и QMiX (27). Његова количина у интеракцији између NaOCl и QMiX још увек није одређивана. Такође, пенетрација преципитата у дентинске тубуле после иригације NaOCl и финалне иригације CHX, EDTA + CHX, MTAD или QMiX још увек није разјашњена. Методе које се користе за анализу присуства PCA у преципитату су различите али показују и парадоксално различите исходе (20, 22, 27, 28).

Узимајући у обзир чињеницу да нежељене интеракције између различитих ириганаса и створени преципитата могу компромитовати ендодонтску терапију (15, 17-20), као и последице које ови токсични супстрати (PCA) имају на опште здравље (7) и периапикално ткиво (21), мишљења смо да је наше истраживање од битног научног и клиничког значаја. Да би се установио клинички прихватљив начин уклањања преципитата у условима када се он ипак ствара, протокол иригације подлеже предлогу новог концепта у циљу превенције антагонистичких реакција и осим ефикасне, омогући безбедну иригацију каналног система зуба.

1. ДЕНТИН

1.1. Састав

Дентин је васкуларно, минерализовано, витално ткиво ендодонцијума и чини највећи део зубне масе. Као високопермеабилно ткиво, чини минерализовану компоненту пулпо-дентинског комплекса са око 70% (по тежини) неорганског материјала, углавном у облику калцијум хидроксипатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (29). Минерали и елементи који улазе у састав дентина, у нижим концентрацијама него у саставу глеђи, чине азот (2,42% - 3,64%), карбонати (2,99% - 3,25%) и цинк око 300 ppm (30, 31). Концентрација флуорида у саставу дентина је између 100-500 ppm и зависи од нивоа флуоризације подручја у којима одређени појединац живи или је додатно узимао препарате флуора и да ли је дентин који се анализира предходно био кариозан (30, 31). Такође, дентин чини и 20% органског материјала, који укључује различите колагене и неколагене протеине, липиде, протеогликане и факторе раста (29). Колаген типа I чини 90% дентинског матрикса, док се колагениа влакана тип III, V и VI налазе у траговима (32). Неколагени протеини, који чине око 10% матрикса, спадају у неколико категорија: фосфопротеини, остеокалцин, матрикс *GLA*-протеин, протеогликани, различити кисели гликопротеини и серумски протеини (31). Од фосфорпротеина у састав матрикса улазе фосфопротеин (*HP, MP, LP*) и дентин матрикс протеин 1 (*AGI*), док од гликопротеина налазимо дентин сијалопротеин, остеонектин и остеопонтин (33-35). Неколагени протеини могу бити важни за процесе током дентиногенезе (32, 36). У матриксу су корисни за стварање минералних материја (32), а када се имобилизују на чврстој подлози, индукују формирање апатита у физиолошким условима (36). Такође, они могу деловати као регулатори величине и брзине кристализације и промовисати дифузију калцијумових јона у ткиву дентина. Однос неорганске и органске компоненте у дентину није константан, нпр. нижи садржај колагена и већа количина минерала уочава се у близини дентинских тубула.

Липиди чине приближно 2% органског матрикса дентина, густо су распоређени уз површину, а присутни су у интерглобуларном дентину (37). Преосталих 10% састава дентина представља вода (37, 38). Од укупне количине воде у дентинским тубулима је смештено 72,2%, док перосталих 24,8% је присутно у минерализованом матриксу. Показано је да садржај воде у дентину утиче на његову еластичност (38).

1.2. Структура

Структуру дентина чине примарни, секундарни и терцијарни дентин у зависности од времена стварања и присуства наддражаја (39, 40). Примарни дентин формирају одонтобласти током развоја зуба, након чега следи споро таложење секундарног дентина после избијања зуба. Секундарни (физиолошки) дентин је слој дентина који се ствара након што зуб после избијања у вилици постане функционалан. Терцијарни дентин се формира као одговор пулпе на нефизиолошке наддражаје нпр. каријес, абразија, ерозија, рестауративна препарација и постављање дефинитивног испуна (29, 39).

Покровни дентин (*mantle dentin*) је први слој примарног дентина који је смештен испод глеђи (29). Мање је минерализован и варира у дебљини између 5 и 30 μm (41). Циркумпулпни дентин представља остатак примарног дентина и присутан је у два облика интертубуларни, који се састоји од минерализованог колагена и перитубуларни, интратубуларни, који је компактно, високотерализовано ткиво са неколагеном материјом (37, 42).

Предентин је неминерализовани слој дентинског матрикса смештен на унутрашњој површини циркумпулпног дентина (43, 44). Примарно је колагене природе и садржи колаген тип I, II, III, VI и дентин фосфопротеин (34, 45). Међутим, постоји велика разлика у дебљини предентина (10 - 30 μm) која се запажа у зависности од старости појединца и анатомске локализације (43, 46).

Као последица дејства инфективно-токсичних, хемијских и физичких наддражаја долази до синтезе реактивног дентина (47, 48). Реактивни дентин синтетишу преживеле постмитотске одонтобластичне ћелије - примарни одонтобласти. Ова врста терцијарног дентина садржи мањи број дентинских каналића са већим или мањим степеном ирегуларности (48). Посебна врста терцијарног дентина је и репаративни дентин, кога синтетишу одонтобластима сличне ћелије, настале након губитка примарних одонтобласта. Процес репаративне дентиногенезе може се одиграти и у присуству других врста ћелија способних да реагују на спољашње наддражаје. На тај начин стварају се и одговарајуће врсте минерализованих ткива - фибродентин, остеоидентин или репаративни дентин (47 - 49). За разлику од примарног дентина, секундарни и терцијарни дентин садрже знатно веће количине колагена типа III. Уколико се

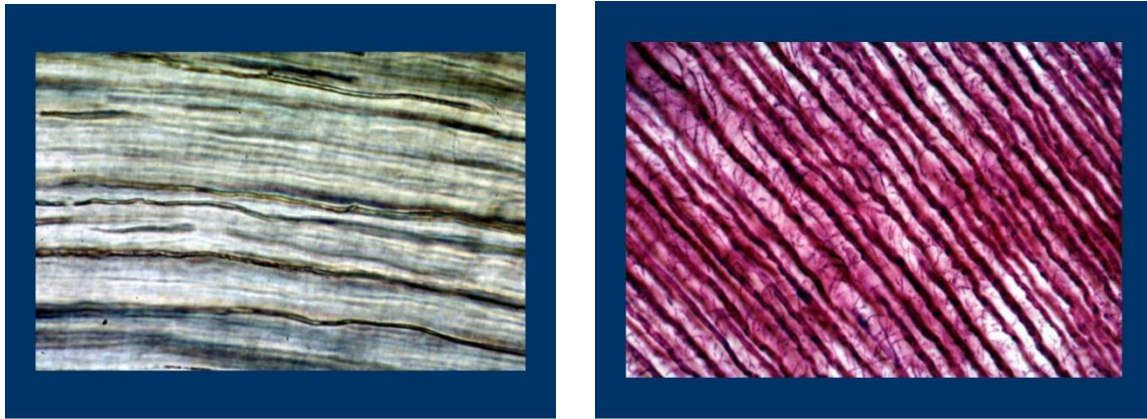
посматрају неколагени протеини, матрикс терцијарног дентина има смањену концентрацију фосфорина у поређењу са примарним дентином (49). Фосфорин спада у групу фосфопротеина и налази се само у минерализованом матриксу, док у предентину није пронађен (50). Фосфопротеини имају високи афинитет за везивање јона калцијума и показују индуктивну улогу у процесу минерализације регуларног дентина (50).

1.3. Дентински тубули

Особеност структуре дентина дају дентински тубули који се пружају целом дужином од пулпе до глеђи, односно цемента. По запремини, дентински тубули чине 10% површине дентина. Непосредно уз пулпу они чине 88% укупног волумена дентина а уз дентино-глеђну границу само 4% (38, 50). Испуњени су дентинском течношћу у којој се налазе продужеци одонтобласта (50-52). Дентински каналићи су у периферним деловима размакнути, док су у близини пулпе гушћи (однос 4:1 са пулпне, односно глеђне стране). Величина тубула према пулпи је 3 μ m, док у периферном дентину у близини споја са глеђи дијаметар тубула је мањи од 1 μ m (38-53). Број дентинских каналића је већи у круничном делу зуба (45,000/mm²), а значајно мањи у апексној трећини зуба (8,000/mm²), посматрано од пулпе ка површини дентина. Густина дентинских тубула се смањује на око 10,000/ mm² на дентино-глеђној граници (38, 53-55).

Тубули на површини пулпе су уобичајно присутни под правим углом. Познато је да се дентински тубули не пружају у правој линији кроз 3-3,5 mm дебљине дентина већ имају "S" облик (примарна закривљеност) (слика 1а). Уз примарне завоје сваки тубул показује низ малих вијугања на размаку сваких неколико микрона (секундарна закривљеност) (слика 1б) (56). Између тубула постоје изразита гранања која омогућавају међусобну комуникацију. Дијаметар грана је у распону од 25 nm до 300 nm за микрогранчице које се пружају под правим углом у односу на главне дентинске тубуле, а 300 nm до 700 nm за fine гране које се пружају под углом 45 степени, и од 0,5 μ m до 1 μ m за главне гране постављене периферно. У корену, гране су у дијаметру од 300 nm до 700 nm (57). Дентински тубули могу бити деструисани због континуираног депоновања минерала, када су под утицајем стреса, каријеса, трауме или испуна. Бактерије се могу наћи на свим површинама система коренског канала, односно, дентинским тубулима инфицираних канала (5). Фактори, као што су врста зуба, узраст, број и врста бактерија, односно, дужина експозиције коренског канала

значајно утичу на дубину продора бактерија у дентинске каналиће. Како је морфологија коренског канала врло комплексна и све површине канала нису у потпуности доступне савременим ендодонтским инструментима потребна је додатна хемијска обрада (5). Сматра се, да је у коренском делу за склерозу дентина одговорно старење (58, 59).



а)

б)

Слика 1. (а) Примарна закривљеност дентинских тубула ; (б) секундарна закривљеност дентинских тубула

1.3.1. Течност дентинских тубула

Тубули у дентину неинфицираног зуба представљају углавном празан простор, испуњен течношћу са продужецима одонтобласта. Стога, у просеку та течност представља 10% запремине дентина а у близини пулпе и више од 20%. Течност се може слободно кретати у тубулима. Егзогени надражаји (каријес, абразија у вези са функцијом, ерозија, јатрогени надражаји, брушење зуба, препарације) изазивају кретање течности (флуида) у дентинским каналићима од споља ка пулпи као и обрнуто, од пулпе према дентину уколико се процес одиграва у пулпи (60). У ком правцу ће доћи до кретања флуида зависи од температуре, дехидратације дентина и осмозе (38, 60). Брзина протока смањује се са старењем а може потпуно нестати када је присутан каријес (60, 61). Температурне промене, ресорптивни процеси и физички стрес могу изазвати тренутни преокрет тока течности унутра ка пулпи (38). Уколико је температура повећана на 20°C изазваће кретање течности за око 5 mm, пошто флуиди имају коефицијент експанзије већи око десет пута од зида дентинских каналића. Топлота, услед ширења флуида проузрокује кретање дентинског ликвора од споља према пулпи, а ниска температура, услед смањења његовог волумена проузроковаће

кретање флуида од пулпе према споља. Међутим, топлота, претерано сушење експонираног дентина изазваће кретање дентинског ликвора према споља што ће изазвати аспирацију једара одонтобласта у дентинске каналиће, деформацију, па и кидање нервних завршетака што је праћено болом (38).

1.3.2. Колонизација бактерија

Због величине дентинских тубула и уобичајеног пасивног тока дентинске течности, колонизација коренског канала бактеријама може да се инхибира али не и у потпуности спречи. Уколико се каријес не лечи, бактерије и њихови нуспроизводи узрокују некрозу пулпе (62, 63). Када је коренски канал инфициран, тубули убрзо постају колонизовани (64). Тубули зуба без виталног пулпног ткива, тј. без спољашњег тока тубуларне течности, могу да буду заражени брже него они са виталним пулпним ткивом (65). Дубина продирања расте са временом и бактеријски производи могу продрети у пулпу, дакле дијагонално целом дужином тубула, у току недељу дана (66-68). У зависности од бактеријске врсте и технике мерења, дубина инвазије у тубуле може варирати почевши од 50 μm до 375 μm , а 600 μm за *E. Coli* и комплетно 1000 μm дужине испитиваног тубула за *E. faecalis* и *S. Sanguis* (68-70). У условима када се инструментацијом и испирањем потпуно уклоне бактерије из канала корена, оне се и даље размножавају у тубулима и могу постати извор инфекције. За терапију коренског канала било би корисно ако би се целокупна течност дентинских тубула заменила "идеалним" ендодонтским иригансом који је у стању да елиминише бактерије (71).

2. ИРИГАНСИ

Иригација канала корена уз механичку и/или хемијску обраду има за циљ уклањање дебриса, лубрикацију канала, растварање ткива, спречавање стварања размазног слоја или његовог растварања. Иригација има и биолошку улогу која се везује за антимикуробну ефикасност, инактивацију ендотоксина, нетоксичности на витална ткива и мали алергогени потенцијал (72-75).

"Идеално" средство за иригацију требало би да је стабилно, ефикасно, дуготрајног антимикуробног и фунгицидног дејства, способно да пенетрира у сва подручја канала корена без негативног ефекта на зубе, периапикално ткиво или опште здравље, а јефтино и лако доступно (9). Међутим, до данас није синтетисан ни један

ириганс који поседује све ове карактеристике и зато је неопходно комбиновање истих како би им се побољшала ефикасност у свакодневној клиничкој пракси.

У ендодонтској терапији данас, најчешће се користе ириганси NaOCl, EDTA и CHX, комбиновани са новијим производима као што су QMiX и MTAD (9, 73, 76).

2.1. НАТРИЈУМ ХИПОХЛОРИТ

У ендодонтској терапији NaOCl је најчешће примењивано средство за иригацију канала корена. Испуњава највећи број услова које треба да има ириганс (76-79).

2.1.1. Хемијска структура и начин деловања

У воденом раствору, NaOCl је у равнотежи са натријум хидроксидом и хипохлорастом киселином (HOCl), који дисосују на своје јоне. Реакција је:



Раствор NaOCl је јака база са $\text{pH} > 11$. У контакту са органским ткивом NaOCl доводи до деградације масти претварајући их у соли масне киселине и глицерол, смањујући тако површински напон преосталог раствора. NaOCl неутралише аминокиселине, при чему рН вредност опада. Растварањем хлора у води и контактом са органским материјама ствара се слаба хипохлораста киселина (HOCl) која има улогу оксиданса. Ова киселина делује као растварач, ослобађа хлор који реагује са аминок групама стварајући хлорамине. Хипохлораста киселина и хипохлоритни јони (OCl⁻) узрокују деградацију и хидролизу аминокиселина. У реакцији хлораминације се стварају хлорамини који интерферирају са метаболизмом ћелије. Хлор као јак оксиданс изазива иреверзибилну оксидацију сулфхидрилних група есенцијалних бактеријских ензима и на тај начин ремети метаболизам ћелије (80).

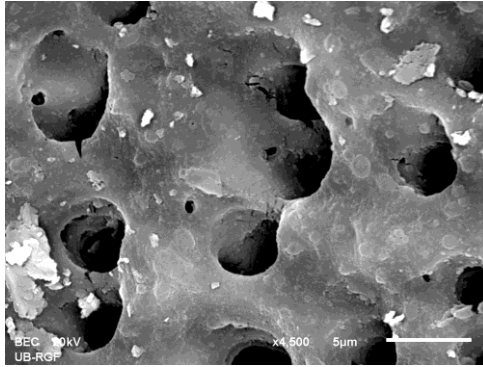
2.1.2. Антимикробни ефекат

У ендодонтској терапији најчешће се употребљава раствор NaOCl у концентрацијама од 0,5% до 6% јер испољава широк спектар неспецифичног деловања на бактерије, вирусе и споре (81, 82). Већа ефикасност NaOCl је забележена са повећањем концентрације, рН и температуре раствора и активирањем раствора уз помоћ ултразвука (83, 84). Ипак, сматра се да концентрација раствора нема значајан утицај на његов антимикробни ефекат уколико се примењује континуирано испирање раствором (85-87), али са повећањем концентрације значајно се повећава токсични

ефекат раствора (88). NaOCl је у стању да поремети и раствори биофилм када се користи као 1%, 5,25% или 6% раствор (81, 82). У лабораторијским условима NaOCl брзо и ефикасно елиминише бактерије, и када се примени у нижим концентрацијама (89-91), док је у клиничким условима његов ефекат ограничен због присуства органских материја, без обзира на примењену концентрацију (73). У појединим *in vitro* студијама показано је да NaOCl има изражен ефекат на *Candida albicans*, али време контакта ириганса са каналом корена током испирања мора бити продужено (91-93). Такође, у клиничким студијама показано је да 2,5% NaOCl умерено ефикасан против бактерија, али мање ефикасан против ендотоксина у инфицираном каналу корена (94, 95).

2.1.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

Органски садржај (остаци ткива, запаљенски ексудат, дентински колаген, микробна биомаса) доводе до слабљења дејства NaOCl (73). NaOCl има способност да раствара органско ткиво, али много ефикасније раствара некротичне биомасе (9, 96). Додавање сурфактанта раствору NaOCl може да повећа органолитички ефекат (86). Смањењем концентрације раствора и времена иригације, смањује се способност NaOCl да пенетрира у дентинске тубуле и изврши њихову дезинфекцију. Са додатком површински активних супстанци, којима се смањује површински напон, повећава се дубина пенетрације NaOCl у дентинске тубуле и брзина растварања ткива (84). Због негативног ефекта на меком ткиву, NaOCl треба користити са опрезом од ризика потискивања ириганса преко апекса. У случају пребацивања раствора у периапикално ткиво може да се јави интензиван постоперативни бол, профузно оштећење ткива, едем, крварење из канала са појавом хеморагија коже и слузнице, секундарне инфекције, анестезије или парестезије (97, 98). Ређе, NaOCl може да изазове алергијске реакције. Такође, овај антисептик показује и нежељени ефекат на чврста ткива, дентин и костно ткиво. Када је дентин изложен NaOCl уочава се смањење микротврдоће, модула еластичности, отпорност на савијање, што је углавном због деградације колагена и глукозаминогликана (99-105). Такође, иреверзибилна ерозија дентина може бити одговорна за штетан утицај на механичке карактеристике дентина (Слика 2) (16, 105, 107).



Слика 2. Репрезентативна *SEM* микрографија ерозије дентина

2.1.4. Цитотоксичност

Цитотоксичност представља молекуларне промене које доводе до оштећења ћелија (108). Тестови цитотоксичности су примарно тестови биокомпатибилности којима одређујемо лизу ћелија, инхибицију ћелијског раста и остале утицаје на ћелије до којих доводе испитиване материје. Данашњи материјали се тестирају према одредбама и стандардима које прописује Међународна организација за стандардизацију (*International Standards Organization (ISO)*). Цитотоксичност одређује безбедносни профил денталних материјала (укључујући одонтоантисептике) или шире узевши, стоматолошких материјала. Препоручени протокол Међународне организације за стандардизацију за испитивање цитотоксичности денталних материјала укључује и њихово поређење са позитивном и негативном контролом (*ISO 10993, 1992*) (109). Поменути *ISO* протокол има четири фазе: у првој фази цитотоксични ефекат материјала се мери у *in vitro* условима на једнослојним ћелијским културама што омогућује добру репродуктивност резултата (110). Материјали који у овим тестовима покажу мали ниво цитотоксичности се даље имплантирају у мале лабораторијске животиње, обично глодаре, и пореде са контролама чиме се добијају *in vivo* цитотоксичне карактеристике (*ISO 10993, 1992*) (109). После ових тестова зуби се екстрахују и хистолошки испитују. Уколико зубна ткива покажу низак ниво ћелијских оштећења заједно са одсутним или минималним степеном запаљења сматра се да је материјал прошао *ISO* захтеве и може се применити у испитивањима на пацијентима (*ISO 10993, 1992*).

Нежељена својства NaOCl су изражена токсичност на орална ткива, гингивалне фибробласте и оралне епителне ћелије (111, 112). Главни недостатак NaOCl је да делује цитотоксично када продре у периапексно ткиво (75). Токсични ефекти на ткива

подразумевају хемолизу, епителне улцерације и некрозу (75). *Nishikiori* и сар. (113) у *in vitro* студији установили су да је летална доза код 50% ћелија (*LC50*) након примене NaOCl 0,79 mM. Међутим, у истој студији није уочен цитотоксични ефекат NaOCl на гингивалне фибробласте у концентрацији од 0,005% или ниже, али је био евидентан у концентрацијама изнад 0,0075%. У истраживањима је показано да је концентрација NaOCl од 0,5% токсична за периапексно ткиво и због тога у ендодонтској терапији се препоручује концентрација од 1% да би се одржао антибактеријски ефекат уз најнижу токсичност (114). За разлику од цитотоксичности, постоје неусаглашена мишљења о томе да ли могу настати оштећења дезоксирибонуклеинске киселине (*DNK*) (115-117). У неким студијама је уочена и генотоксичност, укључујући оне у којима је испитиван ефекат NaOCl на хуманим лимфоцитима (118, 119).

2.1.5. Способност продирања у дентинске тубуле

Могућност ириганаса да продру у дентинске тубуле је важна због тога што могу бити инфицирани више дана или недеља (66, 67, 71). До данас је ограничен број студија у којима је испитивана пенетрација NaOCl (120, 121). Дубина на којој се елиминишу бактерије може да варира од 200 μm до 500 μm , у зависности од тога да ли се користи 1% или 6% NaOCl (122-129).

2.1.6. Деактивирање

Иако се може рећи да је NaOCl брзоделујући агенс ипак је неопходно да у каналу буде присутан одређени временски период. Познато је да дентин и мека ткива смањују антимикуробни ефекат NaOCl (86, 130, 131). Хлор, одговоран за растварање ткива и антибактеријско деловање је веома нестабилан и врло лако бива искоришћен у реакцији са каналним супстратима, отприлике за око два минута (80, 105) Стога је неопходно стално допремање нових количина ириганса, да се обезбеди ефикасна дезинфекција канала и растварање некротичних материја. До смањења антимикуробног ефекта NaOCl може довести и његово комбиновање са EDTA (130-134). Чак и најмање концентрације EDTA могу да изазову овај ефекат јер њихова реакција доводи до формирања мехурића и губитка активне компоненте, хлора. Слична реакција која доводи до везивања хлора настаје када се NaOCl дода лимунска киселина (131-135).

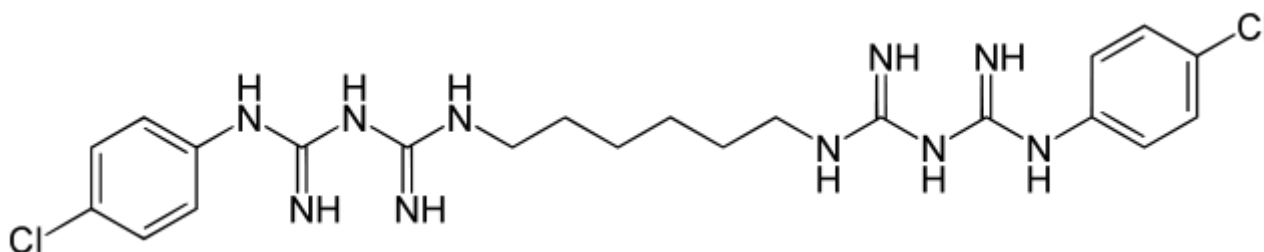
EDTA тако смањује не само антимикуробни ефекат NaOCl (136), већ значајно смањује и могућност растварања ткива (137).

2.2. ХЛОРХЕКСИДИН

Хлорхексидин, $C_{22} H_{30} Cl_2 N_{10} 2(C_6 H_{12} O_7)$ се користи у медицини дуги низ година као раствор за дезинфекцију (76). У стоматологији је регистрован као средство у превенцији каријеса, као антиплак средство за превенцију гингивитиса, у терапији пародонталних обољења и код афтозних улцерација. У ендодонцији, СНХ се користи за иригацију канала корена и интерсеансну медијацију (79, 138). У студији *Sodhi* и сар. (139) показано је да постоје високе стопе успеха ако се витални зуби током третмана иригирају са СНХ, када је контраиндикувана употреба NaOCl (140).

2.2.1. Хемијска структура и начин деловања

СНХ је хлорфенил бисбигванидни антимикуробни агенс, са структуром од два симетрична 4-хлорофенилна прстена и две бигванидне групе повезане хексаметиленским ланцем (слика 3).



Слика 3. Хемијска структура СНХ

То је јака база, молекулске масе 505,4 g/mol, која има катјонски потенцијал и користи се у облику стабилне соли (139, 141, 142). У контакту са негативно наелектрисаном површином бактерија, СНХ као позитивно наелектрисан хидрофобни и липофилни молекул реагује са фосфолипидима и липополисахаридима ћелијске мембране микроорганизама. Услед тога, долази до поремећаја пермеабилности мембране и уласка СНХ у ћелију било активним или пасивним транспортом (143-146). СНХ у

ниској концентрацији од 0,2% делује бактериостатски, иницира руптуру ћелијског зида и излазак молекула мале молекулске масе, прије свега калијума и фосфора. У већим концентрацијама од 2% испољава бактерицидно деловање које је последица коагулације цитоплазме (144). Код појединих бактерија СНХ може да утиче на метаболизам ћелије тако што инхибира активност фосфотрансферазног система у метаболизму шећера и спречава стварање киселина (139, 142, 144, 147). Као антимикробни агенс широког спектра, делује на G^+ и G^- бактерије и гљивице, али ефекат против G^+ бактерија је најизраженији (144, 146, 148).

2.2.2. Антимикробни ефекат

Антимикробна активност СНХ је интензивно тестирана. У бројним истраживањима је компариран антимикробни ефекат СНХ са физиолошким раствором и NaOCl. У појединим студијама показано је да NaOCl ефикасније делује од СНХ (123, 125), док у другим студијама ефекат СНХ је био супериорнији (126, 148). Међутим, постоје студије у којима је уочен сличан антимикробни потенцијал оба ириганса (149-152). У *in vivo* студијама констатовано је да укључивање СНХ у протокол иригације као финалног ириганса било ефикасније од физиолошког раствора (153, 154). С обзиром да и NaOCl и СНХ имају и предности и мана, многи аутори су препоручили да се ова два ириганса комбинују у циљу побољшања антимикробне активности у каналу корена (155). Такође, у истраживањима је показано да способност елиминисања бактерија са NaOCl је смањена на једну четвртину, а са СНХ једну половину, и процена бактеријских оптерећења са применом молекуларних техника су показале сличне налазе (156). Међутим, ови налази нису репродуковани у студији са нижом концентрацијом СНХ (157). Када су испитивани ефекти на биофилм у експерименталним *in vitro* студијама, уочено је да СНХ ефикасно уклања ендодонтски биофилм бактерија (158). У поређењу са другим иригансима, као што је NaOCl, ефекат СНХ је био знатно нижи, што је показало да СНХ не може бити ефикасан као појединачан ириганс (128, 159). Међутим, постоје студије у којима је запажено да способност СНХ да инактивира липополисахариде није се разликовала од NaOCl (94, 95). Испитивањем ефикасности ових ириганаса на гљивице, 2% СНХ је показао исту ефективност као 1,3% NaOCl (92). У скоријем истраживању о ефикасности NaOCl и СНХ у клиничким условима нису нађени докази који би препоручили једног од њих као средство избора у ендодонтској терапији, у лечењу зуба са инфицираним коренским

каналима једнокорених зуба (160). Међутим, када се СНХ користи као гел или раствор већи антимикробни ефекат забележен је у концентрацији од 2% у односу на 0,2% (161, 162), иако начин деловања остаје исти без обзира на концентрације (163). СНХ у концентрацији од 2% је ефикаснији и има дужи ефекат субстантивности него 0,12% (164). Међутим, активност унутар тубула не зависи од коришћених концентрација (148). Сугерисано је да субстантивност се ослања на повећање времена контакта између дентина и СНХ, који треба да траје од једног сата до седам дана (165).

2.2.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

СНХ за разлику од NaOCl није у стању да раствори органски материјал унутар канала корена, што представља један од његових главних недостатака (166). У истраживањима показано је да није било ефекта на пулно ткиво говеда и меко ткиво непца свиња, после коришћења ириганса (166, 167). Такође, када је дентин изложен дејству СНХ, нису уочене штетне последице (104), због немогућности СНХ да раствори мека и тврда зубна ткива. У *in vitro* студији, може се запазити да је СНХ имао инхибиторни ефекат на активности матричне металопротеиназе 2 (желатиназа А), 9 (желатиназа Б) и 8 (колагеназе 2), и предложено је да механизам одговоран за ову активност може бити катјонска структура (167). Такође, ово се може објаснити тако што завршно испирање канала СНХ може да појача везу композита за дентин (168, 169). У клиничким условима овај ефекат није значајан, јер више фактора може играти значајну улогу у стабилности везе композитне смоле и дентина (170).

2.2.4. Цитотоксичност

СНХ, у концентрацијама у којима се примењује у стоматологији, испољава незнатну токсичност која није ћелијски специфична (171, 172). Забележена је његова цитотоксичност на хумане гингивалне фибробласте, ћелије оралног епитела, ћелије периодонталног лигамента, ћелије алвеоларне кости и остеобласне ћелије (173-175). Сматра се да је овај ефекат зависан од примењене концентрације и дужине деловања ириганса (176-178). Цитотоксични ефекат СНХ зависан од примењене концентрације (0,0024%, 0,004% и 0,02%) на ћелије које личе на одонтобласте показан је у студији *de Souza* и сар. (179). Међутим, у студији *Lucarotti* и сар. (180) уочено је да 0,01% СНХ оштетио 95% хуманих фибробласта, док у студији *Hidalgo* и сар. (181) забележено је потпуно уништење ћелија фибробласта са раствором СНХ у концентрацији од 0,005%. Такође, постоји и велики број *in vitro* студија у којима су уочени штетни ефекти СНХ

на фибробласте (138, 181, 182). СНХ може утицати на цервикалне и периферне неутрофиле, због литичке акције и прекида ћелијске мембране. Он инхибира функцију неутрофила при концентрацијама већим од 0,005% (183). У *in vivo* условима, у односу на NaOCl, цитотоксичност СНХ је много мања, али треба напоменути да могу настати инфламација у кратком временском периоду и гранулацијске промене након дужег времена (184). Дуготрајна орална примена СНХ може бити повезана са нежељеним ефектима као што су: пребојавање зуба и композитних испуна, поремећај укуса, стварање конкремената, ерозија слuzнице, као и успорено зарастање ране (185), док учесталост појаве алергијских реакција је око 2% (186).

2.2.5. Супстантивност

СНХ постиже ефикасну дезинфекцију канала корена због особине супстантивности, тј. постепеног и пролонгираног дејства на микроорганизме (187). Позитивно наелектрисана молекула СНХ се са високим афинитетом везује и за негативно наелектрисане површине у усној дупљи, што знатно доприноси његовој адсорптивности и продуженом антибактеријском деловању. Осим на бактерије, СНХ се адсорбује на албумине и друге протеине у пљувачки и серуму, пеликулу на површини зуба и мукозне мембране, а везује се и за хидроксиапатит. Адсорпција СНХ за ове супstrate је реверзибилна (188), због чега после везивања долази до спорог ослобађања активних концентрација раствора. Протраховани антимикуробни ефекат зависи од концентрације ириганса. У нижој концентрацији од 0,12%, СНХ је показао тренутни антимикуробни ефекат на пародонтална ткива (189). У *in vitro* студији, СНХ као ендодонтски ириганс има продужени антимикуробни ефекат до 72 сата (163). Међутим, у клиничким условима супстантивност траје 48 сати након инструментације и иригације СНХ (190). Постепено и пролонгирано деловање СНХ се објашњава као реверзибилно прихватање и ослобађање СНХ (191, 192). Када се примени у нижим концентрацијама (< 0,01%), СНХ формира један стабилан слој на површини, који може да утиче на физичке и хемијске карактеристике површине за коју је везан. Примењен у већим концентрацијама (> 0,02) СНХ формира више слојева на површини на којој делује. Овај „депо“ СНХ је у динамичкој равнотежи са слободним молекулима лека на месту деловања (191, 192). Поједини аутори сматрају да протраховани антимикуробни ефекат СНХ зависи од његове адсорптивности за дентин у току првог сата деловања (193). После засићења дентина иригансом у току првог сата, антимикуробни ефекат СНХ

се повећава у функцији времена. Антимикробни ефекат у каналу корена може да траје и до 12 недеља, зависно од концентрације и времена деловања (194, 195). Из тих разлога би се СНХ требао користити не само за иригацију канала корена, већ и за интерсеансну медикацију.

2.2.6. Способност продирања у дентинске тубуле

Пенетрација СНХ у дентинске тубуле се пре свега односи на мерење ефекта СНХ на бактерије у дентинским тубулима. Резултати истраживања су показали да дистанца од 100 μm до 300 μm у тубулима остаје лимит ефикасности СНХ (123, 125, 126, 128, 129, 150, 196, 197). Концентрација СНХ не игра значајну улогу у пенетрацији у дентинске тубуле (196), док додавање детергента може да повећа антимикробно дејство СНХ (150). Постоје многобројна истраживања о индиректном продирању СНХ у дентинске тубуле (123, 125, 126, 128, 129, 150, 196, 197), али нема расположивих студија које указују на стварно присуство СНХ у тубулима.

2.2.7. Деактивирање

Познато је да дентин смањује ефикасност антимикробног дејства СНХ. Ово је израженије када се користи нижа концентрација СНХ од 0,05%, док, када се користе концентрације веће од 0,5%, смањење је минимално (131). Механизам смањења ефикасности је непознат (198, 199). У истраживањима је показано да албумин говеђег серума и дентински матрикс могу да инхибирају СНХ више него дентин (199) а колаген, са друге стране, слабо инхибира његов ефекат (199). Међутим, комбиновање СНХ и EDTA доводи до инактивације СНХ (198, 199).

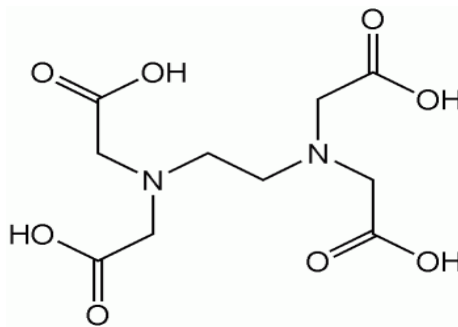
2.3. ЕТИЛЕНДИАМИНТЕТРАСИРЋЕТНА КИСЕЛИНА

Због свог протеолитичког деловања, NaOCl је у могућности да раствори органски, али не и неоргански део размазног слоја. Зато се у ендодонтској терапији NaOCl комбинује са хелаторима или киселинама ради оптимизирања ефикасности иригације. Досадашња истраживања су показала да СНХ не може ефикасно да раствори дентин, као и да NaOCl може да проузрокује ерозију (16, 104, 106, 107). Међутим, ниједан од ових ириганаса не може ефикасно растворити минералне компоненте дентина и уклонити размазни слој који се формира током инструментације канала корена. Само додавањем деминерализованог агенса, EDTA, може се остварити овај ефекат (200). Стога, раствор EDTA концентрације од 10-17% и pH 7-8 делује као

хелатор и користи се за уклањање неорганског дела дентинског зида и размазног слоја (9, 81).

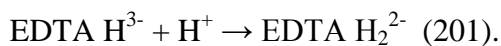
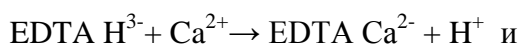
2.3.1. Хемијска структура и начин деловања

EDTA има хемијску формулу $C_{10}H_{16}N_2O_8$. Као безбојна, у води растворљива супстанца ствара стабилне комплексе са металним јонима као што су калцијумови јони, али и јони магнезијума, мангана и цинка. EDTA има више од једног пара слободних електрона и сваки од тих парова може формирати везу са централно постављеним металним јоном (слика 4) (201).



Слика 4. Хемијска структура EDTA

Када се дода дестилована вода на дентин, калцијум хидроксиапатит се дели у своје јонске компоненте, углавном калцијум и фосфат, док се не успостави равнотежа. Када се дода EDTA, хемијски се веже за калцијум проузрокујући даље растварање калцијум хидроксиапатита. Две истовремене реакције се јављају:



Како се те реакције настављају, кисели облици више дисоцирају и брзина деминерализације се успорава. Молекули EDTA вежу калцијум и декалцификују дентин (201-203).

2.3.2. Антимикробни ефекат

У ендодонцији, EDTA је најчешће коришћени раствор за уклањање размазног слоја. EDTA уклања размазни слој за мање од 60 секунди уколико оствари контакт са

зидом канала. Процењује се да је ефекат декалцификације на једном зиду канала око 50 μm , односно 100 μm у целом каналу што одговара врху инструмента број 10. EDTA има ограничену вредност као игриганс, јер испољава слаб антимикуробни ефекат (204). Када се упореди антимикуробни ефекат NaOCl и CHX са EDTA, раствор EDTA садржи компоненте које показују мању ефикасност (152). Поједини аутори сматрају да смањење броја бактерија после примене овог хелатора настаје због његовог ефекта на размазни слој пре него антисептичког деловања (205). У поређењу са физиолошким раствором, у једној *in vivo* студији уочено је да је раствор EDTA много ефикаснији у елиминисању бактерија из канала корена (206). Антисептици, као што су кватерна једињења амонијака се додају EDTA у циљу појачавања антимикуробног деловања (205). Додатком кватерног амонијевог бромида - цетримид (*Cetavlon*) развијен је EDTAC који показује сличан ефекат као EDTA, уз већу каустичност. EDTA се комбинује са уреа пероксидом и полиетилен гликолом, али ове пасте не спречавају растварање размазног слоја. У циљу појачавања ефекта чишћења раствору EDTA може да се дода и сурфактант (*Smear Clear*) (205). Активирање ириганса током испирања појачава ефекат чишћења. Међутим, важно је истаћи да ултразвучна активација, осим што изазива појачано акустично микрокретање течности, узрокује и повећање температуре раствора. Наиме, загревање раствора EDTA на температури 20-90°C смањује способност везивања јона калцијума (206).

2.3.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

EDTA смањује микротврдоћу дентина (207, 208) и узрокује ерозију (14). EDTA је хелатно средство који реагује са јонима калцијума из дентина и гради растворљиви калцијум хелат. У научним студијама показано је да EDTA декалцификује дентин до дубине од 20 до 30 μm за време од пет минута (207, 208). Резултати истраживања показали су да чак концентрација од 0,03% EDTA има декалцификујући ефекат на дентин, док са 10% EDTA ефекат је значајно већи (209). Обим декалцификације је повезан са продуженим временом контакта EDTA са подлогом. Време контакта је такође директно повезано са смањењем тврдоће дентина и дубине декалцификације, која би могла да достигне и до 50 μm (209-211). Девет минута после апликације, тврдоћа се може смањити на 25% (209) и с временом ефекат декалцификације престаје када сви молекули EDTA вежу калцијум (205-207). Дентин код пацијената старијих од 60 година подлеже већој деминерализацији или ерозији, што се може објаснити

чињеницом да дентин садржи мање органских компоненти (212). Такође, краткотрајно излагање дентина EDTA има негативан утицај на микротврдоћу (213, 214) и смањује отпорност дентина на притисак. Ерозијом дентина се обезбеђују чистији зидови канала без дебриса и бактерија, али са друге стране ерозија може представљати фактор ризика за настанак вертикалних фрактура корена (215). У истраживањима је уочено да када се EDTA убризга у мека ткива, инфламација је умерена (209). EDTA у концентрацијама изнад 0,5% депримира метаболичку активност ћелија, међутим није у стању да уништи колаген (216).

2.3.4. Цитотоксичност

Показало се да EDTA има већу цитотоксичност него NaOCl (217). Разлог може бити да NaOCl са губитком хлора брзо смањује ефикасност, а EDTA делује док су изоловани сви јони калцијума (80, 201). *Nygaard-Ostby* (218) је испитивао утицај 15% EDTA на хуману пулпу и периапексно ткиво зуба са виталном и некротичном пулпом. Резултати тог истраживања показали су да EDTA не доводи до оштећења ериапексног ткива 14 месеци после иницирања у периапексно ткиво, као и да његова примена у трајању од 28 дана не доводи до некрозе пулпе после пулпотомије. Забележен је цитотоксични ефекат EDTA на фибробласте и макрофаге који је дозно зависан (116, 219-221). Када се апликује у ткиво доводи до изражене иритације, која може бити присутна и 28 дана после примене EDTA (222).

2.3.5. Способност продирања у дентинске тубуле

Иако су слаба антимикуробна својства EDTA, у једној студији показано је да EDTA има способност да продре и елиминише бактерије у дентинским тубулима (129). Међутим, у студији *Ørstavik & Haapasalo* (197) показан је минимални или никакав утицај EDTA на тубуле. Ипак, EDTA као деминерализовани агенс може брзо да продире у дентинске тубуле до 20-30 μm . После дугорочног испирања, граница пенетрације може бити 50 μm (210). Ово је потврђено у више студија где је мерена пенетрација или изложеност дентинских тубула (209, 211, 213, 223). Ерозија дентина може лако настати са прекомерним испирања са EDTA (212), што значајно утиче на интертубуларни и перитубуларни дентин (211).

2.3.6. Деактивирање

Активност EDTA траје све док молекули киселине не вежу јоне калцијума (224). Због тога за потпуну инактивацију EDTA је потребано време. Показало се да EDTA смањује антимикробни ефекат NaOCl, међутим везивањем калцијума EDTA не мења ефикасност NaOCl (133, 134, 136).

2.4. КОМБИНАЦИЈЕ ИРИГАНАСА

У последњих неколико година на тржишту су се појавили комбиновани раствори за испирање који садрже више од једне активне компоненте. Најчешће представљају комбинацију антимикробног агенса (тетрациклина или СНХ), хелатора (EDTA или лимунске киселине) и детерџента (73). Површински активне супстанце-детерџенти се додају да би се смањио површински напон ириганаса, повећао контакт са зидовима канала и унапредила ефикасност. У појединим истраживањима показано је да додавање ових супстанци побољшава пенетрацију ириганаса у неинструментоване делове канала, убрзава замену постојећег раствора, повећавајући антимикробну ефикасност и ефекат растварања ткива (84). Сурфактант, агенс за влажење се најчешће додаје растворима као што су NaOCl, СНХ или EDTA. Стога, у ендодонтској терапији користе се нови комбиновани ириганси MTAD и QMiX (73). Постоји велики број *in vitro* студија у којима је испитивана њихова ефикасност (123, 125, 126, 151, 225-235), док *in vivo* студије недостају.

2.4.1. ДЕТЕРѢЕНТИ

Детерџенти или површински активни агенси обично се додају иригансима у циљу побољшања њихове ефикасности, смањењем површног напона раствора (231). Показало се да контактни угао NaOCl и дентина је значајно смањен чак и са малим додатком површински активног агенса. Овај додатак не мења друга својства NaOCl, као што су цитотоксичност, садржај слободног хлора и антимикробно дејство (236). Неколико студија, које су испитивале ефекат комбинованих ириганаса показале су да додавање детерџената смањује време потребно за убијање *E. faecalis* и елиминисање већег броја бактерија (158, 199, 237). Поред тога, њихова резидуална ефикасност је побољшана (237), дентински тубули су отворени (238) и способност ириганаса да продре и елиминисе бактерије у дентинским тубулима је значајно повећана (130, 150). Међутим, неки од тих налаза су оспорени у другим студијама (233, 234). Показано је да

неколико комбинованих ириганаса који садрже сурфактанте нису могли уколони биофилм који се формирао на површини дентина (233, 234). Међутим, постоје студије у којима је уочено да различите компоненте дентина могу бити одговорне за инхибицију активности ириганаса, али додавањем детерџента његова деактивација се може смањити (198, 199).

2.4.2. МТАД

МТАД је ириганс који представља мешавину антибиотика (тетрациклина), лимунске киселине и детерџента. У састав МТАД улазе доксициклин (3%), лимунска киселина (4,25%) и полисорбат (*Tween*) 80 детерџент (0,5%) (14). Као готов производ, МТАД се састоји из два дела, праха и течности који се мешају пре употребе. У ендодонтској терапији, МТАД се користи за завршну иригацију, односно за каналну дезинфекцију и уклањање размазног слоја. Тачан механизам деловања није познат, али ефекат на размазни слој се приписује антибиотику (тетрациклину) и лимунској киселини (239).

2.4.2.1. Антимикробни ефекат

Антимикробни ефекат МТАД потиче од доксициклина, јер нема довољно података о ефекту лимунске киселине на бактерије у каналу корена. Доксициклин је тетрациклин широког антибиотског спектра који свој бактериостатски ефекат испољава инхибицијом синтезе протеина (14, 19, 240). МТАД делује на G^+ аеробне и факултативно анаеробне бактерије које су доведене у везу с неуспешним ендодонтским лечењем. Посебно је ефикасан у елиминисању биофилма *E. Faecalis* након иницијалног испирања 1,3% NaOCl (240-242). У истраживањима показано је да антимикробни ефекат МТАД је слабији од NaOCl и CHX (14, 240, 241). То се може објаснити оксидацијом МТАД под дејством NaOCl (19). Међутим, у другим студијама уочено је да МТАД делотворнији у елиминацији бактерија из инфицираног коренског канала од 5,25% NaOCl (240). Он приликом разблажења од 200 пута још увек има антибактеријски учинак на *E. Faecalis* за разлику од NaOCl који га губи ако се разреди више од 32 пута (14, 243). У студијама *in vitro* уочено је да готово 40% коренских канала остаје инфицирано након употребе NaOCl као и супериорнији учинак МТАД који својим пролонгираним антимикробним деловањем смањује потребу стављања медикаментних уложака и вишесеансни ендодонтски третман (243). У клиничким условима, финална иригација МТАД није повезан са већом учесталашћу

постоперативног бола у поређењу са хемомеханичком инструментацијом уз примену NaOCl и EDTA (244), као ни са већим смањењем броја бактерија од оног који је постигнут хемомеханичком обрадом канала (245). Према протоколу, 5 ml MTAD се користи за финалну иригацију у трајању од 5 минута, после обраде канала и иригације 1,3% NaOCl (246).

2.4.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

MTAD је новије средство за уклањање размазног слоја. У истраживањима показано је да ефекат уклањања размазног слоја MTAD сличан комбинацији NaOCl и EDTA (14, 247, 248). Способност уклањања размазног слоја се приписује деловању лимунске киселине и доксициклина. Поред тога, постоје студије у којима је откривено да MTAD ефикасније уклања размазни слој у поређењу EDTA, нарочито у апексној трећини, при чему узрокује мањи ерозивни ефекат на дентин (247). Минималан ерозивни утицај на дентин има захваљујући ниском рН (2,5), не мењајући физичка својства дентина и повећавајући снагу везе. Главна разлика између EDTA и MTAD је велики афинитет доксициклина на дентин због којег постоји продужени антибактеријски ефекат. MTAD не поседује способност растварања органског ткива и његова примена се препоручује као финални ириганс после целокупне хемомеханичке обраде канала корена (246).

2.4.2.3. Цитотоксичност

MTAD је биокомпатибилан материјал (249-251). По спроведеним студијама, MTAD је имао мању цитотоксичност од еугенола, 3% водоник пероксида, пасте калцијум хидроксида, 5,25% NaOCl и EDTA (245). У истраживањима је такође показано да MTAD је цитотоксичнији од 2,63%, 1,31% и 0,66% NaOCl (252). Контраиндикован је код трудница, дојиља и деце испод осам година због дисколорацијског деловања доксициклина на зубе у развоју (249).

2.4.2.4. Способност продирања у дентинске тубуле

Детерцент у саставу MTAD смањује површински напон и олакшава пенетрацију раствора. Низак површински напон MTAD ($34,5 \text{ mJ/m}^2$) може да осигура потпунији контакт ириганса са дентином канала корена и тиме повећа способност дубљег продирања ириганса у дентинске каналиће, чиме осигурава ефикасније уклањање

размазног слоја, дезинфекцију канала, бољу и лакшу дифузију дејствених компонената интраканалних лекова (253).

2.4.2.5. Деактивирање

Смањена активност МТАД се може објаснити његовом оксидацијом под дејством NaOCl (243). Такође, ефикасност МТАД може бити смањена присуством серумских албумина у каналу корена (254).

2.4.3. QMiX

QMiX (смеша 2% СНХ, 17% EDTA и детерџента) је релативно новије средство за иригацију канала корена и на тржишту се појавио последњих неколико година. Представља мешавину различитих компоненти које испољавају антимикробно дејство, као и органо - и минералолитички ефекат на канални детритус и размазни слој (73). Препорука произвођача је да се користи као финални ириганс у трајању 60-90 секунди, после иницијаног испирања коренских канала са 5,25% NaOCl (225, 255). Уколико је NaOCl коришћен за иригацију, канал је неопходно испрати физиолошким раствором у циљу превенције нежељене интеракције раствора (73, 255). Још увек недостају подаци о његовој клиничкој ефикасности.

2.4.3.1. Антимикробни ефекат

QMiX испољава изражен антимикробни ефекат сличан 6% NaOCl, а супериорнији од 2% СНХ, МТАД или NaOCl примењеног у нижим концентрацијама у експерименталним условима (151, 225). QMiX је ефикасан у елиминисању *E. Faecalis* као 1% NaOCl, али показано је да брже уклања биофилм и елиминише бактерије од 2% СНХ и једнако добро као 2% NaOCl (151). У студији *Pai* и сар. (243) уочено је да QMiX ефикасан у елиминисању бактерија, али неефикасан у уклањању биофилма, што смањује његов свеобухватни антимикробни ефекат. Такође, *Ordinola-Zapata* и сар. (233) показали су да је QMiX раствор мање ефикасан у уклањању биофилма од 6% NaOCl, али има већи ефекат од 2% СНХ.

2.4.3.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

У студијама где је проучаван ефекат уклањања размазног слоја са QMiX раствором запажено је сличан или супериорнији од 17% EDTA (151, 228, 231), при чему његова предност у односу на EDTA је мањи ерозивни ефекат на дентин (230).

Уклањање размазног слоја са QMiX и EDTA може бити у вези са чињеницом да постоји слична јачина везе дентина и силера, после употребе ових ириганаса (228, 231). Поред уклањања размазног слоја, QMiX има способност да повећа влажност дентина захваљујући детергенту у свом саставу, док EDTA има слабији потенцијал влажења (229). У студији *Aranda-Garcia* и сар. (227) показано је да 17% EDTA узроковала већу ерозију дентина у односу на QMiX, док се редукција микротврдоће дентина након примене ових ириганаса није разликовала.

2.4.3.3. Цитотоксичност

QMiX има мању цитотоксичност од 17% EDTA, 2% CHX и 3% NaOCl (256). Иако су NaOCl и QMiX токсични за мезенхималне ћелије, резултати истраживања су показали да је излагање мезенхималних ћелија QMiX раствору имало значајно већи проценат преживљавања ћелија од NaOCl (257). Такође, SEM анализом су уочене минималне морфолошке промене на ћелијама које су биле изложене QMiX раствору (256). Са друге стране, у студији где је проучаван цитотоксични ефекат различитих ендодонтских ириганаса (5,25% NaOCl, 2% CHX, 17% EDTA, MTAD и QMiX) на мезенхималне ћелије, проценат преживелих ћелија је био значајно мањи у групама NaOCl, EDTA, MTAD и QMiX, у односу на групу CHX (258). QMiX раствор је имао нижу цитотоксичност у односу на MTAD и EDTA, а већу у односу на NaOCl и CHX, али његова цитотоксичност се мењала током времена у поређењу са другим растворима.

2.4.3.4. Способност продирања у дентинске тубуле

Истраживања о пенетрацији QMiX у дентинске тубуле се односи на испитивање његове антимикуробне ефикасности у току иригације, у различитим временским интервалима при чему се мерио број елиминисаних бактерија у тубулима (123, 125, 126). Показало се да је QMiX испољио своје антимикуробно дејство до исте дубине као 6% NaOCl, при чему су оба ириганса елиминисала бактерије целом дужином дентинских тубула у трајању од три минута. Поред тога, уочено је да бактерије биофилма старог један дан су биле елиминисане у тубулима пропорционално између QMiX и 6% NaOCl, али QMiX је био ефикаснији него 2% CHX и NaOCl у нижим концентрацијама (126). Међутим, испитивањем биофилма старог три недеље QMiX раствор је показао мању ефикасност од 6% NaOCl, али ипак је био ефикаснији од других ириганаса (123). У другој студији наводи се да способност бактерицидног деловања QMiX на биофилм

унутар дентинских каналића, након излагања 6% NaOCl у трајању од десет минута ефикаснија је од комбинације 6% NaOCl, 17% EDTA и 2% CHX (123, 126). Тај ефекат је уочен на дубини до 300 μm (125).

2.4.3.5. Деактивирање

Приликом испитивања антимикубног ефеката QMiX раствора подвргнутог интеракцији са дентином уочено је да његова ефикасност одложена, али његов антимикубни ефекат није у потпуности елиминисан. Иако се антимикубни ефекат непосредно блокира, са временом се врати антимикубно дејство QMiX (259).

3. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ИРИГАНАСА

Комбиновање два или више ириганаса се препоручује јер повећава ефикасност иригације (136, 155, 238). Мешање ириганаса може проузроковати деактивирање најмање једног од њих (132-136), па је потребно познавати могуће интеракције између ириганаса да би се спречило стварање чврстих продуката познатих као преципитат и да би се оптимизирао протокол иригације.

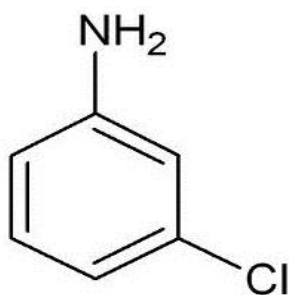
3.1. NaOCl и CHX

Установљена је интеракција између два најчешће коришћена ириганса у ендодонтској терапији, NaOCl и CHX, која се огледа у стварању наранцасто-браон преципитата. У једном од првих истраживања запажа се могућност реакције између NaOCl и CHX, при чему уочено је да хлорхексидин-хлорид повећава ефикасност иригације (155). Са друге стране, постоје студије у којима су ови резултати оспорени. Концензус је да ова мешавина доводи до формирања преципитата који је потенцијално токсичан (17, 23, 132, 139, 165, 260-264). Стога, тренутна реакција постоји и огледа се у промени боје раствора када се 2% CHX помеша чак и са врло ниским концентрацијама NaOCl (0,023%). Повећање концентрације NaOCl на само 0,19% доводи и до формирања видљивог преципитата чија се количина повећава са концентрацијом NaOCl (17). Уочена је промена боје раствора од светло до тамно браон, при чему је најтамнију пребојеност показао раствор са највећом концентрацијом NaOCl. Присуство преципитата у замућеном раствору је запажено тек након центрифугирања. Чак и да концентрација CHX буде десет пута мања од 0,2% CHX настаје тренутна реакција са

0,5% NaOCl (262, 263). У овој студији показано је да интеракција између NaOCl и CHX, као и стварање преципитата, не зависе само од концентрације NaOCl, већ и од концентрације CHX.

3.1.1. Преципитат и детекција парахлоранилина (*para-chloroaniline*) (*PCA*)

Промена боје овог раствора има и клинички значај јер може довести до дисколорације дентина а створени преципитат утиче на пенетрацију интраканалних медикамената у дентинске тубуле и квалитет адхезије силера за зидове канала (22, 265). Преципитат настаје у ацидо-базној реакцији у којој CHX, као киселина, има могућност предаје протона, а NaOCl је база која може прихватити протоне. Услед ове измене долази до стварања неутралног и нерастворљивог једињења, преципитата (17). Главни састојак преципитата, *PCA*, (17, 165), испољава токсичан ефекат, делује канцерогено на животиње (266) и потенцијално је канцероген за човека (267). Међутим, поједини истраживачи нису уочили да се у интеракцији ова два антисептика *PCA* ствара у већој количини (260, 261, 268), већ да долази до настанка других једињења. Ипак метаболизмом новостворених једињења долази до и стварања *PCA*. *PCA* може настати и у одсуству NaOCl, разлагањем CHX у присуству светлости и топлоте. Зато, постоје дилеме у погледу састава преципитата насталог мешањем NaOCl и CHX. На основу *X-ray* спектроскопије и секундарне масене спектрометрије, у саставу преципитата откривено је присуство хлоранилина који има хлор и амино групу везану за бензенев прстен (17) (слика 5).



Слика 5. Молекулска структура парахлоранилина

Овде може бити укључен било који од три изомера анилина (Cl (C₆H₄) H₂N), односно 2-хлороанилин, 3-хлороанилин и 4-хлороанилин, што чини парахлоранилин или *PCA*. Такође, ови налази су потврђени коришћењем технике диазотизације, којом се детектује присуство ароматичних амина. Закључено је да су хлороанилин и ароматични

амин заиста били присутни (165). У наредној студији, коришћењем гасне хроматографије са масеном спектрометријом резултати су показали да 2-хлороанилина и 3-хлороанилин нису били присутни, само *PCA* је детектован у талогу (269). Контрадикторни резултати добијени су када се талог анализирао нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом и није уочена мерљива количина *PCA* (260). У другој студији, коришћењем Бајлштајнов теста растворљивости показано је присуство хлора и анилина и поново потврђен параположај хлора, применом *NMR* спектроскопске анализе (264). Такође, једна група аутора је закључила да коришћењем једнодимензионе и дводимензионе *NMR* спектроскопије су идентификована два субституисана једињења бензена, као што су пара-хлорофенилуреа (*PCU*) и пара-хлорофенилгванидил-1,6-дигванидил-хексан (261). Како је *PCA* нестабилан, то може бити разлог немогућности његове детекције. У окружењу које омогућава да узорак испарава, *PCA* се не може открити. За разлику од ових налаза, користећи секундарну масену спектроскопску анализу (*TOF-SIMS*), уочено је да када се узорак преципита охлади и спречи испаравање, велики пораст *PCA* је откривен, с обзиром да детекција *PCA* је смањена на собној температури (139). Примарна електроспреј јонизацијска масена спектрометрија (*ESI-MS*) је још једном потврдила присуство *PCA* (126). Такође, гасном хроматографијом/масеном спектрометријом (*GC/MS*) потврђено је присуство *PCA*, користећи три дела доказа. Вршењем електроспреј јонизације са квадропол масеном спектрометријом (*ESIQ-TOF-MS*) није детектован сигнал који одговара *PCA* (132).

3.1.2. Хемијска структура *PCA*

Количина створеног *PCA* је директно пропорционална концентрацији NaOCl који интерагује са CHX (17). Сирћетна киселина може растворити преципитат али промена боје и даље постоји, што се може објаснити чињеницом мање поларности производа и могућношћу стварања преципитата у воденом раствору (262). Сматра се да преципитат и *PCA* настају ацидо-базном реакцијом. CHX има киселу реакцију (pH 5,5-6,0) и способност да донира протоне, а NaOCl је база која може прихватити протоне, са *PCA* који остаје део тог преципитата (17, 271). Иницијална структура CHX је показала да стварање преципитата се постиже хлорисањем гванидног азота (132). Алтернативно у киселом раствору, растварач нападом на угљеник са дефицитарним електронима у CHX , доводи до тетрахедарског интермедијата са излазним групама које су *PCA* или амонијак. *PCA* лакше напусти групу, зато што амонијак је више у основи у односу на

ароматичне аminer из *PCA*. Те реакције имају облик пара-хлорфенилбигванид-амидиноуреe или пара-хлорфенилгванид-амидино-парахлорфенил-уреe.

3.1.3. Токсичност *PCA* и преципитата

Резултат ацидо-базне реакције CHX и NaOCl је формирање нерастворљивог преципитата, који се састоји од *PCA*, за кога је показано да делује токсично (123, 272). Међутим, једна студија је показала нетоксичност *PCA* (273). Када је преципитат тестиран у експериментима субкутане имлантације код пацова, показало се да је више токсичан него CHX или NaOCl , посебно у краткорочном тестирању (25). *PCA* је показао цитотоксичан и карценогени ефекат на животиње (25, 274). Такође, сматра се да је потенцијално карценоген за човека и може изазвати метхемоглобинемiju (274).

3.1.4. Превенција

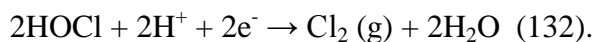
Да би се спречио настанак преципитата и евентуално пребојавање зуба, не треба дозволити да NaOCl и CHX дођу у непосредан контакт. Међутим, то није увек могуће. У неколико студија где су истраживане методе превенције формирања преципитата (132, 134, 264, 270, 275). Показало се да заостали NaOCl после испирања канала треба уклонити дестилованом водом и канал корена посушити папирним поенима пре иригације са CHX . Метода примене папирног поена за уклањање резидуалног NaOCl из канала, може да смањи али не елиминише број оклудираних тубула преципитатом у каналу корена (275). Други метод за превенцију настанка преципитата је употреба интермедијарног испирања између два ириганса (22, 264, 270). Предложено је да се лимунска киселина користи пре финалног испирања са CHX , при чему је доказано да су дентински тубули остали отворени без формирања преципитата (22). Међутим, *PCA* је још увек била присутна (270). У циљу превенције стварања преципитата предложена је дестилована вода, као још један ириганс који може да спречи или смањи формирање талоба (132). Резултати истраживања су показали да ако се користе физиолошки раствор или дестилована вода пре CHX , дебљина преципитата се смањује у поређењу са дентином када није коришћено интермедијерно наводњавање. У појединим лабораторијским студијама доказано је да алкохол и сирћетна киселина могу да спрече стварање преципитата (262, 276). До скора је и физиолошки раствор био предлаган као погодан међу-ириганс који успешно „раздваја“ растворе за испирање канала корена зуба (264). Међутим, између CHX и физиолошког раствора може постојати интеракција која се огледа у стварању нерастворљивог беличастог преципитата (132).

3.2. NaOCl и EDTA

Када се помеша NaOCl са EDTA јавља се тренутно ослобађање хлора. Преципитат се не формира, већ су примећени само мехурићи (132-135). Губитак активног хлора је брз. Чак и са малом количином EDTA изгубљено је до 80% хлора (133). Поред тога, може се детектовати пад рН вредности (277). Сматра се да EDTA индукује повећање негативних јона уклањањем Na^+ из NaOCl, што доводи до смањења рН и значајно утиче на смањење ефекта растварања ткива.

3.2.1. Хемијска реакција

Мехурићи углавно настају када се EDTA помеша са NaOCl, а виде се као последица отпуштања хлора (132-135). Следеће две реакције су одговорне за овај поступак:



3.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

Губитак хлора из раствора NaOCl утиче на способност растварања остатака пулног ткива унутар канала. У студијама у којима је испитиван протеолитички ефекат NaOCl на пулно ткиво свиња и говеда запажа се потпуно растварање ткива, док додавањем EDTA ткива нису растворена. Ово се може објаснити чињеницом да додавање хелатора доводи до деактивације NaOCl (136, 137). У интеракцији EDTA и NaOCl, хелатор задржава способност везивања Са јона, огранолоитички ефекат се NaOCl смањује и у раствору нема слободног хлора (133, 135, 136). Стога, у клиничким условима ова два ириганса треба да се користе самостално. Ефикасност EDTA да уклони размазни слој није нарушена раствором NaOCl (134). NaOCl није у стању да спречи деминерализујуће дејство EDTA на перитубуларни и интертубуларни дентин, јер доводи до веома споре деградације овог хелатора (EDTA). Због тога се препоручује као финални ириганс после EDTA (269).

3.2.3. Превенција

Интермедијарно испирање канала корена дестилованом водом се препоручује да се спречи или смањи реакција између NaOCl и EDTA (132). Други начин да се избегне

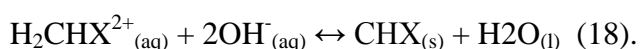
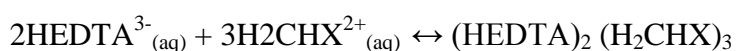
реакција је обилно испирање са NaOCl после употребе EDTA, да би се уклонили остаци хелатора (133, 134).

3.3. CHX и EDTA

Комбиновање EDTA и CHX је праћено стварањем беличастог или млечно-белог преципитата. У једној студији, тренутна реакција је уочена формирањем нерастворљивог ружичастог прашкастог преципитата (277). Анализирајући преципитат, применом атомске апсорпционе спектрометрије, показано је да преципитат садржи EDTA и CHX у односу 1:1. Створени преципитат није резултат хемијске деградације CHX, већ представља његову со. Постоје докази да се овај преципитат не састоји од PCA, већ га чине соли које настају неутрализацијом катионског CHX и анионског EDTA (277). У студијама које су детаљније испитивале преципитат, применом течне хроматографије високих перформанси, преципитат је описан да садржи 90% EDTA или CHX, без деградације CHX и стварања PCA (18). Слично, у другој студији, применом масене спектрометрије за анализу преципитата откривено је присуство оригиналних једињења у преципитату, што је поново указало на кисело-базну реакцију без деградације CHX (132). Иако нетоксичан са хемијског аспекта, овај преципитат може бити потиснут у периапексни простор или представљати сметњу дефинитивном пуњењу (275).

3.3.1. Хемијска реакција

Следеће једначине описују реакцију која настаје када се EDTA помеша са CHX:



Обе реакције могу довести до формирања чврсте супстанце која садржи CHX. Међутим друга реакција, током формирања морала би да садржи EDTA (18).

3.4. NaOCl и MTAD

NaOCl је показао да реагује са MTAD у присуству светлости, узрокујући браон дисколорацију дентина (14). Наиме, до данас рађена је само једна *in vitro* студија у којој се запажа формирање жутог преципитата, непознатог хемијског састава, дуж зидова канала корена када је MTAD коришћен за финално испирање након NaOCl (19). Такође,

аутори су приметили црвено-љубичасто бојење дентина након излагања светлости, а после иницијалног испирања канала корена са 1,3 % NaOCl праћеног са финалним испирањем MTAD (243). Познато је да постоји реакција између NaOCl и лимунске киселине, која је довела до формирања белог преципитата, што је указало на сложену интеракцију између NaOCl и MTAD која захтева даља истраживања за проверу сигурности и корисности ове комбинације ириганаса (19).

3.5. NaOCl и QMiX

Комбиновање NaOCl и QMiX може да изазове промену боје раствора али без формирања преципитата, па је препорука произвођача да се између ова два ириганса канал корена испере физиолошким раствором (278). Осим тога, постоје две објављене студије са супротним налазима о ставарању преципитата, после интеракције NaOCl и QMiX (20, 27), а у којима *PCA* није откривен као последица смеше раствора. Међутим, хемијски састав посматраног преципитата још увек није у потпуности разјашњен.

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

Ограничен број *in vitro* студија о интеракцији између појединих ириганса који се користе у савременој ендодонтској терапији, са једне, а са друге стране чињеница да последице тих интеракција, које карактерише стварање преципитата, могу имати утицај на исход ендодонтске терапије поставили смо следеће циљеве истраживања:

1. Утврдити присуство и количину преципитата на унутрашњем зиду дентина у коронарној, средњој и апексној трећини канала корена након иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 2% CHX + 17% EDTA, 5,25% NaOCl и **QMiX** и 1,3% NaOCl и MTAD применом *SEM*.
2. Утврдити број затворених дентинских тубула у коронарној, средњој и апексној трећини канала корена након иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 2% CHX + 17% EDTA, 5,25% NaOCl и **QMiX** и 1,3% NaOCl и MTAD применом *SEM*.
3. Утврдити дентинску пропустљивост у коронарној, средњој и апексној трећини канала корена након иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 2% CHX + 17% EDTA, 5,25% NaOCl и **QMiX** и 1,3% NaOCl и MTAD.
4. Упоредити количину преципитата, број затворених дентинских тубула и дентинску пропустљивост између испитиваних група (група 1, 2, 3, 4, 5).
5. Утврдити и упоредити хемијски састав преципитата у апексној и коронарној трећини код испитиваних група применом *EDS*.
6. Испитати присуства *PCA* у саставу преципитата применом танкослојне хроматографије (*Thin Layer Chromatography (TLC)*), нуклеарно-магнетно-резонантне спектроскопије (*Nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR)*) и инфрацрвене спектроскопије (*Infrared spectroscopy (IR)*).

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

Иригација канала 5,25% NaOCl и 2% СНХ доводи до стварања веће количине преципитата на површини дентина канала корена, него иригација 5,25%/1,3% NaOCl и EDTA + СНХ, QMIX или MTAD, смањујући број отворених дентинских тубула и пермеабилност дентина у свим коренским трећинама. Мешањем раствора који садрже СНХ са другим иригансима праћено је стварањем преципитата који не садржи *РСА*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

Истраживање се састојало из два дела. Први део је дизајниран као експериментална рандомизована студија на материјалу хуманог порекла *in vitro*. У овом делу је испитиван утицај преципитата, насталог у интеракцији различитих ириганаса, на површину дентина и дентинске тубуле екстрахованих хуманих зуба, као и хемијски састав створеног преципитата.

Други део је дизајниран као експериментална *in vitro* студија у којој је испитивано присуство *РСА* у преципитату насталом комбиновањем различитих раствора за иригацију канала корена. Етички одбор Медицинског факултета у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву је одобрио спровођење истраживања (Број: 01-3-88/2015). Јуниор пројекат (Бр. 2016/06) Факултета Медицинских наука Универзитета у Крагујевцу омогућио је суфинансирање ове студије.

4.2. ОДАБИР И ПРИПРЕМА УЗОРКА

4.2.1. Одабир узорка

Узорак је сачињавало сто педесет једнокорених интактних горњих зуба екстрахованих из пародонтолошких разлога. Критеријуми за укључивање у истраживање су били: интактан зуб, који претходно није ендодонтски лечен и који нема коронарне рестаурације. Зуби са каријесним лезијама, незавршеним растом корена, као и они где је на радиограмима уочено постојање калцификација, интерних ресорпција или постојање сложене каналне морфологије су искључени из истраживања. Присуство једног, централно постављеног канала без анатомских варијација коморе пулпе потврђено је радиографисањем. Након уклањања меких ткива са површине корена екстраховани зуби су чувани у физиолошком раствору са додатаком 0,2% тимола на температури од 4°C до почетка експеримента.

Крунице зуба су одвојене дијамантским диском да би се добили коренови стандардизоване дужине од 14 mm. У зависности од врсте ириганаса коришћеног за финално испирање канала корена зуби су методом случајног узорка (таблице случајних бројева) подељени у пет група ($n=30$):

1. **СНХ група** (2% СНХ раствор, *Consepsis, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*) (слика 6.1)
2. **EDTA + СНХ група** (17% EDTA, *ENDO-SOLution, CerKamed, PPH CerKamed, Stalowa Wola, Poland* /2% СНХ раствор (*Consepsis, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*)) (слика 6.2)
3. **MTAD група** (*MTAD, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*) (слика 6.3)
4. **QMiX група** (*QMiX, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*) (слика 6.4)
5. **Дестилована вода** (контролна група)



Слика 6.1. 2 % СНХ раствор (*Consepsis, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*)



Слика 6.2. 17% EDTA раствор (*ENDO-SOLution, CerKamed, PPH CerKamed, Stalowa Wola, Poland*)



Слика 6.3. MTAD (*Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*)



Слика 6.4. QMiX (*Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*)

4.2.2. Инструментација канала корена

Инструментацију канала корена је спровео један доктор, специјалиста ендодонције. За одређивање радне дужине канала коришћена је ручна К-турпија број #15 (*Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*). Турпија је пласирана у канал корена све док врх инструмента није досегао апикални отвор. Затим је та дужина скраћена за један милиметар и добијена вредност је коришћена као **радна дужина**. Апекс сваког корена је након тога запечаћен розе воском како би се спречило истискивање ириганса преко апекса током обраде канала.

Канали су препарисани крунично-апексном тзв. “*crown-down*” техником, коришћењем машинских никл-титанијумских *Protaper Universal* инструмената (*Dentsply, Maillefer, Switzerland*) мењаних после сваког петог корена (према упутству произвођача). Величина апексне препарације у свим групама је износила 40/0.06 (инструмент F4). Покретање инструмената вршено је помоћу електричног мотора *X-Smart* (*Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) и редукиционог микроколењака (16:1), са уједначеном брзином ротације од 300 обртаја у минути и контролом обртног момента од 1,4 Ncm.

После сваке инструментације канал је испиран са 1ml 5,25% раствора NaOCl, осим у MTAD групи где је коришћен 1,3% NaOCl, према преопоруци произвођача. За испирање канала корена примењивана је игла величине 27G (*Endo-Eze, Ultradent, South Jordan, UT, USA*) која је постављана 1 mm краће од радне дужине и у току инцирања ириганса померана апексно-крунично. Након завршене инструментације сви канали су испирани са 5 ml 17% EDTA у трајању од пет минута у циљу уклањања размазног слоја, а затим и дестилованом водом, да се уклоне остаци раствора EDTA. Након тога коренови су испирани на следећи начин:

1. CHX група: 5 ml 5,25% NaOCl 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml 2% CHX 2 минута
2. EDTA + CHX група: 5 ml 5,25% NaOCl 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml 17% EDTA 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml 2% CHX 2 минута
3. MTAD група: 5 ml 1,3% NaOCl 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml MTAD 2 минута

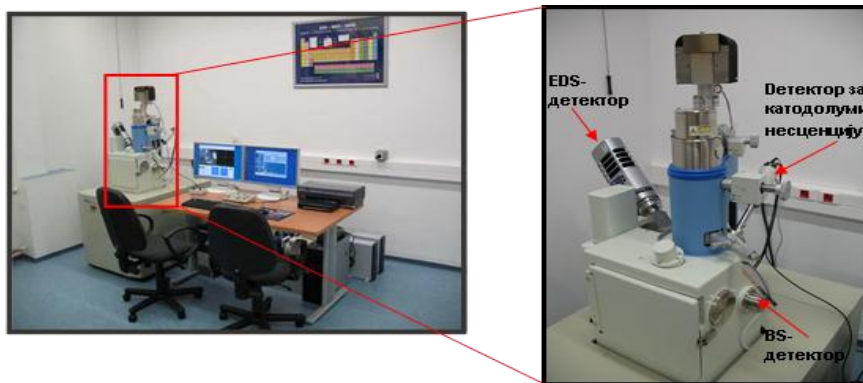
4. QMiX група: 5 ml 5,25% NaOCl 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml QMiX 2 минута

5. Контролна група: 5 ml 5,25% NaOCl 2 минута + 10 ml дестиловане воде 2 минута + 5 ml дестиловане воде 2 минута.

Након завршене иригације, канали су посушени папирним поенима (*Paper Points, Dentsply, Maillefer, Switzerland*).

4.3. SEM АНАЛИЗА УЗОРАКА

SEM анализа узорака канала корена је урађена на Рударско-геолошком факултету, Универзитета у Београду, Србија (слика 6.7).



Слика 6.7. Лабораторија за SEM-EDS (лево); JEOL JSM-6610LV микроскоп са приказаним детекторима (десно)

4.3.1. Припрема узорка

Осамнаест узорака из сваке групе је одбарано за испитивање утицаја различитих финалних ириганса на површину дентина. Дијамантским диском је направљен танки, уздужни рез са букалне и лингвалне површине корена водећи рачуна да не дође до перфорације канала. На површини корена усечени су и плитки хоризонтални жлебови на растојању од **два, седам и дванаест mm од врха корена**, како би се за сваки узорак прецизно дефинисала тачка посматрања по трећинама канала. На тај начин је искључена и пристрасност посматрача при одабиру регије за посматрање. Уздужно цепање зуба је урађено помоћу малог длета и чекића, постављеног у формиран уздужни

урез. Половина корена која се правилније одломилa и на којој нису била присутна оштећења је коришћена за даљу анализу. Одабрана половина узорка је очишћена од прашине, влакана, папира, замашћених делова и отисака прстију и затим дехидрирана раствором етанола у трајању од неколико минута у ултразвучној кади, постепено повећавајући концентрацију раствора (25%, 50%, 75% и 100%) (слика 6.8). Узорци су затим напаривани златом дебљине 20 nm $19,32 \times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$ (*SCD050 Sputter Coater; LEICA, TO, Japan*) са циљем повећања електропроводљивости односно постизања квалитетније структуре слике (слика 6.9). Узорак је постављен на алуминијумске носаче помоћу лепљиве траке и анализирани SEM-ом (*SEM, JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan*) (слика 4.10 и 4.11).



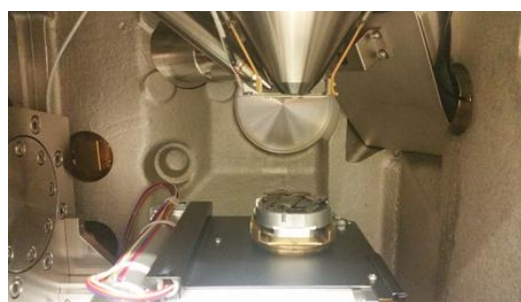
Слика 6.8 Ултразвучна када за припрему узорка



Слика 6.9 Уређај за напаривање узорка (*SCD050 Sputter Coater; LEICA, TO, Japan*)



Слика 6.10. Алуминијумски носач узорка



Слика 6.11. SEM уређај за посматрање узорка (*SEM, JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan*)

Површина дентина у круничној, средњој и апикалној трећини корена је анализирана при увеличању од 500x, 2.000x и 4.500x у фази висине од 10mm и напону 15kV.

За утврђивање присуства преципитата у дентинским тубулима додатно је анализирано десет коренова зуба, по два из сваке групе. Уграђивани су у смолу и након тога попречно пресечени на три, шест и девет mm од врха користећи дијамантски диск и мањи број обртаја. Узорци су дехидрирани коришћењем растућих концентрација етанола (25%, 50%, 75% и 100%), постављени на алуминијумски држач (слика 6.12), напаривањем превучени златом и на крају анализирани SEM-ом (*JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan*) при увећању од 3 700× до 6 500×.



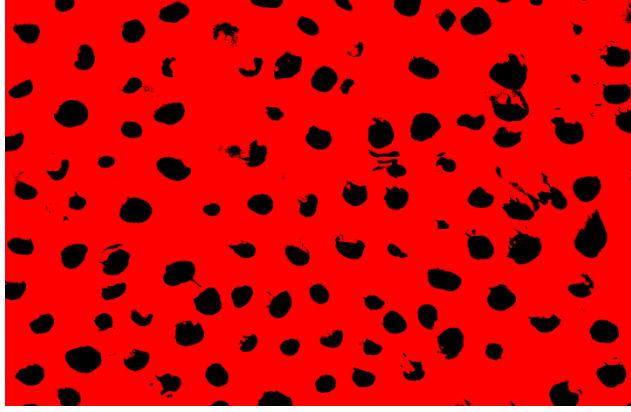
Слика 6.12. Алуминијумски носач за посматрање узорака под SEM-ом

4.3.2. Одређивање количине преципитата на површини дентина канала корена

Три микрофотографије направљене су при увећању од 2000x у коронарној, средњој и апексној трећини корена, укупно девет слика по узорку, односно укупно 162 слике по групи. Микрографије су сачуване у *TIFF* формату. Репрезентативна подручја сваке трећине канала корена су анализирана помоћу рачунарског програма *Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems*. Слике су стандардизоване на величину 47μm x 63μm и одређен је број пиксела целокупне слике. Затим је помоћу магнетног показивача означена површина слике са насталим преципитатом и одређен је број пиксела. Дељењем ових двеју вредности израчунат је проценат преципитата за сваку слику.

4.3.3. Одређивање броја потпуно затворених дентинских тубула канала корена

Број потпуно затворених дентинских тубула је одређиван на истим микрофотографијама које су коришћене за SEM анализу преципитата. Бројање тубула рађено је помоћу компјутерског програма за обраду микрофотографија- *ImageJ 1.48V (Java 1.7.0 71; Wayne Rasband National Institutes of Health, USA)*. Број затворених тубула, одређен у односу на константну јединицу површине, је изражен у процентима (слика 6.13).



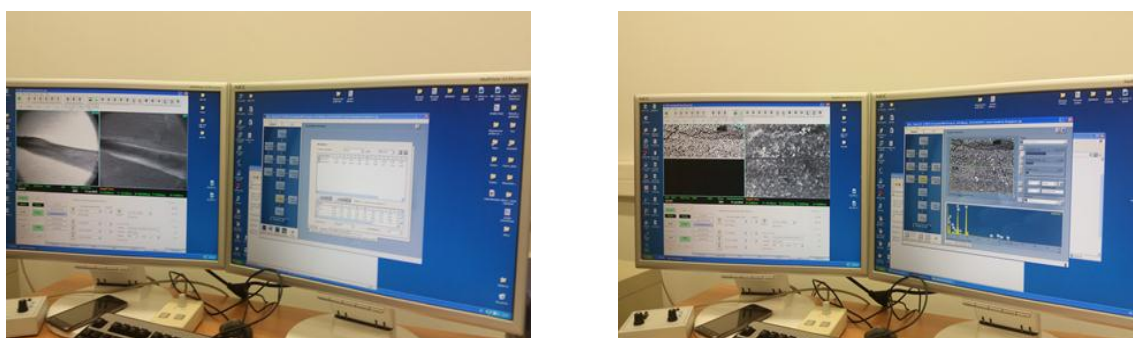
Слика 6.13. Шематски приказ микрографије (увеличање 2000x) за бројање отворених (црна) и затворених дентинских тубула (црвена)

4.4. ИСПИТИВАЊЕ ПЕРМЕАБИЛНОСТИ ДЕНТИНА

Преосталих педесет узорака је коришћено за испитивање утицаја преципитата на пермеабилност дентина канала корена зуба. Коренови су обложени полимеризујућом епоксидном смолом (*Brascola Ltda; São Bernardo do Campo, SP, Brazil*) остављајући слободан отвор канала, а затим потопљани у 0,2% раствор Родамина Б (*Rhodamine B*). Након 24 часа, су континуирано испирани под млазом текуће воде током наредна 24 часа. Након тог периода смола је уклоњена оштрим ножем а коренови су положени у полиестарску смолу. Сваки корен исечен је на хоризонталне дискове дебљине од 1 mm помоћу машине за сечење, уз примену малог броја обртаја и хлађење воденим млазом (*Extec Labcut 1010, Enfield, CT*). Сви пресеци су исполирани са силицијум карбидним брусним папирима како би се добила равна површина. Из сваке трећине корена изабран је насумично по један хоризонтални диск, најчешће из средњег дела трећине који је скениран (*Epson Perfection 1240U skener, Epson Corp., Tokyo, Japan*) с резолуцијом од 400dpi и анализиран помоћу софтвера *ImageLab 4.1 (Bio Red, Tokyo, Japan)* у циљу одређивања породора боје. Продор боје у дентинске каналиће изражен је као проценат површине у коју је пенетрирала боја у односу на укупну површину трећине корена.

4.5. ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ПРЕЦИПИТАТА НА ПОВРШИНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА

Преципитат на површини дентина канала корена зуба испитиван *SEM*-ом је даље подвргнут *EDS* анализи у циљу одређивања хемијског састава преципитата. Количина елемената **Ca, P, C, O, Mg, Cl, Na и N** у преципитату сваког узорка је мерена у две тачке дуж канала корена, у коронарној и апексној трећини (слика 6.14). У контролној групи *EDS* анализом је одређен хемијски састав дентина канала корена. Количина елемената у саставу преципитата односно дентина (контролна група) је изражена у процентима.



Слика 6.14. Шематски приказ за мерење количине хемијских елемената у преципитату

4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ *PCA* У ПРЕЦИПИТАТУ

Одређивање присуства *PCA* у преципитату је обављено на Институту за хемију Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, Србија.

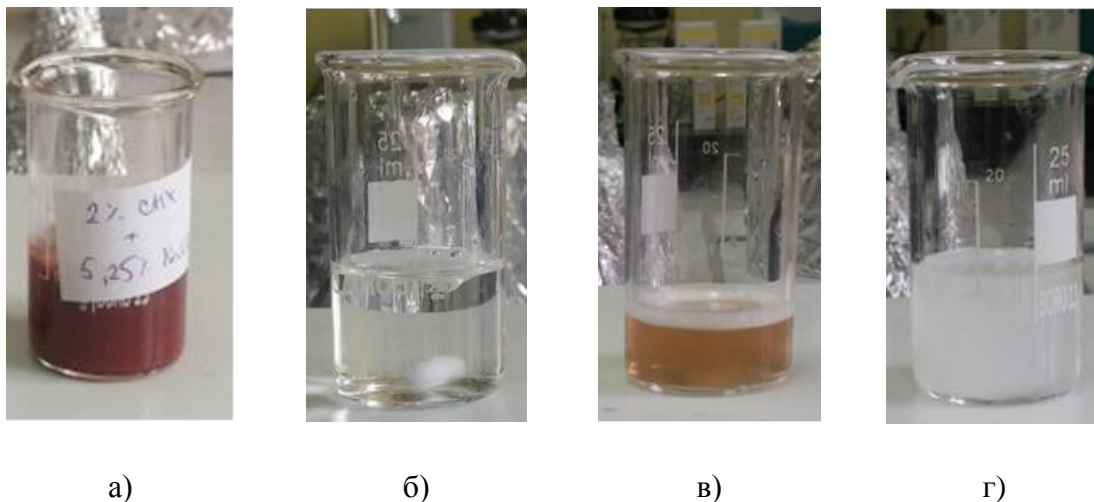
4.6.1. Хемикалије и растварачи

У студији за хемијску анализу *PCA* коришћени су комерицијално доступни раствори за иригацију (5,25% NaOCl, 2% CHX, 17% EDTA и QMiX), као и друге хемикалије потребне за анализу (парахлороанилине, етил-ацетат, хексан, натријум сулфат и денатурисани диметил-сулфоксид (*DMSO-d6*, *Sigma-Aldrich*, *Sent Luis*, *Mizuri*, *SAD*). Све хемикалије су биле без аналитичке чистоће реагенаса и употребљене су без даљег пречишћавања. Експеримент је обављен на собној температури (25°C).

4.6.2. Комбиновање и мешање ириганаса

Помешано је 5 ml 5,25% NaOCl са 5 ml 2% CHX, 17% EDTA или QMiX, а 2% CHX раствор са 17% EDTA. Сви ириганси су измешани у односу 1:1 (в/в), а добијене

смеше су квалитативно анализирани на промену боје, стварање преципитата и/или формирање мехурића. Визуелни аспект мешања ириганаса је приказан на слици 6.15.



Слика 6.15. Визуелни аспект интеракције између ириганаса: 5,25% NaOCl и 2% CHX (а); 5,25% NaOCl и 17% EDTA (б); 5,25% NaOCl и QMiX 2% (в); CHX и 17% EDTA (г);

4.6.3. Одређивање *PCA*

Преципитат настао мешањем ириганаса је издвајан стандардном процедуром (три пута помоћу 15 ml етил-ацетата), да би се преципитат превео у органски растварач. Тако издвојен органски слој је одвојен и посушен преко анхидрованог натријум сулфата (28). Растварач је уклоњен под снажним притиском и добијен је чврст преципитат који је анализиран помоћу *TLC*, $^1\text{H-NMR}$ и *IR*.

4.6.3.1. *TLC* анализа

За *TLC* анализу је коришћен силико гел дијаметра 60 mm који је постављен по алуминијумским плочама дебљине 0,2 mm. Десет милиграма чврсте супстанце је растворено у 5 ml етил ацетата. Две капи одговарајућег раствора су убризгане на *TLC* плочу. У близини овог места, две капи раствора добијене растварањем 10 mg *PCA* у 5 ml етил-ацетата су убризгане као стационарна фаза а плоча постављена у *TLC* резервоар који садржи етил-ацетат/хексан мешавину у односу 1:2 (v/v) као покретна фаза.

4.6.3.2. ¹H-NMR анализа

Преципитат и 20 mg PCA су растворени у 0,7 ml DMSO-*db* и пренети у 5 mm NMR епрувету. ¹H-NMR спектри су бележени на 25°C у спектрометру (*Varian Gemini 2000 NMR Spectrometer Systems*) на 200 MHz. Хемијска померања су изражена у ppm (δ) и скаларне спојнице су изражене у Hz.

4.6.3.3. IR анализа

IR спектри су одређени помоћу KBr диск технике (*PerkinElmer Spectroscopy, Waltham, MA*), спектрометром у распону 4000- 4500 cm⁻¹.

4.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

Величина узорка за оцену разлике у количини створеног преципитата између група је одређена на основу истраживања *Arslan* и сар. (20) у којем је испитивана интеракција NaOCl и CHX и QMiX раствора (независне варијабле) у стварању наранцасто-браон преципитата (зависна варијабла). Узимајући у обзир да у поменутој студији у 5,2% случајева није забележено ставрање преципитата у групи где је коришћена комбинација NaOCl и CHX, односно у 49,1% случајева где је коришћена комбинација NaOCl и QMiX раствора одређена је величина узорка од по најмање 18 зуба у свакој групи, при статистичкој снази теста од 80% (грешка II типа) и нивоом значајности од 5% (грешка I типа) (*G*Power 3.1*).

4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података је урађена у статистичком програму SPSS 20.0 (*IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Резултати су приказани у облику средњих вредности и стандардних девијација. За поређење разлика у количини талога, броју затворених дентинских тубула и хемијском саставу преципитата (*Kolmogorov–Smirnov test* $p < 0,05$) између и унутар група је коришћен *Kruskal–Wallis test*, са *Dunn post hoc* анализом и *Mann-Whitney test*. Разлике у пенетрацији боје (*Kolmogorov–Smirnov test* $p > 0,05$) између група су одређене применом једносмерне анализе варијансе (АНОВА), са *post hoc*

анализом коришћењем *Tukey's* теста. Ниво статистичке значајности дефинисан је као 5% (праг значајности $p < 0,05$).

5. РЕЗУЛТАТИ

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Количина преципитата формираног на површини дентина канала корена – SEM анализа

SEM анализом је показано да је после различитих протокола иригације на површини дентина формиран преципитат у свим испитиваним групама, осим контролне, где преципитат није уочен (слика 7.1). Количина формираног преципитата на површини дентина, по каналним трећинама је приказана у табели 1.

Табела 1. Просечне вредности ($\pm SD$) количине преципитата (%) формираног на површини дентина канала корена након различитих протокола иригације

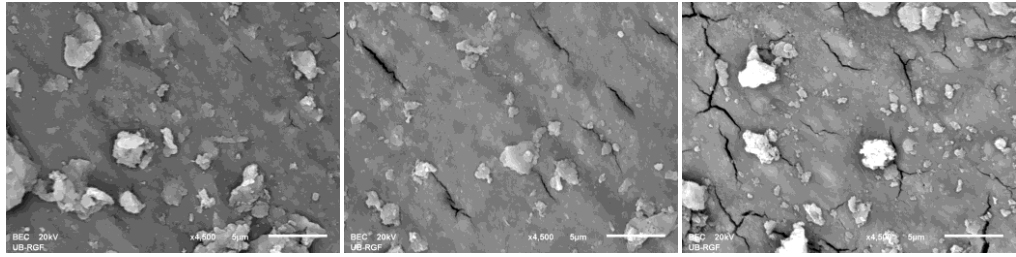
Трећина Канала	СНХ група	ЕДТА+СНХ Група	QMiX група	MTAD група
Коронарна	13,13 \pm 13,47 ^{Aa}	7,30 \pm 4,92 ^{ABa}	4,34 \pm 3,04 ^{ABa}	4,69 \pm 5,02 ^{Ba}
Средња	11,81 \pm 14,23 ^{Aa}	6,79 \pm 6,54 ^{ABa}	3,85 \pm 4,12 ^{Ba}	4,30 \pm 4,67 ^{ABa}
Апексна	10,07 \pm 5,96 ^{Aa}	6,70 \pm 4,49 ^{ABa}	3,57 \pm 4,47 ^{BCa}	3,66 \pm 4,92 ^{Ca}

Средње вредности са истим великим словима (ред) или малим словима (колона) нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

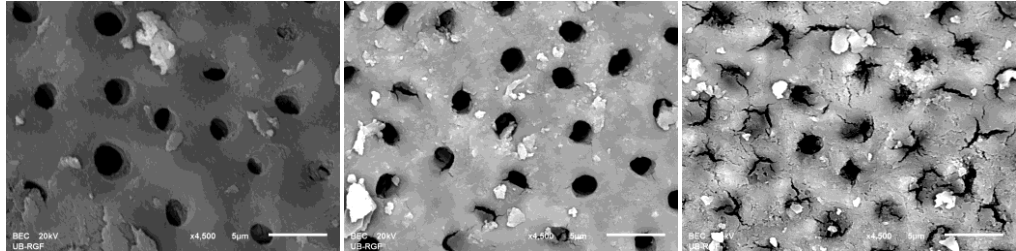
Највећа количина преципитата је забележена у СНХ групи. Анализом података је показано да је количина преципитата у овој групи била значајно већа у односу на MTAD групу ($p < 0,05$) у коронарој трећини и поређено са QMiX групом у средњој трећини ($p < 0,05$). У апексној трећини, преципитат формиран у СНХ групи био је значајно већи од оног у QMiX и MTAD групи ($p < 0,05$). Значајна разлика у количини преципитата је забележена у апексној трећини и између EDTA+ СНХ и MTAD групе ($p < 0,05$).

Посматрано по трећинама канала корена, највећа количина преципитата је уочена у коронарној а најмања у апексној трећини у свим групама, али та разлика није достигла статистичку значајност ($p > 0,05$).

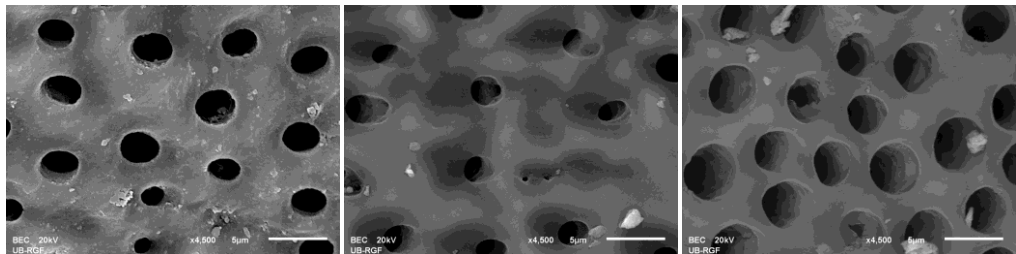
а) CHX група



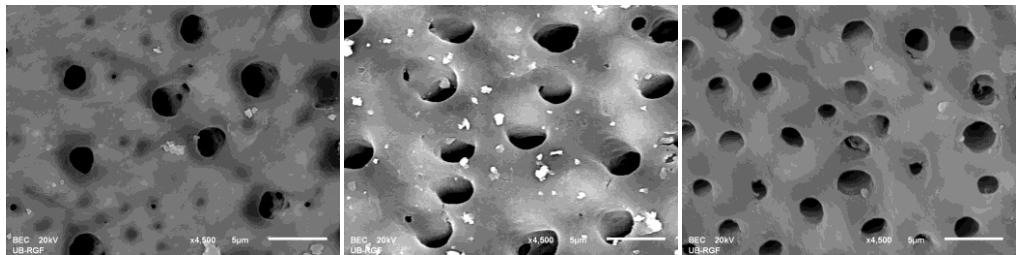
б) CHX + EDTA група



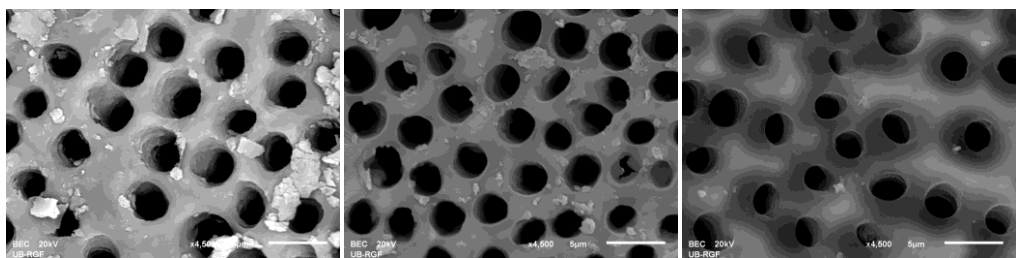
в) MTAD група



г) QMiX група



д) Дестилована вода



Апексна трећина

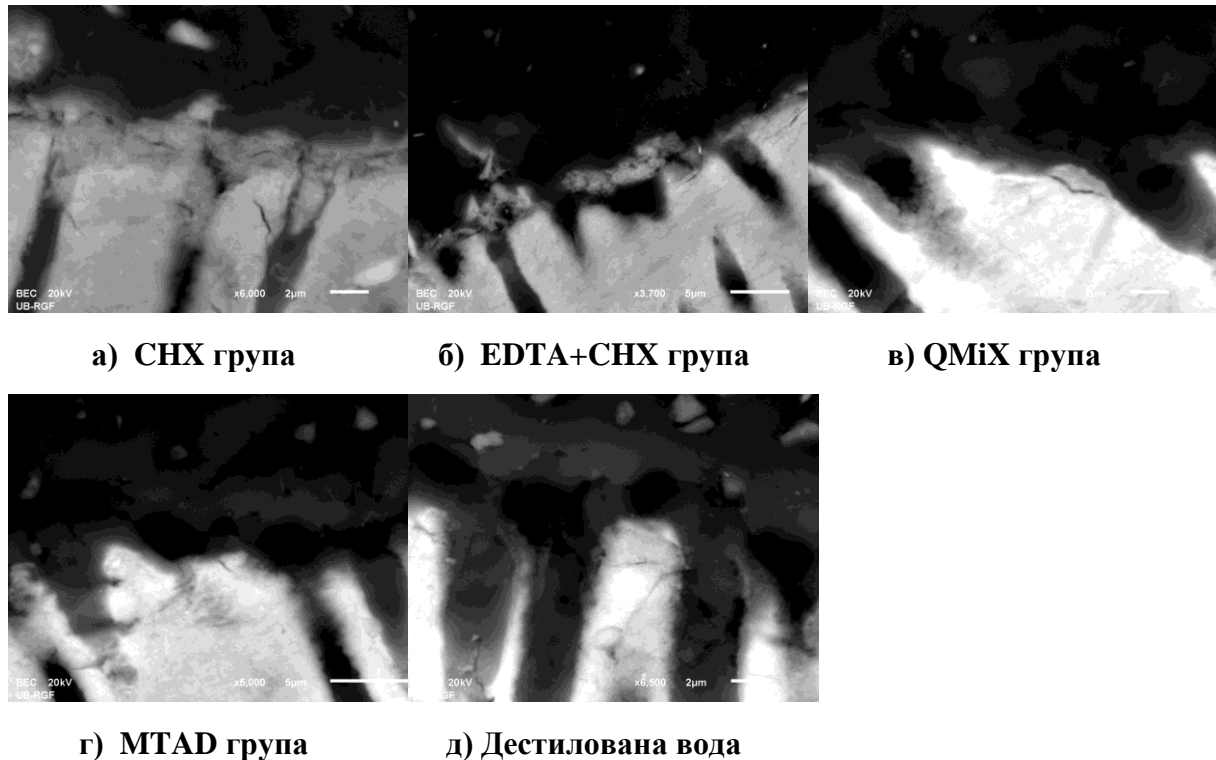
Средња трећина

Коронарна трећина

Слика 7.1. Репрезентативне SEM микрографије преципитата на површини дентина канала корена у апексној, средњој и коронарној трећини након различитих протокола иригације: CHX група (а); EDTA + CHX група (б); MTAD група (в); QMiX група (г); дестилована вода (контролна група) (д).

5.2. Присуство преципитата унутар дентинских тубула – SEM анализа

На SEM микрографијама попречног пресека канала корена после различитих протокола иригације је уочено постојање преципитата и унутар дентинских тубула у свим испитиваним групама, осим контролне, где преципитат није пронађен (слика 7.2).



Слика 7.2. Репрезентативне SEM микрографије (увећања између 3 700× и 6 500×) преципитата унутар дентинских тубула након различитих протокола иригације: CHX (а); EDTA + CHX (б); MTAD (в); QMiX (г), дестилована вода (контролна група) (д).

5.3. SEM анализа - Број затворених дентинских тубула канала корена

У табели 2. приказан је број затворених дентинских тубула за сваку групу по трећинама канала корена. Најмањи број затворених тубула је уочен у контролној групи, док је највећи број затворених дентинских тубула забележен у групи CHX у свим коренским трећинама канала. Статистичком анализаом је показано да је у коронарној трећини број затворених дентинских тубула у CHX и EDTA + CHX групи био значајно већи у односу на све друге групе ($p < 0,05$). У средњој трећини, број затворених дентинских тубула у CHX групи је био значајно већи у поређењу са контролном, QMiX

и МТАД групом ($p < 0,05$) и у ЕДТА + СНХ групи у односу на контролну и QMiX групу ($p < 0,05$). У апексној трећини, значајно већи број затворених дентинских тубула је нађен у СНХ групи у односу на све групе, осим ЕДТА + СНХ групе. Такође, значајна разлика је забележена између ЕДТА + СНХ и контролне групе ($p < 0,05$). Број затворених дентинских тубула у QMiX и МТАД групи је био сличан као у контролној групи ($p > 0,05$).

Анализом броја затворених дентинских тубула по трећинама је показан највећи број затворених дентинских тубула у апексној, а најмањи у коронарној трећини, са значајном разликом између коронарне и апексне трећине у ЕДТА + СНХ и МТАД групи, као и између коронарне и других трећина у QMiX групи ($p < 0,05$). У контролној и СНХ групи није забележена разлика у броју затворених тубула у односу на коренску трећину ($p > 0,05$).

5.4. Утицај преципитата на пермеабилност дентина канала корена

Просечне вредности пенетрације боје у дентинске тубуле у односу на врсту финалног ириганса су приказане у табели 3. Највећа пенетрација боје је нађена у контролној групи, а најмања у СНХ групи. У коронарној трећини значајно већа пенетрација боје у дентинске тубуле је уочена у МТАД, QMiX и контролној групи у односу на СНХ групу ($p < 0,05$). У средњој трећини у свим групама је забележена значајно већа пенетрација боје него у СНХ групи ($p < 0,05$). У апексној трећини, већа пенетрација боје је пронађена у контролној групи у односу на све остале групе ($p < 0,05$) и као и у МТАД и QMiX групи у поређењу са СНХ групом ($p < 0,05$).

У свакој од испитиваних група највећа пенетрација боје у дентинске тубуле је забележена у коронарној, а најмања у апексној трећини. Значајна разлика је уочена између свих трећина канала корена у свакој групи укључујући и контролну групу ($p < 0,05$).

Табела 2. Просечне вредности (\pm SD) броја затворених дентинских тубула канала корена (%) након различитих протокола иригације

Трећина Канала	Дестилована Вода	СНХ група	СНХ+ЕDТА Група	QMiX група	MTAD група
Коронарна	22,21 \pm 8,33 ^{Aa}	67,82 \pm 18,78 ^{ba}	48,89 \pm 15,35 ^{ba}	24,67 \pm 8,32 ^{Aa}	25,65 \pm 10,29 ^{Aa}
Средња	27,26 \pm 10,70 ^{Aa}	68,17 \pm 17,07 ^{ba}	55,41 \pm 16,89 ^{бЦаб}	35,79 \pm 12,29 ^{Aб}	38,70 \pm 16,04 ^{Aцаб}
Апексна	34,31 \pm 15,28 ^{Aa}	79,38 \pm 13,86 ^{ba}	68,19 \pm 19,68 ^{бЦб}	50,04 \pm 17,25 ^{Aцб}	52,80 \pm 17,86 ^{Aцб}

Средње вредности са истим великим словима (ред) или малим словима (колона) нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

Табела 3. Просечне вредности (\pm SD) пенетрације боје (%) у дентинске тубуле канала корена након различитих протокола иригације

Трећина Канала	Дестилована Вода	СНХ група	СНХ+ЕDТА Група	QMiX група	MTAD група
Коронарна	83,77 \pm 17,65 ^{Aa}	61,61 \pm 14,56 ^{ba}	76,72 \pm 10,71 ^{Aba}	81,33 \pm 6,74 ^{Aa}	79,28 \pm 7,81 ^{Aa}
Средња	65,50 \pm 18,28 ^{Aб}	25,80 \pm 9,03 ^{бб}	52,95 \pm 15,28 ^{Aб}	62,24 \pm 15,37 ^{Aб}	58,52 \pm 13,30 ^{Aб}
Апексна	36,01 \pm 12,19 ^{Aц}	14,43 \pm 3,85 ^{бц}	16,80 \pm 4,91 ^{бЦц}	24,57 \pm 5,23 ^{Цц}	25,87 \pm 6,56 ^{Цц}

Средње вредности са истим великим словима (ред) или малим словима (колона) нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

5.5. Хемијски састав преципитата формираног на повшини дентина канала корена– *EDS* анализа

У табели 4. приказане су просечне вредности хемијских елемената у саставу преципитата насталог после различитих протокола иригације и површина дентина канала корена (контролна група). *EDS* анализом преципитата у CHX групи је показано значајно више Cl у поређењу са преципитатом формираним у другим групама и поређено са вредностима Cl у дентину канала корена (контролна група) ($p < 0,05$). Други елементи у преципитату у CHX групи се нису значајно разликовали од оних нађених у EDTA + CHX и QMiX групи. Такође, преципитат створен у EDTA + CHX групи није се значајно разликовао у погледу хемијског састава од оног насталог у QMiX групи. Са друге стране, хемијски састав преципитата у MTAD групи је значајно варао у односу на друге испитиване групе. Наиме, значајна разлика је нађена у количини Ca, P, S, Cl и Na између MTAD и QMiX групе, док је у односу на CHX и EDTA + CHX групу разлика уочена и у количини Mg и O.

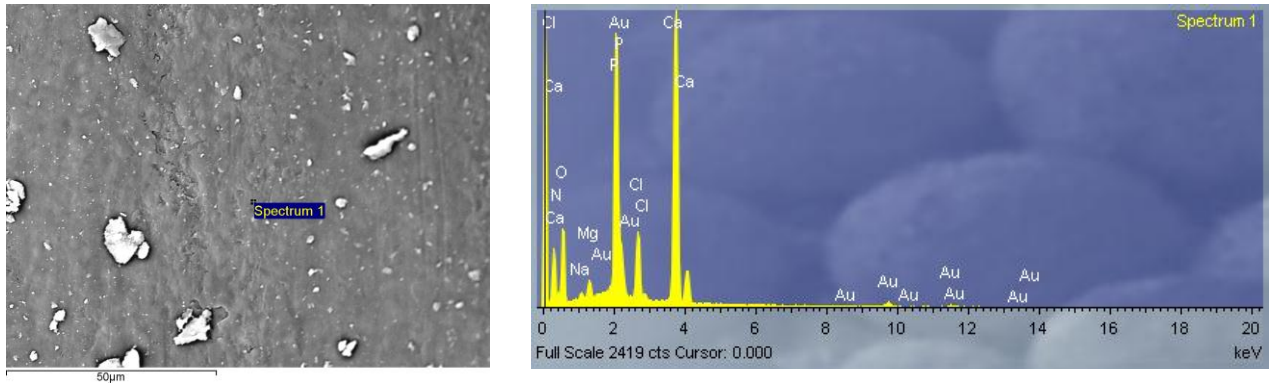
Анализом састава преципитата у апексној и коронарној трећини канала корена није показала значајну разлику у вредностима хемијских елемената у групама CHX, EDTA + CHX и QMiX ($p > 0,05$), осим за вредност Cl у CHX групи ($p < 0,05$). Значајне разлике у количини Ca, P, Mg, Cl и Na у преципитату између апексне и коронарне трећине су уочене у MTAD групи ($p < 0,05$).

Табела 4. Просечне вредности (\pm SD) хемијских елемената (%) у саставу преципитата након различитих протокола иригације

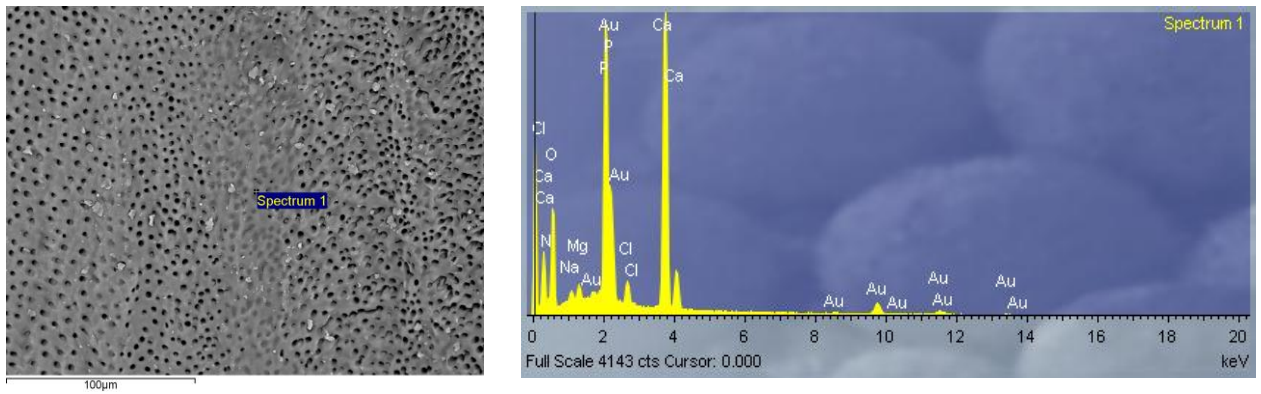
	Трећина Корена	Дестилована вода	СНХ Група	ЕДТА+СНХ Група	QMiX Група	MTAD Група
Са	Апексна	23,43 \pm 3,80 ^{Aa}	16,71 \pm 5,97 ^{Ba}	19,62 \pm 2,32 ^{ABa}	17,86 \pm 4,21 ^{Ba}	10,20 \pm 4,54 ^{Ca}
	Коронарна	23,20 \pm 3,27 ^{Aa}	15,45 \pm 3,52 ^{BCa}	17,48 \pm 4,30 ^{BCa}	18,92 \pm 3,79 ^{Ba}	13,36 \pm 3,90 ^{CB}
P	Апексна	17,07 \pm 5,47 ^{Aa}	10,75 \pm 2,48 ^{ABa}	10,08 \pm 1,78 ^{Ba}	9,69 \pm 2,52 ^{Ba}	4,58 \pm 1,35 ^{Ca}
	Коронарна	16,62 \pm 5,44 ^{Aa}	10,78 \pm 2,07 ^{ABa}	10,34 \pm 2,14 ^{Ba}	9,40 \pm 1,56 ^{BCa}	6,84 \pm 1,64 ^{CB}
O	Апексна	44,61 \pm 3,55 ^{Aa}	37,34 \pm 6,97 ^{BCa}	38,49 \pm 10,73 ^{Ab}	34,27 \pm 7,20 ^{BCa}	30,50 \pm 5,48 ^{Ca}
	Коронарна	44,82 \pm 3,99 ^{Aa}	36,26 \pm 7,96 ^{Ba}	35,39 \pm 9,40 ^{BCa}	34,98 \pm 4,88 ^{BCa}	28,05 \pm 4,75 ^{Ca}
C	Апексна	17,94 \pm 5,00 ^{Aa}	28,01 \pm 7,11 ^{Ba}	22,65 \pm 5,17 ^{ABa}	28,58 \pm 6,60 ^{Ba}	45,04 \pm 4,65 ^{Ca}
	Коронарна	18,22 \pm 5,19 ^{Aa}	28,21 \pm 6,70 ^{Ba}	23,19 \pm 4,62 ^{ABa}	27,81 \pm 7,10 ^{Ba}	45,16 \pm 9,44 ^{Ca}
Mg	Апексна	0,79 \pm 0,27 ^{Aa}	0,57 \pm 0,20 ^{ABa}	0,62 \pm 0,17 ^{ABa}	0,47 \pm 0,17 ^{BCa}	0,33 \pm 0,17 ^{Ca}
	Коронарна	0,80 \pm 0,29 ^{Aa}	0,72 \pm 0,24 ^{Aa}	0,77 \pm 0,18 ^{Ab}	0,65 \pm 0,29 ^{Ab}	0,61 \pm 0,29 ^{Ab}
Cl	Апексна	0,55 \pm 0,74 ^{Aa}	2,16 \pm 0,71 ^{Ba}	0,64 \pm 0,33 ^{ACa}	0,91 \pm 0,09 ^{CBa}	0,33 \pm 0,29 ^{Aa}
	Коронарна	0,49 \pm 0,32 ^{Aa}	3,09 \pm 1,26 ^{Bb}	0,63 \pm 0,22 ^{ACa}	0,80 \pm 0,35 ^{Ca}	0,47 \pm 0,11 ^{ADb}
Na	Апексна	0,53 \pm 0,50 ^{ABa}	0,85 \pm 0,32 ^{ACa}	0,98 \pm 0,26 ^{Ca}	0,82 \pm 0,55 ^{ACa}	0,39 \pm 0,12 ^{Ba}
	Коронарна	0,59 \pm 0,69 ^{ABa}	0,89 \pm 0,38 ^{ABa}	1,07 \pm 0,25 ^{Aa}	1,11 \pm 0,39 ^{Ab}	0,61 \pm 0,17 ^{Bb}
N	Апексна	0,00 \pm 0,00 ^{Aa}	0,70 \pm 2,21 ^{Aa}	0,31 \pm 0,86 ^{Aa}	0,17 \pm 0,49 ^{Aa}	0,21 \pm 0,57 ^{Aa}
	Коронарна	0,00 \pm 0,00 ^{Aa}	0,59 \pm 2,29 ^{Aa}	0,26 \pm 0,63 ^{Aa}	0,17 \pm 0,47 ^{Aa}	0,19 \pm 0,45 ^{Aa}

Средње вредности са истим великим словима (ред) или малим словима (колоне) нису биле статистички значајне ($p > 0,05$).

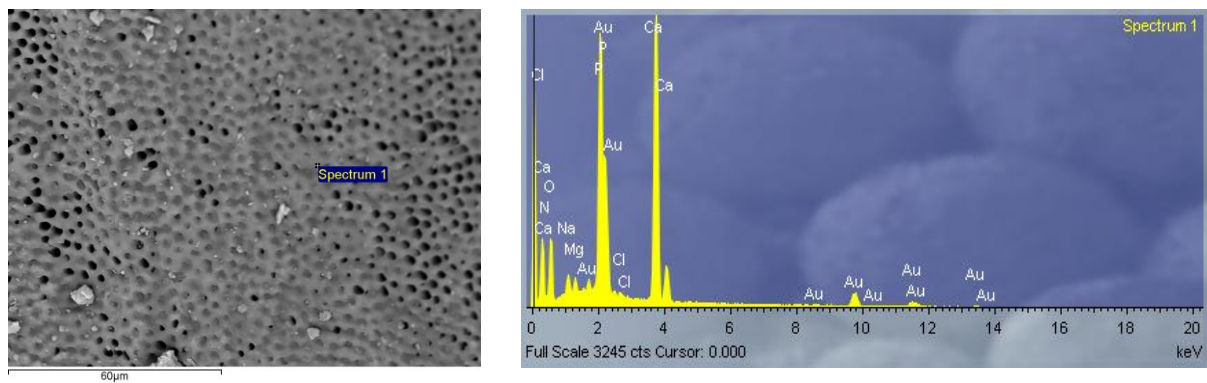
EDS слике површине преципитата у CHX, EDTA + CHX, MTAD и QMiX групи и површине dentina у контролној групи су приказане на слици 7.3.



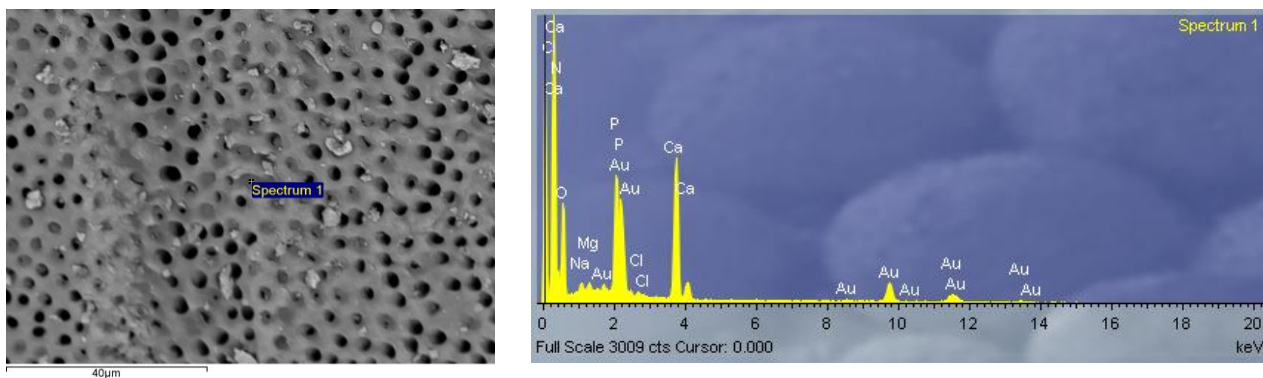
а) CHX група



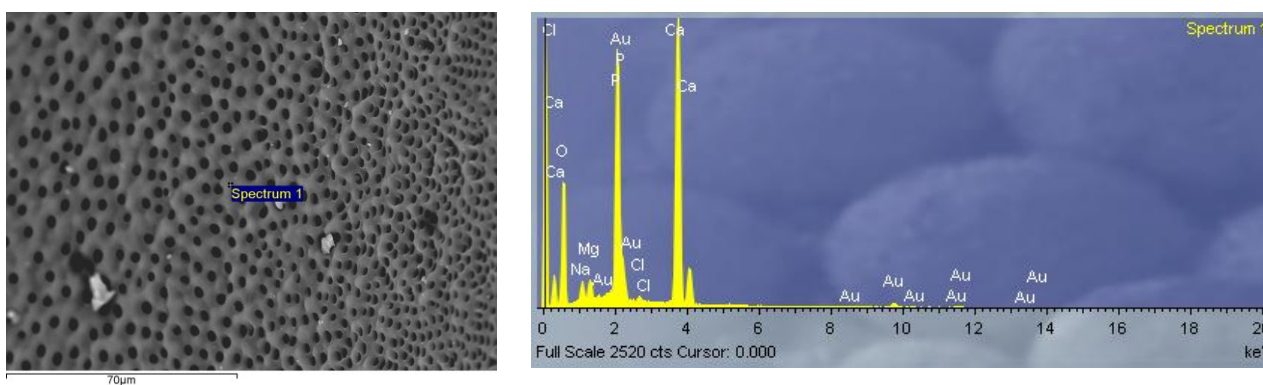
б) CHX+EDTA група



в) QMiX група



г) МТАД група



д) Дестилована вода

Слика 7.3. Репрезентативне EDS слике преципитата на површини дентина након различитих протокола иригације: CHX (а); EDTA+ CHX (б); MTAD (в); QMiX (г) и дентина канала корена после иригације дестилованом водом (контролна група) (д).

5.6. Присуство *PCA* у саставу преципитата

Визуелне карактеристике раствора насталих мешањем различитих ириганаса приказане су у табели 5. Одмах након мешања 5,25% NaOCl и 2% CHX формиран је браон преципитат. Комбинација 5,25% NaOCl и QMiX је дала наранџасто-браон пребојавања раствора и формирања мехурића, док је мешање 5,25% NaOCl и 17% EDTA довело само до стварања мехурића. Мешање 2% CHX и 17% EDTA било је праћено стварањем белог преципитата.

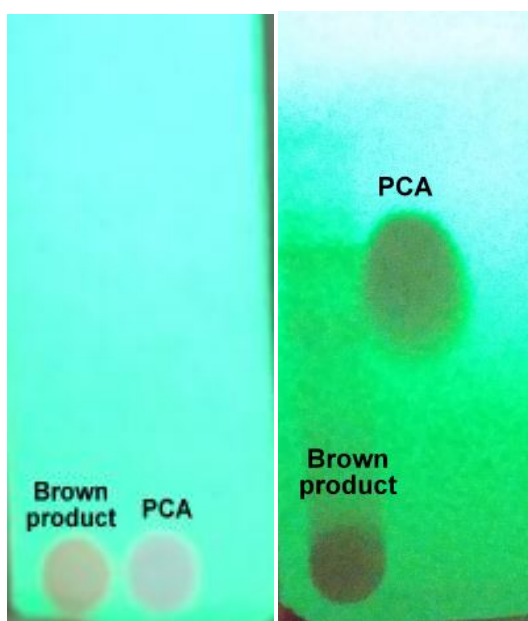
Табела 5. Визуелне карактеристике комбинованих ириганаса

Раствор 1	Раствор 2	Визуелне карактеристике*
5,25% NaOCl	2% CHX	Браон преципитат
5,25% NaOCl	QMiX	Наранџасто-браон пребојавање и мехурићи
5,25% NaOCl	17% EDTA	Формирање мехурића
2% CHX	17% EDTA	Бели преципитат

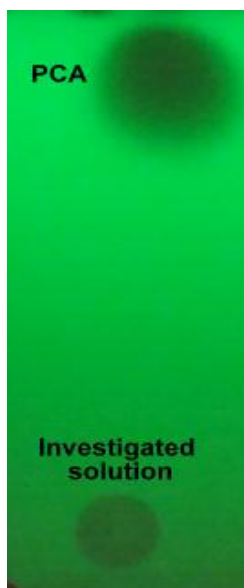
*Раствори су мешани у односу 1:1 (v/v) на собној температури.

5.6.1. Резултати *TLC* анализе

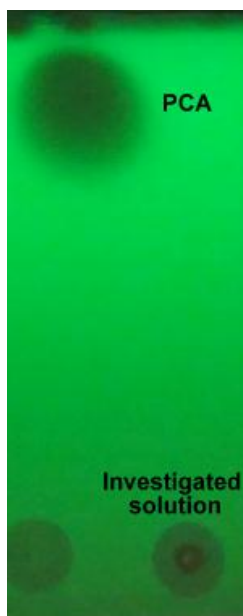
TLC анализом после мешања раствора 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и QMiX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA, и 2% CHX и 17% EDTA није показано присуство *PCA* (слике 7.4-7.7).



Слика 7.4. *TLC* анализа присуства *PCA* у производу насталом мешањем 5,25% NaOCl и 2% CHX; *TLC* плоча пре (лево) и након развијања у растварачу (десно).



Слика 7.5. *TLC* анализа присуства *PCA* у производу насталом мешањем 5,25% NaOCl и QMIX ; *TLC* плоча након развијања у растварачу



Слика 7.6. *TLC* анализа присуства *PCA* у производу насталом мешањем 5,25% NaOCl и 17% EDTA ; *TLC* плоча након развијања у растварачу



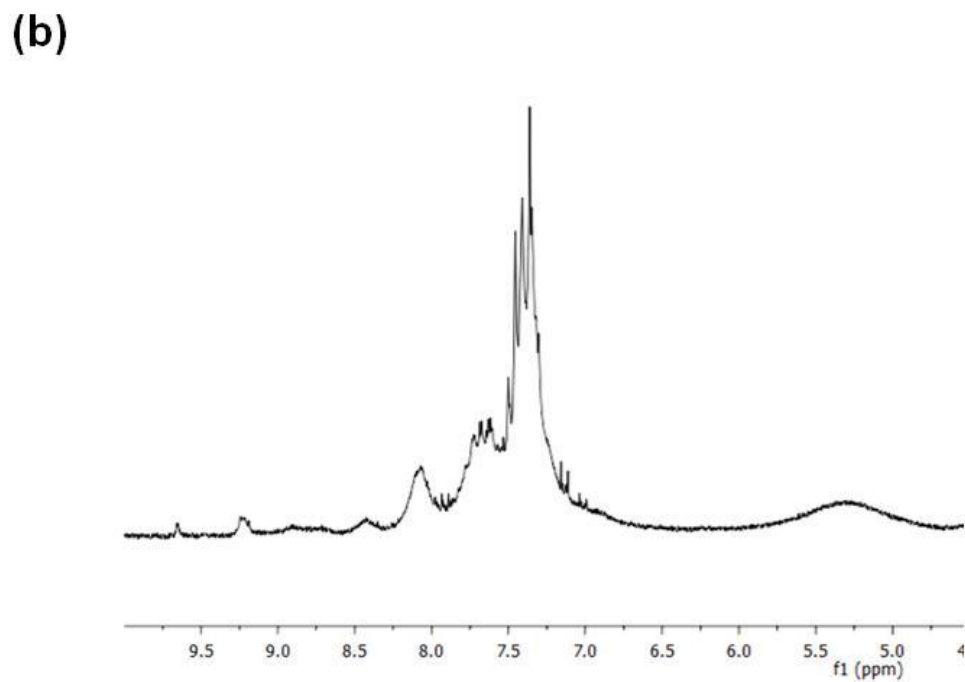
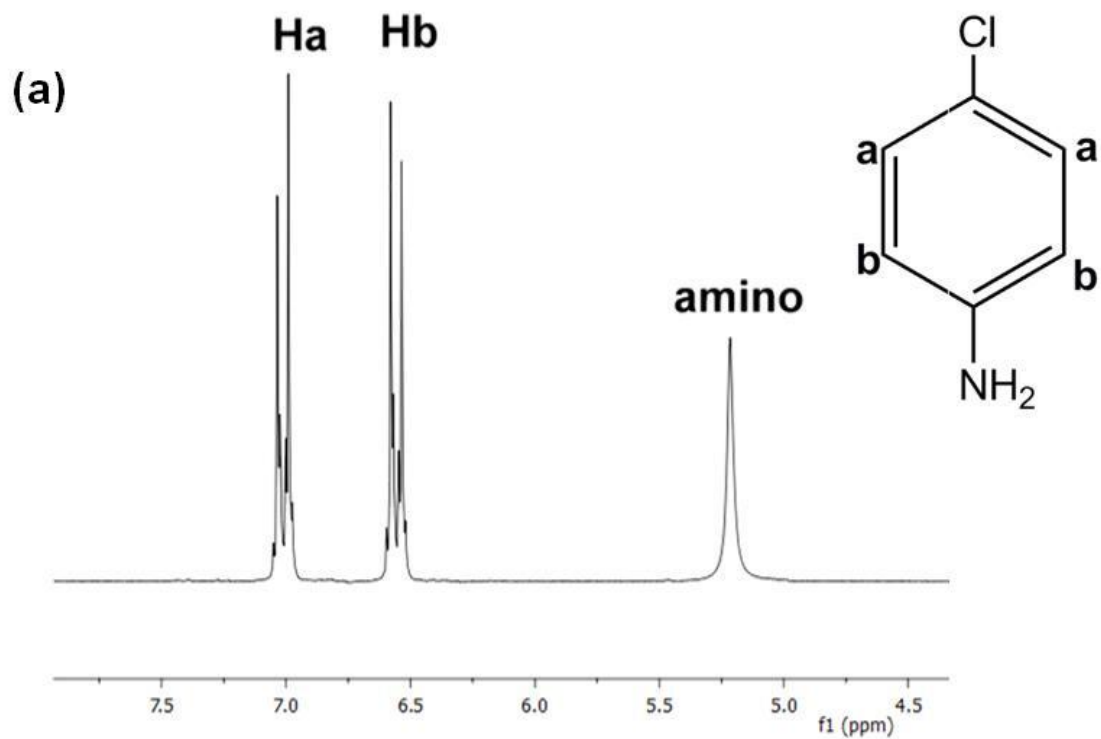
Слика 7.7. *TLC* анализа присуства *PCA* у производу насталом мешањем 2% *CHX* и 17% *EDTA*; *TLC* плоча након развијања у растварачу

5.6.2. Резултати $^1\text{H NMR}$ анализе

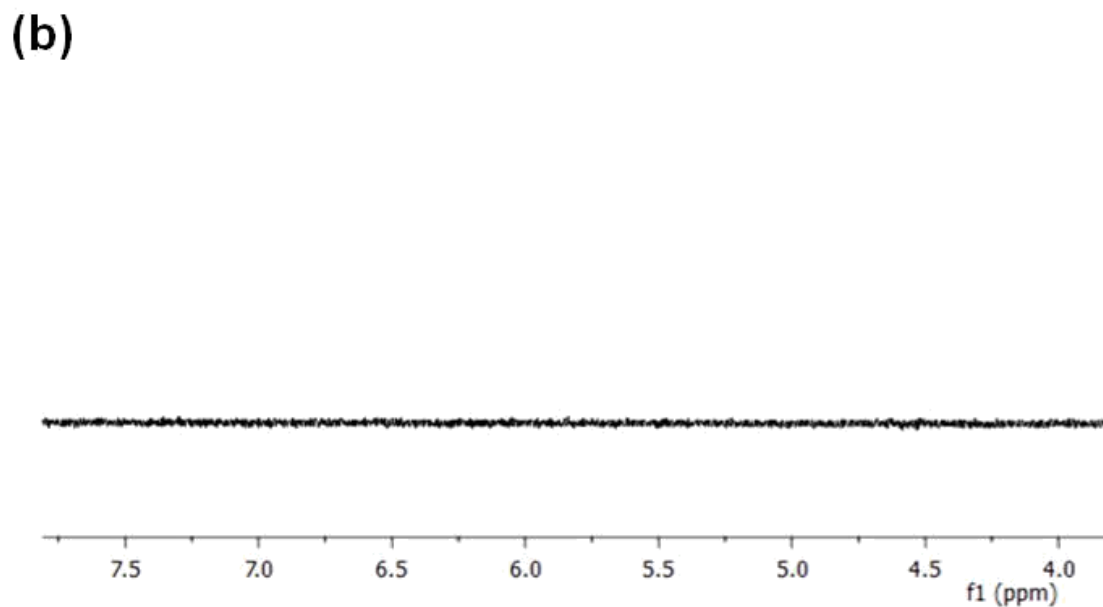
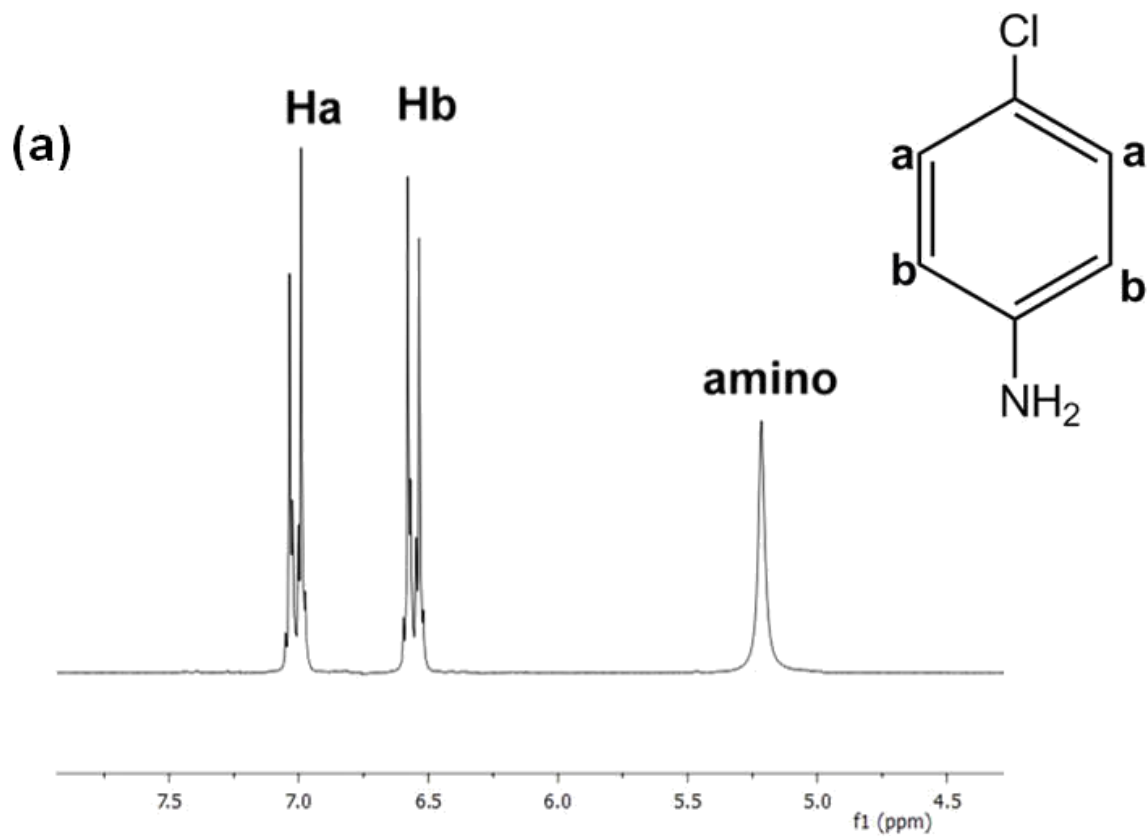
$^1\text{H NMR}$ спектар *PCA* и преципитата насталих мешањем 5,25% NaOCl и 2% *CHX*, 5,25% NaOCl и *QMIX*, 5,25% NaOCl 17% *EDTA*, 2% *CHX* и 17% *EDTA*, су приказани на сликама 5.8-5.11. $^1\text{H NMR}$ спектар *PCA* карактерише постојање сигнала на 7,01 и 6,56 ppm са константом коњузије $J = 8.8 \text{ Hz}$ који се приписују ароматичном протону H_a односно H_b , док су NH_2 протони одговорни за сигнал на 5,22 ppm. Карактеристични сигнали за *PCA* нису нађени ни у једном од створених преципитата. Додавање *PCA* у раствор мешавине ириганаса је додатно указало да преципитат настао као последица хемијске интеракције 5,25% NaOCl и 2% *CHX*; 5,25% NaOCl и *QMIX*; 5,25% NaOCl и 17% *EDTA*; 2% *CHX* и 17% *EDTA* не садржи *PCA*.

5.6.3. Резултати *IR* анализе

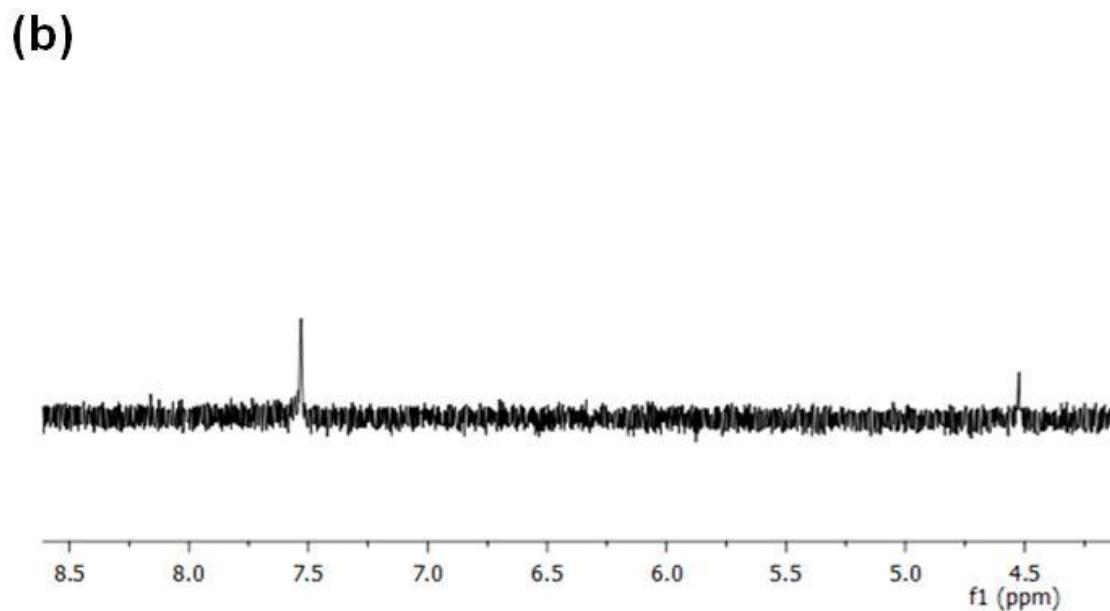
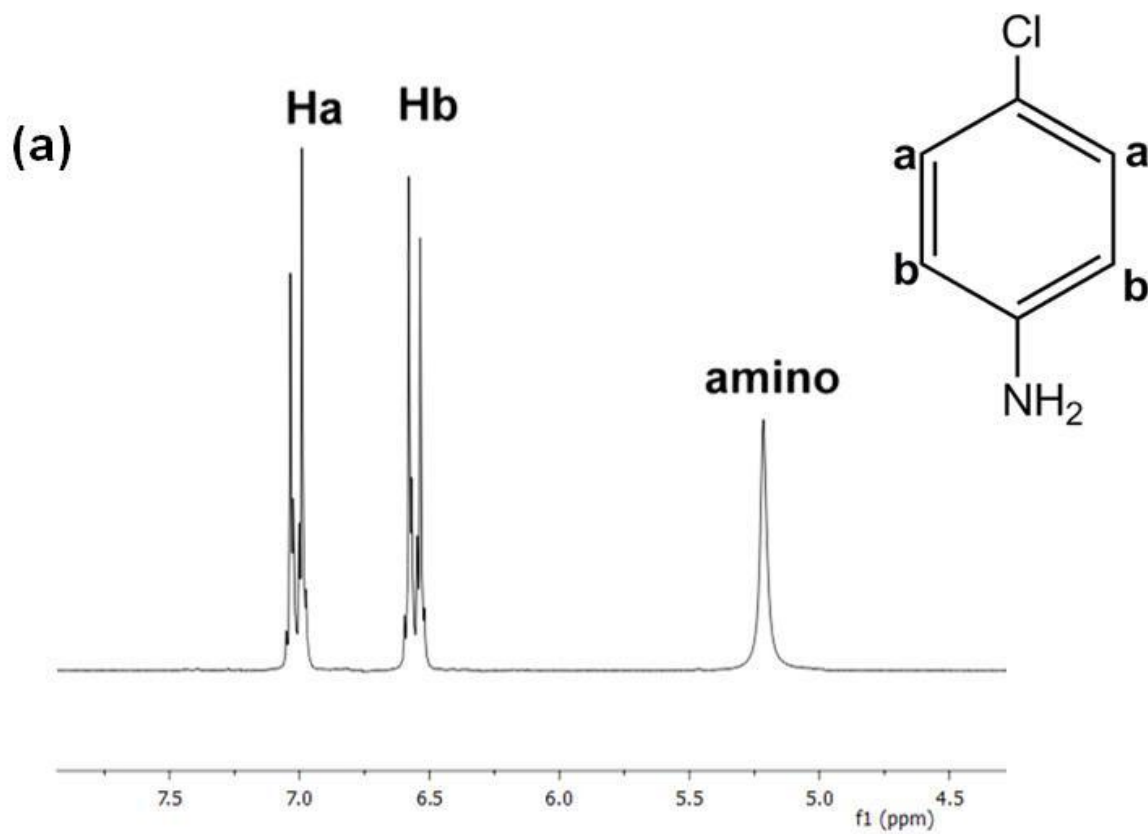
Као последица присуства остатка амина, *IR* спектар *PCA* карактеришу два сигнала на 3472 cm^{-1} и 3382 cm^{-1} , због асиметричне и симетричне вибрације истезања. Ни један од ових сигнала није откривен у производима насталим мешањем 5,25% NaOCl и 2% *CHX*, 5,25% NaOCl и *QMIX*, 5,25% NaOCl и 17% *EDTA*, 2% *CHX* и 17% *EDTA* што указује да ове комбинације ириганаса не доводе до настанка *PCA* (слике 5.12-5.15).



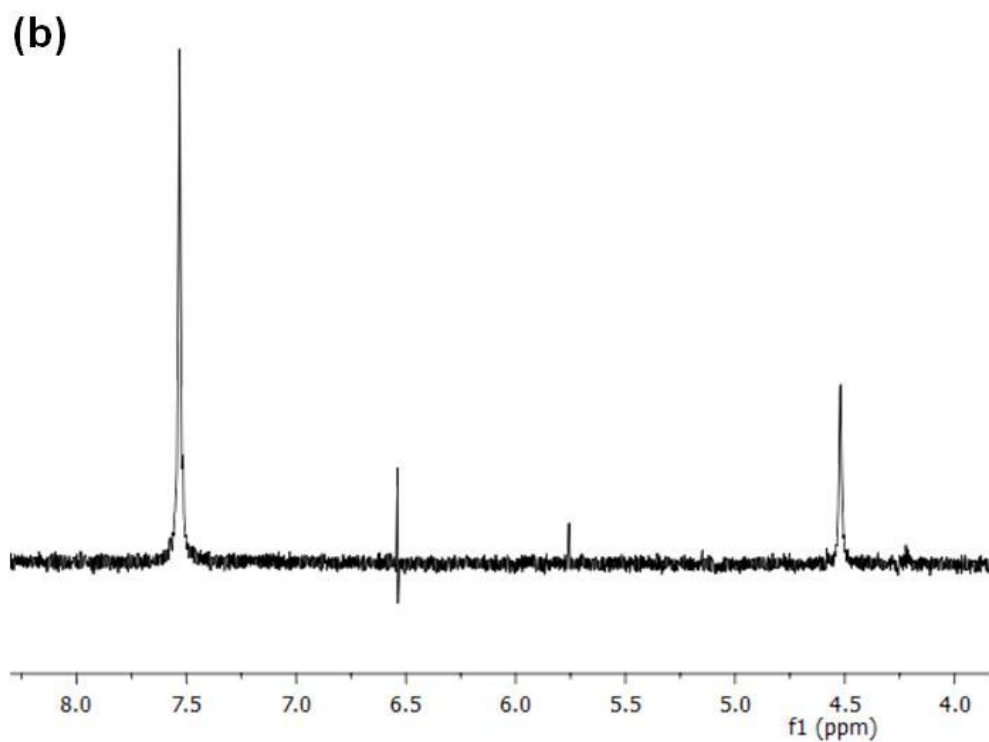
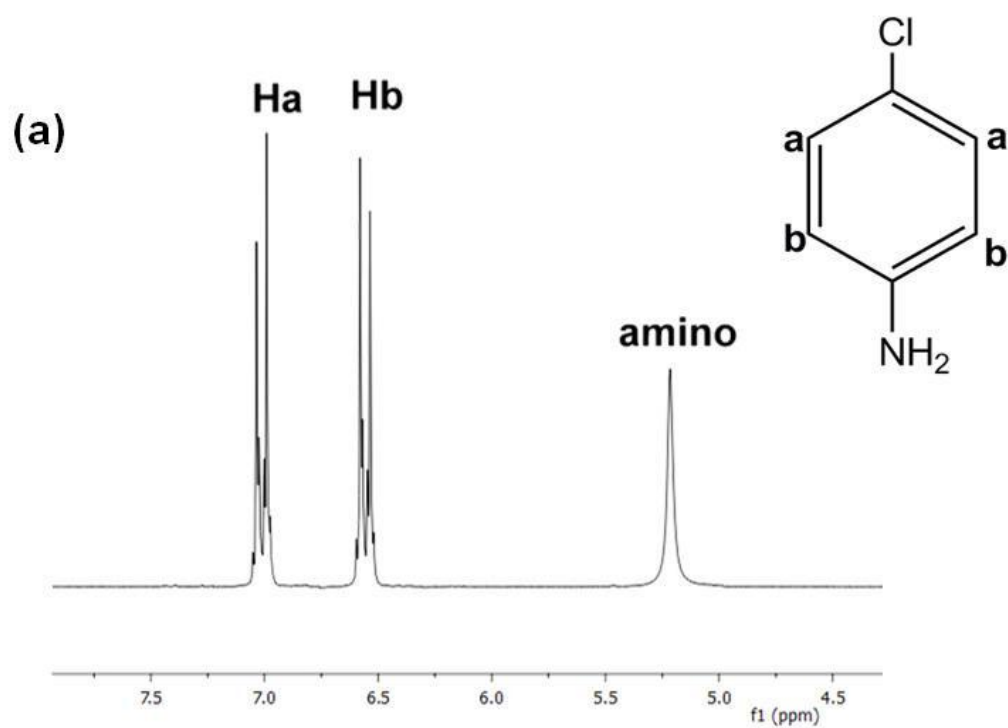
Слика 5.8. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (a) и браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и 2% CHX (б) у DMCO-d_6 на собној температури



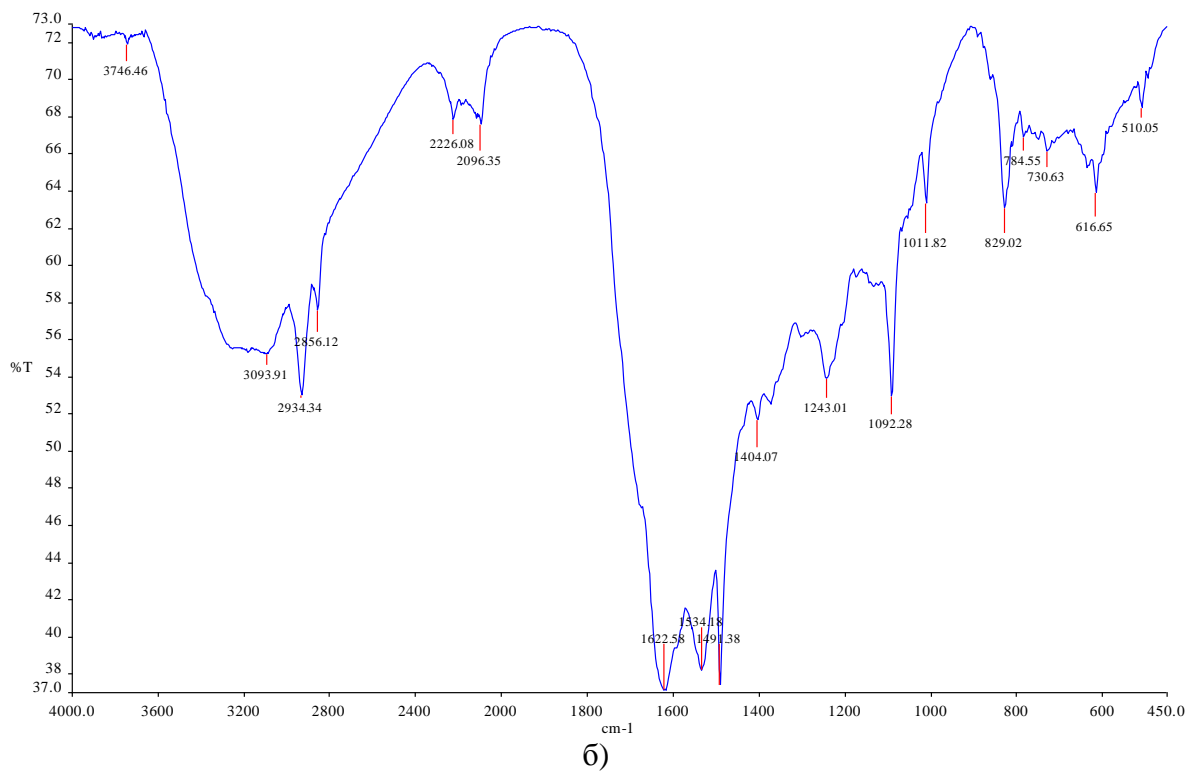
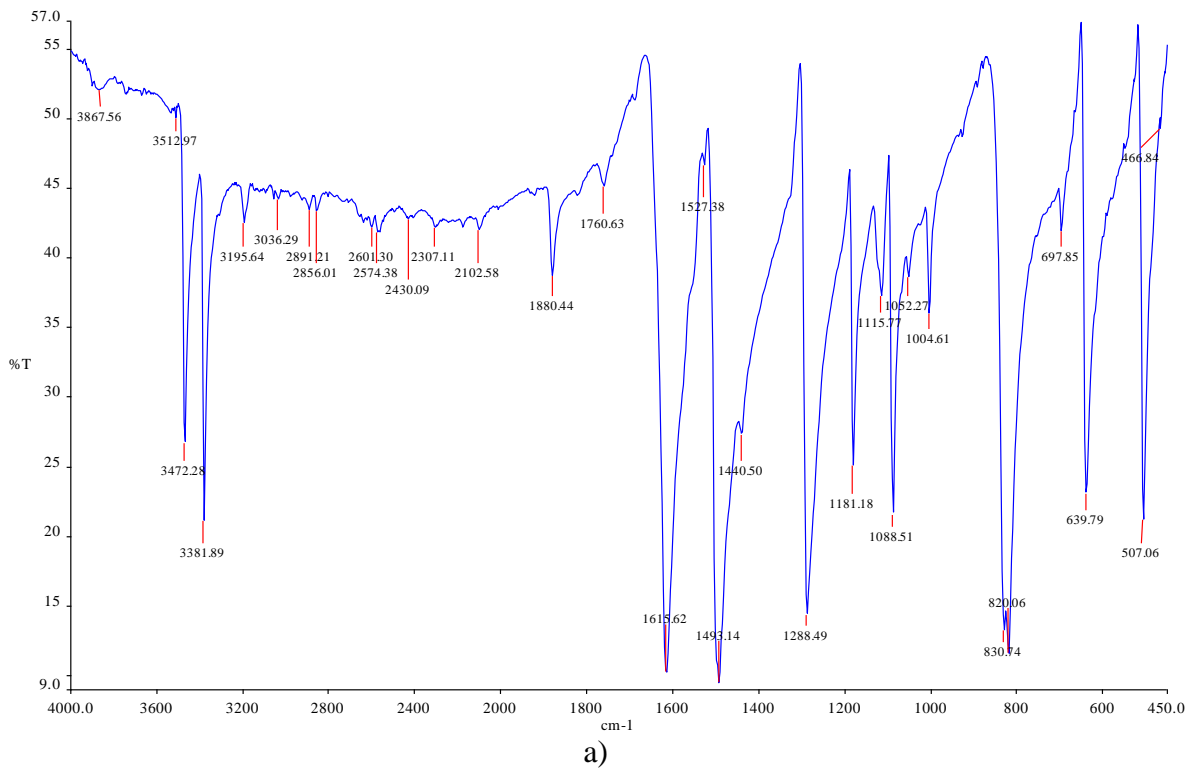
Слика 7.9. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (а) и наранџасто-браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и QMiX (б) у $\text{DMSO-}d_6$ на собној температури



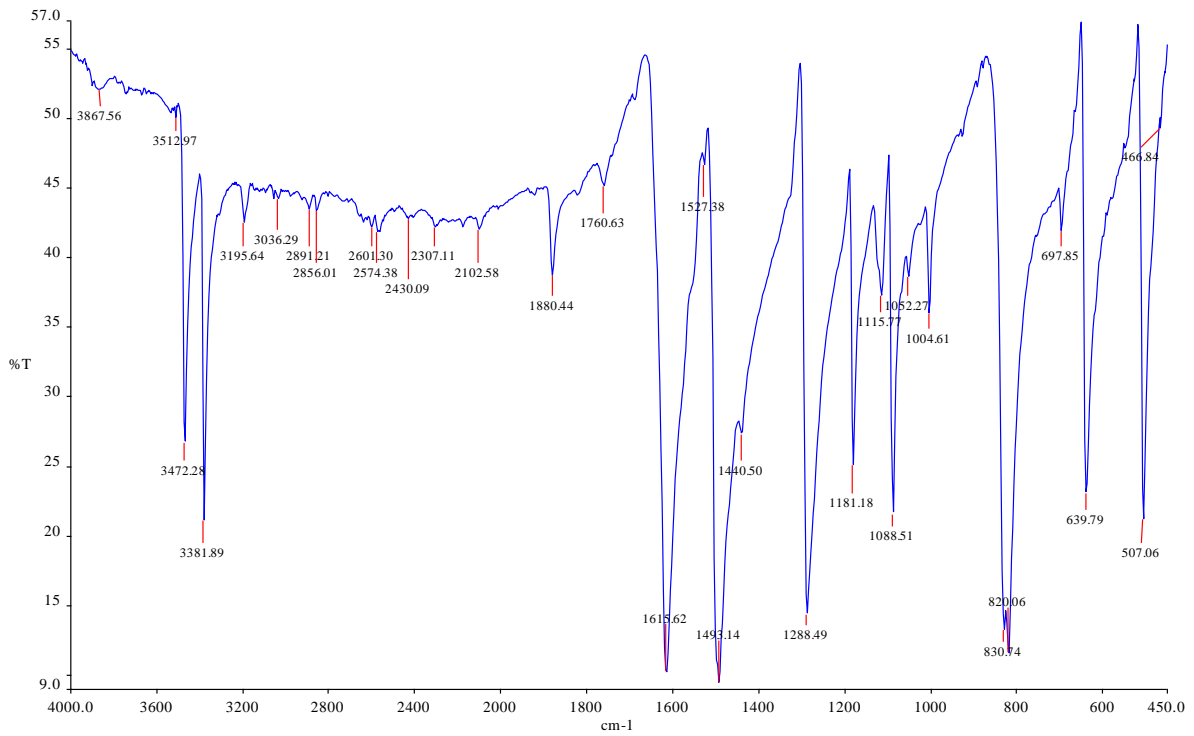
Слика 7.10. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (a) и белу чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и 17% EDTA (б) у DMSO-d_6 на собној температури



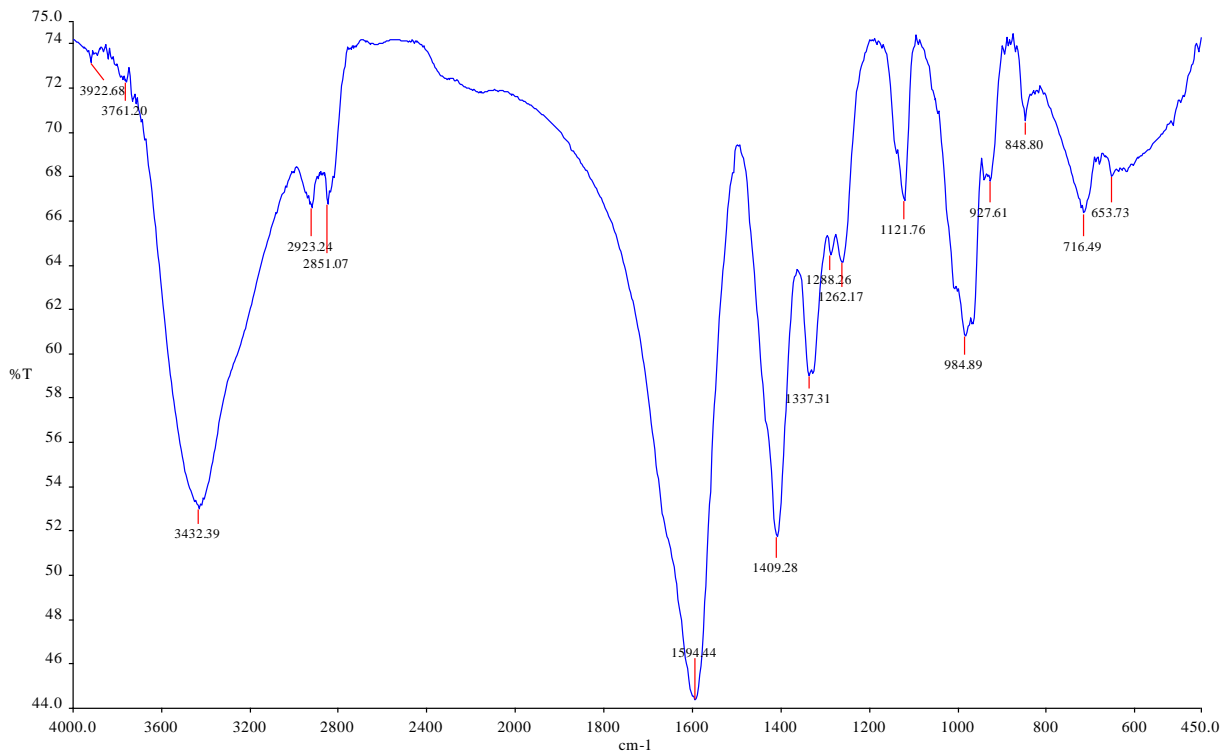
Слика 7.11. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (а) и белу чврсту супстанцу настале мешањем 2% CHX и 17% EDTA (б) у $\text{DMSO-}d_6$ на собној температури



Слика 7.12. IR спектри PCA (а) и браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и 2% CHX (б).

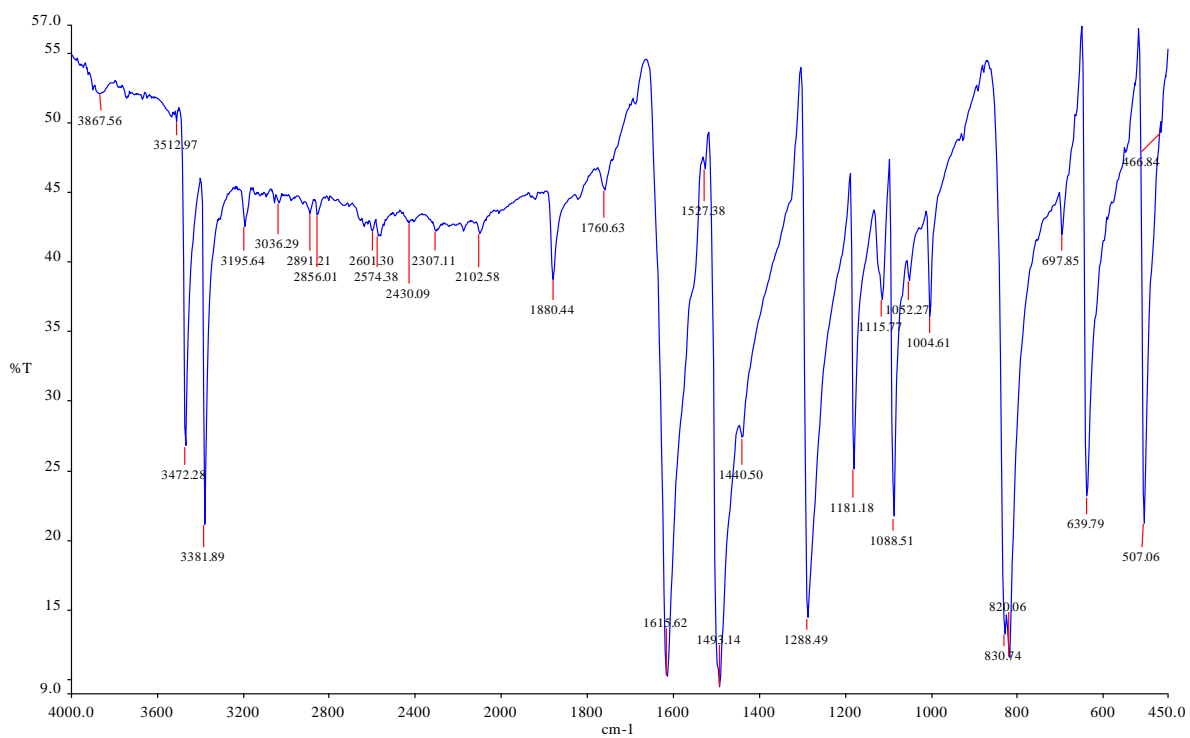


a)

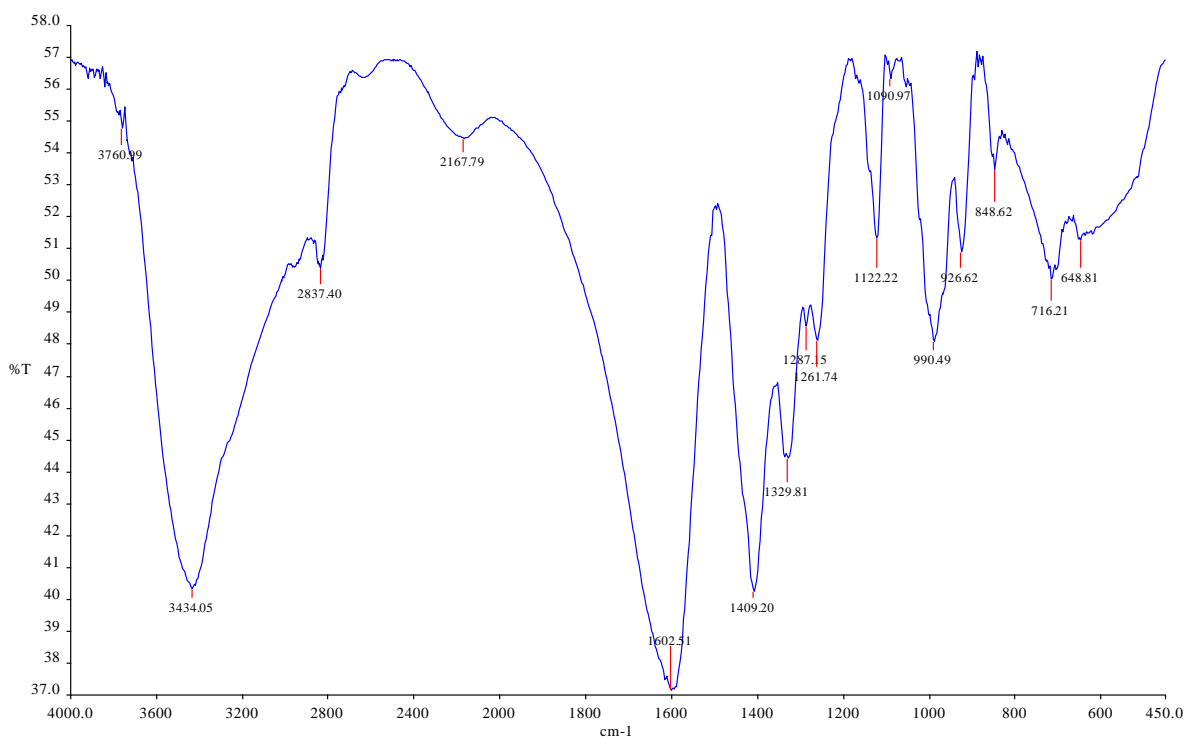


б)

Слика 7.13. IR спектри PCA (а) и наранцасто-браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и QMiX (б)

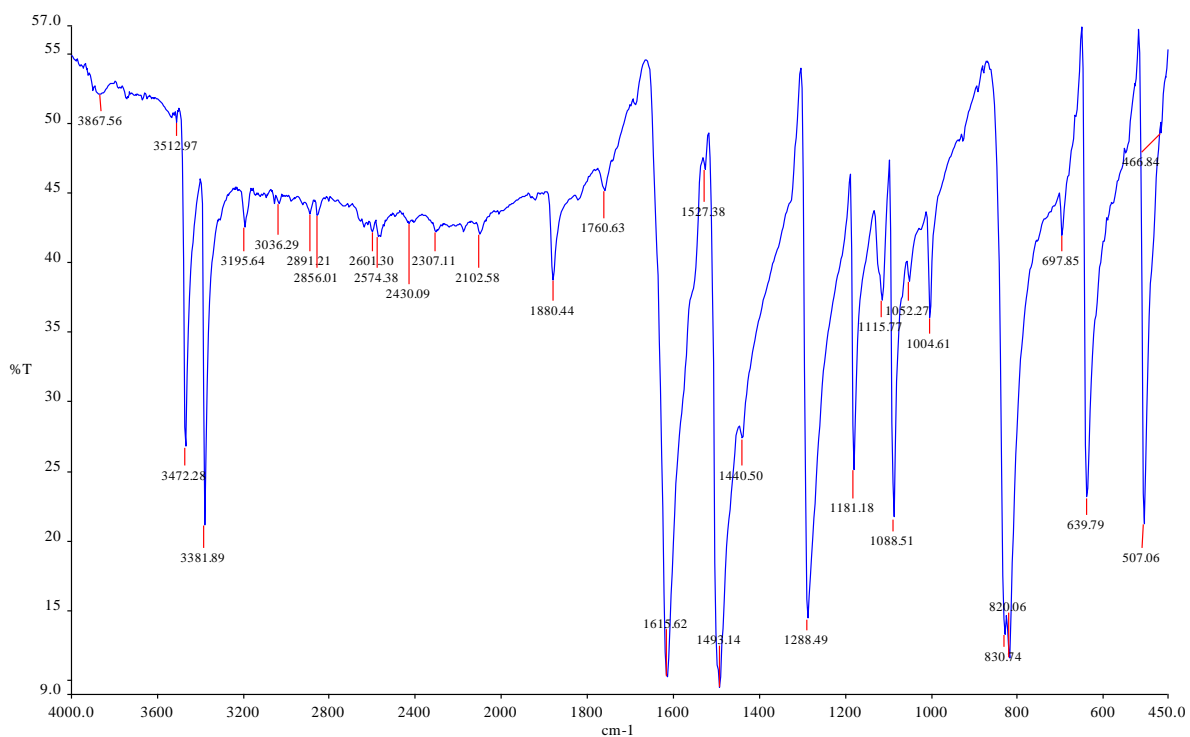


a)

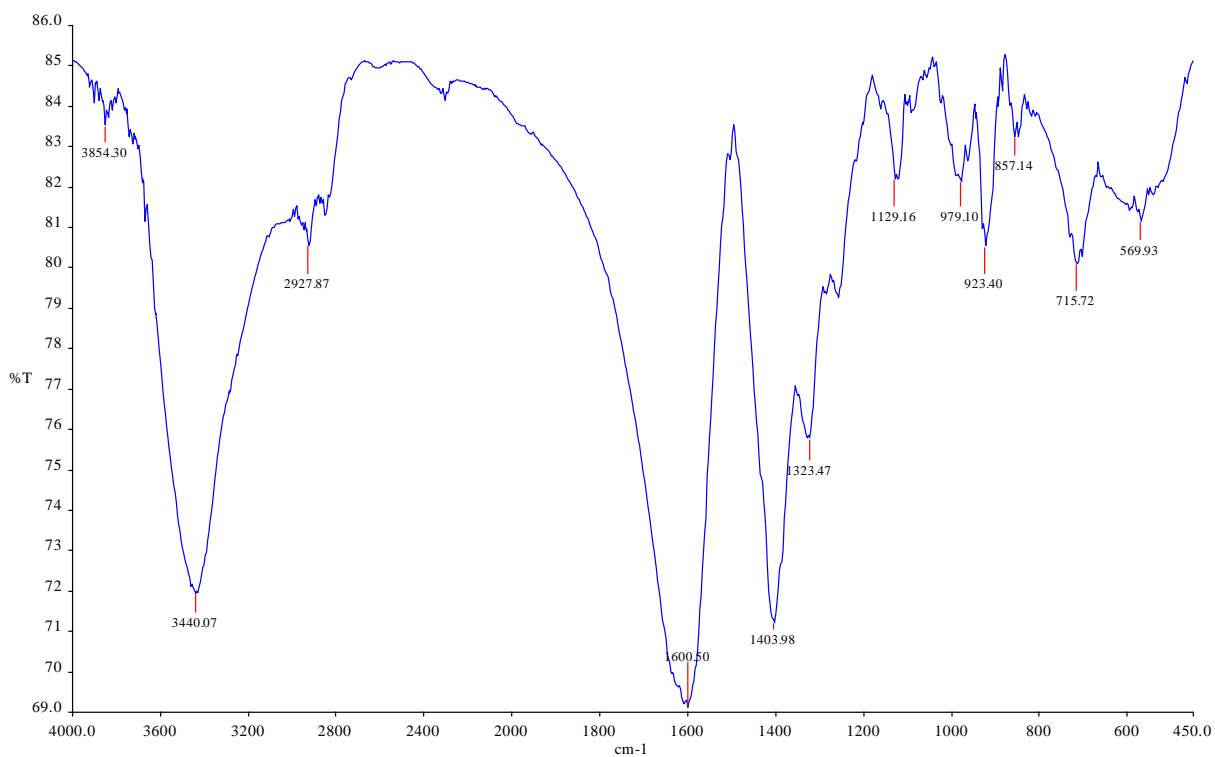


б)

Слика 7.14. IR спектри PCA (а) и белу чврсту супстанцу настала мешањем 5,25% NaOCl и 17% EDTA (б)



а)



б)

Слика 7.15. IR спектри *PCA* (а) и белу чврсту супстанцу настала мешањем 2% *CHX* и 17% *EDTA* (б)

6. ДИСКУСИЈА

6. ДИСКУСИЈА

Експериментални протокол у овом истраживању је развијен у складу са предходно описаним моделима за процену утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина (22, 275, 279). За разлику од клиничких, *in vivo* испитивања, оваква *in vitro* испитивања се могу спровести под строго контролисаним условима. Стандардизација унутрашње анатомије канала се може постићи употребом хуманих зуба исте морфолошке групе и сличних димензија канала корена, како би се смањио утицај анатомских варијабли на резултате (280-282). Стога су у овом истраживању коришћени предњи максиларни зуби са једним правим каналом који су препарисани до исте величине апикалне препарације. У *in vitro* истраживањима није могуће обезбедити услове који владају током инструментације и испирања коренских канала у клиничким условима (280, 281). Да би се имитирали клинички услови у овом истраживању је коришћен затворени модел препарације канала. За инструментацију канала коришћени су инструменти према препоруци произвођача, а сваки инструмент је употребљен за препарацију само пет канала (283, 284). Након завршене инструментације, канали су испрани 17% EDTA у трајању пет минута, пре другог циклуса испирања NaOCl и финалног испирања, у циљу уклањања размазног слоја. Стога се може претпоставити да је на површини дентина и дентинским тубулима заостао само преципитат. У другом циклусу испирања дестилована вода је коришћена за уклањање остатака NaOCl пре финалног испирања CHX, QMiX и MTAD, док је у EDTA + CHX групи примењена и пре и после испирања EDTA у циљу превенције могуће интеракције између ириганаса, како је препоручено за клиничке услове (76).

За визуелизацију преципитата на површини и унутар дентинских тубула и одређивање његовог утицаја на површину дентина (мерење броја затворених дентинских тубула) коришћен је SEM. SEM представља најчешће коришћени метод за оцену површине дентина и дентинских тубула, присуства дебриса, размазног слоја, преципитата, као и ерозивних и других микроструктурних промена након инструментације и иригације канала корена (22, 275, 285, 286). То омогућава велики распон увеличања за посматрање површине дентина, које се креће од 10x до 500.000x. Међутим, још увек не постоји усаглашено мишљење које је оптимално увеличање за анализу (285). Познато је да мање увеличање омогућава сагледавање шире површине дентина, при чему се могу наћи очишћена и неочишћена површина дентина једна поред

друге. С друге стране, већа увеличања омогућују увид у микроструктуру и грађу дентина, као и прецизнију процену остатака материјала, дентинског дебриса, размазног слоја, преципитата и броја затворених дентинских тубула (22, 275). Такође, при одабиру регије за анализу не треба занемарити ризик од пристрасности, посебно при коришћењу већег увеличања (287). Стога је у овој студији коришћено мање увеличање (2000×) за процену количине преципитата и бројање дентинских тубула, слично као и у другим истраживањима (22, 275, 279). Такође, у циљу смањења пристрасности, средишњи део канала је у свакој од трећина одбаран за анализу (22, 275, 288). За хемијску анализу преципитата створеног на површини дентина коришћен је *EDS*. *EDS* представља микро-аналитичку технику која се широко примењује за хемијску анализу елемената дентина (289). Новија истраживања потврђују примену *EDS* за испитивање присуства рецидуа каналних ириганаса (290) као и за одређивање хемијског састава преципитата (279). За оцену присуства *PCA* у преципитату насталом кобиновањем различитих раствора за иригацију канала корена примењене су *TLC*, *NMR* и *IR* анализа. У предходним студијама (17, 28) показано да употреба деструктивних метода, као што су масене спектроскопије засноване на разлагању преципитата, може утицати на квалитет добијених резултата, у овој студији су примењене *TLC*, $^1\text{H-NMR}$ и *IR* због тога што ове методе показују велику осетљивост, омогућавају идентификацију компоненти у датој смеси и одређују чистоћу молекула смеше.

У овом истраживању *SEM* анализом је показано да се преципитат не ствара на површини дентина у узорцима који су испирани 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група) (Слика 5.1 д). Са друге стране у коренским каналима који су испирани различитим финалним иригансима преципитат је нађен на површини дентина (Слика 5.1 а, б, в, г). Нашом студијом показали смо да је иригација канала корена 5,25% NaOCl и 2% CHX била праћена стварањем преципитата, који није спречен ни применом дестиловане воде као интермедијарног ириганса, што је у складу са резултатима других истраживања (264, 291). У интеракцији између NaOCl и CHX стварање неутралног и нерастворљивог преципитата браон боје последица је ацидо-базне реакције између киселине, CHX , која донира протоне и базе, NaOCl , која може да прихвати протоне из CHX (17). Поред NaOCl , CHX може да реагује и са EDTA . У тој реакцији долази до стварања нерастворљивог ружичастог (277) или белчастог преципитата (18, 132). Овај преципитат је вероватно со настала неутрализацијом CHX EDTA . Резултати овог

истраживања су показали да финално испирање 17% EDTA + 2% CHX је довело до стварања преципитата на површини дентина. Такође, ови налази су указали и да примена дестиловане воде између 17% EDTA и 2% CHX није довољна да у потпуности спречи интеракцију. *Prado* и сар. (279) су показали да испирање канала дестилованом водом после 2% CHX и пре примене 17% EDTA је довољно до спречи стварање хемијског размазног слоја, односно преципитата. Ипак, када се канали испирају 5,25% NaOCl а затим дестилованом водом, 17% EDTA, дестилованом водом и на крају 2% CHX, преципитат се уочава на површини дентина (279), што је у складу са резултатима овог истраживања. Претпоставља се да је настали преципитат резултат присуства NaOCl прије него интеракције CHX и EDTA (279). У QMiX раствору интеракција између CHX и EDTA је спречена хемијским дизајном раствора (151). Ипак, постоји могућност да CHX из QMiX реагује са NaOCl. Према неким налазима комбиновање NaOCl и QMiX доводи до промене боје раствора али без стварања преципитата. Стога је препорука произвођача да се између ова два ириганса канала корена испере физиолошким раствором (255). У прилог томе говоре и налази *Kolosowski* и сар. (27) који нису нашли преципитат на површини дентина дентинских блокова који су потопљени у 2,5% NaOCl, а потом у физиолошки раствор и QMiX, применом *TOF-SIMS*. Спектроскопска анализа површине дентина канала корена *Arslan* и сар. (20) показује да испирање канала 2,5% NaOCl и QMiX, без интермедијарног испирања, доводи до стварања наранцасто-браон преципитата на површини дентина. Слични су резултати и овог *SEM* истраживања где је примена QMiX након 5,25% NaOCl праћена стварањем преципитата на површини канала корена иако је канал испран дестилованом водом између два ириганса. Разлике у резултатима између нашег и поменутих истраживања могу се приписати разликама у концентрацији примењеног NaOCl. Могуће је и да физиолошки раствор може да спречи интеракцију између NaOCl и QMiX и преципитацију када се NaOCl примени у нижим концентрацијама, али не и када се примени као 5,25% раствор.

Врста интермедијарног ириганса који се користи за уклањање NaOCl може такође имати утицај на преципитацију (264, 270, 279). Наиме, показано је да CHX реагује и са физиолошким раствором што је праћено стварањем преципитата (соли) (132). Стога, може се претпоставити да испирање канала корена физиолошким

раствором између NaOCl и QMiX смањује количину слободног CHX из QMiX за реакцију са NaOCl, за разлику од дестиловане воде, која само уклања NaOCl.

Различити резултати студија се такође могу приписати различитим методама које су коришћене за визуелизацију преципитата, као и карактеристикама узорака и протоколу иригације. У студији *Kolosowski* *cap.* (27), блокови дентина су били отворени на оба краја, што је омогућило једнаку експозицију и адекватну замену ириганаса у свим узорцима, вероватно спречавајући интеракцију између њих, за разлику од истраживања *Arslan* и *cap.* (20) и овог истраживања где су узорак чинили коренски канали испирани уз коришћење шприца и игле, где није могуће остварити допремање исте количине ириганса у све делове канала корена. У студији *Tau* и *cap.* (242) уочено је да се мешањем NaOCl и MTAD долази до формирања жутог преципитата, као последица оксидације доксицилина у присуству NaOCl. Такође, у клиничким условима жути преципитат се формира дуж зидова канала корена након употребе 1,53%-6,15% NaOCl уз финално испирање MTAD (248). У складу са резултатима поменутих истраживања су и налази наше студије. Наиме, преципитат је нађен на површини коренског дентина после иригације канала корена 1,3% NaOCl и финалног испирања MTAD. Занимљиво је истаћи да примена дестиловане воде након 1,3% NaOCl није спречила преципитацију, иако је препоручено да се канал испере дестилованом водом или неким другим раствором после NaOCl да би се спречило формирање преципитата (242).

У нашој студији количина створеног преципитата после испирања 5,25% NaOCl и финалног испирања 2% CHX је била за око 2-3 пута већа од количине преципитата створеног у другим испитиваним групама. Ипак, значајна разлика у колични преципитата између CHX и других група је забележена само у коронарној и средњој трећини у ондосу на MTAD групу и у апексној трећини у односу на QMiX и MTAD групу, што је вероватно последица високих стандардних девијација у свакој од испитиваних група. Такође, добили смо да количина преципитата у EDTA + CHX и QMiX групи није значајно различита, али је преципитат у EDTA + CHX групи био скоро двоструко већи. Овакве налазе можемо објаснити мањом количином CHX у QMiX раствору, јер интеракција између NaOCl и CHX и стварање преципитата не зависи само од концентрације NaOCl (17) већ и од концентрације CHX (263). Из истог разлога се може претпоставити да испирање канала са нижом концентрацијом NaOCl

(1,3%) пре примене MTAD је довело до стварања мање количине преципитата у овој групи. Интересантно је истаћи да је слична количина преципитата створена у свим коренским трећинама, са највећом количином у коронарној а најмањом у апексној трећини канала. *Krishnamurthy & Sudhakaran* (264) испитујући интеракцију између 2,5% NaOCl и 2% CHX су стереомикроскопски измерили највећу дебљину преципитата у коронарној а најмању у апексној трећини, са значајном разликом између апексне и друге две трећине. Концентрација NaOCl, као и начин анализе преципитата и његове квантификације су вероватно разлози разлика између истраживања.

Поред испитивања присуства и количине преципитата на површини дентина након примене различитих комбинација ириганаса за испирање канала корена, у овом истраживању је испитан и утицај створеног преципитата на површину дентина одређивањем броја затворених тубула. Добијени резултати су показали да преципитат настао после финалне иригације 2% CHX након испирања 5,25% NaOCl значајно смањује број отворених дентинских тубула у свим коренским трећинама. *Bui* и сар. (275) су применом атмосферског (*environmental*) SEM на микрофотографијама површине канала (4000×) утврдили да се у реакцији између 5,25% NaOCl и 2% CHX не формира значајна количина преципитата ($7,91 \pm 19,34$), али створени преципитат значајно повећава број затворених дентинских тубула у коронарној ($102,33 \pm 4,40$) и средњој трећини ($15,93 \pm 19,40$) канала корена, без обзира да ли је NaOCl уклоњен пре испирања CHX. Преципитат који је настао у EDTA + CHX групи је узроковао значајно повећање броја затворених дентинских тубула у поређењу са контролном групом у свим коренским трећинама. Штавише, број затворених дентинских тубула, иако мањи, није се разликовао од оног забележеног у CHX групи. Значајно је истаћи да је број затворених тубула у EDTA + CHX групи био и значајно већи у односу на QMiX групу (раствор који садржи оба ириганса) осим у апексној трећини. Овај резултат индиректно потврђује претходне налазе да је интеракција између EDTA и CHX у QMiX спречена (151), али не и између CHX из QMiX и NaOCl. Ипак, створени преципитат после финалне иригације QMiX после NaOCl и дестиловане воде није имао значајан утицај на површину дентина испитиван преко броја затворених дентинских тубула. Слично, број затворених дентинских тубула у MTAD групи се није разликовао од контролних узорака. Посматрано по коренским трећинама, у EDTA + CHX и MTAD групи разлика у броју затворених дентинских тубула је уочена између апексне и коронарне трећине,

односно у QMiX групи између коронарне и друге две трећине. Ови налази би се могли приписати смањеном допремању ириганса у апексне порције канала (275), што последично доводи и до стварања мање количине преципитата у овим деловима. Иако резултати овог истраживања нису показали значајну разлику у количини преципитата по коренским трећинама, већа количина преципитата је створена у свим групама у коронарној а најмања у апексној трећини. Занимљиво је истаћи да у групи са СНХ, није забележена разлика у броју оклудираних тубула по трећинама, што потврђује претходне резултате да је у овој групи формирана знатна количина преципитата у свим деловима коренског канала. Такође, склероза тубула која започиње у апексном делу канала би могла имати утицати на добијене резултате. Ипак, значајна разлика у броју затворених дентинских тубула није забележена у контролним узорцима, што индиректно потврђује да карактеристике узорка нису утицале на резултате.

Ириганси који се користе у ендодонтској процедури делују осим на површину дентина и на дентинске тубуле. Наиме, показано је да ириганси који су коришћени и у нашем истраживању продриру у дентинске тубуле и до дубине од 500 μm , према налазима истраживања која су користила продор боје или антибактеријски ефекат, као меру пенетрације раствора (125, 126, 292). Стога, интеракција између ириганаса може да се деси и у дентинским тубулама, а не само на површини дентина, па створени преципитат може да перзистира у дентинским тубулама чак иако се уклони из главног коренског канала. У нашем истраживању *SEM* анализом попречних пресека коренских канала после различитих протокола иригације показано је постојање преципитата унутар дентинских тубула у свим испитиваним групама, осим контролне групе, где преципитат није уочен. Као индиректна мера количине створеног преципитата у дентинским тубулама у нашем истраживању је испитивана дентинска пропустљивост мерењем продора боје. Резултати ове студије показују да је испирање канала 5,25% NaOCl и 2% СНХ довело до смањења пермеабилности дентина у свим коренским трећинама у поређењу са контролним узорцима. Користећи исту методологију *Akisue* и сар. (22) су уочили да је преципитат настао после иригације канала 1% NaOCl и 2% СНХ узроковао смањење пермеабилности дентина само у апексној трећини, у поређењу са контролном групом (без иригације) и коренским каналима који су испирани 15% лимунском киселином и 2% СНХ. Процент продора боје после иригације 5,25% NaOCl и 2% СНХ у овом истраживању је био мањи од оног после иригације 1% NaOCl и 2%

CHX у студији *Akisue* и сар. (22) у коренској ($61,61 \pm 14,56$ vs. $72,90 \pm 13,42$) и средњој ($25,80 \pm 9,03$ vs. $54,74 \pm 20,44$), док је у апексној трећини проценат продора боје био нешто већи ($14,43 \pm 3,85$ vs. $16,59 \pm 10,14$). Разлике у резултатима између поменуте студије и овог истраживања се могу приписати разликама у концентрацији NaOCl (1% vs. 5,25%), јер формирање преципитата зависи од концентрације NaOCl (9). У коренским каналима који су испирани 17% EDTA + 2% CHX, QMiX или MTAD после NaOCl није забележна значајна разлика у продору боје у поређењу са контролном групом у коронарној и средњој трећини. Ипак, у апикалној трећини све групе су показале значајно мањи продор боје у односу на контролну групу. Такође, продор боје у QMiX и MTAD групи је био значајно већи у односу на онај нађен у CHX групи у свим трећинама. Ови налази указују да се преципитат вероватно ствара у дентинским тубулима после иригације 17% EDTA + 2% CHX, QMiX и MTAD, али не у толикој мери да значајно смањи пермеабилност дентина у коренској и средњој трећини, за разлику од интеракције између 5,25% NaOCl и 2% CHX. Занимљиво је истаћи да *Kolosowski* и сар. (27) нису пронашли преципитат нити на површини дентина нити у дентинским тубулама након потапања дентинских блокова у 2,5% NaOCl, потом у физиолошки раствор и QMiX, применом *TOF-SIMS*. Ипак, директна поређења није могуће спровести због знатних методолошких разлика. Одсуство значајне разлике у пермеабилности дентина између контролне и EDTA + CHX, QMiX и MTAD групе у коронарној и средњој трећини, указује да дестилована вода има знатан утицај на формирање преципитата у дентинским тубулима, осим у апексном делу. Ограничења коришћеног протокола иригације и смањено допремање ириганса у апексне порције канала, укључујући и дестиловану воду, могу бити разлог смањене апексне пермеабилности дентина у EDTA + CHX, QMiX и MTAD групи. На пенетрацију боје у дентинске тубуле, посебно у апексном делу, утиче и склероза тубула и морфолошка група зуба (281, 282). Стога у овом истраживању утицај ова два фактора је смањен на најмању могућу меру одабиром хомогеног узорка (горњи једнокорени зуби особа млађих од 30 година).

У складу са резултатима других истраживања (22, 281, 293) значајна разлика у продору боје између трећина је забележена у свим групама, укључујући и контролну групу, са највећом пенетрацијом боје у коронарној а најмањом у апексној трећини канала корена. Неправилности дентинских тубула у апексном делу, као и мање

димензије и мања густина дентинских тубула у апексном делу корена (281) су могући разлози мање дентинске пропустљивости овог дела корена. Наиме, број дентинских тубула према пулпи се смањује са $40\ 000\ \text{mm}^{-2}$ коронарно до $14\ 400\ \text{mm}^{-2}$ апикално (294). Штавише, смањена ефикасности иригације у овим деловима канала корена, а самим тим и у дентинским тубулима, може такође имати утицај.

Клинички значај преципитата створеног у интеракцијама различитих ираганаса још увијек није довољно познат. Преципитат настао у интеракцији 5,25% NaOCl и 2% CHX би могао да ремети дезинфекцију дентина и дентинских тубула. Наиме, смањујући број отворених дентинских тубула и пермеабилност дентина, како је показано у овом истраживању, преципитат би могао да спречи продирање интраканалних медикамента у дентинске тубуле (22, 275). Наиме, у инфицираним коренским каналима бактерије се могу наћи у дентинским тубулама, и до $375\ \mu\text{m}$ (295), и њихова перзистенција након хемомеханичке препарације може бити одговорна за реинфекцију канала и неуспех лечења. Такође, створени преципитат може да утиче на адхезију материјала за пуњење за зидове канала корена (265) и може да смањи пенетрацију материјала за пуњење у дентинске тубуле. Пенетрација силера у дентинске тубуле повећава површински контакт између дентина и материјала за пуњење, чиме се може побољшати ретенција материјала за пуњење, али и остварити антимикуробни ефекат на бактерије које заостају у дентинским тубулима, изолујући их од извора хранљивих материја (296). Штавише, преципитат може да представља пут преко кога може доћи до цурења између пуњења коренског канала и зида дентина. *Vivacqua-Gomes* и сар. (265) су уочили да се комбиновање 1% NaOCl и 2% CHX код зуба са каналним пуњењем фаворизује појаву коронарног микроцурења. Занимљиво је истаћи да је преципитат створен после иригације 17% EDTA + 2% CHX довео до значајне оклузије дентинских тубула у свим деловима канала, али без значајанијег утицаја на пермеабилност дентина. Са друге стране, преципитат створен после иригације QMiX и MTAD није довео до значајних промена у броју оклудираних дентинских тубула нити пермеабилности дентина. Иако нису забележене значајне промене на површини дентина, преципитат створен после иригације QMiX и MTAD, а посебно онај настао после иригације 17% EDTA + 2% CHX је потребно даље испитати, посебно јер поред резултата овог истраживања, ови подаци у доступној литератури недостају.

Нашим истраживањем преципитата уоченог на површини дентина даље подвргнутом *EDS* анализи у циљу потврде преципитата и одређивања његовог хемијског састава. У *CHX* групи *EDS* анализа преципитата је показала постојање значајно више *Cl* у поређењу са преципитатом формираним у другим групама и вредностима *Cl* у дентину канала корена (контролна група). Слично овим налазима *Prado* и сар. (279) су такође показали висок ниво *Cl* и присуство *N* и *C* у хемијском размазном слоју (преципитату) насталом после комбиновања *NaOCl* и *CHX*. Узимајућу у обзир да ови елементи улазе у састав *CHX* ($C_{22}H_{30}Cl_2N_{10}$) аутори су претпоставили да је преципитат резултат деградације *CHX* оксидативним деловањем *NaOCl* (261). У прилог томе говоре и налази о одсуству *N* и ниском нивоу *Cl* у размазном слоју који је резултат инструментације као и на чистој површини дентина (261). И у овом истраживању у контролним узорцима који су испирани *NaOCl* и дестилованом водом није детектован *N* док је *Cl* био присутан у малим количинама. Занимљиво је истаћи да се хемијски састав преципитата створеног у *EDTA* + *CHX* групи није разликовао од оног насталог у *QMIX* групи, што не изненађује узимајући у обзир да *QMIX* у свом саставу сдржи *EDTA* и *CHX*. Међутим, преципитат у овим групама се по свом хемијском саставу није значајно разликовао ни од оног нађеног у *CHX* групи, осим за вредност *Cl*. Могло би се претпоставити да се сличне реакције одвијају после иригације канала 5,25% *NaOCl* и финалне иригације 2% *CHX*, 17% *EDTA* + 2% *CHX* и *QMIX*, односно да преципитат настао у тим интеракцијама је вероватно последица интеракције *NaOCl* и *CHX* пре него интеракције *EDTA* и *CHX*, како је и раније сугерисано од стране истраживача (261). Ипак, узимајући у обзир да је ово прво истраживање у којем је анализиран хемијски састав преципитата после иригације канала 5,25% *NaOCl* и финалне иригације 17% *EDTA* + 2% *CHX* и *QMIX* није могуће спровести додатна поређења и анализе.

Ово је прво истраживање у којем је одређена хемијска структура преципитата насталог после иригације канала 1,3% *NaOCl* и *MTAD*. Састав преципитата у *MTAD* групи је показао значајне варијације у односу на друге испитиване групе. Значајна разлика је нађена у количини *Ca*, *P*, *C*, *Cl* и *Na* између *MTAD* и *QMIX* групе, док је у односу на *CHX* и *EDTA* + *CHX* групу та разлика укључила и *Mg* и *O*. Локализација преципитата (апексно/крунично) није имала утицај на хемијски састав преципитата у *CHX*, *EDTA* + *CHX* и *QMIX* групи (осим за вредност *Cl* у *CHX* групи), што није био

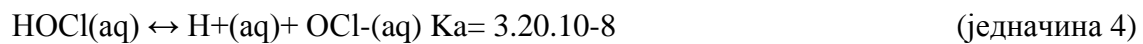
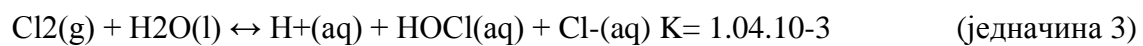
случај са преципитатом у МТАД групи где су уочене значајне разлике у количини Са, Р, Mg, Cl и Na између апексне и коронарне трећине. Тачан узрок ових разлика још увек није јасан, али указује да хемијске реакције које се дешавају између NaOCl и МТАД се значајно разликују од оних који укључују NaOCl и СНХ.

У воденом раствору СНХ може постепено да хидролизује и формира *РСА*. Стога мешање СНХ и NaOCl може да узрокује хидролизу СНХ на мање фрагменте. Према неким претпоставкама прво долази до кидања везе између угљеника и азота због мале дисоцијационе енергије везе између ова два атома. Услед ове дисоцијације долази до стварања између осталих продуката и *РСА* (17). Сматра да је *РСА* канцероген за човека и животиње (25, 260, 297) и да може довести до метхемоглобинемije код новорођенчади (298). Преципитат, због токсичног ефекта *РСА* на периапикално ткиво, може бити одговоран за мањи успех ендодонтске терапије канала корена (273). Литературни подаци су указали да токсичност испољава не само *РСА*, него и његови деградациони продукти (260, 261). Знатне количине *РСА* у преципитату насталом у интеракцији између NaOCl и СНХ су нађене применом спекторскопије рендгенским фотоелектронима (*X-ray photoelectron spectroscopy (XPS)*), *TOF-SIMS* (17) и *GC/MS* (20). Ипак, *РСА* није нађен у преципитату када је за анализу коришћена нуклерана магнетна резонанца (*NMR*) (260), као ни течна хроматографија (*high-performance liquid chromatography (HPLC)*), *¹H-NMR*, *TLC*, *IR* спектроскопија и *GC/MS* (28). У овом истраживању је за анализу присуства *РСА* коришћена *TLC*, *¹H-NMR* и *IR* спектроскопија. Све три анализе су показале да се у преципитату насталом мешањем 5,25% NaOCl и 2% СНХ не ствара *РСА*, што је у сагласности са резултатима истраживања у којем су коришћене ове методе идентификације (28). Занимљиво је истаћи да *Nowicki & Sem* (261) после мешања NaOCl и СНХ нису нашли *РСА* применом *NMR*, али уочили постојање два друга молекула: пара-хлорфенилуреа и пара-хлорфенилгванидил-1,6-дигванидил хексана. Токсичност ових једињења још није истражена, али хлорфенилуреа може даље да метаболише у *РСА*. Супротно овим налазима, резултати студија *Basrani* и сар. (17) и *Arslan* и сар. (20) су *¹H-NMR* спектроскопијом показали да преципитат настао у интеракцији NaOCl и СНХ у свом саставу садржи *РСА*. У студији *Arslan* и сар. (20) аутори су тумачили *¹H-NMR* спектар између 6,5 и 8,5 ppm и показали да сигнали забележени на 7,0-8,0 ppm представљају *РСА*. Међутим, *¹H-NMR* спектроскопијом нису обухватили анализу чистог *РСА*. Наиме,

да би се могло рећи да се *PCA* формира у реакцији NaOCl и CHX применом ^1H-NMR анализе, неопходно је да се забележи сигнал амино групе (NH₂) на 5-5,5 ppm, што није показано у поменутом истраживању. То може да утиче на веродостојност добијеног резултата. Поред разлика у експерименталним условима и аналитичким методама (27, 28) разлике у резултатима између студија се могу прописати и нестабилности *PCA* у присуству NaOCl (299). Наиме, услед оксидативног деловања NaOCl *PCA* се брзо трансформише у парахлор-нитробензен и друге продукте, који такође испољавају токсичан ефекат. Стога је могуће да се *PCA* ствара у преципитату али да његова брза деградација спречава његову идентификацију (299). Мешање 5,25% NaOCl и QMiX, који у себи садржи CHX, је било праћено наранцасто-браон пребојавањем раствора и формирањем преципитата и мехурића, али формирани продукт у себи није садржио *PCA*. У ^1H-NMR спектру након мешања 5,25% NaOCl и QMiX није нађен ни један од сигнала у региону 4,50-8,50 ppm укључујући и оне за CHX. То се може приписати нижој количини CHX у QMiX раствору (20). Слично, студија *Kolosowski* и сар. (27), применом *TOF-SIMS* методе је показала да се не ствара нити преципитат нити *PCA* на површини дентина и у дентинским тубулима после мешања NaOCl и QMiX. Поред NaOCl, CHX у каналу долази у контакт и са EDTA, те је стога испитано да ли се у овој интеракцији формира *PCA*. Добијени резултати *TLC* и спектроскопских анализа су показали да у присуству EDTA не долази до разлагања CHX и стварања *PCA*. Ови налази су у сагласности са студијом о интеракцији CHX и EDTA (18) где је *HPLC* анализа указала да CHX не разграђује EDTA и да бели талог као последица ове реакције представља со формирану неутрализацијом катијонског CHX и анионске EDTA, према једначини:



Као резултат ове интеракције, долази до слабљења ефекта EDTA на размазни слој, те се због тога препоручује испирање канала физиолошким раствором између два раствора (18). Насупрот овом налазу, када се 5,25% NaOCl помеша са 17% EDTA, добијени резултати су показали да се преципитат не формира, већ су били уочени само мехурићи. Продукт добијен њиховим мешањем после испирања растварача није садржао *PCA*. Мехурићи су углавном настали због формирања хлора у складу са следећим једначинама (132, 133):



где је K = константа равнотеже и K_a = константа равнотеже киселине и дисоцијације

Ови резултати могу се објаснити тако што је HOCl јако оксидационо средство и Cl_2 може настати редукцијом ове киселине у присуству EDTA (133).



7. ЗАКЉУЧЦИ

7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Иригација канала корена 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX, 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD праћена је стварањем преципитата на површини дентина канала корена и у дентинским тубулима. Преципитат није нађен после испирања канала корена 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група).

Највећа количина преципитата створена је у коронарној, а најмања у апексној трећини канала корена у свакој од испитиваних комбинација ириганаса, док по коренским трећинама није било разлике.

2. После иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, количина створеног преципитата у **коронарној трећини** канала корена била је значајно већа у поређењу са оном створеном после иригације 1,3% NaOCl и MTAD.

После иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, количина преципитата у **средњој трећини** канала корена била је значајно већа у односу на преципитат створен после иригације 5,25% NaOCl и QMiX.

После иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, количина преципитата у **апексној трећини** канала корена била је значајно већа у поређењу са оном насталом после иригације 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD.

3. Број затворених дентинских тубула на површини канала корена после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX је у свим коренским трећинама био значајно већи у поређењу са бројем затворених дентинских тубула после испирања 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група), 5,25% NaOCl и QMiX и 5,25% NaOCl и MTAD.

Број затворених дентинских тубула у коронарној трећини је био значајно већи од оног после испирања 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD а у средњој трећини значајно већи од оног после испирања 5,25% NaOCl и QMiX.

4. Број затворених дентинских тубула у испитиваним комбинацијама ириганаса био је **највећи у апексној**, а **најмањи у коронарној трећини** канала корена.

После иригације 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX и 1,3% NaOCl и MTAD налазимо значајано већи број затворених дентинских тубула у апексној него у коронарној трећини.

После иригације 5,25% NaOCl и QMiX налазимо значајано већи број затворених дентинских тубула у апексној и средњој у односу на коронарну трећину.

5. Отвореност дентинских тубула доказана је значајно већом пенетрацијом боје у дентинске тубуле, после иригације 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група).

У свим испитиваним комбинацијама ириганаса је забележена значајно већа пенетрација боје него после иригације **5,25% NaOCl и 2% CHX** и отвореност дентинских тубула је била **најлошија** после иригације овом комбинацијом.

После иригације, комбинацијом 5,25% NaOCl и QMiX, као и комбинацијом 1,3% NaOCl и MTAD, у свим коренским трећинама остварени су резултати **најприближнији контролној групи.**

6. Највећа пенетрација боје је забележена у коронарној, а најмања у апексној трећини канала корена у свакој од испитиваних комбинација ириганаса, са **значајном разликом између коренских трећина.**
7. У односу на испитиван хемијски састав, EDS анализом показано је да количине Cl у садржају преципитата, насталог после иригације **5,25% NaOCl и 2% CHX** је значајно виши у поређењу са свим групама, укључујући и контролну групу.

Састав хемијских елемената у преципитату после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX и 5,25% NaOCl и QMiX у **апексној и коронарној трећини** канала се није разликовао осим за вредност Cl после испирања 5,25% NaOCl и 2% CHX. После иригације канала 1,3% NaOCl и MTAD хемијски састав преципитата је највише промењен, са значајном разликом у количини Ca, P, Mg, Cl и Na у саставу преципитата између **апексне и коронарне** трећине.

8. Присуство PCA у саставу преципитата није показано ни у једној од комбинација ириганаса коришћењем TLC, ¹H NMR и IR анализа.

8. ЛИТЕРАТУРА

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Fernández R1, Cadavid D, Zapata SM, Alvarez LG, Restrepo FA. Impact of three radiographic methods in the outcome of nonsurgical endodontic treatment: a five-year follow-up. *J Endod*. 2013;39(9):1097-1103.
2. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(6):825-842.
3. 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(5):297-306.
4. Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998;24(11):763-767.
5. Heling II, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J*. 1998;31(1):8-14.
6. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J* 2014; 216(6):299-303.
7. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod* 2012; 38(4):426-431.
8. Nogo-Zivanovic D, Bjelovic Lj, Ivanovic V, Kanjevac T, Tanackovic I. Consideration of therapeutic possibilities of irrigants in endodontic therapy. *Ser J Exp Clin Res* 2018; in press [DOI:10.1515/SJECR-2016-0095].
9. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32(5):389-398.
10. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28(1):17-19.
11. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J* 2009;35(3):131-139.
12. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod* 2011;37(2):143-150.
13. Souza MA, Montagner A, Lana DL, Vidal CM, Farina AP, Cecchin D. Comparative evaluation of the retaining of QMix and chlorhexidine formulations on human dentin: a chemical analysis. *Clinical Oral Investigations* 2016; doi:10.1007/s00784-016-1837-9.
14. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Katterring JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29(6):400-403.

15. Lin Dai, Khaled K, Sara K, et al. The effect of QMiX, an Experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* 2011;37(1):80-84.
16. Qian W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative analysis of the effect of irrigant solution sequences on dentin erosion. *J Endod* 2011;37(10):1437–1441.
17. Basrani BR, Manek S, Sodhi RNS, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 2007;33(8):966–969.
18. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek M, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod* 2008;34(12):1521–1523.
19. Tay FR, Mazzoni A, Pashley DH, Day TE, Ngoh EC, Breschi L. Potential iatrogenic tetracycline staining of endodontically treated teeth via NaOCl/MTAD irrigation: a preliminary report. *J Endod* 2006;32(4):354–358.
20. Arslan H, Uygun AD, Keskin A, Karatas E, Seçkin F, Yildirim A. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/ NaOCl and QMix/ NaOCl. *Int Endod J* 2015;48(10):1199-1203.
21. Luiz PC, Fernandes D, Damiao M, et al. Determination of parachloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod* 2008;34(12):1508–1514.
22. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod* 2010;36(5):847-850.
23. Cintra LT1, Watanabe S, Samuel RO, da Silva Facundo AC, de Azevedo Queiroz IO, Dezan-Júnior E, Gomes-Filho JE. The use of NaOCl in combination with CHX produces cytotoxic product. *Clin Oral Investig*. 2014;18(3):935-940.
24. Kacmar P, Pistl J, Mikulal. The effect of p-chloroaniline on leucocytes of cheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1995;17(3):577-584.
25. Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 1991;29(2):119–124.
26. Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J*. 2002;35(9):791-795.
27. Kolosowski KP, Sodhi rn, Kishen A, Basrani BR. Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and final rinse of chlorhexidine or QMix. *J Endod* 2014;40(12):36-40.

28. Orhan EO, Irmak Ö, Hür D, Yaman BC, Karabucak B Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine? *J Endod* 2016;42(3):455-459.
29. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4(5):679-728.
30. Coklica V, Brudevold F, Amdur BH. The distribution and composition of density fractions from human crown dentine. *Arch Oral Biol* 1969;14(5):451-460.
31. Foreman PC, Soames JV. Comparative study of the composition of primary and secondary dentine. *Caries Res* 1989;23(1):1-4.
32. Linde A. Dentin Matrix Proteins:Composition and Possible Functions in Calcification, *Anat Rec* 1989;224(2):154-166).
33. Woltgens, J.H.M, Bronckers, A.I.J.J, Lyaruu, D.M. Fifth international conference on tooth morphogenetis and differentiation, *Connect Tissue Res* 1995;32,33,554 pp.
34. Butler WT, Ritchie H. The nature and functional significance of dentin extracellular matrix proteins. *Int J Dev Biol* 1995;39(1):169-179.
35. Gage JP. Electrophoretic characterization of peptides from normal mature human dentine. *Arch Oral Biol* 1984;29(8):575-580.
36. Lussi A, Lide A. Mineral Induction in vivo by Dentine Proteins. *Caries Res*, 1993;27(4):241-248.
37. Weiner S, Veis A, Beniash E, Arad T, Dillon JW, Sabsay B, et al. Peritubular dentin formation: crystal organization and the macromolecular constituents in human teeth. *J Struct Biol* 1999;126(1):27-41.
38. Pashley DH. Dynamics of the pulpo-dentin complex. *Crit Rev Oral Biol Med* 1996;7(2):104-133.
39. Kuttler Y. Classification of dentine into primary, secondary, and tertiary. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1959;12(8):996-999.
40. Zilberman U1, Smith P. Sex- and age-related differences in primary and secondary dentin formation. *Adv Dent Res* 2001;15(8):42-45.
41. Herr P, Holz J, Baume LJ. Mantle dentine in man--a quantitative microradiographic study. *J Biol Buccale* 1986;14(2):139-146.
42. Berkovitz BK, Holland GR, Moxham BJ. 3rd ed. Edinburgh: Mosby International Limited; 2002. *Oral Anatomy, Embryology and Histology*.
43. Torneck CD. Dentin pulp complex. In: Tencate AR, editor. *Oral Histology*. 5th ed. Singapore: Harcourt Asia Pte Ltd; 1999. p. 152.
44. Becker J, Schuppan D, Benzian H, Bals T, Hahn EG, Cantaluppi C, et al. Immunohistochemical distribution of collagens types IV, V, and VI and of pro-collagens types I and III in human alveolar bone and dentine. *J Histochem Cytochem* 1986;34(11):1417-1429.

45. Praveen SB, Ram MM, Ravi PA, Mandana D, Sushruth N, Selvamani M. Predentin thickness analysis in developing and developed permanent teeth. *Journal of Natural Science, Biology and Medicine* 2015;6(2):310–313.
46. Michel G, Askok BK, Marian Y, Adele B. Dentin: Structure, Composition and Mineralization. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;3:711–735.
47. Stanley HR, White CL, McCray L. The rate of tertiary (reparative) dentine formation in the human tooth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966;21(2):180-189.
48. Linde A, Goldberg M. Dentinogenesis. *Critical Reviews in Oral Biology and medicine* 1993; 4(5):679-728.
49. Huq N L. N-terminal sequencing analysis of bovine dentine phosphophoryn after conversion of phosphoserine to S-propyl-cysteine residues. *J Dent Res* 2000; 79(11):1914-1919.
50. Byers MR, Sugaya A. Odontoblast processes in dentin revealed by fluorescent Di-I. *J Histochem Cytochem* 1995;43(2):159-168.
51. Goracci G, Mori G, Baldi M. Terminal end of the human odontoblast process: a study using SEM and confocal microscopy. *Clin Oral Investig* 1999;3(3):126-132.
52. Goracci G, Mori G, Marci F, Baldi M. Extent of the odontoblastic process. Analysis by SEM and confocal microscopy. *Minerva Stomatol* 1999;48(1-2):1-8.
53. Garberoglio R, Brännström M. Scanning electron microscopic investigation of human dentinal tubules. *Arch Oral Biol* 1976;21(6):355-362.
54. Fosse G, Saele PK, Eide R. Numerical density and distributional pattern of dentin tubules. *Acta Odontol Scand* 1992;50(4):201-210.
55. Carrigan PJ, Morse DR, Furst ML, Sinai IH. A scanning electron microscopic evaluation of human dentinal tubules according to age and location. *J Endod* 1984;10(8):359-363.
56. Zaslansky P, Zabler S, Fratzl P. 3D variations in human crown dentin tubule orientation: a phase-contrast microtomography study. *Dent Mater* 2010;26(1):e1-10.
57. Mjör IA, Nordahl I. The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Arch Oral Biol* 1996;41(5):401-412.
58. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The amount and distribution of sclerotic human root dentine. *Arch Oral Biol* 1983;28(7):645-649.
59. Vasiliadis L, Darling AI, Levers BG. The histology of sclerotic human root dentine. *Arch Oral Biol* 1983;28(8):693-700.
60. Tagami J, Hosoda H, Burrow MF, Nakajima M. Effect of aging and caries on dentin permeability. *Proc Finn Dent Soc* 1992;88 Suppl 1:149-154.
61. Coffey CT, Ingram MJ, Bjorndal AM. Analysis of human dentinal fluid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30(6):835-837.

62. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Magalhães KM, Guimarães-Pinto T. Cultivable bacteria in infected root canals as identified by 16S rRNA gene sequencing. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(4):266-271.
63. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990;16(12):580-588.
64. Siqueira JF, De Uzeda M, Fonseca ME. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod* 1996;22(6):308-310.
65. Nagaoka S, Miyazaki Y, Liu HJ, Iwamoto Y, Kitano M, Kawagoe M. Bacterial invasion into dentinal tubules of human vital and nonvital teeth. *J Endod* 1995;21(2):70-73.
66. Lundy T, Stanley HR. Correlation of pulpal histopathology and clinical symptoms in human teeth subjected to experimental irritation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;27(2):187-201.
67. Olgart L, Brännström M, Johnson G. Invasion of bacteria into dentinal tubules. Experiments in vivo and in vitro. *Acta Odontol Scand* 1974;32(1):61-70.
68. Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 1990;16(7):331-334.
69. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995;11(1):6-9.
70. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(2):171-183.
71. Hargreaves K, Cohen S. Cohen's Pathways of the Pulp Expert Consult. In. 10th ed. St. Louis: Mosby Elsevier; 2011. p. 246.
72. Shen Y, Gao Y, Lin J, Ma J, Wang Z, Haapasalo M. Methods and models to study irrigation. *Endod Topics* 2012;27(2):3-34.
73. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54(2):291-312.
74. Shuping GB, Ørstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod* 2000;26(12):751-55.
75. Hülsmann M, Rödiger T, Nordmeyer S. Complications during root canal irrigation. *Endod Topics* 2007;16(3):27-63.
76. Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Topics* 2012;27(3):74-102.

77. Slaus G, Bottenberg P. A survey of endodontic practice amongst Flemish dentists. *Int Endod J* 2002;35(9):759-767.
78. Clarkson RM, Podlich HM, Savage NW, Moule AJ. A survey of sodium hypochlorite use by general dental practitioners and endodontists in Australia. *Aust Dent J* 2003;48(1):20-26.
79. Dutner J, Mines P, Anderson A. Irrigation trends among American Association of Endodontists members: a web-based survey. *J Endod* 2012;38(1):37-40.
80. Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J* 2002;13(2):113-117.
81. Del Carpio-Perochena AE, Bramante CM, Duarte MA, Cavenago BC, Villas-Boas MH, Graeff MS, et al. Biofilm dissolution and cleaning ability of different irrigant solutions on intraorally infected dentin. *J Endod* 2011;37(8):1134-1138.
82. Giardino L, Ambu E, Savoldi E, Rimondini R, Cassanelli C, Debbia EA. Comparative evaluation of antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite, MTAD, and Tetraclean against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2007;33(7):852-855.
83. Basrani B, Haapasalo M. Topical disinfectant for root canal irrigation. In: Cohenca N, editor. *Disinfection of root canal systems: The treatment of apical periodontitis*. Wiley-Blackwell, 2014;p;109-40.
84. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang H, Haapasalo M. Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod*. 2010;36(9):1558-1562.
85. Byström A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89(4):321-8.
86. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982;15(4):187-196.
87. Siqueira JF Jr1, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2.5%, and 5.25% sodium hypochlorite. *J Endod*. 2000;26(6):331-4.
88. Spangberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1973;36(6):856-71.
89. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001;34(6):424-428.
90. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J*. 2004;37(7):438-446.

91. 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(1):79-84.
92. Waltimo TM, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999;32(6):421-429.
93. Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34(3):268-272.
94. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22(6):411-418.
95. Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J* 2004;15(2):109-114.
96. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod* 1981;7(10):466-469.
97. Behrents KT, Speer ML, Noujeim M. Sodium hypochlorite accident with evaluation by cone beam computed tomography. *Int Endod J* 2012;45(5):492-498.
98. Kleier DJ, Averbach RE, Mehdipour O. The sodium hypochlorite accident: experience of diplomates of the American Board of Endodontics. *J Endod* 2008;34(11):1346-1350.
99. Kerbl FM, DeVilliers P, Litaker M, Eleazer PD. Physical effects of sodium hypochlorite on bone: an ex vivo study. *J Endod* 2012;38(3):357-359.
100. Zaparolli D, Saquy PC, Cruz-Filho AM. Effect of sodium hypochlorite and EDTA irrigation, individually and in alternation, on dentin microhardness at the furcation area of mandibular molars. *Braz Dent J* 2012;23(6):654-658.
101. Slutzky-Goldberg I, Maree M, Liberman R, Heling I. Effect of sodium hypochlorite on dentin microhardness. *J Endod* 2004;30(12):880-882.
102. Grigoratos D, Knowles J, Ng YL, Gulabivala K. Effect of exposing dentine to sodium hypochlorite and calcium hydroxide on its flexural strength and elastic modulus. *Int Endod J* 2001;34(2):113-119.
103. Marending M, Paqué F, Fischer J, Zehnder M. Impact of irrigant sequence on mechanical properties of human root dentin. *J Endod* 2007;33(11):1325-1328.
104. Butt N, Talwar S. In-vitro evaluation of various solvents for retrieval of mineral trioxide aggregate and their effect on microhardness of dentin. *J Conserv Dent* 2013;16(3):199-202.

105. Oyarzún A, Cordero AM, Whittle M. Immunohistochemical evaluation of the effects of sodium hypochlorite on dentin collagen and glycosaminoglycans. *J Endod* 2002;28(3):152-156.
106. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J* 2002;35(11):934-939.
107. Zhang K, Tay FR, Kim YK, Mitchell JK, Kim JR, Carrilho M, et al. The effect of initial irrigation with two different sodium hypochlorite concentrations on the erosion of instrumented radicular dentin. *Dent Mater* 2010;26(6):514-523.
108. Aldridge WN. The biochemical principles of toxicology. *Exp Toxicol* 1993;5:56-78.
109. ISO 10993. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization 1992.
110. Schmalz G. Agar overlay method. *Int Endod J* 1988;21:59-66.
111. Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An in vitro valuation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2005;31(8):613-615.
112. Alaçam T, Omürlü H, Ozkul A, Görgül G, Misirligil A. Cytotoxicity versus antibacterial activity of some antiseptics in vitro. *J Nihon Univ Sch Dent* 1993;35(1):22-27.
113. Nishikiori R, Nomura Y, Sawajiri M, Masuki K, Hirata I, Okazaki M. Influence of chlorine dioxide on cell death and cell cycle of human gingival fibroblasts. *J Dent* 2008;36(12):993-998.
114. Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biological effects of dental materials. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptic in vitro. *Oral Surg* 1973;36:856-871.
115. Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec-Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions in vitro. *J Endod* 2001;27(4):278-280.
116. Masillamoni CR, Kettering JD, Torabinejad M. The biocompatibility of some root canal medicaments and irrigants. *Int Endod J* 1981;14(2):115-120.
117. Marins JS, Sassone LM, Fidel SR, Ribeiro DA. In vitro genotoxicity and cytotoxicity in murine fibroblasts exposed to EDTA, NaOCl, MTAD and citric acid. *Braz Dent J* 2012;23(5):527-533.
118. Meier JR, Bull RJ, Stober JA, Cimino MC. Evaluation of chemicals used for drinking water disinfection for production of chromosomal damage and sperm-head abnormalities in mice. *Environ Mutagen* 1985;7(2):201-211.

119. Ishidate M, Sofuni T, Yoshikawa K, Hayashi M, Nohmi T, Sawada M. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. *Food Chem Toxicol* 1984;22(8):623-636.
120. Gül S, Savsar A, Tayfa Z. Cytotoxic and genotoxic effects of sodium hypochlorite on human peripheral lymphocytes in vitro. *Cytotechnology* 2009;59(2):113-119.
121. Kuga MC, Gouveia-Jorge É, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Bonetti-Filho I, Faria G. Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112(6):e155-159.
122. Zou L, Shen Y, Li W, Haapasalo M. Penetration of sodium hypochlorite into dentin. *J Endod* 2010;36(5):793-796.
123. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *J Endod* 2012;38(10):1376-1379.
124. Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J* 2006;39(1):10-17.
125. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod* 2013;39(11):1395-1400.
126. Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37(10):1380-1385.
127. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997;23(12):725-727.
128. Buck RA, Eleazer PD, Staat RH, Scheetz JP. Effectiveness of three endodontic irrigants at various tubular depths in human dentin. *J Endod* 2001;27(3):206-208.
129. Buck R, Eleazer PD, Staat RH. In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontics irrigants. *J Endod* 1999;25(12):786-788.
130. Slutzky-Goldberg I, Hanut A, Matalon S, Baev V, Slutzky H. The effect of dentin on the pulp tissue dissolution capacity of sodium hypochlorite and calcium hydroxide. *J Endod* 2013;39(8):980-983.
131. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000;33(2):126-131.
132. Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simão RA, et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod* 2013;39(4):505-510.

133. Clarkson RM, Podlich HM, Moule AJ. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the active chlorine content of sodium hypochlorite solutions when mixed in various proportions. *J Endod* 2011;37(4):538-543.
134. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005;31(11):817-820.
135. Baumgartner JC, Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987;13(2):47-51.
136. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36(6):411-417.
137. Irala LE, Graziotin-Soares R, Salles AA, Munari AZ, Pereira JS. Dissolution of bovine pulp tissue in solutions consisting of varying NaOCl concentrations and combined with EDTA. *Braz Oral Res* 2010;24(3):271-276.
138. Løe H, Schiott CR. The effect of mouthrinses and topical application of chlorhexidine on the development of dental plaque and gingivitis in man. *J Periodontal Res* 1970;5(2):79-83.
139. Sodhi R, Manek S, Fillery E, Basrani B. ToF-SIMS studies on chlorhexidine and its reaction products with sodium hypochlorite to ascertain decomposition products. *Surface and Interface Analysis* 2011;43(1-2):591-594.
140. Jordan RA, Holzner AL, Markovic L, Brueckner I, Zimmer S. Clinical effectiveness of basic root canal treatment after 24 months: a randomized controlled trial. *J Endod* 2014;40(4):465-470.
141. Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of nonsurgical root canal treatment: part 1: periapical health. *Int Endod J* 2011;44(7):583-609.
142. Fardal O, Turnbull RS. A review of the literature on use of chlorhexidine in dentistry. *J Am Dent Assoc* 1986;112(6):863-869.
143. Davies A. The mode of action of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 1973;12:68-75.
144. Hugo WB, Longworth AR. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Pharm Pharmacol* 1966;18(9):569-578.
145. Hugo WB, Longworth AR. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *J Pharm Pharmacol* 1964;16:655-662.
146. Hennessey TS. Some antibacterial properties of chlorhexidine. *J Periodontal Res Suppl* 1973;12:61-67.
147. Hugo WB, Longworth AR. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate. *J Pharm Pharmacol* 1965;17:28-32.

148. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993;9(6):243-248.
149. Byström A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985;18(1):35-40.
150. Wang Z, Shen Y, Ma J, Haapasalo M. The effect of detergents on the antibacterial activity of disinfecting solutions in dentin. *J Endod* 2012;38(7):948-953.
151. Stojcic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012;45(4):363-371.
152. Ohara P, Torabinejad M, Kettering JD. Antibacterial effects of various endodontic irrigants on selected anaerobic bacteria. *Endod Dent Traumatol* 1993;9(3):95-100.
153. Zamany A, Safavi K, Spångberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(5):578-581.
154. Tanomaru Filho M, Yamashita JC, Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru JM, Ito IY. In vivo microbiological evaluation of the effect of biomechanical preparation of root canals using different irrigating solutions. *J Appl Oral Sci* 2006;14(2):105-110.
155. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998;24(7):472-476.
156. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. In vivo evaluation of microbial reductio after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 2006;39(6):484-492.
157. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SS, Guimarães-Pinto T, Magalhães KM, Lima KC. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104(1):122-130.
158. Lima KC, Fava LR, Siqueira JF. Susceptibilities of *Enterococcus faecalis* biofilms to some antimicrobial medications. *J Endod* 2001;27(10):616-619.
159. Chávez de Paz LE, Bergenholtz G, Svensäter G. The effects of antimicrobials on endodontic biofilm bacteria. *J Endod* 2010;36(1):70-77.
160. Gonçalves LS, Rodrigues RC, Andrade Junior CV, Soares RG, Vettore MV. The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod*. 2016;42(4):527-32.
161. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;94(2):240-245.

162. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96(5):618-624.
163. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23(4):229-231.
164. Lin S, Levin L, Weiss EI, Peled M, Fuss Z. In vitro antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow-release device. *Quintessence Int* 2006;37(5):391-394.
165. Basrani BR, Manek S, Fillery E. Using diazotization to characterize the effect of heat or sodium hypochlorite on 2.0% chlorhexidine. *J Endod* 2009;35(9):1296-1299.
166. Okino LA, Siqueira EL, Santos M, Bombana AC, Figueiredo JA. Dissolution of pulp tissue by aqueous solution of chlorhexidine digluconate and chlorhexidine digluconate gel. *Int Endod J*. 2004;37(1):38-41.
167. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30(11):785-787.
168. Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. *Clin Diagn Lab Immunol* 1999;6(3):437-439.
169. Breschi L, Mazzoni A, Nato F, Carrilho M, Visintini E, Tjäderhane L. Chlorhexidine stabilizes the adhesive interface: a 2-year in vitro study. *Dent Mater* 2010;26(4):320-325.
170. Carrilho MR, Carvalho RM, de Goes MF, di Hipólito V, Geraldini S, Tay FR, et al. Chlorhexidine preserves dentin bond in vitro. *J Dent Res* 2007;86(1):90-94.
171. Sartori N, Stolf SC, Silva SB, Lopes GC, Carrilho M. Influence of chlorhexidine digluconate on the clinical performance of adhesive restorations: a 3-year follow-up. *J Dent* 2013;41(12):1188-1195.
172. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 2008;22(2):308-317.
173. Almazin SM, Dziak R, Andreana S, Ciancio SG. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation in vitro. *J Periodontol* 2009;80:999-1005.
174. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J* 2010;43:430-435.
175. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine – induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999;70:1443-1448.

176. Bernardi A, Teixeira CS. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. *Quintessence Int.* 2015;46(7):575-582.
177. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102.
178. Babich H, Wurzbarger BJ, Rubin YL, Sinensky MC, Blau L. An in vitro study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol.* 1995;11(2):79-88.
179. De Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of different concentrations of Chlorhexidine. *Am J Dent* 2007;20:400-404.
180. Lucarotti ME, White H, Deas J, Silver IA, Leaper DJ. Antiseptic toxicity to breast carcinoma in tissue culture: an adjuvant to conservation therapy? *Ann R Coll Surg Engl* 1990;72(6):388-392.
181. Hidalgo E, Dominguez C. Mechanisms underlying chlorhexidine-induced cytotoxicity. *Toxicol In Vitro* 2001;15(4-5):271-276.
182. Faria G, Celes MR, De Rossi A, Silva LA, Silva JS, Rossi MA. Evaluation of chlorhexidine toxicity injected in the paw of mice and added to cultured 1929 fibroblasts. *J Endod* 2007;33(6):715-722.
183. Agarwal S, Piesco NP, Peterson DE, Charon J, Suzuki JB, Godowski KC, et al. Effects of sanguinarium, chlorhexidine and tetracycline on neutrophil viability and functions in vitro. *J Periodontal Res* 1997;32(3):335-344.
184. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995;21(10):513-515.
185. Dumitrescu AL, editor. *Antibiotics and Antiseptics in Periodontal Therapy.* Berlin: Springer-Verlag: 2011.
186. Krautheim AB1, Jermann TH, Bircher AJ. Chlorhexidine anaphylaxis: case report and review of the literature. *Contact Dermatitis.* 2004;50(3):113-6.
187. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J* 2009; 35:131-139.
188. Hjeljord LG, Rolla G, Bonesvoll P. Chlorhexidine-protein interactions. *J Periodontal Res* 1973;12(Suppl):11-16.
189. Stabholz A, Kettering J, Aprecio R, Zimmerman G, Baker PJ, Wikesjö UM. Retention of antimicrobial activity by human root surfaces after in situ subgingival irrigation with tetracycline HCl or chlorhexidine. *J Periodontol* 1993;64(2):137-141.
190. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifácio KC, Ito IY. In vivo antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. *J Endod* 1999;25(3):167-171.

191. Emilson CG, Ericson T, Heyden G, Magnusson BC. Uptake of chlorhexidine to hydroxyapatite. *J Periodontal Res Suppl* 1973;12:17-21.
192. Lin S, Levin L, Weiss EI, Peled M, Fuss Z. In vitro antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow-release device. *Quintessence Int* 2006;37(5):391-394.
193. Saini HR, Tewari S, Sangwan P, Duhan J, Gupta A. Effect of different apical preparation sizes on outcome of primary endodontic treatment: a randomized controlled trial. *J Endod* 2012;38:1309-15.
194. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006;32(3):112-115.
195. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;98(4):488-492.
196. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993;9(6):243-248.
197. Ørstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990;6(4):142-149.
198. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Int Endod J* 2001;34(3):184-188.
199. Portenier I, Haapasalo H, Ørstavik D, Yamauchi M, Haapasalo M. Inactivation of the antibacterial activity of iodine potassium iodide and chlorhexidine digluconate against *Enterococcus faecalis* by dentin, dentin matrix, type-I collagen, and heat-killed microbial whole cells. *J Endod* 2002;28(9):634-637.
200. Ram Z. Chelation in root canal therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;49(1):64-74.
201. Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003;36(12):810-830.
202. Seidberg BH, Schilder H. An evaluation of EDTA in endodontics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1974;37(4):609-620.
203. Calvo Pérez V, Medina Cárdenas ME, Sánchez Planells U. The possible role of pH changes during EDTA demineralization of teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989;68(2):220-222.
204. Goldman M, Kronman JH, Goldman LB, Clausen H, Grady J. New method of irrigation during endodontic treatment. *J Endod.* 1976;2(9):257-260.
205. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L⁻¹ citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J.* 2000;33(1):46-52

206. Zehnder M, Paque F. Disinfection of the root canal system during root canal retreatment. *Endod Topics* 2008;19:58-73.
207. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod* 2005;31(2):107-110.
208. Aslantas EE, Buzoglu HD, Altundasar E, Serper A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *J Endod* 2014;40(6):876-879.
209. Patterson SS. In vivo and in vitro studies of the effect of the disodium salt of ethylenediamine tetra-acetate on human dentine and its endodontic implications. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963;16:83-103.
210. Nygaard-Østby B. Chelation in root canal therapy. *Odontologisk Tidsskrift* 1957;65(2):3-11.
211. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28(1):17-19.
212. Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Cehreli ZC, Varol E, Temel A. Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod* 2012;38(2):204-208.
213. De-Deus G, Reis C, Fidel S, Fidel R, Paciornik S. Dentine demineralization when subjected to EDTA with or without various wetting agents: a co-site digital optical microscopy study. *Int Endod J* 2008;41(4):279-287.
214. Cruz-Filho AM, Sousa-Neto MD, Savioli RN, Silva RG, Vansan LP, Pécora JD. Effect of chelating solutions on the microhardness of root canal lumen dentin. *J Endod* 2011;37(3):358-362.
215. Uzunoglu E, Aktemur S, Uyanik MO, Durmaz V, Nagas E. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid on root fracture with respect to concentration at different time exposures. *J Endod* 2012;38(8):1110-1113.
216. Lindemann RA, Hume WR, Wolcott RB. Dentin permeability and pulpal response to EDTA. *J Prosthet Dent* 1985;53(3):341-343.
217. Serper A, Calt S, Dogan AL, Guc D, Ozçelik B, Kuraner T. Comparison of the cytotoxic effects and smear layer removing capacity of oxidative potential water, NaOCl and EDTA. *J Oral Sci* 2001;43(4):233-238.
218. Nygaard-Ostby B. Chelation in root canal therapy: ethylenediaminetetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. *Odontol Tidsskr* 1957;65:3-11.
219. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod* 2005;31(10):746-748.
220. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits in vitro substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod* 1997;23(4):205-208.

221. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod* 1996;22(7):337-340.
222. Zaccaro Scelza MF, da Silva Pierro VS, Changas MA, da Silva LE, Scelza P. Evaluation of inflammatory responses of EDTA, EDTA-T, and citric acid in animal model. *J Endod* 2010;36:515-519.
223. McComb D, Smith DC, Beagrie GS. The results of in vivo endodontic chemomechanical instrumentation--a scanning electron microscopic study. *J Br Endod Soc* 1976;9(1):11-18.
224. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentin wall in vitro. *J Dent Res* 1982;61(2):435-438.
225. Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, et al. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* 2011;37(1):80-84.
226. Alkahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health* 2014;14(1):27.
227. Aranda-Garcia AJ, Kuga MC, Chavéz-Andrade GM, Kalatzis-Sousa NG, Hungaro Duarte MA, Faria G, et al. Effect of final irrigation protocols on microhardness and erosion of root canal dentin. *Microsc Res Tech* 2013;76(10):1079-1083.
228. Aranda-Garcia AJ, Kuga MC, Vitorino KR, Chávez-Andrade GM, Duarte MA, Bonetti-Filho I, et al. Effect of the root canal final rinse protocols on the debris and smear layer removal and on the push-out strength of an epoxy-based sealer. *Microsc Res Tech* 2013;76(5):533-537.
229. Ballal NV, Tweeny A, Khechen K, Prabhu KN, Satyanarayan, Tay FR. Wettability of root canal sealers on intraradicular dentine treated with different irrigating solutions. *J Dent* 2013;41(6):556-560.
230. Eliot C, Hatton JF, Stewart GP, Hildebolt CF, Jane Gillespie M, Gutmann JL. The effect of the irrigant QMix on removal of canal wall smear layer: an ex vivo study. *Odontology*. 2014;102(2):232-40.
231. Elnaghy AM. Effect of QMix irrigant on bond strength of glass fibre posts to root dentine. *Int Endod J* 2014;47(3):280-289.
232. Guerreiro-Tanomaru JM, Nascimento CA, Faria-Júnior NB, Graeff MS, Watanabe E, Tanomaru-Filho M. Antibiofilm activity of irrigating solutions associated with cetrimide. *Confocal laser scanning microscopy*. *Int Endod J* 2014.
233. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Garcia RB, de Andrade FB, Bernardineli N, de Moraes IG, et al. The antimicrobial effect of new and conventional endodontic irrigants on intra-orally infected dentin. *Acta Odontol Scand* 2013;71(3-4):424-431.

234. Pai S, Thomas MS. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* 2011;37(6):741; author reply 741-743.
235. Malkhassian G, Manzur AJ, Legner M, Fillery ED, Manek S, Basrani BR, et al. Antibacterial efficacy of MTAD final rinse and two percent chlorhexidine gel medication in teeth with apical periodontitis: a randomized double-blinded clinical trial. *J Endod* 2009;35(11):1483-1490.
236. Bukiet F, Couderc G, Camps J, Tassery H, Cuisinier F, About I. Wetting properties and critical micellar concentration of benzalkonium chloride mixed in sodium hypochlorite. *J Endod* 2012;38(11):1525-1529.
237. Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003;36(6):423-432.
238. Brännström M, Nordenvall KJ, Glantz PO. The effect of EDTA-containing surface-active solutions on the morphology of prepared dentin: an in vivo study. *J Dent Res* 1980;59(7):1127-1131.
239. Haznedaroğlu F, Ersev H. Tetracycline HCl solution as a root canal irrigant. *J Endod*. 2001;27(12):738-740.
240. Dunavant TR, Regan JD, Glickman GN, Solomon ES, Honeyman AL. Comparative evaluation of endodontic irrigants against *Enterococcus faecalis* biofilms. *J Endod*. 2006;32(6):527-531.
241. Mohammadi Z, Giardino L, Palazzi F. Evaluation of the antifungal activity of four solutions used as a final rinse in vitro. *Aust Endod J*. 2013;39(1):31-34.
242. Tay FR, Hiraishi N, Schuster GS, Pashley DH, Loushine RJ, Ounsi HF, Grandini S, Yau JYY, Mazzoni A, Donnelly A, King NM. Reduction in antimicrobial substantivity of MTAD after initial sodium hypochlorite irrigation. *J Endod* 2006;32:970-975.
243. Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentin powder or BSA. *J Endod* 2006;32:138-141.
244. Torabinejad M, Shabahang S, Bahjri K. Effect of MTAD on postoperative discomfort: a randomized clinical trial. *J Endod*. 2005;31(3):171-176.
245. Malkhassian G, Manzur AJ, Legner M, Fillery ED, Manek S, Basrani BR, Friedman S. Antibacterial efficacy of MTAD final rinse and two percent chlorhexidine gel medication in teeth with apical periodontitis: a randomized double-blinded clinical trial. *J Endod*. 2009;35(11):1483-1490.
246. Shabahang S, Torabinejad M. Effect of MTAD on *Enterococcus faecalis*-contaminated root canals of extracted human teeth. *J Endod*. 2003;29(9):576-579

247. Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Doyle MD, Gillespie WT, Weller RN, King NM. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. *J Endod*. 2006;32(3):218-221.
248. Tay FR, Hosoya Y, Loushine RJ, Pashley DH, Weller RN, Low DC. Ultrastructure of intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. II. The consequence of obturation with an epoxy resin-based sealer. *J Endod*. 2006;32(5):473-477.
249. Zhang W, Torabinejad M, Li Y. Evaluation of cytotoxicity of MTAD using the MTT-tetrazolium method. *J Endod* 2003;29(10):654-657.
250. Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by murine-cultured macrophages. *J Endod* 2009;35(6):824-828.
251. Yasuda Y, Tatematsu Y, Fujii S, Maeda H, Akamine A, Torabinejad M. Effect of MTAD on the differentiation of osteoblast-like cells. *J Endod* 2010;36(2):260-263.
252. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod* 2008;34(12):1474-1479.
253. Giardino L, Ambu E, Becce C, Rimondini L, Morra M. Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *J Endod* 2006;32(11):1091-1093.
254. Machnick TK, Torabinejad M, Munoz CA, Shabahang S. Effect of MTAD on the bond strength to enamel and dentin. *J Endod* 2003;29(12):818-821.
255. QMiX 2in1 Irrigating solution. In.: Dentsply Tulsa Dental Specialities; 2012.
256. Chandrasekhar V, Amulya V, Rani VS, Prakash TJ, Ranjani AS, Gayathri C. Evaluation of biocompatibility of a new root canal irrigant Q Mix™ 2 in 1- An in vivo study. *J Conserv Dent* 2013;16(1):36-40.
257. Alkahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health* 2014;14(1):27.
258. Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endod J*. 2016;11(4):293-297.
259. Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA. Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod* 2013;39(3):406-410.
260. Thomas JE, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36(2):315-317.

261. Nowicki JB, Sem DS. An in vitro spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 2011;37(7):983-988.
262. Marchesan MA, Pasternak Júnior B, Afonso MM, Sousa-Neto MD, Paschoalato C. Chemical analysis of the flocculate formed by the association of sodium hypochlorite and chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103(5):e103-105.
263. Gasic J, Popovic J, Zivković S, Petrovic A, Barac R, Nikolic M. Ultrastructural analysis of the root canal walls after simultaneous irrigation of different sodium hypochlorite concentration and 0.2% chlorhexidine gluconate. *Microsc Res Tech* 2012;75(8):1099-1103.
264. Krishnamurthy S, Sudhakaran S. Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* 2010;36(7):1154-1157.
265. Van der Bijl P, Gelderblom WC, Thiel PG. On the mutagenicity of parachloroaniline, a breakdown product of chlorhexidine. *J Dent Assoc S Afr*. 1984;39(8):535-537.
266. Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol*. 1999;29(2):119-124.
267. Matsumoto M, Aiso S, Senoh H, et al. Carcinogenicity and chronic toxicity of parachloronitrobenzene in rats and mice by two-year feeding. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2006; 25(3):571-584.
268. Mortenson D, Sadilek M, Flake NM, Paranjpe A, Heling I, Johnson JD, et al. The effect of using an alternative irrigant between sodium hypochlorite and chlorhexidine to prevent the formation of para-chloroaniline within the root canal system. *Int Endod J* 2012;45(9):878-882.
269. Basrani BR, Manek S, Mathers D, Fillery E, Sodhi RN. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod* 2010;36(2):312-314.
270. Zong Z, Kirsch LE. Studies on the instability of chlorhexidine, part I: kinetics and mechanisms. *J Pharm Sci* 2012;101(7):2417-2427.
271. Lueken A, Juhl-Strauss U, Krieger G, Witte I. Synergistic DNA damage by oxidative stress (induced by H₂O₂) and nongenotoxic environmental chemicals in human fibroblasts. *Toxicol Lett* 2004;147(1):35-43.
272. Chhabra RS, Thompson M, Elwell MR, Gerken DK. Toxicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 1990;28(10):717-722.
273. Sakagami Y, Yamazaki H, Ogasawara N, Yokoyama H, Ose Y, Sato T. The evaluation of genotoxic activities of disinfectants and their metabolites by umu test. *Mutat Res* 1988;209(3-4):155-160.

274. van der Vorst MM, Tamminga P, Wijburg FA, Schutgens RB. Severe methaemoglobinaemia due to para-chloraniline intoxication in premature neonates. *Eur J Pediatr* 1990;150(1):73.
275. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 2008;34(2):181-185.
276. Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CE, Carvalho CA, Camargo SE, Camargo CH. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(5):e82-7.
277. González-López S, Camejo-Aguilar D, Sanchez-Sanchez P, Bolaños-Carmona V. Effect of CHX on the decalcifying effect of 10% citric acid, 20% citric acid, or 17% EDTA. *J Endod* 2006;32(8):781-784.
278. Dentsply Tulsa Dental Specialities (2012) QMiX® 2 in 1 Irrigating Solution, Directions for Use. In.
279. Do Prado M, Simão RA, Gomes BP. Evaluation of different irrigation protocols concerning the formation of chemical smear layer. *Microsc Res Tech.* 2013;76(2):196-200.
280. Hata G, Uemura N, Kato AS, Imura N, Novo NF, Toda T. A comparison of shaping ability using ProFile, GT file and Flex-R endodontic instruments in simulated canals. *J Endod* 2002;28:316–320.
281. Paqué F, Luder HU, Sener B, Zehnder M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *Int Endod J* 2006; 39(1):18-25.
282. Ribeiro RG, Marchesan MA, Silva RG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Dentin permeability of the apical third in different groups of teeth. *Braz Dent J.* 2010; 21(3):216–219.
283. Imura N, Kato AS, Hata G-I, Uemura M, Toda T, Weine F. A comparison of the relative efficacies of four hand and rotary instrumentation techniques during endodontic retreatment. *Int Endod J* 2000;33(4):361–366.
284. Schwerz L, Eduardo C, Bueno S, Eduardo C, Arruda DA, Andréa R, et al. Comparison of the effectiveness of the protaper system versus hand instrumentation in endodontic retreatment: a scanning electron microscopy study. *RSBO Rev Sul-Brasileira Odontol* 2012;9:368–374.
285. Goldstein JI, Newbury DE, Echlin PP, Joy D, Fiori C, Lifshin E. Scanning electron microscopy and X-ray microanalysis. A text for biologists, material scientist, and geologists. 2nd edition, New York: Plenum Press 1992.
286. Prado M, Gusman H, Gomes BPF, Simão RA. Scanning electron microscopic investigation of the effectiveness of phosphoric acid in smear layer removal when compared with EDTA and citric acid. *J Endod* 2011;37:255–258.

287. Metzger Z, Solomonov M, Kfir A. The role of mechanical instrumentation in the cleaning of root canals. *Endod Top* 2013;29:87–109.
288. Delong A. Electron sources for electron microscopes. *Eur Microsc Anal* 1993;9–11.
289. Wang Z, Maezono H, Shen Y, Haapasalo M. Evaluation of Root Canal Dentin Erosion after Different Irrigation Methods Using Energy-dispersive X-ray Spectroscopy. *J Endod*. 2016;42(12):1834-1839.
290. do Nascimento AL, Busanello FH, Só MV, Kuga MC, Pereira JR, Grecca FS. Residues of different gel formulations on dentinal walls: A SEM/EDS analysis. *Microsc Res Tech*. 2015;78(6):495-499.
291. Magro MG, Kuga MC, Aranda-Garcia AJ, Victorino KR, Chávez-Andrade GM, Faria G, Keine KC, Só MV. Effectiveness of several solutions to prevent the formation of precipitate due to the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine and its effect on bond strength of an epoxy-based sealer. *Int Endod J* 2015;48 (5):478-483.
292. Saghiri MA, Delvarani A, Mehrvarzfar P, Malganji G, Lotfi M, Dadresanfar B, Saghiri AM, Dadvand S. A study of the relation between erosion and microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;108(6):e29-34.
293. Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M. Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J*. 2008; 41(12):1115–1122.
294. Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J*. 2001; 34(5):346–353.
295. Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2001; 27(2):76-81.
296. Mamootil K, Messer HH. Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *Int Endod J*. 2007;40(11):873–881.
297. World Health Organisation. International Agency for Research on cancer: IARC monography on the evaluation of carcinogenic risks to human. Lyon, France, 2006;86:1-25.
298. Messmer A, Nickel CH, Bareiss D. p-Chloroaniline poisoning causing methemoglobinemia: a case report and review of the literature. *Case Rep Emerg Med* 2015;2015:208732.
299. Nocca G, Ahmed HMA, Martorana GE, Callà C, Gambarini G, Rengo S, Spagnuolo G. Chromographic Analysis and Cytotoxic Effects of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite Reaction Mixtures. *J Endod*. 2017;43(9):1545-1552.

СКРАЋЕНИЦЕ

C	Угљеник (енгл. <i>Carbon</i>)
Ca	Калцијум (енгл. <i>Calcium</i>)
CHX	Хлорхексидин (енгл. <i>Chlorhexidine</i>)
Cl	Хлор (енгл. <i>Chlorine</i>)
DNK	Дезоксирибонуклеинска киселина (енгл. <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
EDTA	Етилендиаминтетрасирћетна киселина (енгл. <i>Ethylendiaminetetraacetic Acid</i>)
EDS	Енергетско диспергована спектроскопија (енгл. <i>Energy-Dispersive Spectroscopy</i>)
ESI-Q-TOF-MS	Електроспреј јонизација са квадропол масеном спектрометријом (енгл. <i>Electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass Spectrometry</i>)
ESI-MS	Примарна електроспреј јонизацијска масена спектрометрија (енгл. <i>Electrospray ionization mass spectrometry</i>)
HOCl	Хипохлораста киселина (енгл. <i>Hypochloric Acid</i>)
GC/MS	Гасна хроматографија/масена спектрометрија (енгл. <i>Gas Chromatography/ Mass Spectrometry</i>)
IR	Инфрацрвена спектроскопија (енгл. <i>Infrared spectroscopy</i>)
ISO	Међународна организација за стандардизацију (енгл. <i>International Standards Organization</i>)
LC50	(енгл. <i>Median lethal dose</i>)
Mg	Магнезијум (енгл. <i>Magnesium</i>)
N	Азот (енгл. <i>Nitrogen</i>)
Na	Натријум (енгл. <i>Sodium</i>)
NaOCl	Натријум хипохлорит (енгл. <i>Sodium hypochlorite</i>)

NMR	Нуклеарно-магнетно-резонантна спектроскопија (енгл. <i>Nuclear magnetic resonance spectroscopy</i>)
O	Кисеоник (енгл. <i>Oxygen</i>)
P	Фосфор (енгл. <i>Phosphorum</i>)
PCA	Парахлоранилин (енгл. <i>Para-Chloroaniline</i>)
PCU	Пара-хлорофенилуреа (енгл. <i>Para-chlorophenylurea</i>)
SEM	Скенинг електронска микроскопија (енгл. <i>Scanning Electron Microscopy</i>)
TLS	Танкослојна хроматографија (енгл. <i>Thin-Layer Chromatography</i>)
TOF-SIMS	Секундарна масена спектроскопска анализа (енгл. <i>Time-of-flight secondary ion mass spectrometry</i>)

БИОГРАФИЈА

Љиљана (рођена Кулић) Бјеловић је рођена 10.05.1984. године у Фочи, Република Српска. Основну и средњу Медицинску школу завршила је у Фочи. Стоматолошки факултет у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву уписала је 2003/04 године а дипломирала 25.12.2009. године са просечном оценом 8,48. Докторску дисертацију под називом “ Процена утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина зуба са једним кореном“ пријавила је 2015. године на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу. Уписала је специјалистичке студије из Болести зуба и ендодонције 2013. године на Медицинском факултету у Фочи, Универзитета у Источном Сарајеву и положила специјалистички испит 21.12.2015. године са одличним успехом.

Од 2010-2014. године је запослена као асистент, а од 2015. године као виши асистент на Медицинском факултету, Универзитета у Источном Сарајеву, за ужу научну област Стоматологија, орална хирургија и медицина. Учествовала је као сарадник на више научних пројеката. Аутор је више научних и стручних радова. Учествовала је на бројним међународним и домаћим научним и стручним скуповима.

БИБЛИОГРАФИЈА

1. Радови објављени у научним часописима међународног значаја (категорија M20):

1. **Vjelović Lj**, Krunić J, Stojanović N, Erić J, Kanjevac T. Evaluation of permeability of root dentin after different irrigation protocols. Srp Arh Celok Lek 2018; 146(9-10): 492-497. **(M23)**
2. **Vjelović Lj**, Glišić B, Živković M, Kanjevac T. Investigation of P-chloroaniline formation in the reactions between different endodontic irrigants. Kragujevac J Sci. 2019; 41: 000-000 **(M24)**
3. Nogo Živanović D, Kanjevac T, **Vjelović Lj**, Ristić V, Tanasković I. The effect of final irrigation with MTAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin. Microsc Res Tech DOI: 10.1002/jemt.23239 **(M22)**

4. Erić J, Tihacek-Šojić Lj, **Bjelović Lj**, Tsakos G. Changes in oral health related quality of life (OHRQoL) and satisfaction with conventional complete dentures among elderly people. *Oral Health Preventive Dentistry* 2017; 5(3):237-244. **(M23)**
5. Erić J, Stančić I, Tihacek-Šojić Lj, **Kulić Lj**, Popovac A, Tsakos G. Prevalence, severity, and clinical determinants of oral impacts in older people in Bosnia and Herzegovina. *European Journal of Oral Sciences* 2012; 5: 438-443. **(M22)**

2. Радови објављени у научним часописима националног значаја (категорија M50):

1. **Bjelović Lj**, Erić J, Stojanović N, Krunić J, Cicmil S, Kanjevac T. Primena verzije upitnika CHILd oral impact on daily performance za procenu kvaliteta života dece na području Bosne i Hercegovina: pilot studija. *Medicinski pregled* 2017; LXX (1-2): 12-17. **(M51)**
2. Nogo-Živanović D, **Bjelović Lj**, Ivanović V, Kanjevac T, Tanasković I. Razmatranje terapijskih mogućnosti iriganasa u endodontskoj terapiji. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2018; 19:103-112. **(M51)**
3. Nogo-Živanović D, **Kulić Lj**, Tanasković I, Ristić V, Kanjevac T. Kvalitet punjanja kanala korena kod odraslog stanovništva u Bosni i Hercegovini lečenih u državnim i privatnim stomatološkim klinikama. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research* 2016; 17(1):43-47. **(M51)**
4. Nogo-Živanović D, **Kulić Lj**, Žuža A, Davidović B, Radović I. Uticaj oralnih kliničkih faktora na samoprocenu zdravlja usta i zuba. *Stomatološki Glasnik Srbije* 2015; 62(3):137-142. **(M51)**
5. Nogo-Živanović D, **Kulić Lj**, Krunić J, Stojanović N. Maksilarni drugi molar sa pet korijenskih kanala- prikaz bolesnika. *Biomedicinska istraživanja* 2014; 5(1):37-41. **(M51)**
6. Nogo-Živanović Dajana, Krunić J, **Kulić Lj**, Erić J, Stojanović N. Oralno zdravlje i specifični uticaj karijesa na kvalitet života osoba srednje životne dobi. *Stomatološki Glasnik Srbije* 2013; 60 (4): 218-225. **(M51)**

7. Đorđević S, Ivanović T, Žuža A, Nogo- Živanović D, **Kulić Lj**. Prevalenca karijesa i gingivitisa kod učenika u opštini Foča. Stomatološki Glasnik Srbije 2012; 59: 22-26. **(M51)**
8. **Kulić Lj**, Nogo-Živanović D, Krunić J, Vujašković M, Stojanović N. Radiološka procena kvaliteta punjenja kanala korena endodontski lečenih zuba na studentskim vježbama. Stomatološki Glasnik Srbije 2011; 58:139-47. **(M51)**

4.Зборници међународних научних скупова (категорија М 30):

1. Erić J, Milić Lemić A, **Bjelović Lj**, Simić I, Grbović A, Tihacek Šoić Lj. Stress distribution in supporting structures of three different prosthodontic designs. 105th, FDI Annual World Dental Congress, Abstract book P-134. International Dental Journal 2017; 67 (suppl. 1): 68-134. **M34**
2. J. Krunić, B. Popović, I. Mladenović, **Lj. Bjelović**, N. Stojanović. Effects of ozone and chlorhexidine on bacteria in dentin lesion. CED-IADR/NOF Oral Health Research Congress. Abstract book 0503. Vienna, Austria, 2017. **M34**
3. **Bjelović Lj**, Krunić J, Erić J, Lečić J, Kanjevac T. The effect of interaction between different endodontic irrigants on dental permeability. 22nd Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-258. Thessaloniki, Greece, 2017. **M34**
4. Davidović B, Janković S, Lečić J, Radović I, **Bjelović Lj**. Oral hygiene status of children with and without asthma. 22nd Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-029. Thessaloniki, Greece, 2017. **M34**
5. **Bjelović Lj**, Nogo- Živanović D, Krunić J, Davidović B, Stanojević M. Radiographic evaluation of periapical status and prevalence of endodontic treatment in an adult bosnian population. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-89. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
6. Davidović B, **Bjelović Lj**, Radović I, Nogo- Živanović D, Stojanović N. Analysis of the canal anatomy of maxillary second premolars. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-90. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
7. Krunić J, **Bjelović Lj**, Žuža A, Mladenović I, Stojanović N. Outcome of endodontic treatment using two different formulation of chlorhexidine as intracanal dressing. 21th

Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book OP-65. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**

8. Erić J, **Bjelović Lj**, Davidović B, Grbović A, Tihaček-Šoić Lj. Influence of different mucosal thickness and resiliency on the stress distribution in mandibular bone. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book OP-123. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
9. Samardžija Jovana H, Milinković M, Ivanović T, **Bjelović Lj**, Obrenović J. Influence of premature extraction of deciduous teeth to the position of the maxillary canines. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-30. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
10. Nogo Živanović D, **Bjelović Lj**, Davidović B, Radović I, Božović Đ. Influence of dental visit pattern on dental status and oral health-related quality of life. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-134. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
11. Ivanović T, Milinković M, Ivanović D, **Bjelović Lj**. Prevalence of primary and secondary crowding with children in need of orthodontic treatment. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-31. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
12. Milinković M, Ivanović T, Ivanović D, **Bjelović Lj**, Cicmil A. Thumbs sucking influence to the open bite etiology-case report. 21th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book PP-32. Banja Luka, B&H, 2016. **M34**
13. **Kulić Lj**, Zuza A, Krunić J, Eric J, Stojanović N. Periapical status related to the quality of root canal fillings and coronal restorations. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 227; Belgrade, Republic of Serbia, 2014. **M34**
14. Eric J, **Kulić Lj**, Nogo-Živanović D, Simić I, Krunić J. Technical quality of root canal treatment carried out in Bosnian general dental services. 19th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 227; Belgrade, Republic of Serbia, 2014. **M34**

15. Zuza A, Nogo-Živanović D, **Kulić Lj**, Radović I, Vujašković M. Tooth wear associated risk factors in adolescents and adults in Republic of Srpska. 19 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 128; Belgrade, Serbia, 2014. **M34**
16. Nogo-Živanović D, Zuza A, **Kulić Lj**, Radović I, Davidović L. Dental status and oral health-related quality of life in an adult Bosnian population. 19 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 128; Belgrade, Serbia, 2014. **M34**
17. Radović I, **Kulić Lj**, Nogo-Živanović D, Janković S, Davidović L. Tooth loss and prosthodontic rehabilitation in middle-aged adults and seniors citizens in Republic of Srpska. 19 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 252; Belgrade, Serbia, 2014. **M34**
18. Davidović B, Stojanović N, Zuza A, Simić I, **Kulić Lj**. Root canal morphology of the maxillary second premolars-the most frequent type according to vertucci's classification. 19 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 252; Belgrade, Serbia, 2014. **M34**
19. Simić I, Davidović B, **Kulić Lj**, Vukotić O, Tomić S. Prevalence of tooth extractions in orthodontic treatment: a five year study. 19 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 252; Belgrade, Serbia, 2014. **M34**
20. **Kulić Lj**, Erić J. Periapical health related to the quality of endodontic treatment and coronal restorations. 18 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 48; Skopje, FYR of Macedonia, 2013. **M34**
21. Nogo Živanović D, **Kulić Lj**, Davidović B, Erić J. Technical quality of endodontic treatment in an adult Bosnian subpopulation. 18 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 49; Skopje, FYR of Macedonia, 2013. **M34**
22. Erić J, **Kulić Lj**, Stojanović Z. Oral health-related quality of life among institutionalized and community-dwelling Bosnian elders. 18 th Congress of the

Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 46; Skopje, FYR of Macedonia, 2013. **M34**

23. Simić I, Tomić S, Davidović B, **Kulić Lj**, Vučinić I. Are we really toothless nation? 18 th Congress of the Balkan Stomatological Society (BaSS). Abstract book, page: 145; Skopje, FYR of Macedonia, 2013. **M34**
24. Erić J, **Kulić Lj**, Tihaček Šoić Lj, Tsakos G. Quality of life and denture satisfaction in complete denture wearers. 101 st FDI Annual World Dental Congress, International Dental Journal 2013; 63 (suppl. I): 64. **M34**
25. **Kulic Lj**, Eric J, Stojanovic N, Krunic J, Davidovic L. Radiographic quality of root fillings performed by undergraduate students. 16th Congress of the BaSS. Abstract book PP6. Bucharest, Romania 2011. **M34**
26. Erić J, Stančić I, Tihaček-Šojić Lj, Stojanović Z, **Kulić Lj**. Oral health related quality of life in elderly people. 16th Congress of the BaSS. Abstract book PP 27. Bucharest, Romania 2011. **M34**
27. Stančić I, Erić J, Janjić-Pavlović O, **Kulić Lj**, Čairović Aleksandra, Radović Katarina. Impact of new prostheses on the OHRQoL of elderly patients. 16th Congress of the BaSS. Abstract book PP6. Bucharest, Romania 2011. **M34**
28. Kulić J, Tihaček-Šojić Lj, Stančić I, Stojanović Z, **Kulić Lj**, Janjić-Pavlović O. Uticaj neadekvatnih zubnih nadoknada na kvalitet života funkcionalno nezavisnih pacijenata starije dobi. XVI Simpozijum protetičara Srbije. Abstract book PP31. Mokra Gora, Republika Srbija, 2009. **M34**
29. Kulić J, Stančić I, Tihaček-Šojić Lj, Stojanović Z, **Kulić Lj**. Agreement between professional evaluation and patient's satisfaction with existing dentures. 15th Congress of the BaSS. Abstract book PP281. Thessaloniki, Greece, 2010. **M34**

5. Зборници скупова националног значаја (категорија М60):

1. **Bjelović Lj**, Krunić J, Stojanović N, Radović I, Žuža A, Kanjevac T. Spektroskopska analiza precipitata nastalog u interakciji različitih endodontskih iriganasa. VIII

Međunarodni simpozijum doktora stomatologije Republike Srpske. Zbornik radova PP 7. Foča, Republika Srpska, BiH, 2017. **M64**

2. **Bjelović Lj**, Radović I, Žuža A, Kostić B, Erić J, Kanjevac T. Hemijska analiza precipitata nastalog u interakciji natrijum hipohlorita i hlorheksidina, MTAD i QMiX. VIII Međunarodni simpozijum doktora stomatologije Republike Srpske. Zbornik radova PP 8. Foča, Republika Srpska, BiH, 2017. **M64**
3. Žuža A, **Bjelović Lj**, Radović I, Janjić-Pavlović O, Božović Đ, Krunić J. Prevalenca, izraženost i faktori rizika za nastanak nekarijesnih cervikalnih lezija kod stanovništva u Republici Srpskoj. VIII Međunarodni simpozijum doktora stomatologije Republike Srpske. Zbornik radova PP 9. Foča, Republika Srpska, BiH, 2017. **M64**
4. Radović I, **Bjelović Lj**, Žuža A, Janković S, Stojanović N. Oralna higijena kod adolescenata. VIII Međunarodni simpozijum doktora stomatologije Republike Srpske. Zbornik radova PP 10. Foča, Republika Srpska, BiH, 2017. **M64**
5. Radović I, Žuža A, Davidović B, **Bjelović Lj**, Davidović L. Primjena sistema za irigaciju sa negativnim apikalnim pritiskom u terapiji velike periapikalne lezije: prikaz slučaja. VIII Međunarodni simpozijum doktora stomatologije Republike Srpske. Zbornik radova PP 11. Foča, Republika Srpska, BiH, 2017. **M64**
6. Kanjevac T, Erić J, **Bjelović Lj**, Vasović M, Sekulić M. Uticaj oralnog zdravlja na svakodnevne aktivnosti školske dece uzrasta 12-15 godina u Kragujevcu. 16. Kongres stomatologa Srbije sa međunarodnim učešćem. Program i zbornik OP 32. Beograd, Republika Srbija, 2017. **M64**
7. **Bjelović Lj**, Erić J, Krunić J, Žuža A, Tanasković I, Kanjevac T. Ispitivanje interakcije kombinacije rastvora natrijum hipohlorita/hlorheksidina i natrijum hipohlorita/QMiX na dentin kanala korijena. IV Kongres stomatologa BiH sa međunarodnim učešćem. Knjiga sažetaka OP 5. Teslić, Bosna i Hercegovina, 2016. **M64**
8. Nogo-Živanović D, **Bjelović Lj**, Kanjevac T, Stojanović N, Radović I, Tanasković I. Uticaj finalne irigacije rastvorom MTAD na razmazni sloj kanala korena. IV Kongres stomatologa BiH sa međunarodnim učešćem. Knjiga sažetaka OP 6. Teslić, Bosna i Hercegovina, 2016. **M64**

9. Žuža A, Davidović L, Stojanović N, **Bjelović Lj**, Božović Đ, Vujašković M. Uticaj konzumiranih kiselih napitaka na prevalencu nekarijesnih cervikalnih lezija. IV Kongres stomatologa BiH sa međunarodnim učešćem. Knjiga sažetaka OP 4. Teslić, Bosna i Hercegovina, 2016. **M64**
10. Erić J, **Bjelović Lj**, Davidović B, Grbović A, Milić Lemić A, Tiháček Šoić Lj. Uticaj debljine i rezilijence sluzokože na distribuciju napona u kosti kod sluzokožno i mješovito poduprtih zubnih nadoknada. IV Kongres stomatologa BiH sa međunarodnim učešćem. Knjiga sažetaka OP 8. Teslić, Bosna i Hercegovina, 2016. **M64**
11. **Bjelović Lj**, Erić J, Radović I, Milinković M, Ivanović T, Davidović B. Procena oralno-zdravstvenog statusa i kvaliteta života kod dece školskog uzrasta. XXXII Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u Stomatologiji: „Kako unaprediti zdravstveno-vaspitni rad u stomatološkoj praksi“, Jagodina, Republika Srbija 2016. **M64**
12. Janković S, Kapuran M, Ivanović M, Radović I, Lečić J, **Bjelović Lj**. Strah od stomatološkog lečenja. XXXII Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u Stomatologiji: „Kako unaprediti zdravstveno-vaspitni rad u stomatološkoj praksi“, Jagodina, Republika Srbija 2016. **M64**
13. Radović I, **Bjelović Lj**, Davidović B, Lukić R, Kapuran M. Komparativna analiza između državnih i privatnih stomatoloških ustanova u obezbjeđivanju stomatološke zaštite. XXXII Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u Stomatologiji: „Kako unaprediti zdravstveno-vaspitni rad u stomatološkoj praksi“, Jagodina, Republika Srbija 2016. **M64**
14. Kapuran M, Janković S, Lečić J, Dimitruk I, **Bjelović Lj**. Stanje prvog stalnog molara kod dvanaestogodišnjaka. XXXII Simpozijum zdravstvenog vaspitanja u Stomatologiji: „Kako unaprediti zdravstveno-vaspitni rad u stomatološkoj praksi“. Jagodina, Republika Srbija 2016. **M64**
15. **Kulić Lj**, Žuža A, Radović I, Davidović L. Radiološka procjena kvaliteta punjenja kanala korijena endodontski liječenih zuba kod ispitsnika istočne regije Bosne i Hercegovine. Kongres „Stomatologija danas“ u BIH sa međunarodnim učešćem, Teslić, Banja Vrućica 19-20. oktobar 2012., Zbornik apstrakata PP:22. **M64**

16. Krunić J, Nogo-Živanović D, **Kulić Lj**, Stojanović N. Uticaj protoka nestimulisane pljuvačke na prevalencu karijesa kod žena u menopauzi na terapiji psihotropnim lijekovima. Kongres „Stomatologija danas“ u BIH sa međunarodnim učešćem, Teslić, Banja Vrućica 19-20. oktobar 2012., Zbornik apstrakata PP:20. **M64**
17. Radović I, **Kulić Lj**, Krunić J, Stojanović N. Stanje zuba i protetski status kod starije populacije u Republici Srpskoj. Kongres „Stomatologija danas“ u BIH sa međunarodnim učešćem, Teslić, Banja Vrućica 19-20. oktobar 2012., Zbornik apstrakata PP:17. **M64**
18. Žuža A, **Kulić Lj**, Nogo-Živanović D, Davidović L. Učestalost oralnih perafunkcija kod osoba sa nekarijesnim cervikalnim lezijama. Kongres „Stomatologija danas“ u BIH sa međunarodnim učešćem, Teslić, Banja Vrućica 19-20. oktobar 2012. Zbornik apstrakata PP:16. **M64**

ПРИЛОГ

8.1. КЉУЧНА ДОКУМЕНТАЦИЈСКА ИНФОРМАТИКА

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА У КРАГУЈЕВЦУ

Редни број-РБ:

Идентификациони број-ИБР:

Тип документације-ТД: Монографска публикација

Тип записа-ТЗ: Текстуални штампани материјал

Врста рада-ВР: Докторска дисертација

Аутор-АУ: Љиљана Бјеловић

Ментор/коментор-МН: проф. др Татјана Кањевац

Наслов рада-НР: Процена утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина зуба са једним кореном

Језик публикације-ЈП: српски/ћирилица

Језик извода-ЈИ: српски/енглески

Земља публиковања-ЗП: Република Србија

Уже географско подручје-УГП: Централна Србија

Година-ГО: 2019. година

Издавач-ИЗ: Ауторски репринт

Место и адреса-МС: Крагујевац, Светозара Марковића 69

Физички опис рада-ФО: 106 страна, 5 табела, 34 слике

Научна област: Медицина, Стоматологија

Научна дисциплина-ДИ: Болести зуба, Ендодонција

Предметна одредница/кључне речи-ПО: Преципитат, дентински тубули, натријум хипохлорит (NaOCl), хлорхексидин (CHX), етилендиаминтетрасирћетна киселина (EDTA), MTAD, QMiX, пермеабилност, скенинг електронска микроскопија (*SEM*), хемијски састав, енергетско дисперговане спектроскопије (*EDS*), парахлоранилин (*PCA*)

УДК

Чува се-ЧУ: У библиотеци Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу

Важна напомена-МН:

Извод-ИД: Увод: Иригација представља један од најзначајнијих поступака у дебридману каналног простора. Раствори који се користе за иригацију у току ендодонтске терапије долазе у контакт један са другим унутар коренског канала. Последица таквих интеракција може довести до стварања чврстих продуката, преципитата. Они имају клинички значај јер могу довести до оклузије дентинских тубула, смањене пермеабилности дентина, ометају пенетрацију интраканалних лекова у дентинске тубуле и компромитују адхезију силера за зидове канала. Хемијска структура и токсичност преципитата још увек није разјашњена.

Циљ овог истраживања је био да се прво испита имедијатно стварање преципитата на површини коренског дентина после иригације натријум хипохлоритом (NaOCl) и завршне иригације хлорхексидином (CHX), етилендиаминтетрасирћетном киселином (EDTA) + CHX, MTAD или QMiX и његов ефекат на дентинске тубуле, а затим да се одреди хемијски састав и присуство парахлоранилина (PCA) у преципитату.

Материјал и методе: У студију је укључено 150 предњих максиларних хуманих зуба који су методом случајног узорка подељени у пет група (n=30) пре инструментације и испирања са NaOCl на основу финалног протокола иригације: CHX (2% CHX), EDTA + CHX (17% EDTA + 2% CHX), MTAD, QMiX и дестилована вода (контролна група). Сто коренова зуба је анализирано скенинг електронском микроскопијом (*Scanning Electron Microscopy (SEM)*). По осамнаест из сваке групе је уздужно раздвојено ради одређивања присуства и количине преципитата и броја затворених дентинских тубула у коронарној, средњој и апексној трећини. Преостала два из сваке групе су хоризонтално пресечена да би се испитало формирање преципитата у дентинским тубулима. За испитивање пермеабилности дентина, педесет коренова је потопљено у 0,2% раствор *Rodamina B* у трајању од 24 часа. Након тога, коренови су хоризонтално пресечени и један део из сваке трећине је изабран методом случајног узорка. Сlike изабраних делова су скениране и софтверски анализирани ради одређивања процента пенетрације боје. Хемијски састав преципитата створеног на површини дентинског зида канала корена у коронарној и апексној трећини је одређен помоћу енергетско дисперговане спектроскопије (*Energy-dispersive spectroscopy (EDS)*). Додатно, 5,25% NaOCl раствор је помешан са 2% CHX, 17% EDTA и QMiX као и 2% CHX са 17% EDTA. Раствори су помешани у односу 1:1 и присуство PCA је испитивано танкослојном хроматографијом, нуклеарно магнетно резонантном спектроскопијом и инфрацрвеном спектроскопијом.

Резултати: *SEM* анализом је показано формирање преципитата на површини дентина и у дентинским тубулима у свим терапијским групама, док у контролној групи преципитат није уочен. Највећа количина преципитата је забележена у CHX групи. Анализом података је показано да је количина преципитата у овој групи била значајно већа у односу на MTAD групу у коронарној ($p < 0,05$) односно QMiX групу у средњој трећини ($p < 0,05$). У апексној трећини, преципитат формиран у CHX групи био је значајно већи од оног у MTAD и QMiX групи ($p < 0,05$). Процент затворених дентинских тубула у CHX је био сличан као у EDTA+CHX групи, али се значајно разликовао од осталих група ($p < 0,05$). Пенетрација боје је била мања у свим трећинама у CHX групи у односу на контролу као и у односу на QMiX и MTAD групу ($p < 0,05$). *EDS* анализом преципитата у CHX групи је показано статистички значајно више хлора у поређењу са преципитатом формираним у другим групама ($p < 0,05$). Мешање 5,25% NaOCl и 2% CHX је било праћено стварањем браон преципитата; 5,25% NaOCl и QMiX наранџасто-браон, а мешање 2% CHX и 17% стварањем белог преципитата. Комбиновање 5,25% NaOCl са 17% EDTA је довело само до стварања мехурића. Резултатима ове студије није показано стварање *PCA* ни за једну од испитаних комбинација раствора.

Закључак: Преципитат богат хлором је обилнији на површини дентинског зида канала корена после иригације 5,25% NaOCl и финалне иригације 2% CHX него после иригације са NaOCl и EDTA + CHX, QMiX или MTAD. Његово повећано присуство смањује број отворених дентинских тубула као и пермеабилност дентина у свим трећинама канала корена. Мешање NaOCl и CHX или QMiX и CHX са EDTA резултира стварањем талоба без *PCA*

Кључне речи: преципитат, дентински тубули, иригација, пермеабилност, *PCA*, *SEM*

Датум прихватања теме од стране ННВ-ДП: 24.02.2016. године

Датум одбране-ДО:

Чланови комисије-КО:

1. **Проф. др Ирена Танасковић**, редовни професор Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Хистологија и ембриологија, председник;
2. **Доц. др Марија Живковић**, доцент Факултета медицинских наука Универзитета у Крагујевцу за ужу научну област Органска хемија, члан;
3. **Доц. др Јелена Крунић**, доцент Медицинског факултета Универзитета у Источном Сарајеву за ужу научну област Дентална патологија, члан.

8.2. KAY WORDS DOCUMENTATION

**UNIVERSITY OF KRAGUJEVAC
FACULTY OF MEDICAL SCIENCES KRAGUJEVAC**

Accession number-ANO:

Identification number-INO:

Documentation type-DT: Monographic publication

Type of record-TR: Textual printed material

Contents code-CC: Ph. D. Thesis

Author-AU: Ljiljana Bjelović

Menthor/co-mentor-MN: Associate professor Tatjana Kanjevac, DMD, Ph.D

Title-TI: Influence of different irrigation solutions on dentin and dentin tubules of single-rooted teeth

Language of text-LT: Serbian/Cyrillic

Language of abstract: Serbian/English

Country of publication-CP: Serbia

Locality of publication-LP: Central Serbia

Publication year-PY: 2019

Publisher-PU: Author reprint

Publication place-PP: Kragujevac, Svetozara Markovica 69, Republic of Serbia

Physical description-PD: 106 pages, 5 tables, 34 images

Scientific field-SF: Medicine, Dentistry

Scientific discipline SD: Tooth disease, Endontology

Subject/key words SKW: precipitate, dentine tubules, sodium hypochlorite (NaOCl), chlorhexidine (CHX), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), MTAD, QMiX, permeability, scanning electron microscopy (*SEM*), chemical composition, energy-dispersive spectroscopy (*EDS*), p-chloroaniline (*PCA*)

UDC

Holding data: Library of Faculty of medical sciences, University of Kragujevac, Republic of Serbia

Note-N:

Abstract-AB: Introduction: Canal irrigation represents one of the most important procedures in the debridement of the canal space. The solutions used for irrigation during endodontic therapy come into contact with each other within the root canal. The consequences of such interactions can be formed solid by-product, precipitate. They has a clinical significance as it can lead to the occlusion of dentinal tubules, a reduced permeability of dentine, impair penetration of intracranial medications into the dentine tubules and compromise adhesion of root canal sealers to the canal walls. Chemical nature and toxicity of the precipitate is still debated.

The aim of this study was to firstly to investigate immediate precipitate formation on root dentin surface irrigated with sodium hypochlorite (NaOCl) followed by the final rinse with chlorhexidine (CHX), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) + CHX, MTAD or QMiX and its effect on dentine tubules, and then to determine the chemical composition and presence of p-chloroaniline (*PCA*) in the precipitate.

Material and Methods: The study included 150 maxillary anterior human teeth randomly divided into five groups (n=30) before instrumentation and irrigation with NaOCl according to final rinse regimen: CHX (2% CHX), EDTA + CHX (17% EDTA + 2% CHX), MTAD, QMiX and control group (distilled water). One hundred teeth roots were subjected to scanning electron microscopy (*SEM*). Eighteen of from each group were split longitudinally for evaluation the presence and amount of precipitate and number of closed dentinal tubules at the coronal, middle, and apical root thirds. Remaining two of each group were horizontally sectioned to evaluate precipitate formation in dentinal tubules. For the dentin permeability analysis, fifty roots were immersed in a 0.2% Rhodamine B solution for 24 hours. After that, roots were horizontally cut and one slice of each third was randomly selected. The obtained images of slices were scanned and analyzed using the software for the assessment of leakage in percentage. Chemical composition of precipitate formed on root dentin surface in coronal and apical thirds was analyzed by energy-dispersive spectroscopy (*EDS*). Additionally, 5.25% NaOCl solution was associated with 2% CHX, 17% EDTA and QMiX as well as 2% CHX was associated with 17% EDTA. The solutions were mixed in a 1:1 ratio and presence of *PCA* was determined by using thin-layer chromatography, proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and infrared spectroscopy. Data were analyzed with Kruskal-Wallis/Dunn and ANOVA/Turkey's tests.

Results: *SEM* analysis showed formed precipitate on dentin surface and in the dentin tubules in all treatment groups, while the control group revealed root canals without precipitate formation. The highest amount of the precipitate was recorded in the CHX group.

Data analysis showed that the amount of the precipitate in this group was significantly higher in relation to the MTAD group ($p < 0.05$) in the coronal third and compared to the QMiX group in the middle third ($p < 0.05$). In the apical third, the amount of the precipitate formed in the CHX group was significantly higher than that in the QMiX and MTAD group ($p < 0.05$). The percentage of closed dentin tubules in CHX group was similar to EDTA+CHX group, but significantly lower than in other groups ($p < 0.05$). Less dye penetration was found in CHX group compared with control as well as with QMiX and MTAD group in all thirds ($p < 0.05$). *EDS* analysis of the precipitate in the CHX group showed statistically significantly higher content of Cl in comparison with the precipitate formed in other groups ($p < 0.05$). Mixing 5.25% NaOCl and 2% CHX, 5.25% NaOCl and QMiX, and 2% CHX and 17% EDTA led to the formation of brown, orange-brown and white precipitate, respectively. Association between 5.25% NaOCl and 17% EDTA yielded the bubbles formation only. The results of the present study showed no formation of *PCA* for the none of the investigated combinations.

Conclusion: The precipitate rich in chlorine is more abundant on the surface of the dentin wall of the root canal after irrigation with NaOCl and final rinse by CHX than after irrigation with NaOCl followed by EDTA + CHX, QMiX or MTAD. Its increased presence reduces the number of open dentin tubules as well as the dentin permeability at all root levels. Mixing of NaOCl with CHX or QMiX, and CHX with EDTA results in precipitate formation without *PCA*.

Key words: precipitate, dentinal tubules, irrigation, permeability, *PCA*, *SEM*

Accepted by the Scientific Board on- ASB: 24.02.2016.

Defended on-DE:

Thesis defended board

(Degree/name/surname/title/faculty)-DB:

1. **Associate professor Ирена Танасковић**, D.M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Department of Histology and Embryology, Chairman;
2. **Assistant professor Марија Живковић**, M.D, Ph.D, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Department of Pharmacy, member;
3. **Assistant professor Јелена Крунић**, M.D, Ph.D, Faculty of Medicine, University of East Sarajevo, Department of Dental pathology, member;

ИЗЈАВА АУТОРА О ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Љиљана Бјеловић, изјављујем да докторска дисертација под насловом:

Процена утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина
зуба са једним кореном

која је одбрањена на Факултету медицинских наука, Универзитета у Крагујевцу
представља *оригинално ауторско дело* настало као резултат *сопственог
истраживачког рада*.

Овом Изјавом такође потврђујем:

- да сам *једини аутор* наведене докторске дисертације,
- да у наведеној докторској дисертацији *нисам извршио/ла повреду* ауторског нити
- другог права интелектуалне својине других лица,
- да умножени примерак докторске дисертације у штампаној и електронској форми
- у чијем се прилогу налази ова Изјава садржи докторску дисертацију истоветну
- одбрањеној докторској дисертацији.

У Крагујевцу, 18.02.2019 године,

потпис аутора

ИЗЈАВА АУТОРА О ИСКОРИШЋАВАЊУ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

Ја, Љиљана Бјеловић,

дозвољавам

не дозвољавам

Универзитетској библиотеци у Крагујевцу да начини два трајна умножена примерка у електронској форми докторске дисертације под насловом:

Процена утицаја средстава за иригацију канала корена на дентин и тубуле дентина зуба са једним кореном

која је одбрањена на Факултету медицинских наука

Универзитета у Крагујевцу, и то у целини, као и да по један примерак тако умножене докторске дисертације учини трајно доступним јавности путем дигиталног репозиторијума Универзитета у Крагујевцу и централног репозиторијума надлежног министарства, тако да припадници јавности могу начинити трајне умножене примерке у електронској форми наведене докторске дисертације путем *преузимања*.

Овом Изјавом такође

дозвољавам

не дозвољавам ¹

¹ Уколико аутор изабере да не дозволи припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од Creative Commons лиценци, то не искључује право припадника јавности да наведену докторску дисертацију користе у складу са одредбама Закона о ауторском и сродним правима.

припадницима јавности да тако доступну докторску дисертацију користе под условима утврђеним једном од следећих Creative Commons лиценци:

- 1) Ауторство
- 2) Ауторство - делити под истим условима
- 3) Ауторство - без прерада
- 4) Ауторство - некомерцијално
- 5) Ауторство - некомерцијално - делити под истим условима
- 6) Ауторство - некомерцијално - без прерада ²

У Крагујевцу, 18.02.2019. године,

потпис аутора

INVESTIGATION OF *P*-CHLOROANILINE FORMATION IN THE REACTIONS BETWEEN DIFFERENT ENDODONTIC IRRIGANTS

Ljiljana Z. Bjelović^a, Biljana Đ. Glišić^b, Marija D. Živković^c and Tatjana V. Kanjevac^{d*}

^aUniversity of East Sarajevo, Faculty of Medicine, Department of Restorative Dentistry and Endodontics, Studentska bb, Foča 73 300, Bosnia and Herzegovina;

^bUniversity of Kragujevac, Faculty of Science, Department of Chemistry, R. Domanovića 12, Kragujevac 34000, Serbia;

^cUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Pharmacy, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

^dUniversity of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Dentistry, Svetozara Markovića 69, 34000 Kragujevac, Serbia

*Corresponding author; E-mail: tatjanakanjevac@yahoo.com

(Received October 5th, 2018; Accepted December 10th, 2018)

ABSTRACT. The aim of this study was to determine whether *p*-chloroaniline (PCA) is formed in the reactions of sodium hypochlorite (NaOCl) with final rinse chlorhexidine (CHX), QMix (combination of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), CHX and detergent) and EDTA/CHX solutions by thin-layer chromatography (TLC), proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and infrared (IR) spectroscopy. Commercially available 5.25% NaOCl solution was mixed with 2% CHX and QMix in 1 : 1 (v/v) ratio at room temperature. Furthermore, 2% CHX was associated with 17% EDTA under the same experimental conditions. The obtained solutions were evaluated qualitatively for color changing, precipitate and/or bubble formation and analyzed by TLC chromatography. The association products were investigated by spectroscopic (¹H NMR and IR) methods in order to determine whether they contain PCA. It was found that interactions between NaOCl/CHX and CHX/EDTA led to forming of brown and white precipitate. When NaOCl was mixed with QMix, an orange-brown precipitate was formed. PCA was not detected as a product of the reactions between NaOCl and final rinse solutions of CHX, QMix and EDTA/CHX association.

Key words: *p*-Chloroaniline, Infrared spectroscopy, Irrigants, Proton nuclear magnetic resonance, Thin-layer chromatography

INTRODUCTION

Root canal irrigation, mechanical or chemical, aims to remove debris, lubricate the canal, dissolve organic and inorganic tissues, as well as to prevent smear layer formation or aid its removal (HAAPASALO *et al.* 2014; HÜLSMANN *et al.* 2007; ZEHNDER *et al.* 2005). The biological function of the irrigants is related to their antimicrobial effect, inactivation of

endotoxin, non-toxicity to vital tissues and low allergenic potential (ZEHNDER *et al.* 2005). The most commonly used irrigants in endodontic therapy are sodium hypochlorite (NaOCl), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and chlorhexidine (CHX) (HAAPASALO *et al.* 2014; HÜLSMANN *et al.* 2007; ZEHNDER *et al.* 2005; BITTER *et al.* 2013; GU *et al.* 2009). In order to reduce surface tension of irrigants, improve their dentinal tubules penetration and enhance their efficiency, combination of two or more irrigants is recommended (STOJICIC *et al.* 2010). Accordingly, QMix (combination of EDTA, CHX and detergent; Dentsply TulsaDental, Tulsa, OK, USA) have been introduced in endodontic practice (STOJICIC *et al.* 2012). Previous studies showed that QMix is as effective as 17% EDTA in removal of smear layer or even superior (STOJICIC *et al.* 2012; DAI *et al.* 2011). Moreover, QMix is as efficacious antimicrobial agent as 6% NaOCl and superior when compared to CHX, MTAD (mixture of doxycycline, citric acid and detergent) and solutions of NaOCl with lower concentrations (DAI *et al.* 2011; WANG *et al.* 2012).

Numerous *in vitro* studies showed that chemical interactions between some irrigants result in formation of precipitates (BASRANI *et al.* 2007; RASIMICK *et al.* 2008; TAY *et al.* 2006; ARSLAN *et al.* 2015). Clinical relevance of the precipitate is in its difficult removal from the canal which can contribute to periapical *p*-chloroaniline (PCA) leaching (VIVAQUA-GOMES *et al.* 2002). Some of these studies (BASRANI *et al.* 2007; BASRANI *et al.* 2010) demonstrated that successive rinsing of root canal with NaOCl and CHX produced an orange-brown precipitate, which contains PCA. However, these findings were not confirmed in the other studies (THOMAS *et al.* 2010; ORHAN *et al.* 2016). It is worth noting that PCA is carcinogenic and toxic (CHHABRA *et al.* 1991; KACMAR *et al.* 1995) and can lead to dentin discoloration (SOUZA *et al.* 2013). After mixing CHX and EDTA, non-toxic white precipitate formation was noticed (RASIMICK *et al.* 2008). There are only a few studies related to precipitate formation in the interactions of most commonly used irrigant NaOCl with QMix solution (ARSLAN *et al.* 2015; KOLOSOWSKI *et al.* 2014), in which PCA was not detected.

A recent study of ORHAN *et al.* 2016 has showed that different methods can be used for PCA presence analysis in the precipitate resulted from NaOCl/CHX association. Additionally, THOMAS *et al.* 2010 reported that mass spectrometry is not a reliable method for PCA formation detection, as well as Beilstein and HCl solubility tests (KRISBNAMURTTY *et al.* 2010). Therefore, the aim of this study was to determine whether PCA is formed in the reactions of NaOCl with final rinse CHX and QMix solutions, as well as a result of EDTA/CHX combination by thin-layer chromatography (TLC), proton nuclear magnetic resonance (^1H NMR) and infrared (IR) spectroscopy.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Commercially available solutions (5.25% NaOCl, 2% CHX (Consepsis, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA), 17% EDTA (ENDO-SOLution, CerKamed, PPH CerKamed, Stalowa Wola, Poland) and QMix) were used in the study. PCA, ethyl acetate, hexane, sodium sulfate and deuterated dimethyl sulfoxide (DMSO- d_6) were purchased from the Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA). All the employed chemicals were of analytical reagent grade and used without further purification.

Associations

5 mL of 5.25% NaOCl solution was mixed with 5 mL of 2% CHX and QMix at room temperature. In addition, 2% CHX was associated with 17% EDTA in 1 : 1 (v/v) ratio. The

final solutions were evaluated qualitatively for color changing, precipitate and/or bubble formation. The visual characteristics of the irrigants' resultant association were summarized in Table 1.

Table 1. Visual characteristics of the irrigants association observed in this study.

Solution 1	Solution 2	Visual characteristic of the association*
5.25% NaOCl	2% CHX	Brown precipitate
5.25% NaOCl	QMix	Orange-brown coloring and bubble formation
2% CHX	17% EDTA	White cloudy precipitate

*Solutions were mixed in 1 : 1 (v/v) ratio at room temperature.

PCA Formation analysis

After mixing 5.25% NaOCl with 2% CHX, a brown-colored mixture was extracted three times with 15.0 mL ethyl acetate, and then organic layer was separated and dried over anhydrous sodium sulfate (ORHAN *et al.* 2016). This solution was analyzed by TLC and then ethyl acetate was removed under reduced pressure. The isolated brown precipitate was further evaluated by spectroscopic (^1H NMR and IR) methods in order to determine whether it contains PCA.

In the case of the other two irrigants associations, the resulting solution was analyzed by TLC and then solvent was removed under reduced pressure. The obtained solids (white for 2% CHX/17% EDTA and orange-brown for 5.25% NaOCl/QMix) were further analyzed by spectroscopic (^1H NMR and IR) methods.

Silica gel 60 on Al plates with layer thickness 0.2 mm (Merck) was used for TLC. Two drops of the corresponding solution were injected on TLC plate. Near this spot, two drops of solution obtained by dissolving 2.0 mg of PCA in 1.0 mL of ethyl acetate were injected as stationary phase. This plate was placed in a TLC tank containing ethyl acetate/hexane mixture in 1 : 2 (v/v) ratio as mobile phase. ^1H NMR spectra were recorded at 25 °C on a Varian Gemini 2000 spectrometer at 200 MHz. 20.0 mg of PCA and the corresponding association products were dissolved in 0.7 mL of DMSO- d_6 and transferred into a 5 mm NMR tube. Chemical shifts are reported in ppm (δ) and scalar couplings are reported in Hertz. IR spectra were recorded as KBr pallets on a Perkin Elmer Spectrum One spectrometer over the range 4000-450 cm^{-1} .

RESULTS AND DISCUSSION

The visual irrigants' resultant association characteristics are summarized in Table 1. Brown and white precipitates were formed in the interactions of 2% CHX with 5.25% NaOCl and 17% EDTA, respectively, immediately after mixing of these irrigants, while the combination of 5.25% NaOCl with QMix resulted in orange-brown solution coloration and bubbles formation.

Different irrigating solutions combinations were studied for PCA presence by TLC, ^1H NMR and IR measurements. The corresponding data for each combination were compared with those for PCA.

TLC plates under UV light for the 5.25% NaOCl/QMix association and PCA before and after corresponding solvent development are shown in Fig. 1. The same picture is obtained for the other irrigant associations, indicating that none of them produces PCA as a by-product.

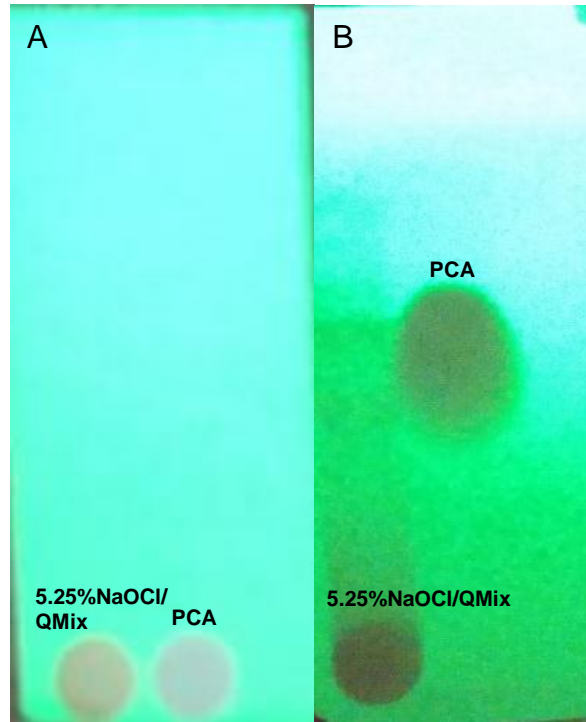


Figure 1. TLC plates under UV light for the 5.25% NaOCl/QMix irrigant association and PCA before (A) and after (B) development in solvent. The same picture is obtained for all other investigated irrigants associations.

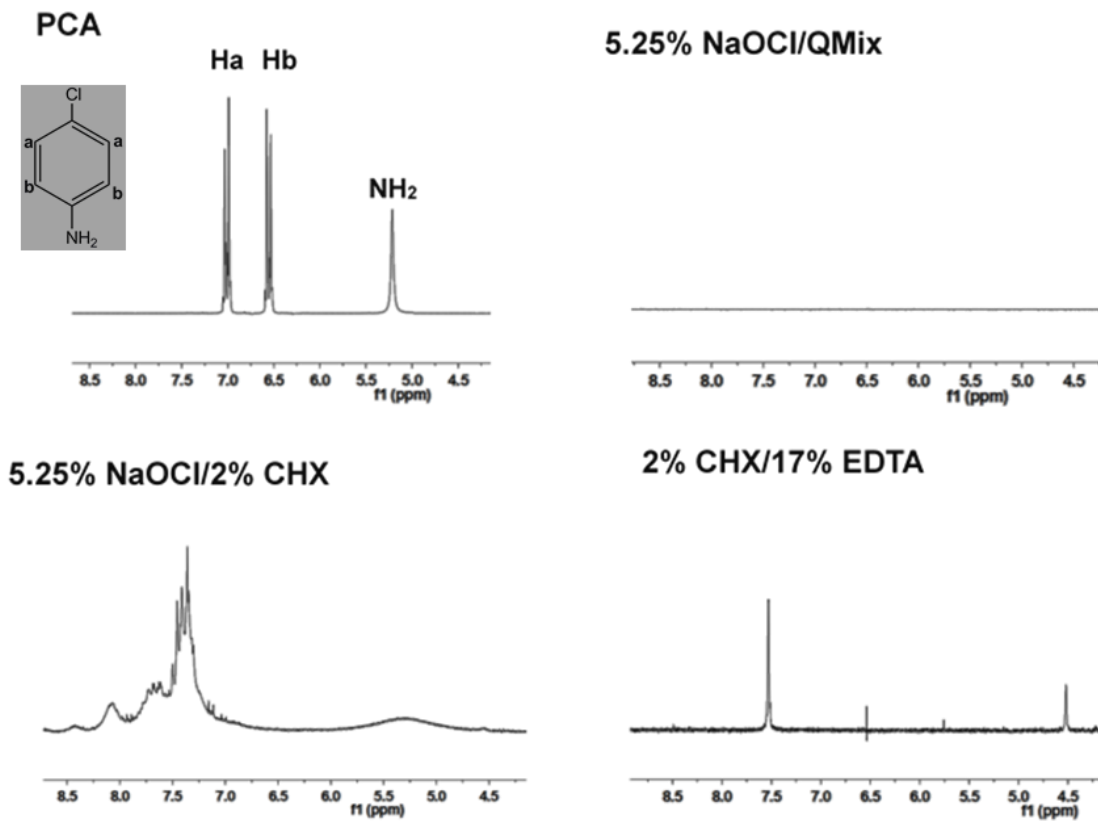


Figure 2. Analysis of investigated irrigants association products by ^1H NMR spectroscopy.
All spectra were recorded in $\text{DMSO-}d_6$ at ambient temperature
and compared with that obtained for PCA.

The ^1H NMR spectrum for each association product was compared with the spectrum of PCA; see Fig. 2. As can be seen from this figure, two doublet signals at 7.01 and 6.56 ppm with coupling constant $J = 8.8$ Hz are present in the spectrum of PCA and are assigned to the pairs of aromatic protons H_a and H_b , respectively, while a singlet at 5.22 ppm is due to the NH_2 protons. However, these resonances are not present in the spectra of association products, indicating that no PCA was formed in the investigated reactions. Moreover, there was no appearance of PCA resonances characteristic in association products spectra recorded 72 h after their dissolution.

In the IR spectrum, PCA has two very strong and sharp bands at 3472 and 3382 cm^{-1} , which were assigned to the asymmetric and symmetric stretching vibration of the primary amino moiety (Fig. 3). None of these bands can be detected in the spectrum of the investigated association products, additionally confirming that these products do not contain PCA.

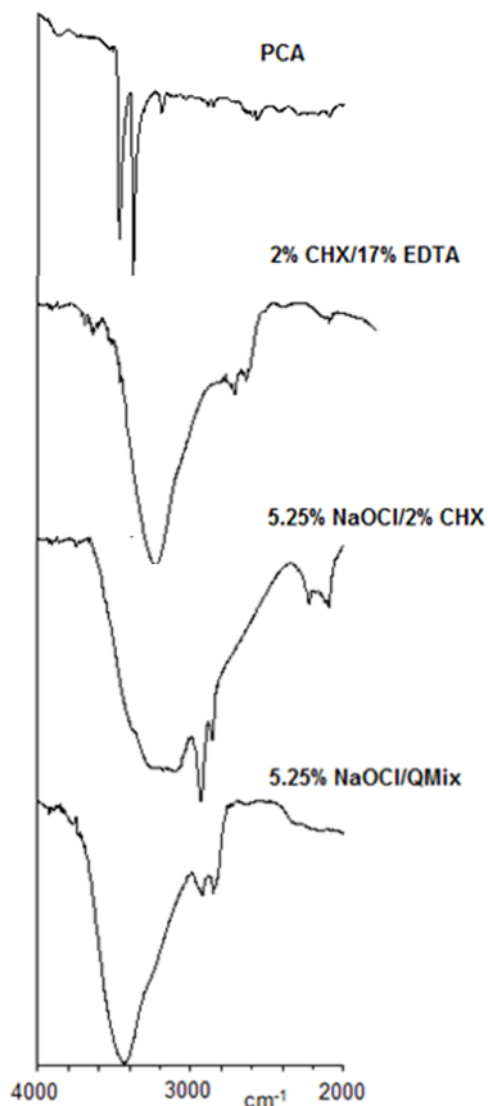


Figure 3. Analysis of the investigated irrigants association products by IR spectroscopy.

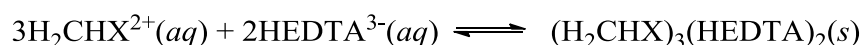
Their spectra in the region of 4000–2000 cm⁻¹ are compared with that for the PCA.

Considering the fact that different irrigants combination during endodontic therapy may enhance their antimicrobial properties (KURUVILLA *et al.* 1998), possible undesirable chemical interactions among the irrigants have to be investigated (ROSSI-FEDELE *et al.* 2012). Some composition precipitate findings, resulted from different irrigants combination, showed that there is still a debate whether it contains PCA (BASRANI *et al.* 2007; RASIMICK *et al.* 2008; TAY *et al.* 2006; ARSLAN *et al.* 2015; THOMAS *et al.* 2010; ORHAN *et al.* 2016). Contradictory results can be explained by different detection sensitivities and methods that include handling and dissolution of the precipitate that may affect product recovery. Also, in some studies, failure to detect PCA may be related to the used materials and methods but is not an evidence of its absence (ORHAN *et al.* 2016; KOLOSOWSKI *et al.* 2014).

The purpose of this *in vitro* study is to determine whether PCA was formed as a by-product of the reactions between NaOCl and final rinse CHX and QMix solutions, as well as a result of EDTA/CHX combination. This can be important because PCA is considered to be cytotoxic on human cells (WORLD HEALTH ORGANISATION 2006), carcinogenic (THOMAS *et al.* 2010) and can lead to neonates methemoglobinemia (MESSMER *et al.* 2015). TLC, ¹H NMR and IR methods were chosen for this study due to their great sensitivity in identifying components of a given reaction mixture, as well as determination of mixture purity. Moreover, ¹H NMR spectroscopy is one of the principal techniques used to structurally characterize compounds in a nondestructive and noninvasive manner. Previous studies (BASRANI *et al.* 2007; ORHAN *et al.* 2016) showed that the use of a destructive method, such as mass spectroscopy, which is based on breaking down of the precipitate, can lead to unreliable results. Therefore, in accordance to previous study by ORHAN *et al.* 2016, noninvasive spectroscopic analyses (¹H NMR and IR) and TLC chromatographic method were used for the identification of compounds present in the precipitate.

On the basis of TLC, ¹H NMR and IR measurements, we found that a brown precipitate formed in the reaction between 5.25% NaOCl and 2% CHX does not contain PCA. This finding is in accordance with previous studies (KACMAR *et al.* 1995; SOUZA *et al.* 2013; Prado *et al.* 2013), where the absence of PCA in the brown precipitate was confirmed by ¹H NMR and ESI-MS analysis. Moreover, NOWICKI *et al.* 2011, reported that NaOCl/CHX association did not produce PCA at any measurable quantity and identified two major CHX breakdown products in NaOCl presence, namely *p*-chlorophenylurea and *p*-chlorophenylguanidyl-1,6-diguanidyl-hexane. Contrary to this, ¹H NMR study by BASRANI *et al.* 2007 and ARSLAN *et al.* 2015, showed that NaOCl mixed with CHX resulted in an orange-brown solution coloration and PCA formation. It is considered that the precipitate was formed by the acid-base reaction between CHX, a dicationic acid, that donated protons and NaOCl that accepted protons (BASRANI *et al.* 2007). This resulted in insoluble precipitate formation that can stain dentin, bond to the walls of the access cavity and root canal (KRISBNAMURTBY *et al.* 2010). Thus, the precipitate acts as a residual film and chemical smear layer that may compromise intracanal medicaments diffusion, disrupts canal filling adhesion and favours coronal restoration breakdown (PRADO *et al.* 2013; BUI *et al.* 2008).

Similarly, in the presence of EDTA, no decomposition of CHX to PCA was observed by TLC and spectroscopic analysis (Fig. 1-3). This is in accordance with the previous HPLC study on the CHX/EDTA association product (RASIMICK *et al.* 2008), showing that CHX was not decomposed by EDTA and that white product obtained from this reaction represented a salt formed by neutralization of the cationic CHX by the anionic EDTA, according to the equation:



As a result of this interaction, the effect of EDTA on smear layer is reduced, therefore manufacturer's recommendation regarding the use of a root canal saline rinse after NaOCl and before EDTA final rinse should be adopted (RASIMICK *et al.* 2008).

QMix is a novel final irrigation compound containing CHX, EDTA and the detergent (DAL *et al.* 2011; WANG *et al.* 2012). Our analysis showed that 5.25% NaOCl with QMix combination resulted in orange-brown solution coloration and bubble formation. Analogous to its constituents, QMix does not undergo decomposition to PCA in the presence of 5.25% NaOCl, what is in accordance with the previous finding (ARSLAN *et al.* 2015). As can be seen from the ^1H NMR spectrum of the 5.25% NaOCl/QMix association product, none of the signals in 4.50-8.50 ppm region including those of CHX was detected (Fig. 2). This might have been due to the fact that CHX concentration in QMix is very low, and therefore could not be detected (ARSLAN *et al.* 2015). Similar results were found by Kolosowski *et al.* 2014, who showed that the precipitate or PCA were not produced by a mixture of NaOCl and QMix using Time-of-Flight Secondary Ion Mass Spectrometry (TOF-SIMS) analysis. It could be argued that the inability to identify PCA was related to the use of different detection techniques, with a reduced sensitivity to low-molecular-weight products or the use of solvents that may have undermined PCA detection (ORHAN *et al.* 2016; KOLOSOWSKI *et al.* 2014).

CONCLUSIONS

The results of our study showed no presence of *p*-chloroaniline as by-product for the none of the investigated irrigants associations, namely 5.25% NaOCl/2% CHX, 2% CHX/17% EDTA and 5.25% NaOCl/QMix. The applied proton NMR and IR spectroscopic techniques and TLC chromatography are shown as very efficient methods of determination whether *p*-chloroaniline is formed in the reactions between presently investigated endodontic irrigants. However, further studies are needed in order to investigate chemical composition of the precipitates formed after previously mentioned associations. Study aimed in this achievement is in progress.

Acknowledgments

This study has been supported by Junior project (No: 2016/06), Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Serbia and Project supported by Ministry of Education, Science and Technological Development (Nos: 175071 and 172036), Serbia.

References:

- [1] ARSLAN, H., UYGUN, A.D., KESKIN, A., KARATAS, E., SECKIN, F., YILDIRIM, A. (2015): Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J* **48**: 1199-1203. doi: 10.1111/iej.12427
- [2] BASRANI, B.R., MANEK, S., MATHERS, D., FILLERY, E., SODHI, R.N. (2010): Determination of 4 chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium

- hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J Endod* **36** (2): 312-314. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.031
- [3] BASRANI, B.R., MANEK, S., SODHI, R.N.S., FILLERY, E., MANZUR, A. (2007): Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* **33**: 9660969. doi: 10.1016/j.joen.2007.04.001
- [4] BITTER, K., HAMBARAYAN, A., NEUMANN, K., BLUNCK, U., STERZENBACH, G. (2013): Various irrigation protocols for final rinse to improve bond strengths of fiber posts inside the root canal. *Eur J Oral Sci* **121**: 3490354. doi: 10.1111/eos.12057
- [5] BUI, T.B., BAUMGARTNER, J.C., MITCHELL, J.C. (2008): Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* **34**: 181-185. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.006
- [6] CHHABRA, R.S., HUFF, J.E., HASEMAN, J.K., ELWELL, M.R., PETERS, A.C. (1991): Carcinogenicity of *p*-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* **29**: 119-124. doi.org/10.1016/0278-6915(91)90166-5
- [7] DAI, L., KHECHEN, K., KHAN, S., GILLEN, B., LOUSHINE, B.A., WIMMER, C.E., GUTMANN, J.L., PASHLEY, D., TAY, F.R. (2011): The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* **37**: 80-84. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.004
- [8] HAAPASALO, M., SHEN, Y., WANG, Z., GAO, Y. (2014): Irrigation in endodontics. *Br Dent J* **216**: 299-303. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204
- [9] HÜLSMANN, M., RÖDIG, T., NORDMEYER, S. (2007): Complications during root canal irrigation. *Endod Topics* **16**: 27-63. doi.org/10.1111/j.1601-1546.2009.00237.x.
- [10] GU, X.H., MAO, C.Y., LIANG, C., WANG, H.M., KERN, M. (2009): Does endodontic post space irrigation affect smear layer removal and bonding effectiveness? *Eur J Oral Sci* **117**: 597-603. doi: 10.1111/j.1600-0722.2009.00661.x.
- [11] KACMAR, P., PISTL, J., MIKULA, I. (1995): The effect of *p*-chloroaniline on leucocytes of cheep peripheral blood under the migration-inhibition test conditions. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **17** (3): 577-584. doi: 10.3109/08923979509016388
- [12] KOLOSOWSKI, K.P., SODHI, R.N., KISHEN, A., BASRANI, B.R. (2014): Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and final rinse of chlorhexidine or QMix. *J Endod* **40**: 36-40. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.017
- [13] KRISBNAMURTHY, S., SUDBAKARAN, S. (2010): Evaluation and prevention of the precipitate formed on interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* **36**: 1154-1157. doi: 10.1016/j.joen.2010.01.012
- [14] KURUVILLA, J.R., KAMATH, M.P. (1998): Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* **24** (7): 472-476. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80049-6
- [15] MESSMER, A., NICKEL, C.H., BAREISS, D. (2015): *p*-Chloroaniline poisoning causing methemoglobinemia: a case report and review of the literature. *Case Rep Emerg Med* **2015**: Article ID 208732, 4 pages. doi: 10.1155/2015/208732
- [16] NOWICKI, J.B., SEM, D.S. (2011): An *in vitro* spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* **37**: 983-988. doi: 10.1016/j.joen.2011.03.033
- [17] ORHAN, E.O., IRMAK, O., HÜR, D., YAMAN, B.C., KARABUCAK, B. (2016): Does para-chloroaniline really form after mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* **42**: 455-459. doi: 10.1016/j.joen.2015.12.024
- [18] PRADO, M., SANTOS, JÚNIOR H.M., REZENDE, C.M., PINTO, A.C., FARIA, R.B., SIMAO, R.A., GOMES, B.P. (2013): Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod* **39**: 505-510. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.050

- [19] PRADO, M., SIMAO, R.A., GOMES, B.P. (2013): Evaluation of different irrigation protocols concerning the formation of chemical smear layer. *Microsc Res Tech* **76** (2): 196-200. doi: 10.1002/jemt.22153
- [20] RASIMICK, B.J., NEKICH, M., HLADEK, M., MUSIKANT, B.L., DEUTSCH, A.S. (2008): Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod* **34**: 1521-1523. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.039
- [21] ROSSI-FEDELE, G., DOGRAMACI, E.J., GUASTALLI, A.R., DE FIGUEIREDO, J.A. (2012): Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod* **38**: 426-431. doi: 10.1016/j.joen.2012.01.006
- [22] SOUZA, M., CECCHIN, D., BARBIZAM, J.V., ALMEIDA, J.F.A., ZAIA, A.A., GOMES, B.P.F.A., FERRAZ, C.C.R. (2013): Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by the interaction between 2% chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust Endod J* **39** (3): 107-111. doi/10.1111/j.1747-4477.2011.00311.x
- [23] STOJICIC, S., SHEN, Y., QIAN, W., JOHNSON, B., HAAPASALO, M. (2012): Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* **45**: 363-371. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01985.x
- [24] STOJICIC, S., ZIVKOVIC, S., QIAN, W., ZHANG, H., HAAPASALO, M. (2010): Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation and surfactant. *J Endod* **36**: 1558-1562. doi: 10.1016/j.joen.2010.06.021
- [25] TAY, F.R., HIRAIISHI, N., SCHUSTER, G.S., PASHLEY, D.H., LOUSHINE, R.J., OUNSI, H.F., GRANDINI, S., YAU, J.Y.Y., MAZZONI, A., DONNELLY, A., KING, N.M. (2006): Reduction in antimicrobial substantivity of MTAD after initial sodium hypochlorite irrigation. *J Endod* **32**: 970-975. doi: 10.1016/j.joen.2006.03.016
- [26] THOMAS, J.E., SEM, D.S. (2010): An *in vitro* spectroscopic analysis to determine whether *p*-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J Endod* **36**: 315-317. doi: 10.1016/j.joen.2009.10.028
- [27] VIVACQUA-GOMES, N., FERRAZ, C.C., GOMES, B.P., ZAIA, A.A., TEIXEIRA, F.B., SOUZA-FILHO, F.J. (2002): Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J* **35**: 791-795. doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00569.x
- [28] WANG, Z., SHEN, Y., HAAPASALO, M. (2012): Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old enterococcus faecalis biofilms in dentine canals. *J Endod* **38**: 1376-1379. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.035
- [29] WORLD HEALTH ORGANISATION. INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER: IARC monography on the evaluation of carcinogenic risks to human. Lyon, France, 2006; **86**: 1-25.
- [30] ZEHNDER, M., SCHMIDLIN, P., SENER, B., WALTIMO, T. (2005): Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* **31**: 817-820. doi: 10.1097/01.don.0000158233.59316.fe



ORIGINAL ARTICLE / ОРИГИНАЛНИ РАД

Evaluation of permeability of root dentin after different irrigation protocols

Ljiljana Bjelović¹, Jelena Krunic¹, Nikola Stojanović¹, Jelena Erić², Tatjana Kanjevac³¹University of East Sarajevo, Faculty of Medicine, Department of Dental Pathology, Foča, Bosnia and Herzegovina;²University of East Sarajevo, Faculty of Medicine, Department of Oral Rehabilitation, Foča, Republic of Srpska, Bosnia and Herzegovina;³University of Kragujevac, Faculty of Medical Sciences, Department of Preventive and Pediatric Dentistry, Kragujevac, Serbia**SUMMARY**

Introduction/Objective This study was aimed at evaluating dentin permeability after irrigation with sodium hypochlorite (NaOCl) and final rinse with chlorhexidine (CHX), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) + CHX, and new combination products: QMiX or MTAD.

Methods Roots of 60 maxillary incisors were randomly divided into five groups (n = 12) before instrumentation and irrigation with NaOCl according to the final irrigation regimen: CHX (2% CHX), EDTA + CHX (17% EDTA + 2% CHX), QMiX, MTAD, and control group (distilled water). After final irrigation, ten roots of each group were horizontally sectioned and dye penetration was evaluated in the coronal, middle, and apical thirds. Remaining samples were subjected to scanning electron microscopy. Data were analyzed with ANOVA/Tukey's test.

Results Less dye penetration was found in CHX group compared with control as well as with QMiX and MTAD group in all thirds (p < 0.05). A significant difference between the control and EDTA + CHX, QMiX or MTAD group was observed only in the apical root third (p < 0.05).

Conclusion Dentin permeability was significantly reduced after final irrigation with CHX, but not after use of other final irrigation solutions, except in the apical third of the root canal.

Keywords: dentinal tubule cleansing; intra-canal disinfectants, irrigants; chlorhexidine; EDTA; MTAD; sodium hypochlorite; QMiX

INTRODUCTION

Irrigation is essential for successful debridement of the root canals with mechanical procedures [1]. Sodium hypochlorite (NaOCl) is the most commonly used irrigation solution due to its antimicrobial action and tissue-dissolving potential [2, 3]. However, NaOCl is not sufficient for total cleaning of the root canal system from microorganisms, debris, tissue remnants, and the smear layer. For optimal irrigation, a combination of irrigation solutions has to be used. Therefore, NaOCl has been used in combination with demineralizing agents such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), for effective removal of the smear layer. Chlorhexidine (CHX), a chemical substance with considerable antimicrobial properties has, been studied as a final irrigation solution after NaOCl and EDTA [2]. Recently, QMiX and MTAD, new combination products, have been aimed at removing the inorganic smear layer and disinfecting the root canal system following NaOCl irrigation [4, 5, 6]. QMiX and MTAD contain an antibacterial agent with known prolonged antimicrobial action (substantivity) (CHX and doxycycline, respectively), a demineralizing

agent (EDTA and citric acid, respectively), and a detergent [7, 8].

Although a combination of irrigants may enhance its antimicrobial and cleaning effectiveness, a possible chemical reaction between them has to be considered. This is especially evident when CHX is combined with NaOCl. The chemical interaction between these two solutions results in the color change of mixture to brown and formation of precipitate [9]. When associated with EDTA, CHX produces white precipitate [10, 11]. In QMiX, this interaction is avoided by its chemical design [5]. The combination of QMiX with NaOCl produced inconsistent results. While some authors found orange-brown precipitation, others found visually detectable color change but without precipitate formation in the interaction of these two solutions [12, 13]. When MTAD was added to NaOCl, yellow precipitate formed [14].

The clinical significance of the precipitate formed in interaction with NaOCl and CHX is that it may contain substance harmful to the general health [15]. Concerns have been raised that color change could compromise esthetics [16]. Furthermore, it can act as a chemical layer occluding dentinal tubules and altering

Received • Примљено:

July 31, 2017

Revised • Ревизија:

October 25, 2017

Accepted • Прихваћено:

October 26, 2017

Online first: October 31, 2017**Correspondence to:**

Ljiljana BJELOVIĆ
Department of Dental Pathology,
Faculty of Medicine, University of
East Sarajevo, Studentska 5
73 300 Foča, Republic of Srpska,
Bosnia and Herzegovina
kulic84@gmail.com

dentin permeability [17, 18]. Subsequently, diffusion of intracanal medicaments and sealing of root canal could be compromised [19]. The penetration of the precipitate into dentinal tubules formed in interaction between either NaOCl or CHX and other irrigation solutions has not yet been clarified.

Therefore, this study was aimed at evaluating dentin permeability after irrigation with NaOCl and final rinse with CHX, EDTA + CHX, QMiX or MTAD. The null hypothesis was that there would be no differences in permeability of root dentin between different final irrigation solutions.

METHODS

Sample selection and treatment

This study was conducted after approval from the Institutional Ethics Committee (No. 01-3-88/2015). Sixty intact human maxillary incisors with single straight and mature roots, and single canals extracted from 18–30-year-old subjects were included in the study. Teeth with caries, restorations, calcifications, intraradicular resorption or complicated root canal anatomy were excluded. Root canal anatomy was verified with radiographs. The root surface was cleaned with a scalpel, ultrasonic instruments, and brushes. The teeth were then stored in 0.9% saline with a 0.2% thymol solution at 4°C until use.

The crown of each tooth was cut to standardize the root lengths to 14 mm. Before chemomechanical preparation, the root canals were divided into five groups ($n = 12$) according to the final irrigant solution used: CHX (2% CHX solution, Consepsis, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA), EDTA + CHX (17% EDTA, ENDO-SOLUTION, CerKamed, PPH CerKamed, Stalowa Wola, Poland, and 2% CHX solution, Consepsis, Dentsply Tulsa Dental), MTAD (Dentsply Tulsa Dental), QMiX (Dentsply Tulsa Dental) and distilled water (control group). The working length was established 1 mm short of the apical foramen by #15 K-file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). After that, apical foramen of each root was sealed with wax. Root canal preparation was carried out with Pro-Taper rotary instruments (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) up to F4 file (40/0.06) as the master apical file. The canals were irrigated with 1 mL 5.25% NaOCl, after each instrument, except in the MTAD group, where canals were irrigated with 1 mL 1.3% NaOCl (recommended manufacturer's protocol). Irrigation was performed with 27 gauge stainless steel needles (Endo-Eze, Ultradent, South Jordan, UT, USA), whose tip was placed 1 mm from the working length and was then moved up and down during irrigation. At the end of preparation, 5 mL of 17% EDTA was used in the canals for five minutes for smear layer removal, followed by distilled water, to remove traces of EDTA. Then, 5 mL of 5.25% (CHX, EDTA + CHX, and QMiX groups) or 1.3% NaOCl (MTAD group) was delivered into the canals for two minutes, followed by 10 mL distilled water for two minutes to minimize the potential

reaction between NaOCl and final irrigant solutions. Final rinse was performed with 5 mL of 2% CHX, 17% EDTA, followed by 2% CHX, QMiX, or MTAD for two minutes. In the EDTA + CHX group, canals received an intermediate flush between two solutions with 10 mL of distilled water for two minutes to prevent interaction. Finally, all canals were dried with paper points.

Dentin permeability analysis

Ten roots of each group were externally coated with fast polymerizing epoxy resin (Brascola Ltda, SP Santa Catarina, Brazil) leaving the root canals free and immersed in 0.2% Rhodamine B solution. After 24 hours, specimens were rinsed continuously under tap water over the next 24 hours. A sharp blade was used to remove resin coatings, and the teeth were embedded in polyester resin. Each root was horizontally sectioned using a slow-speed water-cooled cut machine (Extec Labcut 1010, Enfield, CT, USA) to obtain 1-mm-thick slices. All slices were polished with silicon carbide papers to obtain a flat surface. A slice from each third was randomly chosen, mostly from each third's middle portion, and scanned (Epson Perfection 1240U scanner; Epson Corp, Tokyo, Japan) with a resolution of 400 dpi, and analyzed with the software ImageLab 4.1 (Bio Red, Tokyo, Japan) to assess dye penetration. Dye penetration in dentin was expressed as percentage of the dye penetrated area in relation to the total root-third area.

Scanning electron microscopy analysis

Two roots of each group were prepared for scanning with an electron microscopy (SEM) analysis. The roots were transversely sectioned at 3 mm, 6 mm, and 9 mm from the apex using a diamond disc at slow-speed. The specimens were dehydrated using ascending grades of ethanol (25%, 50%, 75%, and 100%), mounted on an aluminum holder, sputter-coated with gold, and then examined with SEM (JEOL-JSM -6610LV, Tokyo, Japan). Specimens were examined at a magnification between 3,700 \times and 6,500 \times and 20 kV to detect precipitate formation on the root dentin surfaces and inside the dentin tubules.

Statistical analysis

The statistical analyses were performed using SPSS software, version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). The results obtained for dye penetration (Kolmogorov-Smirnov test $p > 0.05$) were submitted to the one-way analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc. The significance levels were set at 5%.

RESULTS

The results of percentage of dye penetration are shown in Table 1 and Figures 1, 2, and 3. The MTAD, QMiX and control group showed significantly higher dye penetration than the CHX group in the coronal third ($p < 0.05$). In the middle

Table 1. The mean \pm SD of dye penetration (%) in dentinal tubule at the coronal, middle and apical third of root dentin; mean values represented with the same superscript uppercase (row) or lowercase (column) letters are not significantly different ($p > 0.05$)

Root level	CHX	EDTA + CHX	QMiX	MTAD	Distilled water
Coronal	61.61 \pm 14.56 ^{Aa}	76.72 \pm 10.71 ^{Ab}	81.33 \pm 6.74 ^{Ba}	79.28 \pm 7.81 ^{Ba}	83.77 \pm 17.65 ^{Ba}
Middle	25.80 \pm 9.03 ^{Ab}	52.95 \pm 15.28 ^{Bb}	62.24 \pm 15.37 ^{Bb}	58.52 \pm 13.30 ^{Bb}	65.50 \pm 18.28 ^{Bb}
Apical	14.43 \pm 3.85 ^{Ac}	16.80 \pm 4.91 ^{ABc}	24.57 \pm 5.23 ^{Bc}	25.87 \pm 6.56 ^{Bc}	36.01 \pm 12.19 ^{Cc}

CHX – chlorhexidine; EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid

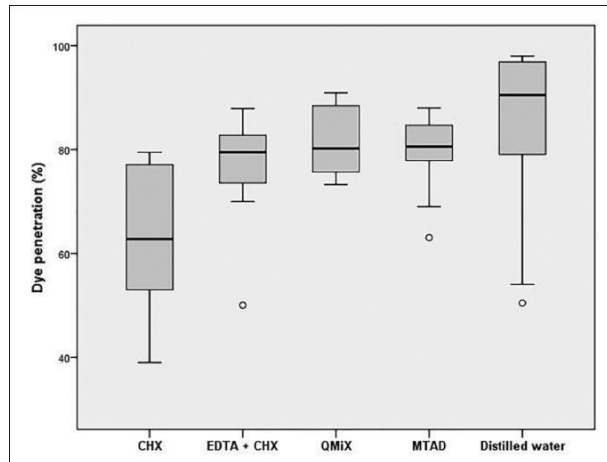


Figure 1. Box plots of dye penetration (%) in the coronal third; horizontal bars – medians; box-boundaries – the 25th and 75th percentiles; whiskers – maximum and minimum observed values; 0 – outliers

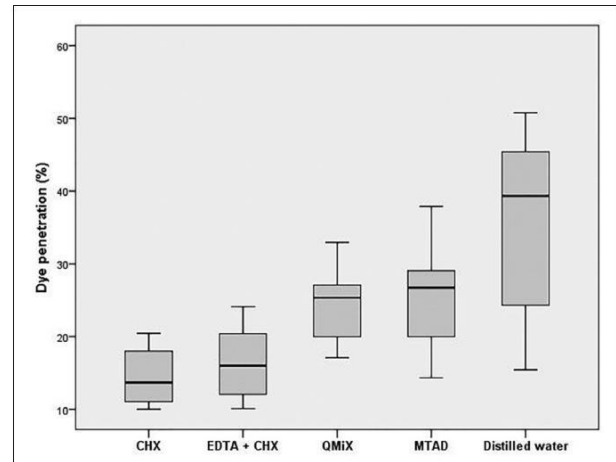


Figure 3. Box plots of dye penetration (%) in apical third; horizontal bars – medians; box-boundaries – the 25th and 75th percentiles; whiskers – maximum and minimum observed values

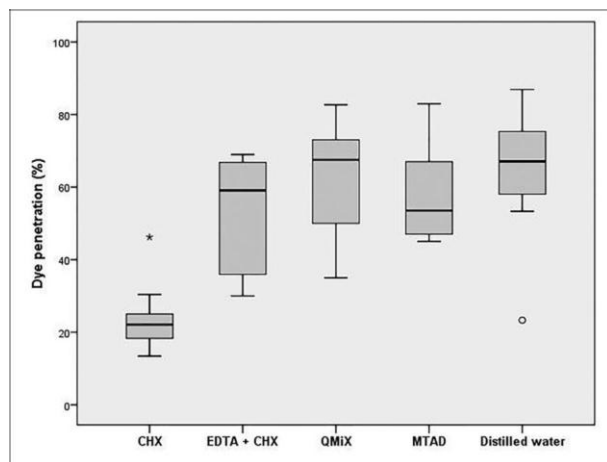


Figure 2. Box plots of dye penetration (%) in the middle third; horizontal bars – medians; box-boundaries – the 25th and 75th percentiles; whiskers – maximum and minimum observed values; 0 – outliers;

*extreme values

third, all groups showed more dye penetration compared to the CHX group ($p < 0.05$). Finally, in the apical third, the control group showed significantly more dye penetration than other groups ($p < 0.05$), while both MTAD and QMiX groups showed significantly greater dye penetration than the CHX group ($p < 0.05$). The highest dye penetration was recorded in the coronal thirds of all groups with significant differences between the thirds ($p < 0.05$) (Table 1).

Representative SEM images of samples irrigated with different final irrigation protocols are shown in Figure 4. Precipitate was found in the samples irrigated with CHX, EDTA + CHX, QMiX, and MTAD, while the control group revealed root canals without precipitate formation.

DISCUSSION

The present study evaluated the interaction between NaOCl and different final irrigants (CHX, EDTA + CHX, QMiX, and MTAD) and its effect on dentin permeability. Root canal irrigation with CHX significantly decreased dentin permeability, while other final irrigant solutions exert no significant effect, except in the apical third.

A closed-end canal model was used in the current study to mimic a clinical setting. Distilled water was used between NaOCl and final irrigation solution (CHX, EDTA + CHX, QMiX, and MTAD) as well as between EDTA and CHX in order to prevent precipitation, as it has been recommended in clinical conditions [4]. Moreover, the operational sequence used was aimed to exclude effect of smear layer on dentin permeability.

In the present study, irrigation with CHX after NaOCl significantly reduced dentin permeability in all thirds of root canals compared to the control group. This result indicates that the product formed in the interaction between NaOCl and CHX, characterized as brown precipitate, is present in dentinal tubules, as has been shown previously [9, 13]. This can be explained by the ability of both solutions to diffuse into tubules up to 500 μ m, according to the results of studies that have used dyes or measured their antibacterial penetration [18, 20, 21, 22]. Akisue et al. [18], employing the same methodology for specimen analysis as in the present study, found that precipitate formed between 1% NaOCl and 2% CHX caused reduction of dentin permeability only in the apical third, when compared to no irrigation control group and group irrigated with 15% citric acid followed by 2% CHX. Discrepancy in the results between our study and the mentioned one could be

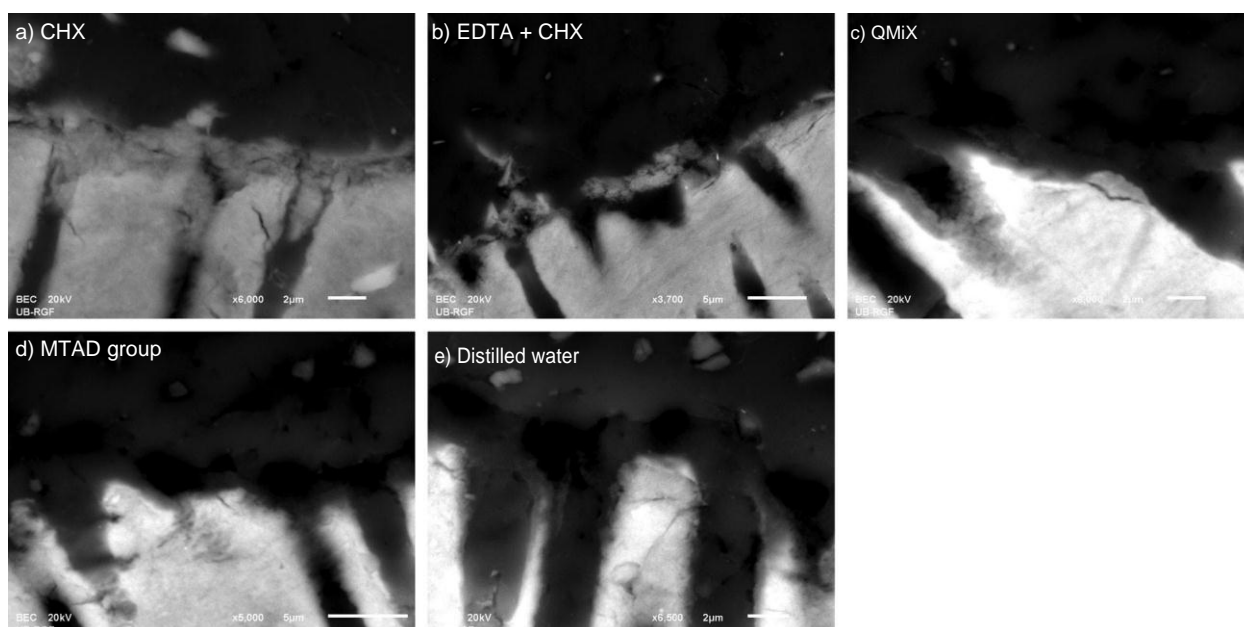


Figure 4. Scanning electron microscope images (magnification between 3,700 \times and 6,500 \times) of the sectioned specimens showing precipitate formation on the root dentin surfaces and inside the dentin tubules after final irrigation with CHX (a), EDTA + CHX (b), QMiX (c), and MTAD (d); in the control group (distilled water), precipitate was not found (e)

attributed to the concentration of NaOCl used (5.25 vs. 1%). Namely, it has been shown that precipitation is concentration-dependent [9]. The precipitate was formed in dentinal tubules, although an attempt was made to prevent its formation by introducing intermediate flush with distilled water in the main canal. This raised some concerns because this precipitate may act as a reservoir of a toxic and carcinogenic substance, known as para-chloranilin (PCA), even after removal of precipitate from main canal [23, 24]. In addition, this precipitate acting as a chemical smear layer may limit the effective disinfection of dentinal tubules by preventing intracanal medicaments from penetrating the dentinal tubules [17, 18]. Namely, in infected root canals, viable bacteria have been found deep within dentinal tubules (up to 375 μm) and their persistence after chemomechanical procedures may be responsible for root canal reinfection and treatment failure [25]. The precipitate may compromise adaptability of the root filling materials to the root canal walls and may reduce the sealer penetration into dentinal tubules as well [19]. The sealer penetration into dentinal tubules increases the surface contact between dentin walls and filling materials, which may improve retention of the filling material by mechanical locking and may exert antibacterial effect on bacteria remaining in dentinal tubules after canal preparation by isolating them from essential nutrient sources [26]. Moreover, the precipitate may provide a path through which leakage could take place between the root canal filling and the dentinal walls. Vivacqua-Gomes et al. [19] found that a combination of 1% NaOCl with 2% CHX favors coronal microleakage of root-filled teeth. Staining potential of this insoluble dark-brown precipitate is also of relevance [16].

In root canals irrigated with EDTA + CHX, QMiX, or MTAD after NaOCl, dentin permeability was reduced but did not significantly differ from the control group in the

coronal and middle third. However, in the apical third, these groups showed significant less dye penetration than the control group. Also, QMiX and MTAD exhibited more dye penetration than CHX in all root thirds. These results indicate that precipitation probably occurs in dentinal tubules, but not in the amount that could affect dentin permeability in coronal and middle thirds, in contrast to interaction between NaOCl and CHX. Stereomicroscope study showed that QMiX had significantly lower scores of precipitate associated with 2.5% NaOCl than 2% CHX in root canals, probably due to lower concentration of CHX in QMiX [12]. On the other hand, Kolosowski et al. [13] found no precipitation neither on dentin surfaces nor in dentinal tubules after immersion of dentin discs in 2.5% NaOCl followed by saline and QMiX, measured by time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS). Although direct comparisons could not be made due to differences in methodology, it can be argued that the intermediate flush with distilled water in our study prevented the interaction between QMiX and 5.25% NaOCl in dentine tubules, as did saline in the mentioned study [13]. Moreover, a lack of significant differences in dentin permeability of EDTA + CHX and MTAD group with control specimens also suggest that distilled water has a significant impact on precipitate prevention in dentinal tubules, except in the apical sections. Limitation of irrigation modality used and impaired delivery of irrigants into the apical third, including distilled water, constitute possible reasons that could explain lower apical dentin permeability in EDTA + CHX, QMiX, and MTAD group. In addition, the influence of anatomical factors on dentin permeability should also be considered. Namely, tubular sclerosis that starts in the third decade of life in the apical region interferes with the penetration of root canal irrigants [27]. Moreover, dye penetration into dentinal tubules

at the apical region is strongly dependent on the group of teeth [28]. In order to standardize dentin pattern among the specimens in the present study, only maxillary incisors of subjects under the age of 30 were included.

In agreement with the previous studies we found the highest dye penetration in the coronal third of the root canal and the lowest in the apical third in all the groups, including controls with significant differences between the thirds [18, 27, 29]. This may be due to the irregularity and lower size and density of dentinal tubules in the apical area [27]. Namely, the number of dentinal tubules decreases from 40,000 mm⁻² from corona near the pulp to 14,400 mm⁻² in the apex [30]. Moreover, lower efficacy of the irrigants in these portions of the root canal cleared out the dentinal tubules less thoroughly.

REFERENCES

- Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014; 216(6):299–303.
- Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5):389–98.
- Nogo-Zivanović D, Bjelović Lj, Ivanović V, Kanjevac T, Tanacković I. Consideration of therapeutic possibilities of irrigants in endodontic therapy. *Ser J Exp Clin Res.* 2017; 19(2):103–12.
- Basrani B, Haapasalo M. Update on endodontic irrigating solutions. *Endod Topics.* 2012; 27(9):74–102.
- Stojčić S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012; 45(4):363–71.
- Jardine AP, Rosa RA, Santini MF, Wagner M, Só MV, Kuga MC, et al. The effect of final irrigation on the penetrability of an epoxy resin-based sealer into dentinal tubules: a confocal microscopy study. *Clin Oral Investig.* 2016; 20(1):117–23.
- Rasimick BJ, Wan J, Musikant BL, Deutsch AS. Stability of doxycycline and chlorhexidine absorbed on root canal dentin. *J Endod.* 2010; 36(3):489–92.
- Souza MA, Montagner A, Lana DL, Vidal CM, Farina AP, Cecchin D. Comparative evaluation of the retaining of QMix and chlorhexidine formulations on human dentin: a chemical analysis. *Clin Oral Investig.* 2016; 21(3):873–8.
- Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod.* 2007; 33(8):966–9.
- Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. *J Endod.* 2008; 34(12):1521–3.
- Prado M, Santos Júnior HM, Rezende CM, Pinto AC, Faria RB, Simão RA, et al. Interactions between irrigants commonly used in endodontic practice: a chemical analysis. *J Endod.* 2013; 39(4):505–10.
- Arslan H, Uygun AD, Keskin A, Karatas E, Seçkin F, Yıldırım A. Evaluation of orange-brown precipitate formed in root canals after irrigation with chlorhexidine and QMix and spectroscopic analysis of precipitates produced by a mixture of chlorhexidine/NaOCl and QMix/NaOCl. *Int Endod J.* 2015; 48(12):1199–203.
- Kolosowski KP, Sodhi RN, Kishen A, Basrani BR. Qualitative analysis of precipitate formation on the surface and in the tubules of dentin irrigated with sodium hypochlorite and a final rinse of chlorhexidine or QMiX. *J Endod.* 2014; 40(12):2036–40.
- Tay FR, Pashley DH, Loushine RJ, Doyle MD, Gillespie WT, Weller RN, et al. Ultrastructure of smear layer-covered intraradicular dentin after irrigation with BioPure MTAD. *J Endod.* 2006; 32(3):218–21.
- Rossi-Fedele G, Dođramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod.* 2012; 38(4):426–31.
- Souza M, Cecchin D, Barbizam JV, Almeida JF, Zaia AA, Gomes BP, et al. Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by the interaction between 2% chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust Endod J.* 2013; 39(3):107–11.
- Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod.* 2008; 34(2):181–5.
- Akisu E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod.* 2010; 36(5):847–50.
- Vivacqua-Gomes N, Ferraz CC, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Influence of irrigants on the coronal microleakage of laterally condensed gutta-percha root fillings. *Int Endod J.* 2002; 35(9):791–5.
- Kuga MC, Gouveia-Jorge É, Tanomaru-Filho M, Guerreiro-Tanomaru JM, Bonetti-Filho I, Faria G. Penetration into dentin of sodium hypochlorite associated with acid solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 112(6):e155–9.
- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod.* 2011; 37(10):1380–5.
- Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effect of smear layer against disinfection protocols on *Enterococcus faecalis*-infected dentin. *J Endod.* 2013; 39(11):1395–400.
- Boehncke A, Kielhorn J, Koennecker G, Pohlenz-Michel C, Mangelsdorf I. Concise International Chemical Assessment Document 48: 4-Chloroaniline. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2003.
- Chhabra RS, Huff JE, Haseman JK, Elwell MR, Peters AC. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol.* 1991; 29(2):119–24.
- Peters LB, Wesselink PR, Buijs JF, van Winkelhoff AJ. Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2001; 27(2):76–81.
- Mamootil K, Messer HH. Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *Int Endod J.* 2007; 40(11):873–81.
- Paqué F, Luder HU, Sener B, Zehnder M. Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. *Int Endod J.* 2006; 39(1):18–25.
- Ribeiro RG, Marchesan MA, Silva RG, Sousa-Neto MD, Pécora JD. Dentin permeability of the apical third in different groups of teeth. *Braz Dent J.* 2010; 21(3):216–9.
- Thaler A, Ebert J, Petschelt A, Pelka M. Influence of tooth age and root section on root dentine dye penetration. *Int Endod J.* 2008; 41(12):1115–22.
- Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *Int Endod J.* 2001; 34(5):346–53.

CONCLUSION

Final irrigation with CHX after initial NaOCl rinse significantly reduced dentin permeability at all root levels. Interactions between NaOCl and EDTA + CHX, QMiX or MTAD exert no significant effect on dentin permeability, except in the apical section of the root canal. Based on the current results, final irrigation with CHX after NaOCl should be avoided in order to prevent precipitate formation, which reduces dentin permeability, subsequently compromising sealing of the root canal system. On the other hand, EDTA + CHX, QMiX, or MTAD might be recommended as reasonable solutions for final irrigation. Further studies are necessary to better clarify the influence of different final irrigants on the dentin permeability.

Испитивање пермеабилности коренског дентина после испирања различитим иригансима

Љиљана Бјеловић¹, Јелена Крунић¹, Никола Стојановић¹, Јелена Ерић², Татјана Кањевац³

¹Универзитет у Источном Сарајеву, Медицински факултет, Катедра за денталну патологију, Фоча, Босна и Херцеговина;

²Универзитет у Источном Сарајеву, Медицински факултет, Катедра за оралну рехабилитацију, Фоча, Босна и Херцеговина;

³Универзитет у Крагујевцу, Медицински факултет, Катедра за превентивну и дечију стоматологију, Крагујевац, Србија

САЖЕТАК

Увод/Циљ Циљ овог истраживања је био да се испита пермеабилност коренског дентина после иригације натријум-хипохлоритом (*NaOCl*) и финалне иригације хлорхексидином (*CHX*), етилен-диамино-сирћетном киселином (*EDTA*) + *CHX* и нових комбинација: *QMiX* или *MTAD*.

Метод Корени 60 горњих централних секутића су, пре инструментације и иригације *NaOCl*, методом случајног узорка подељени у пет група ($n = 12$) на основу финалног протокола иригације: *CHX* (2% *CHX*), *EDTA* + *CHX* (17% *EDTA* + 2% *CHX*), *QMiX*, *MTAD* и контролна група (дестилована вода). После финалне иригације, десет коренова из сваке групе су хоризонтално пресечени и пенетрација боје је одређена у круничној, средњој и апексној трећини. Преостали узорци

су испитивани методом електронске микроскопије. Подаци су анализирани применом *ANOVA/Tukey's* теста. **Резултати**

Пенетрација боје у *CHX* групи је била мања у свим трећинама у односу на контролну, као и у односу на *QMiX* и *MTAD* групу ($p < 0,05$). Значајна разлика између контрол-не и група *EDTA* + *CHX*, *QMiX* и *MTAD* је забележена само у апексној трећини корена ($p < 0,05$).

Закључак Пермеабилност дентина је значајно смањена по-сле финалне иригације *CHX*, али не и после иригације другим растворима, осим у апексној трећини.

Кључне речи: чистићење зубних тубула; интраканални дезинфицијенси; хлорхексидин; *EDTA*; *MTAD*; натријум-хипо-хлорит;

RESEARCH ARTICLE

The effect of final irrigation with MTAD, QMix, and EDTA on smear layer removal and mineral content of root canal dentin

Dajana Nogo-Živanović¹ | Tatjana Kanjevac² | Ljiljana Bjelović¹ | Vladimir Ristić² | Irena Tanasković³

¹Department for Restorative Dentistry and Endodontics, Faculty of Medicine, University of East Sarajevo, Foca, Bosnia and Herzegovina

²Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

³Department of Histology and Embryology, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Kragujevac, Serbia

Correspondence

Tatjana Kanjevac, Department of Dentistry, Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Svetozara Markovića 69, Kragujevac 34000, Serbia.

Email: tatjanakanjevac@yahoo.com

Review Editor: George Perry

Funding information

Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia, Grant/Award Number: 175071; Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac, Grant/Award Number: 2016/06

Abstract

To compare the smear layer removal ability and mineral content of root canal dentine after initial irrigation with NaOCl and final irrigation with MTAD, QMix, and 17% EDTA. Forty extracted human maxillary incisors before root canal preparation and irrigation with NaOCl were randomly divided into four groups (n = 10) according to the type of final irrigants used: MTAD, QMix, 17% EDTA, and control (sterile distilled water). Scanning electron microscopy (SEM) was used to assess the presence of smear layer. SEM energy-dispersive X-ray spectroscopy was used to quantify dentin mineral composition in MTAD, QMix, 17% EDTA group, and in no-treatment samples (no-treatment group; n = 10). Among the various chelating agents, there were no significant differences in the smear layer removal in the middle and coronal thirds (p > .05). In the apical third, QMix removed significantly more smear layer than 17% EDTA (p < .05), but similarly to MTAD (p > .05). Final irrigation with MTAD resulted in a significant increase in the carbon (C) value compared to EDTA (p < .001). There was no significant difference in the mineral composition between the MTAD and the QMix group, although the values of the mineral elements were significantly altered in the MTAD group. QMix had smear layer removal capability similar to MTAD but better than EDTA in the apical third. MTAD yielded the most pronounced effect on mineral component of root dentin; however, differences were significant only for C level compared to 17% EDTA.

KEY WORDS

dentin mineral composition, EDS, irrigation, SEM, smear layer

1 | INTRODUCTION

The aim of endodontic therapy is the complete disinfection of the root canal system (Siqueira Jr & Rôças, 2008). This may be achieved by mechanical instrumentation in conjunction with chemical means. Mechanical instrumentation, by either hand or mechanical instruments, is accompanied by the formation of an amorphous, irregular, and granular layer on the surface of the dentin root canal, known as the smear layer. It consists of inorganic dental particles and organic materials including remnants of vital or necrotic pulp tissue, bacteria, and their by-products (Violich & Chandler, 2010). Although there is still no consensus on the effect of the smear layer on the outcome of

endodontic treatment, its elimination provides more efficient penetration of the irrigation agents, intracanal medicaments and sealers into the dentinal tubules, and fortifies the bond between resin-based sealers and the surface of the root canal (Wang, Shen, & Haapasalo, 2013; White, Goldman, & Lin, 1984). Irrigating solutions are used for removing the smear layer, but none of the available irrigants can effectively dissolve both components of the smear layer. Therefore, in endodontic therapy, irrigation of the canal root with sodium hypochlorite (NaOCl) is recommended to dissolve the organic component and final irrigation with 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) to remove the inorganic component of the smear layer. After smear layer removal, root canals can be finally rinsed with anti-septics, such as NaOCl or chlorhexidine (CHX), to attack the remaining

bacteria, if any (Nogo-Zivanovic, Bjelovic, Ivanovic, Kanjevac, & Tanaskovic, 2018; Zehnder, 2006).

To accomplish the removal of the smear layer and disinfection requirements simultaneously, and therefore to simplify irrigation protocol, new combinational products have been introduced as the final irrigants after NaOCl: MTAD and QMix (both Dentsply Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK). MTAD and QMix are composed of chelating agent (citric acid and EDTA, respectively), antimicrobial agent (doxycycline and CHX, respectively), and a detergent (Tween-80 and cetrimide, respectively) (Stojicic, Zivkovic, Qian, Zhang, & Haapasalo, 2010; Torabinejad et al., 2003). The difference in the efficiency of the removal of the smear layer between MTAD, QMix, and 17% EDTA was examined in several previous studies. However, obtained results have not yet reached a unified conclusion on which irrigant solution was the most efficient (Ali Mozayeni, Hossein Javaheri, Poorroosta, Asna Ashari, & Hossein Javaheri, 2009; Dai et al., 2011; Eliot et al., 2014; Jardine et al., 2016; Stojicic, Shen, Qian, Johnson, & Haapasalo, 2012; Ulusoy & Görgül, 2013; Vemuri et al., 2016).

By removing inorganic and organic matter from the surface of dentine, root canal irrigants can simultaneously induce changes in the mineral composition of dentine and in the ratio of calcium (Ca) and phosphorus (P) present in hydroxyapatite. These changes may affect the microhardness, permeability, and solubility of dentine, as well as the sealing of the resin-based material to the root dentin surface (Dogan & Çalt, 2001; Perdigão, Eiriksson, Rosa, Lopes, & Gomes, 2001). As calcium chelating agent, 17% EDTA extracts significant amount of Ca from root canal dentin (Sayin, Serper, Cehreli, & Kalayci, 2007). It has been shown that MTAD and QMix were also capable to remove Ca from root canal dentin, but their effect is less pronounced than that of 17% EDTA (Aksel, Serper, Kalayci, Somer, & Erisken, 2016; Yadav, Tikku, Chandra, Yadav, & Patel, 2015). On the other hand, some studies found that MTAD removes more P (Kumar et al., 2016) while QMix eliminates more Ca and P from root dentin in comparison to 17% EDTA (Ballal, Jain, & Tay, 2016). Many of these studies focused on the demineralizing effect of the MTAD (Sayin et al., 2009) or QMix alone (Aksel et al., 2016; Kumar et al., 2016), although under clinical conditions, they are used after initial irrigation with NaOCl. Namely, it has been shown that NaOCl can significantly affect the mineral composition of root dentin (Dogan & Çalt, 2001) and that changes in the mineral composition of dentine are not the result of the use of chelating agents but the use of NaOCl as an irrigant (Zhang et al., 2010). To date, there are no studies comparing demineralizing effect of these three chelating final irrigants (MTAD, QMix, and 17% EDTA), especially when considering their use in conjunction with NaOCl.

Therefore, the aim of this in vitro study was to compare the effectiveness of the removal of the smear layer and the change in the mineral composition of the root dentine after initial irrigation with NaOCl and final irrigation with MTAD, QMix, and 17% EDTA. The null hypothesis tested was that there is no difference among the final irrigation solutions in terms of smear layer removal and the dentin mineral composition.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Selection and preparation of the samples

The protocol of this study was approved by the Ethical Committee of Faculty of Medicine (No: 01-112272). All procedures performed in this study were in accordance with the ethical standards of the Institutional research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments. All enrolled patients provided written informed consent before inclusion in research. Forty extracted human single-rooted maxillary incisors extracted for prosthodontics reasons were collected. Criteria for the inclusion in the study were intact teeth, with no previous endodontic treatment and without coronary restoration. Radiographic evaluations were employed to verify the presence of one central root canal, normal pulp chamber, and fully formed apex. After removing soft tissues from the root surface, the selected teeth were stored in distilled water at 4 C until further analysis. Dental crowns were sectioned with a diamond disc to obtain

15 mm of root length. An ISO size #10 K-type file (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) was inserted into the canal until the tip of the file was observed at the apical foramen and working length was determined subtracting 1 mm from the recorder distance. All apices of the root are sealed with wax to simulate clinical conditions. Before the chemomechanical treatment of the root canals, by the method of random sampling, the roots were divided into four groups (n = 10) according to the type of irrigant used for final irrigation: MTAD, QMix, EDTA (17% EDTA, ENDO-SOLUTION, CerKamed, PPH CerKamed, Stalowa Wola, Poland), and control (sterile distilled water). Each canal was prepared by the ProTaper Universal instruments (Dentsply, Tulsa Dental Specialties, Tulsa, OK) to size F4 (40/0.06). After each instrument, canals were irrigated with 2 ml of 5.25% NaOCl, except for the roots in the MTAD group, where 1.3% NaOCl was used (manufacturer's recommendation).

2.2 | Final rinse protocols

Table 1 presents the final irrigations protocols after finishing instrumentation.

After final rinse, root canals were rinsed with distilled water to remove any precipitate and dried with paper points. All irrigating solutions were introduced with a 30-G syringe needle (Endo Easy Tip, Ultradent products Inc.) inserted to 1 mm of the working length.

2.3 | Scanning electron microscopy

Scanning electron microscopy (SEM) was used to evaluate the efficacy of removal of the smear layer of final irrigants. On the buccal and oral surfaces of the root, longitudinal grooves are made using a diamond disc and are divided into two halves. One randomly chosen half of each specimen was coded and subjected to increasing concentrations of ethanol (25%, 50%, 75%, and 100%), mounted on aluminum holder, sputter coated with gold and then examined with SEM (JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan) at 20 kV. The root canals were photographed at an enlargement of 2,000× to assess the presence of a smear layer in coronal (10–12 mm from apex), middle (6–7 mm from apex), and

TABLE 1 Final rinse protocols

Group	NaOCl			Distilled water		Final irrigants		Final irrigant
	ml	Time (min)	Conc. (%)	ml	Time (min)	ml	Time (min)	
MTAD	5	2	1.3	-	-	5	2	MTAD QMix
	5	2	5.25	5	2	5	2	QMix EDTA
	5	2	5.25	-	-	5	2	17% EDTA
Control	5	2	5.25	-	-	5	2	Distilled water

apical (1–2 mm from apex) thirds. Two blinded and previously calibrated observers scored the images employing the criteria proposed by Hülsmann, Rummelin, and Schäfers (1997): 1 = no smear layer, all dentinal tubules open; 2 = small amount of smear layer, some dentinal tubules open; 3 = homogeneous smear layer covering the root canal wall, only few dentinal tubules open; 4 = complete root canal wall covered by a homogeneous smear layer, no open dentinal tubules; and 5 = heavy, inhomogeneous smear layer covering the complete root canal wall.

2.4 | Energy-dispersive X-ray spectroscopy

The selected half of each sample from MTAD, QMix, and EDTA group was also tested using SEM-energy dispersive spectroscopy (EDS) to determine the mineral composition of root dentin. Ten extra uninstrumented roots (15 mm length) of single-rooted human mandibular premolars, with the same inclusion criteria as in previous group, were used as negative control group (no-treatment group). These roots were sectioned longitudinally, split into two halves, subjected to serial dehydration, and gold coated using the same protocol used for the SEM analysis. The levels of calcium (Ca), phosphorus (P), carbon (C), oxygen (O), and magnesium (Mg) on the surface of dentin of each sample were measured in coronal and apical thirds. Every third was marked at the center and at two other adjacent areas at the same distance, free from smear layer and debris (MTAD, QMix, and EDTA group), at a voltage of 20 kV for 60 s. The average atomic percentage of each element was calculated.

2.5 | Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical software version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY). Because the element

composition data appeared to have violated the normality (Kolmogorov-Smirnov test), the differences between and within the groups were compared using Kruskal-Wallis analysis of variance with Dunn post hoc method or Mann-Whitney U test. For smear layer evaluation, the intraexaminers and interexaminers reliability were rated using coefficient of Kappa test. The significance levels were set at 5%.

3 | RESULTS

3.1 | Smear layer evaluation

Figures 1–4 show the representative SEM micrographs of the apical, middle, and coronal thirds of root dentin after various irrigation protocols. In the analyzed samples of the control group, a smear layer covering the entire surface of dentine in all root thirds was observed (Figure 4). An analysis of samples treated with chelating agents showed complete absence of a smear layer in the QMix group in the coronal third (Figure 2c). In the MTAD group, the smear layer was present in the apical third, while in the other two thirds, it was not observed (Figure 1). In the EDTA group, the presence of a smear layer was observed in all root thirds, with the highest score in the apical third (Figure 3).

The Kappa test showed a good interexaminer and intraexaminer agreement in determining a smear layer score, and the test values ranged from 0.80 and higher for different groups. Average values of the smear layer scores on the dentine surface after the different irrigation protocols are shown in Table 2. The control group showed heavy presence of a smear layer in all the thirds. This group had a significantly higher mean score than all three chelating irrigants group ($p < .05$), except EDTA group in the apical root third ($p > .05$). There

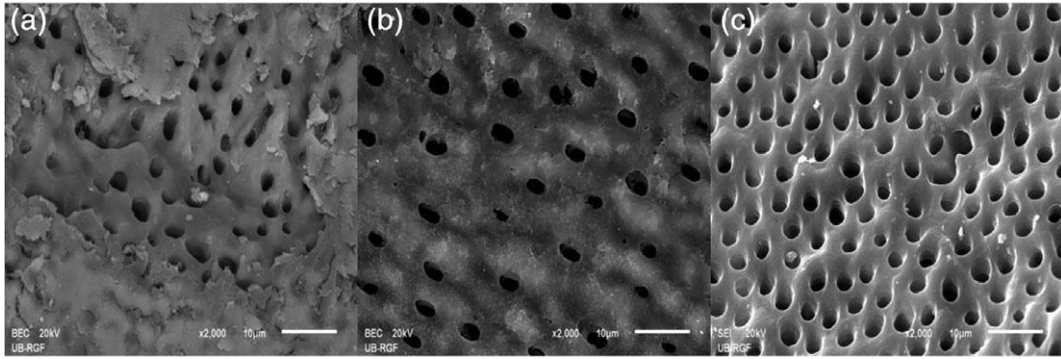


FIGURE 1 Representative SEM micrographs of root canal wall dentin after final irrigation with MTAD (magnification 2,000×): (a) apical third, (b) middle third, and (c) coronal third

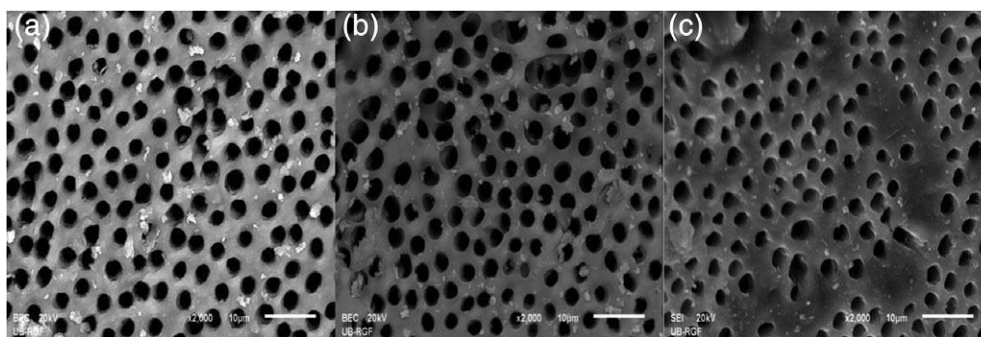


FIGURE 2 Representative SEM micrographs of root canal wall dentin after final irrigation with QMix (magnification 2,000×): (a) apical third, (b) middle third, and (c) coronal third

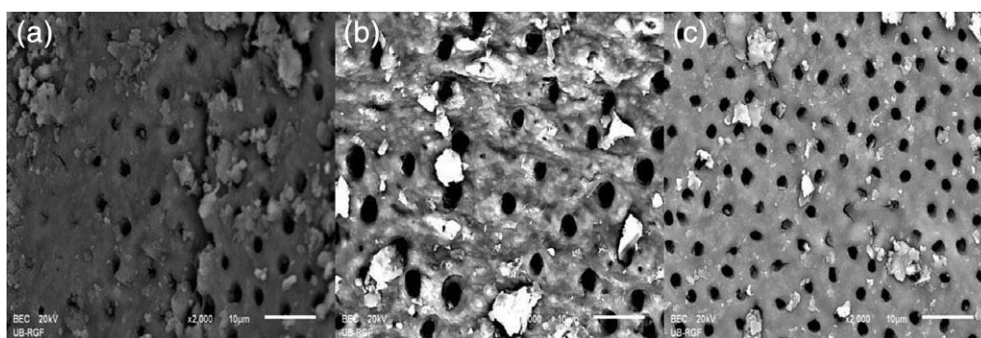


FIGURE 3 Representative SEM micrographs of root canal wall dentin after final irrigation with EDTA (magnification 2,000×): (a) apical third, (b) middle third, and (c) coronal third

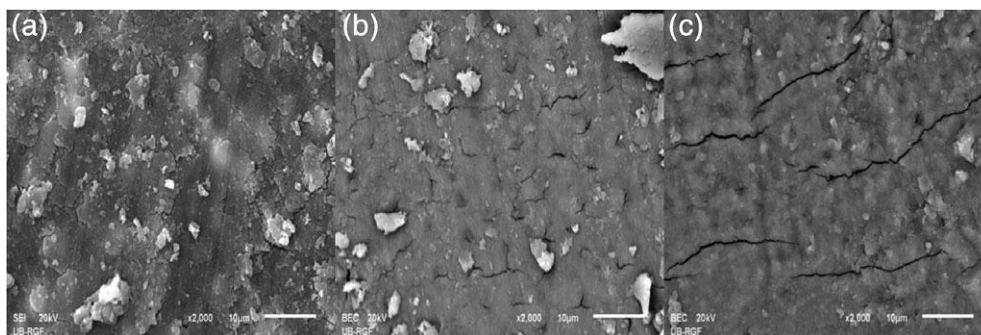


FIGURE 4 Representative SEM micrographs of root canal wall dentin after final irrigation with distilled water (control group) (magnification 2,000×): (a) apical third, (b) middle third, and (c) coronal third
 were no significant differences in the efficacy of cleaning in the middle and coronal thirds between the MTAD, QMix, and EDTA groups ($p > .05$).

In the apical third, the QMix group had a significantly lower score than EDTA ($p < .05$) but similar to the MTAD group ($p > .05$). None of the chelating solutions removed the smear layer from the dentin surface completely.

The highest smear layer mean scores were found in the apical third, followed by the middle and the coronal thirds in all groups. A significant difference was found between the coronal and other two thirds in the MTAD group ($p < .01$) as well as coronal and apical thirds in the EDTA group ($p < .01$). On the other hand, the smear layer did not differ by root thirds in QMix and the control group ($p > .05$).

TABLE 2 The mean smear scores ± SD of root canal treated with different chelating solutions

Groups	n	Coronal	Middle	Apical
MTAD group	10	1.10 ± 0.31 ^{Aa}	2.20 ± 0.63 ^{Ab}	2.60 ± 0.52 ^{ABb}
group	10	1.40 ± 0.70 ^{Aa}	2.40 ± 0.70 ^{Ab}	3.10 ± 1.10 ^{BCb} Control
group	10	4.00 ± 0.67 ^{Ba}	4.30 ± 0.82 ^{Ba}	4.70 ± 0.48 ^{Ca}

Note. Mean values represented with same superscript uppercase letters (column) or lowercase letters (row) are not significantly different (p > .05)

3.2 | Mineral content assessment

EDS analysis of mineral elements in the apical and coronal thirds of root canal dentin in different final chelating irrigation groups and no treatment group is shown in Table 3. Compared to no-treatment group, root dentine in the MTAD group yielded less Ca, P, O, and Mg and more C. Differences between these two groups were statistically significant in both the coronal and apical thirds ($p < .01$), except for the O values in the apical third ($p > .05$). QMix and EDTA final rinse changed the mineral levels in dentin when compared with no treatment group; however, differences were significant only for P level in both apical and coronal thirds ($p < .05$). When the chelating solutions were compared, MTAD irrigation resulted in significant increase of C level when compared to EDTA (apical and coronal third) ($p < .001$). No significant differences in other mineral levels were found among the chelating solutions. When different root canal levels of the groups were compared, significant difference was found only for Mg in QMix ($p < .05$) and O in EDTA group ($p < .05$).

4 | DISCUSSION

This study compared the smear layer removal capability of MTAD, QMix, and 17% EDTA, and for the first time, their effect on mineral content of root canal dentin after initial irrigation with NaOCl. Because some of tested chelating solutions differ in their effect on smear layer removal and the dentin mineral composition, the null hypothesis has to be rejected. The obtained results showed that the three chelating final irri-

gants were similarly effective in smear layer removal from coronal and middle third. In the apical third, QMix more effectively removes smear layer than 17% EDTA and similar to MTAD. These results are in accordance with recent studies of Ballal et al. (2016) and Vemuri et al. (2016) showing superior effect of QMix in removing the smear layer in the apical third than that of EDTA. Lower smear layer capability of 17% EDTA in the apical root third has been shown in previous studies (Ballal, Kandian, Mala, Bhat, & Acharya, 2009; Mancini, Armellin, Casaglia, Cerroni, & Cianconi, 2009; Torabinejad et al., 2003). Other authors found that QMix is effective as 17% EDTA (Aranda-Garcia et al., 2013; Jardine et al., 2016). The explanation for the present results could be attributed to several reasons. Considering that QMix, beside EDTA, contains CHX and detergent, observed findings probably occurred because of synergistic effect of components present in QMix. Although cleaning ability of CHX was shown in some studies (Ferraz, de Almeida Gomes, Zaia, Teixeira, & de Souza-Filho, 2001), the detergent presence probably enhances QMix effectiveness. Namely, detergents decrease surface tension of solution and facilitate the contact of irrigant with the dentinal walls, enabling better smear layer removal. This could partially explain why EDTA, with higher surface tension compared to other investigated chelating solutions (Giardino, Ambu, Becce, Rimondini, & Morra, 2006; Giardino, Andrade, & Beltrami, 2016), was the least effective in smear layer removal from apical third. Lower smear layer capability of EDTA in the apical third can also be attributed to the fact that the chelate activity of the neutral EDTA solution is based not only on the removal of

TABLE 3 The mean levels \pm SD of five element of root canal dentin treated with different chelating solutions

Groups	n	Ca		P		O		C		Mg	
		Apical	Coronal	Apical	Coronal	Apical	Coronal	Apical	Coronal	Apical	Coronal
MTAD group	10	11.75 \pm 6.12 ^{Aa}	14.75 \pm 5.82 ^{Aa}	6.12 \pm 3.35 ^{Aa}	7.68 \pm 3.34 ^{Aa}	40.63 \pm 12.33 ^{Aa}	40.03 \pm 9.55 ^{Ab}	44.74 \pm 4.51 ^{Aa}	42.17 \pm 5.28 ^{Aa}	0.41 \pm 0.27 ^{Aa}	0.56 \pm 0.33 ^{Aa}
QMix group	10	19.73 \pm 5.65 ^{ABa}	20.84 \pm 3.65 ^{ABa}	10.55 \pm 2.88 ^{Aa}	11.15 \pm 2.17 ^{Aa}	42.30 \pm 8.45 ^{ABa}	43.78 \pm 6.06 ^{ABb}	47.89 \pm 5.98 ^{ABa}	27.89 \pm 3.79 ^{ABa}	0.61 \pm 0.17 ^{ABa}	0.77 \pm 0.23 ^{ABb}
EDTA group	10										
No-treatment											

Note. Mean values represented with same superscript uppercase letters (column) or lowercase letters (row) are not significantly different ($p > .05$).

calcium ions from inorganic dentine but also on the elimination of calcium from the organic components of dentine, such as water-soluble noncollagen proteins. Because noncollagenous proteins are present in lower concentration in apical region, the degree of EDTA decalcification is diminished (Verdelis, Ellades, Ovlir, & Margelos, 1999). Tubular sclerosis of root dentine in the apical root region may further affect EDTA efficacy (Lottanti, Gautschi, Sener, & Zehnder, 2009). Syringe needle irrigation is a standard method for root canal irrigation. However, previous results indicate that root canal cleanliness remains to be the problem, when this method is used (Gu et al., 2009; Tay et al., 2010). This is also supported by the results of our research, as none of the chelating agents has completely removed the smear layer. However, apart from EDTA in the apical third, the examined chelating agents were significantly superior to the control group, which did not show any effect on the smear layer.

The efficacy of chelating agents in the removal of the smear layer decreases from the coronal to the apical third, although the root canals in all groups are shaped to a size of 0.40 (taper 6%) to allow adequate cleaning and penetration of solutions to the apical part. The obtained results are consistent with the results of previous studies showing that irrigation solutions are least effective in the apical third (Dai et al., 2011; Ulusoy & Görgül, 2013). The vapor lock due to the closed root canal system (used to stimulate clinical condition) and the reduction of canal diameter in the apical third might have influenced debridement efficacy of irrigating solutions. However, in contrast to EDTA and MTAD, no significant difference was observed among all thirds of root canals after QMix treatment. This result indicates that QMix penetration in the apical third of the root canal was as good as in other thirds.

Although there are some concerns about possible influence of smear layer on dentin mineral measurement, in this study, SEM-EDS analysis was performed after root canal preparation and initial irrigation with NaOCl. The rationale behind this was to resemble more accurate and closer the clinical conditions. Moreover, effects of different irrigation protocols on dentin composition were recently investigated using similar methodology (Wang, Maezono, Shen, & Haapasalo, 2016). This study showed that the MTAD significantly decreased Ca, P, O, and Mg levels and increased C level of root dentin compared with no-treatment group. These changes in the mineral composition of root dentin can mainly be attributed to the low pH of doxycycline and citric acid that are part of MTAD, which is a calcium chelator.

Although MTAD yielded the most pronounced effect on mineral content of root dentin compared with QMix and EDTA, these differences did not reach significance except for C level in EDTA group. The effect of initial irrigation with NaOCl and final irrigation with MTAD on Ca or P level has been compared with EDTA in several previous studies, showing different results. While 17% EDTA with surfactant removed more Ca than MTAD (Yadav et al., 2015), MTAD removed significantly more P than 17% EDTA (Kumar et al., 2016). Differences in study design and mineral assessment may help to explain the disparate results obtained in present and mentioned studies. The exact reason behind the significant increase of C level after MTAD in

this study is not clear. It can be speculated that MTAD increase organic material on the root surfaces more than EDTA. Namely, it has been observed that the demineralization kinetics of

MTAD is significantly faster than those detected by 17% EDTA (De-Deus, Reis, Fidel, Fidel, & Paciornik, 2007). Tay et al. (2006) found that the demineralization of intact intraradicular dentin and the exposure of collagen fibers after the action of MTAD was more pronounced (5–6 mm) than after 17% EDTA (1–2 mm) when these solutions were used for final irrigation for 2 min after 1.3% NaOCl. Nevertheless, these changes induced by MTAD, when compared to other two chelating solutions, may be considered subtle and acceptable for clinical use.

In this study, EDTA caused a slight modification in the inorganic component of root dentin, decreasing the P level compared with no-treatment group. Recent study also showed that sequential 2.5% NaOCl/17% EDTA immersion was associated with reduction of the P levels in dentin particles (Ramírez-Bommer, Gulabivala, Ng, & Young, 2018). It has also been shown that the irrigation of the canal with 5% NaOCl along with the final irrigation with 17% EDTA causes only minor changes in the values of C, O, Ca, and P in the circumpulpal dentine (Wang et al., 2016). It might have been expected that QMix would change mineral content more than the EDTA, because known effects of detergent and CHX on root dentin microhardness, indirect measure of mineral changes in root canal dentin (Akçay & Sen, 2012; Oliveira et al., 2007), and observed better smear layer removal efficacy. On contrary, our results showed that QMix exert same changes in apical and coronal thirds as EDTA compared to no-treatment group. This can be explained by a previous study which shows that the addition of detergent to EDTA does not increase the removal of Ca ions from dentine compared to pure EDTA solution (Poggio, Dagna, Colombo, Scribante, & Chiesa, 2014; Zehnder, Schmidlin, Sener, & Waltimo, 2005). Also, the addition of CHX chelate solutions has no effect on their decalcifying effect, as shown for citric acid (Gonzalez-Lopez, Camejo-Aguilar, Sanchez-Sanchez, & Bolanos-Carmona, 2006). Moreover, an insignificant difference in Ca loss between the dentin specimens immersed in 5% NaOCl followed by EDTA or QMix was found (Taneja, Kumari, & Anand, 2014), supporting present results.

5 | CONCLUSION

In the conditions of this *in vitro* study, it was found that QMix efficiently removes the smear layer, similar to MTAD, but superior to 17% EDTA in the apical third. MTAD yielded the most pronounced effect on mineral component of root dentin; however, differences were significant only for C level compared to 17% EDTA. The study provides evidence in support of the use of newer chelating irrigation solutions as final irrigants after NaOCl. Further studies should be carried out not only *in vitro* but also in clinical conditions to obtain an appropriate assessment of their efficacy in cleaning the canal.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Junior Project (No: 2016/06) of the Faculty of Medical Sciences, University of Kragujevac and the Ministry of Education, Science and Technological Development of the Republic of Serbia (No: 175071).

ORCID

Dajana Nogo-Živanovic  <https://orcid.org/0000-0002-4773-3602>

Ljiljana Bjelovic  <https://orcid.org/0000-0002-2619-0012>

REFERENCES

- Akçay, I., & Sen, B. H. (2012). The effect of surfactant addition to EDTA on microhardness of root dentin. *Journal of Endodontics*, 38(5), 704–707. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.02.004>
- Aksel, H., Serper, A., Kalayci, S., Somer, G., & Eriskan, C. (2016). Effects of QMIX and ethylenediaminetetraacetic acid on decalcification and erosion of root canal dentin. *Microscopy Research and Technique*, 79(11), 1056–1061. <https://doi.org/10.1002/jemt.22745>
- Ali Mozayeni, M., Hossein Javaheri, G., Poorroosta, P., Asna Ashari, M., & Hossein Javaheri, H. (2009). Effect of 17% EDTA and MTAD on intracanal smear layer removal: A scanning electron microscopic study. *Australian Endodontic Journal*, 35(1), 13–17.
- Aranda-Garcia, A. J., Kuga, M. C., Vitorino, K. R., Chávez-Andrade, G. M., Hungaro Duarte, M. A., Bonetti-Filho, I., & Reis Só, M. V. (2013). Effect of the root canal final rinse protocols on the debris and smear layer removal and on the push-out strength of an epoxy-based sealer. *Microscopy Research and Technique*, 76(5), 533–537. <https://doi.org/10.1002/jemt.22196>
- Ballal, N. V., Jain, I., & Tay, F. R. (2016). Evaluation of the smear layer removal and decalcification effect of QMIX, maleic acid and EDTA on root canal dentine. *Journal of Dentistry*, 51, 62–68. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2016.06.001>
- Ballal, N. V., Kandian, S., Mala, K., Bhat, K. S., & Acharya, S. (2009). Comparison of the efficacy of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in smear layer removal from instrumented human root canal: A scanning electron microscopic study. *Journal of Endodontics*, 35(11), 1573–1576. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.07.021>
- Dai, L., Khechen, K., Khan, S., Gillen, B., Loushine, B. A., Wimmer, C. E., ... Tay, F. R. (2011). The effect of QMIX, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *Journal of Endodontics*, 37(1), 80–84. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.10.004>
- De-Deus, G., Reis, C., Fidel, S., Fidel, R., & Paciornik, S. (2007). Dentin demineralization when subjected to BioPure MTAD: A longitudinal and quantitative assessment. *Journal of Endodontics*, 33(11), 1364–1368.
- Dog an, H., & Çalt, S. (2001). Effects of chelating agents and sodium hypochlorite on mineral content of root dentin. *Journal of Endodontics*, 27(9), 578–580.
- Eliot, C., Hatton, J. F., Stewart, G. P., Hildebolt, C. F., Gillespie, M. J., & Gutmann, J. L. (2014). The effect of the irrigant QMIX on removal of canal wall smear layer: An ex vivo study. *Odontology*, 102(2), 232–240. <https://doi.org/10.1007/s10266-012-0102-1>
- Ferraz, C. C. R., de Almeida Gomes, B. P. F., Zaia, A. A., Teixeira, F. B., & de Souza-Filho, F. J. (2001). In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. *Journal of Endodontics*, 27(7), 452–455.
- Giardino, L., Ambu, E., Becce, C., Rimondini, L., & Morra, M. (2006). Surface tension comparison of four common root canal irrigants and two new irrigants containing antibiotic. *Journal of Endodontics*, 32(11), 1091–1093.
- Giardino, L., Andrade, F. B. d., & Beltrami, R. (2016). Antimicrobial effect and surface tension of some chelating solutions with added surfactants. *Brazilian Dental Journal*, 27(5), 584–588. <https://doi.org/10.1590/0103-6440201600985>
- Gonzalez-Lopez, S., Camejo-Aguilar, D., Sanchez-Sanchez, P., & Bolanos-Carmona, V. (2006). Effect of CHX on the decalcifying effect of 10% citric acid, 20% citric acid, or 17% EDTA. *Journal of Endodontics*, 32(8), 781–784. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.02.006>
- Gu, L.-s., Kim, J. R., Ling, J., Choi, K. K., Pashley, D. H., & Tay, F. R. (2009). Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *Journal of Endodontics*, 35(5), 301–306.
- Jardine, A. P., Da Rosa, R. A., Santini, M. F., Wagner, M., Só, M. V. R., Kuga, M. C., & Kopper, P. M. P. (2016). The effect of final irrigation on the penetrability of an epoxy resin-based sealer into dentinal tubules: A confocal microscopy study. *Clinical Oral Investigations*, 20(1), 117–123. <https://doi.org/10.1007/s00784-015-1474-8>
- Kumar, Y., Lohar, J., Bhat, S., Bhati, M., Gandhi, A., & Mehta, A. (2016). *Journal of Endodontics*, 35(6), 791–804. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.010>
- Hülsmann, M., Rummelin, C., & Schäfers, F. (1997). Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand
- Comparative evaluation of demineralization of radicular dentin with 17% ethylenediaminetetraacetic acid, 10% citric acid, and MTAD at different time intervals: An in vitro study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 6(1), 44–48. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.175412>
- Lottanti, S., Gautschi, H., Sener, B., & Zehnder, M. (2009). Effects of ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acid irrigation on human root dentine and the smear layer. *International Endodontic Journal*, 42(4), 335–343. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01514.x>
- Mancini, M., Armellini, E., Casaglia, A., Cerroni, L., & Cianconi, L. (2009). A comparative study of smear layer removal and erosion in apical intraradicular dentine with three irrigating solutions: A scanning electron microscopy evaluation. *Journal of Endodontics*, 35(6), 900–903. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.03.052>
- Nogo-Zivanovic, D., Bjelovic, L., Ivanovic, V., Kanjevac, T., & Tanaskovic, I. (2018). Consideration of the therapeutic potential of irrigants in endodontic therapy. *Serbian Journal of Experimental and Clinical Research*, 19(2), 103–112. <https://doi.org/10.1515/sjecr-2016-0095>
- Oliveira, L. D., Carvalho, C. A. T., Nunes, W., Valera, M. C., Camargo, C. H. R., & Jorge, A. O. C. (2007). Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 104(4), e125–e128.
- Perdigão, J., Eiriksson, S., Rosa, B. T., Lopes, M., & Gomes, G. (2001). Effect of calcium removal on dentin bond strengths. *Quintessence International*, 32(2), 142–146.
- Poggio, C., Dagna, A., Colombo, M., Scribante, A., & Chiesa, M. (2014). Decalcifying efficacy of different irrigating solutions: Effect of cetrimide addition. *Brazilian Oral Research*, 28, 1–6.
- Ramírez-Bommer, C., Gulabivala, K., Ng, Y. L., & Young, A. (2018). Estimated depth of apatite and collagen degradation in human dentine by sequential exposure to sodium hypochlorite and EDTA: A quantitative FTIR study. *International Endodontic Journal*, 51(4), 469–478. <https://doi.org/10.1111/iej.12864>
- Sayin, T. C., Cehreli, Z. C., Deniz, D., Akçay, A., Tuncel, B., Dagli, F., & Kalayci, S. (2009). Time-dependent decalcifying effects of endodontic irrigants with antibacterial properties. *Journal of Endodontics*, 35(2), 280–283. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.016>
- Sayin, T. C., Serper, A., Cehreli, Z. C., & Kalayci, S. (2007). Calcium loss from root canal dentin following EDTA, EGTA, EDTAC, and tetracycline-HCl treatment with or without subsequent NaOCl irrigation. *Journal of Endodontics*, 33(5), 581–584.
- Siqueira, J. F., Jr., & Rôças, I. N. (2008). Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *Journal of Endodontics*, 34(11), 1291–1301. e1293. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028>
- Stojicic, S., Shen, Y., Qian, W., Johnson, B., & Haapasalo, M. (2012). Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMIX. *International Endodontic Journal*, 45(4), 363–371. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.01985.x>
- Stojicic, S., Zivkovic, S., Qian, W., Zhang, H., & Haapasalo, M. (2010). Tissue dissolution by sodium hypochlorite: Effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *Journal of Endodontics*, 36(9), 1558–1562. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.021>

- Taneja, S., Kumari, M., & Anand, S. (2014). Effect of QMIX, peracetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on calcium loss and microhardness of root dentine. *Journal of Conservative Dentistry: JCD*, 17(2), 155–158. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.128058>
- Tay, F. R., Gu, L.-s., Schoeffel, G. J., Wimmer, C., Susin, L., Zhang, K., & Pashley, D. H. (2010). Effect of vapor lock on root canal debridement by using a side-vented needle for positive-pressure irrigant delivery. *Journal of Endodontics*, 36(4), 745–750. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.11.0>

