

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ  
СТОМАТОЛОШКИ ФАКУЛТЕТ

Дијана Д. Тришић

**УТИЦАЈ ФОТОДИНАМСКЕ ТЕРАПИЈЕ  
И ДИОДНОГ ЛАСЕРА НА  
УСПЕШНОСТ ЕНДОДОНТСКОГ  
ЛЕЧЕЊА МЛАДИХ СТАЛНИХ ЗУБА И  
БИОСТИМУЛАЦИЈУ МАТИЧНИХ  
ЋЕЛИЈА ПОРЕКЛОМ ИЗ АПИКАЛНЕ  
ПАПИЛЕ**

докторска дисертација

Београд, 2019.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Dijana D. Trisic

**INFLUENCE OF PHOTODYNAMIC  
THERAPY AND DIODE LASER ON  
SUCCESSFUL ENDODONTIC  
TREATMENT OF YOUNG PERMANENT  
TEETH AND BIOSTIMULATION OF  
STEM CELLS FROM APICAL PAPILLA**

Doctoral Disertation

Belgrade, 2019.

**Ментори:**

**др Дејан Марковић, редовни професор**  
Клиника за Дечју и превентивну стоматологију  
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

**др Бранка Поповић, ванредни професор**  
Институтски предмети, Хумана генетика  
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

**Комисија:**

**др Тамара Перић, ванредни професор**  
Клиника за Дечју и превентивну стоматологију  
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

**др Јелена Милашин, редовни професор**  
Институтски предмети, Хумана генетика  
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

**др Славољуб Живковић, редовни професор**  
Клиника за болести зуба  
Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду

**др Марина Соковић, научни саветник**  
Институт за биолошка истраживања „Синиша Станковић“, Универзитет у Београду

**др Бојана Ћетеновић, научни сарадник**  
Институт за нуклеарне науке - Винча, Универзитет у Београду

Датум одбране: \_\_\_\_\_

*Захваљујем се свом метору, проф. др Дејану Марковићу, на указаном поверењу током дугогодишње сарадње, на стрпљењу и саветима. Посебно се захваљујем на стручном вођењу у клиничком делу истраживања. Захваљујем се и коментору, проф. др **Бранки Поповић**, на помоћи при планирању, раду у области молекуларне генетике и обликовању ове дисертације.*

*Најискреније се захваљујем предивном човеку, руководиоцу пројекта, научном саветнику др **Вукоману Јокановићу**, на отварању врата у бескрајни свет могућег, родитељском односу и несебичној подршци. Хвала Вам на времену, свим разговорима, саветима, свесрдном дељењу знања и искустава која далеко превазилазе поље ове дисертације.*

*Захваљујем се и проф. др **Тамари Перић**, проф. др **Славољубу Живковићу** и научном саветнику др **Марини Соковић** на љубазности, посвећеном времену и несебичној помоћи око обликовања ове докторске дисертације.*

*Проф. др **Јелени Милашин** неизмерно хвала што је препознала у мени искру љубави ка науци и дала пуну подршку за истраживања на матичним ћелијама. Хвала Вам на ентузијазму, драгоценим сугестијама и помоћи.*

*Научном сараднику др **Бојани Ђетеновић** хвала на свесрдној и несебичној подршци, на свим саветима и усмеравању. Што је била ту да оно тренутно стави у контекст шире слике, чиме је увек од мене тражила да будем боља верзија себе. Хвала што радом на себи чиниш и мене бољом, на пажњи и пријатељству.*

*О свег срца захваљујем се и **Бошку, Лази, Маји, Нађи и Јеленама** уз које је овај пут постао потпунији и далеко радоснији. Посебно се захваљујем Бошку на безрезервној подршци и охрабрењу да идеја са једног листа папира постане далеко више, и Лази, нашем непресушном извору духовитости и подршке који је учинио ово време неизмерно лакшим.*

*Др Дренки Тривановић и др Тамари Кукољ са Института за медицинска истраживања хвала на великој помоћи током првих корака у испитивању вијабилности ћелија.*

*Колективу Института Стоматолошког факултета хвала на пријатељској атмосфери. Доц. др Милени Радуновић хвала на помоћи у микробиолошком раду.*

*Колективу Клинике за дечију и превентивну стоматологију и драгим специјалистима Клинике, а посебно асистенту др Милошу Белоци, др Катарини Мадих, др Влади Милановићу, др Весни Тричковић, др Весни Недељковић, др Весни Тупајић, др Ксенији Анђушић и др Катарини Унтенекер неизмерно хвала на свој подршци, помоћи и саветима.*

*Хвала и свима осталима који су допринели да ова дисертација дође до свог завршног облика, а које сам ненамерно изоставила.*

*Мојој породици, за сву љубав, веру, разумевање и несебичну подршку.*

## Индекс појмова

*SCAP* - матичне ћелије пореклом из апикалне папиле

МО - микроорганизми

*qPCR* - ланчана реакција умножавања гена полимеразом у реалном времену

ХАП - хронични апикални пародонтитис

МТА - минерални триоксидни агрегат

*NaOCl* - натријум-хипохлорит

*PDT* - фотодинамска терапија

*PCR* - метода ланчане реакције полимеразе

## Утицај фотодинамске терапије и диодног ласера на успешност ендодонтског лечења младих сталних зуба и биостимулацију матичних ћелија пореклом из апикалне папиле

### *Сажетак*

**Увод:** Матичне ћелије пореклом из апикалне папиле (*SCAP*) представљају хомогену ћелијску популацију која диферентује у примарне одонтобласте и формира примарни дентин корена. Млади стални зуби, услед склоности ка повредама и развојним аномалијама, су у великом ризику за настанак ендодонтских обољења. Током ендодонтског лечења младих сталних зуба контрола инфекције представља неопходан корак у стварању услова за регенерацију и зарастање. Услед доброг антибактеријског потенцијала, предложена је употреба фотодинамске терапије и диодних ласера велике снаге у ендодонтском лечењу, као додатка важећим протоколима. **Циљ** овог истраживања био је да се испита биокомпатибилност диодног ласера и фотодинамске терапије на матичним ћелијама пореклом из апикалне папиле зуба, као и антимикуробно дејство традиционалних антимикуробних средстава, ласера, и материјала за дефинитивну оптурацију канала корена у ендодонтском лечењу младих сталних зуба.

**Материјали и методе:** Ћелије из апикалне папиле су изоловане и окарактерисане према међународно дефинисаним критеријумима за мезенхималне матичне ћелије. На окарактерисаним матичним ћелијама пореклом из апикалне папиле испитана је биокомпатибилност диодног ласера и фотодинамске терапије тестом митохондријске активности (*МТТ*) и директним тестом вијабилности ћелија (Неутрално црвено) након 1 сата, 1 и 7 дана. Биостимулативно дејство ласера на потенцијал миграције испитано је тестом огреботине, док је утицај на потенцијал остеогеног усмеравања испитана мерењем алкалне фосфатазе (3, 7 и 14 дана) и бојењем Ализарин црвеним. Испитан је и ниво релативне генске експресије и специфично бојење протеина за маркере одонто/остеогене диференцијације, након 21 дана. У рандомизованој контролисаној клиничкој студији, пацијенти су распоређени у 3 огледне групе. Антимикуробно дејство је испитано након дејства стандардних антимикуробних средстава, као и након додатног дејства диодног ласера и фотодинамске терапије у одговарајућим групама. Узорци су засејани на



микробиолошким подлогама, и додатно анализирани молекуларно-генетичким методама. Испитивање антимикубног дејства калцијум-хидроксида, минерал триоксид агрегата и калцијум силиката обогаченог бизмут оксидом је урађено на клиничким изолатима методом двослојног агар дифузионог теста у три временска периода (1, 3 и 24 сата). За статистичку анализу резултата коришћен је софтвер Призма верзија 6, одговарајућим тестовима, зависно од испитане нормалности расподеле података.

**Резултати:** Након пете пасаже, *SCAP* ћелије су окарактерисане методом проточне цитометрије. Маркери мезенхималних матичних ћелија (CD 105, CD 90 и CD 73) су били високо испољени (98 - 99%) на мембранама ћелија из узорка. Такође, ћелије су усмерене ка остеогеној, адипогеној и хондрогеној ћелијској лози, ради квалитативне потврде мезенхималне природе изолованих ћелија. Тестови биокомпатибилности показали су да одабрани параметри оба ласера утичу на повећану митохондријуску активност и пролиферацију ћелија. Биостимулативно дејство након излагања ћелија третманима оба ласера показано је у виду брже миграције ћелије, повећаног стварања алкалне фосфатазе, депоновања калцијума у ванћелијском матриксу, као и повећаном експресијом гена и стварања протеина специфичних за ћелије диферентоване ка остео/одонтобластима. Анализа микробиолошких узорака из клиничке студије показала је да се након стандардне механичко-медикаментозне обраде канала број микроорганизама значајно смањило у свим групама. Антимикубно дејство ласера се показало значајним у додатном смањењу укупног броја бактерија, као и смањењу броја зуба позитивних на присуство бактерија. Након додатног обескличења ласерима је нађено значајно смањење позитивних узорака на бактеријске врсте *P. micros*, *T. forsythia* и *P. endodontalis*. Након 6 месеци лечени зуби нису показивали знаке и симптоме ендодонтског обољења нити друге патолошке промене на корену зуба. Инхибиција раста испитиваних бактерија показана је у присуству материјала за дефинитивну оптурацију канала корена. Током времена примећен је тренд опадања инхибиционих зона раста.

**Закључци:** Према добијеним резултатима снаге од 1 и 1.5 W диодног ласера (940 nm) доводе до максималног биостимулативног дејства, док у случају фотодинамске терапије најбоље дејство се постиже уз нижу концентрацију фотосензитивног

агенса. Примена диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије показала се веома значајом у смањењу броја узорака позитивних на присуство вијабилних бактерија у клиничким условима. Наиме, оба ласера су довела до значајно већег броја стерилних канала у односу на контролну групу. Судаћи по добијеним резултатима најбоље антимикубно дејство се постиже применом фотодинамске терапије као додатне методе обескличења у ендодонтском лечењу. Испитивани материјали за дефинитивну оптурацију делују додатно антимикубно на изолате из канала корена младих сталних зуба, те представљају значајан део синергистичког антимикубног дејства током ендодонтског лечења младих сталних зуба.

**Кључне речи:** млади стални зуби, матичне ћелије пореклом из апикалне папиле, ендодонција, диодни ласер, фотодинамска терапија, фотобиомодулација

**Научна област:** медицинске науке

**Ужа научна област:** стоматолошке науке

**UDK:** 577.2:616.314.16-085.831(043.3)

## **Influence of photodynamic therapy and diode laser on successful endodontic treatment of young permanent teeth and biostimulation of stem cells from apical papilla**

### ***Abstract***

**Introduction:** Stem cells from apical papilla (*SCAPs*) represent a homogeneous cell population which differentiates into primary odontoblasts and form primary root dentine. Young permanent teeth, more prone to dental trauma and developmental anomalies, have greater susceptibility to develop endodontic infections. During endodontic treatment of young permanent teeth, control of infection represents a necessary step in creating conditions for further tissue regeneration and healing. Due to good antibacterial potential, the application of photodynamic therapy and a high-power diode laser has been recommended, as addition to standard endodontic protocol. **The Aim** of this study was to investigate biocompatibility of diode laser and photodynamic therapy on stem cells from apical papilla, as well as the antibacterial effect of standard disinfection, lasers, and materials for definitive root canal obturation in endodontic treatment of young permanent teeth.

**Materials and methods:** *SCAPs* were isolated and characterized by internationally accepted criteria for mesenchymal stem cells. Biocompatibility of diode laser and photodynamic therapy was investigated on characterized stem cells by the mitochondrial activity assay (MTT assay) and cells viability assay (Neutral red assay) after 1 hour, 1 and 7 days. Lasers biostimulation effect on cells migration was evaluated by scratch assay, while the effect on osteogenic differentiation was investigated by measurement of alkaline phosphatase (3, 7, and 14 days) and Alizarin red staining. Relative gene expression analysis and protein staining of selected markers for odonto/osteogenic differentiation, have been performed as well after 21 days. In a randomized controlled clinical study, patients have been relocated in 3 study groups. Antibacterial effect was evaluated after standard endodontic treatment, as well as after diode laser application and photodynamic therapy, in corresponding groups. Samples were seeded on microbial plates, and additionally analyzed by molecular methods. Antibacterial effects of calcium hydroxide, mineral trioxide aggregate, and calcium silicate with the addition of bismuth oxide were investigated on clinical isolates, by the method of double agar diffusion test

in three time periods (1, 3, and 24 hours). Statistical analysis was performed on Prism software version 6, with corresponding tests depending on normality of data distribution.

**Results:** After the fifth passage, *SCAPs* were characterized by flow cytometry. Mesenchymal stem cells markers (CD 105, CD 90 и CD 73) were highly (98 - 99%) expressed on cell membranes. Also, cells were successfully induced into osteogenic, adipogenic and chondrogenic lineage, to qualitatively confirm the mesenchymal nature of *SCAPs*. Biocompatibility tests revealed that chosen lasers' parameters influence higher mitochondrial activity and cell proliferation. Lasers biostimulation of cells was revealed by enhanced cells migration, a higher concentration of alkaline phosphatase in cells and calcium deposits on cells membrane, as well as a higher gene expression and production of proteins characteristic for cells differentiated into odonto/osteoblasts. Microbial clinical samples analysis revealed the adequate antibacterial effect of standard endodontic therapy. Additional antibacterial effect of investigated lasers contributed to further reduction of bacteria population, resulting in a number of samples that were sterile after treatment. Lasers significantly reduced the number of samples positive for *P. micros*, *T. forsythia*, and *P. endodontalis*. Six months after endodontic treatment, there were no adverse effects on teeth roots and healing was observed in patients subjected to standard endodontic and additional lasers treatments. Growth inhibition of selected bacteria was revealed in the presence of materials for definitive root obturation. The trend of reduction of inhibition zones was observed during time periods.

**Conclusions:** The results of the study revealed that the highest biostimulative effect occurs when diode laser (940 nm) is applied with output powers of 1 and 1.5 W, while for photodynamic therapy lower concentration of photosensitive agents is advised for attaining the maximum effect. Additional disinfection of root canal with a diode laser (940 nm) and photodynamic therapy prove to be a valuable factor in providing the higher percent of sterile root canals, in comparison to the control group. It was revealed that the highest antibacterial effect is obtained by photodynamic therapy application in addition to standard therapy. Materials for definitive root canal obturation have antibacterial potential and represent a valuable part of synergistic antibacterial effect during long-term endodontic treatment of young permanent teeth.

**Key words:** young permanent teeth, stem cells from apical papilla, endodontics, diode laser, photodynamic therapy, photobiomodulation

**Scientific field:** Medical Sciences

**Narrower scientific field:** Dental Sciences

**UDK:** 577.2:616.314.16-085.831(043.3)

## Садржај

<b>1. Увод</b> .....	1
1.1. Развој корена сталних зуба.....	2
1.2. Ендодонтско лечење сталних зуба.....	6
1.2.1. Анатомија каналног система корена сталних зуба.....	10
1.2.2. Бактеријске врсте резистентне на стандардну ендодонтску терапију.....	12
1.3. Ендодонтско лечење младих сталних зуба.....	13
1.3.1. Недостаци традиционалних неспецифичних дезинфекционих средстава у ендодонцији.....	16
1.3.2. Даље поље истраживања контроле ендодонтске инфекције.....	18
1.3.2.1. Примена ласера у ендодонтском лечењу.....	19
<b>2. Циљеви истраживања</b> .....	24
2.1. Радна хипотеза.....	25
2.2. Циљеви истраживања.....	25
<b>3. Материјали и методе</b> .....	26
3.1. Изолација и култивација ћелија из ткива апикалне папиле.....	27
3.1.1. Есеј формирања колонија.....	29
3.1.2. Есеј пролиферације.....	29
3.2. Карактеризација ћелија.....	30
3.2.1. Усмеравање ћелија ткива апикалне папиле у три ћелијске лозе.....	30
3.2.1.1. Квалитативно доказивање потенцијала ка остеогеном усмеравању.....	31
3.2.1.2. Квалитативно доказивање потенцијала ка адипогеном усмеравању.....	31
3.2.1.3. Квалитативно доказивање потенцијала ка хондрогеном усмеравању.....	32
3.3. <i>In vitro</i> испитивање биокомпатибилности диодног ласера и <i>PDT</i> на <i>SCAP</i> ћелије.....	33
3.3.1. Дизајн студије.....	33
3.3.1.1. Директни тест вијабилности ћелија - есеј Неутрално црвено ( <i>NR</i> ).....	35
3.3.1.2. Индиректни тест вијабилности ћелија - есеј митохондријске активности ( <i>MTT</i> ).....	36
3.3.2. Тест потенцијала миграције озрачених ћелија.....	37
3.4. Испитивање утицаја ласера на остеогени потенцијал <i>SCAP</i> ћелија.....	38

3.4.1. Одређивање активности алкалне фосфатазе након дејства ласера на <i>SCAP</i> ћелије.....	39
3.4.1.1. <i>In situ</i> хистолошко бојење алкалне фосфатазе.....	39
3.4.1.2. Квантитативни есеј активности алкалне фосфатазе.....	39
3.4.2. Одређивање експресије гена маркера одонто/остеогеног усмеравања након дејства ласера на <i>SCAP</i> ћелије.....	40
3.4.3. Квалитативно доказивање остеоогеног усмеравања ћелија озрачених ласерима.....	42
3.4.4. Имуноцитохемијска анализа испољавања одабраних протеина - маркера одонто/остеогеног усмеравања ћелија након дејства ласера.....	43
3.5. Прелиминарно испитивање безбедности примене ласера велике снаге на младим сталним зубима <i>in vitro</i> условима.....	44
3.5.1. Припрема узорака.....	44
3.5.2. Симулација ендодонтског ласерског третмана.....	45
3.5.3. Мерење температуре.....	46
3.6. Рандомизована контролисана клиничка студија.....	46
3.6.1. Клиничка фаза истраживања утицаја примене дидоног ласера (940 nm) и <i>PDT</i> у ендодонтском лечењу младих сталних зуба.....	46
3.6.1.1. Величина узорка.....	46
3.6.1.2. Критеријуми за укључење у студију.....	47
3.6.1.3. Критеријуми за искључење из студије.....	47
3.6.1.4. Клинички рад и праћење пацијената.....	48
3.6.2. Лабораторијска анализа микробиолошких узорака.....	50
3.6.2.1. Стандардна култивација микробиолошких узорака.....	50
3.6.2.2. Анализе микробиолошких узорака молекуларно-генетичким методама....	51
3.6.2.2.1. Одређивање укупне бактеријске ДНК у узорцима.....	51
3.6.2.2.2. Одређивање укупног броја бактеријских генома за <i>Streptococcus spp.</i> и <i>Enterococcus faecalis</i> .....	52
3.6.2.2.3. Квалитативно испитивање микробиолошких узорака.....	53
3.6.2.2.3.1. <i>PCR</i> метода идентификације бактерија.....	53
3.6.2.2.3.2. Гел електрофореза.....	54

3.6.2.3. Изолација и идентификација аеробних и анаеробних бактерија из клиничких узорака.....	55
3.6.2.3.1. Антибактеријско дејство ендодонтских материјала на бактеријске изолате из канала корена.....	56
3.7. Статистичка анализа.....	57
<b>4. Резултати.....</b>	<b>58</b>
4.1. Изолација и култивација ћелија из ткива апикалне папиле.....	59
4.1.2. Есеј формирања колонија.....	61
4.1.3. Есеј пролиферације.....	62
4.1.4. Карактеризација ћелија из ткива апикалне папиле.....	63
4.1.4.1. Проточна цитометрија.....	63
4.1.4.2. Усмеравање ћелија апикалне папиле у три ћелијске лозе.....	63
4.1.4.2.1. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка одонто/остеобластима.....	64
4.1.4.2.2. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка адипоцитима.....	65
4.1.4.2.3. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка хондроцитима.....	66
4.2. In vitro истраживање утицаја ласера на SCAP ћелије.....	67
4.2.1. Испитивање биокомпатибилности диодног ласера и PDT на SCAP ћелије - есеј митохондријске активности (MTT) и есеј вијабилности ћелија (NR).....	67
4.2.2. Потенцијал миграције SCAP ћелија након зрачења - есеј огреботине.....	70
4.2.3. Усмеравање SCAP ћелија након зрачења ка одонто/остеогеној ћелијској линији.....	72
4.2.3.1. Потенцијал стварања алкалне фосфатазе у ћелијама након зрачења.....	72
4.2.3.2. Експресија гена - маркера одонто/остеогеног усмеравања након дејства ласера на SCAP ћелије.....	73
4.2.3.3. Квалитативно доказивање остеогеног усмеравања ћелија озрачених ласерима бојењем Ализарин црвеним.....	75
4.2.3.4. Имуноцитохемијска анализа испољавања одабраних протеина - маркера одонто/остеогеног усмеравања ћелија након дејства ласера.....	76
4.3. Испитивање безбедности примене ласера велике снаге (940 nm).....	78

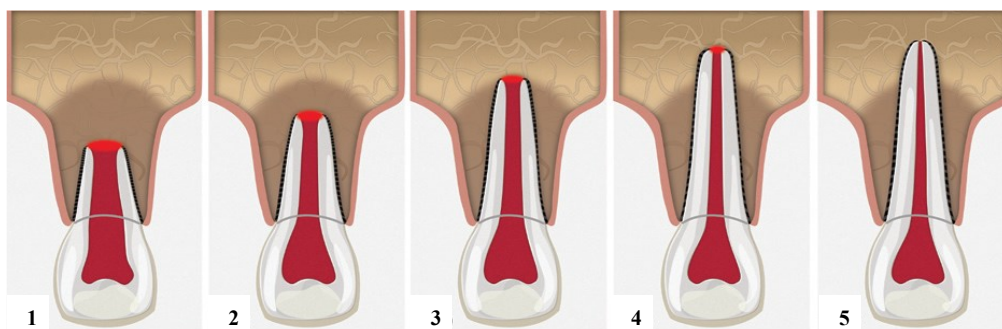


4.4. Рандомизована контролисана клиничка студија.....	80
4.4.1. Клиничка фаза истраживања примене дидоног ласера (940 nm) и PDT у ендодонтском лечењу младих сталних зуба.....	80
4.4.2. Резултати антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији.....	80
4.4.2.1. Резултати квантитативних анализа антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији.....	80
4.4.2.2. Резултати квалитативних анализа антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији.....	85
4.4.2.3. Клиничко праћење пацијената.....	89
4.4.3. Антибактеријско дејство ендодонтских материјала на бактеријске изолате из канала корена.....	90
<b>5. Дискусија.....</b>	<b>92</b>
5.1. Дискусија резултата изолације и карактеризације матичних ћелија из апикалне папиле.....	93
5.2. Дискусија резултата биокompatбилности ласера на SCAP ћелије током ендодонтске терапије.....	96
5.3. Дискусија резултата биостимулативног дејства ласера на SCAP ћелије током ендодонтске терапије.....	101
5.4. Дискусија резултата еодонтске ласерске терапије.....	105
5.4.1. Дискусија резултата фототермалног дејства диодног ласера (940 nm).....	105
5.4.2. Дискусија антимикробног дејства ласера у рандомизованој контролисаној клиничкој студији.....	107
5.5. Дискусија резултата антимикробног дејства ендодонтских материјала.....	114
<b>6. Закључци.....</b>	<b>118</b>
Литература.....	121
Прилози	

## **1. *Увод***

## 1.1. Развој корена сталних зуба

Развој корена сталних зуба почиње након формирања крунице и завршава се две до три године након ницања зуба [1]. Стални зуби од ницања до завршетка раста и развоја корена називају се млади стални зуби. Зуби са незавршеним растом корена сматрају се органом у развоју. У односу на ширину апикалног врха и дужину корена, дефинисано је пет стадијума развоја корена (Слика 1) [2]. Први стадијум означава зуб широког, дивергентног отвора врха корена, док је дужина корена мања од половине коначне дужине. Током другог стадијума дужина корена износи око половине очекиване дужине по завршетку развоја. Током трећег стадијума дужина корена се налази на две трећине укупне дужине. У четвртом стадијуму корен досеже готово пуну дужину, док је отвор врха корена широко отворен. Пети стадијум означава зуб са уским отвором на врху корена и завршеним развојем корена.



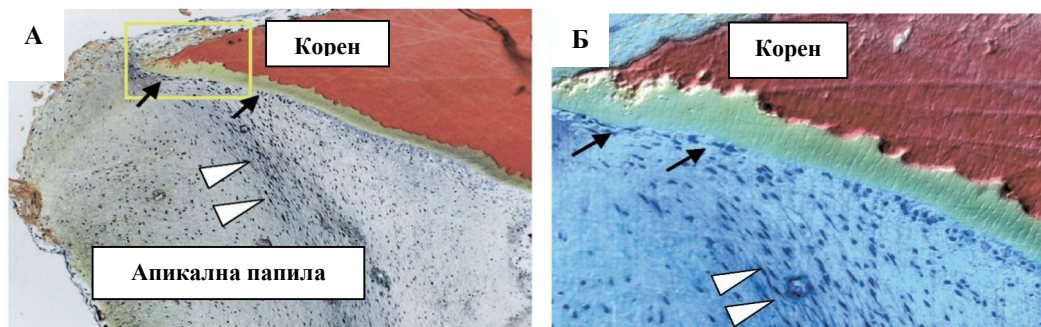
Слика 1. Стадијуми развоја зуба. Преузето и модификовано из рада *Plascencia* и сар. [3]

Услед повреде или инфекције пулпног ткива зуба током описаних фаза развоја долази до престанка раста и развоја корена. Корен сталног зуба заустављен у развоју одликује се танким зидовима, широким каналом и широко отвореним врхом корена. Тростандардно затварање канала корена се тешко постиже доступним ендодонтским материјалима. Стога, ендодонтско лечење младог сталног зуба, услед повреде или каријеса, представља знатан изазов. Током развоја корена младог зуба одвија се и раст алеоларног наставка и периодонталних лигамената [4]. Тиме губитак младог сталног зуба може довести до поремећаја оралних функција, неадекватног максиларног развоја и настанка малоклузија.

Развој корена подразумева каскаду процеса и учествовање различитих врста ткива и ћелија. Апикални део корена током раста делује као развојни центар [5, 6]. Апикална папила, периапикални зубни фоликул и Хертвигова епителна овојница локализовани су на коренском крају где се налази центар раста корена зуба, зубне пулпе, и периодонталног ткива [6]. Показано је да зубна папила доприноси формирању корена, и да у последњим фазама развоја гради ткиво пулпе [7–9]. Након фазе звона у развоју зуба, зубна папила се позиционира апикалније од пулног ткива. Развој корена почиње када епителне ћелије из предела врата зуба пролиферишу апикално, а затим утичу на усмеравање мезенхималих матичних ћелија зубне папиле ка примарним одонтобластима и мезенхим фоликула ка цементобластима [7]. Двослојна епителна структура, Хертвигова овојница, такође мигрира апикално и учествује у формирању корена. Морфолошки, Хертвигова овојница представља дупликатуру зубне папиле и зубног фоликула. Током развоја корена, дупликатура учествује у биоминерализацији (стварању дентина и цемента) и индукцији организације грађе корена [10, 11]. Такође, дупликатура је одговорна за облик корена и формирање цемента путем епително-мезенхималне транзиције.

Ткиво локализовано у пределу врха корена младог сталног зуба недавно је описано и названо апикална папила (Слика 2) [12]. Апикална папила заправо представља апикални део некадашње денталне папиле - мезенхималног дела ткива који је укључен у епително-мезенхималну интеракцију током формирања зуба. Апикална папила се уочава на врху корена зуба након што је завршено формирање прве две трећине корена. На хистолошком пресеку апикалног дела зуба са незавршеним растом корена описује се зона богата ћелијама (епителна дијафрагма) уткана између ткива пулпе и апикалне папиле. Ткиво апикалне папиле се налази апикалније од зоне богате ћелијама којом је раздвојена од пулпе зуба [12]. Иако у блиском контакту, у случају некрозе ткива пулпе, апикална папила показује отпорност и способност очувања виталитета, највише захваљујући доступној колатералној циркулацији из околине [13, 14]. Ткиво апикалне папиле лабаво је везано за врх корена зуба и лако се одваја. И поред бројних сазнања улога апикалне папиле у развоју корена још увек није потпуно истражена. Хистолошка анализа је показала да се ткиво апикалне папиле јасно разликује од ткива пулпе, и да садржи матичне ћелије са јединственим потенцијалом [12]. Матичне/прогениторне ћелије

се налазе и у зубној пулпи и у апикалној папили, али се њихове карактеристике до одређеног степена разликују [12, 15]. Густина васкуларне мреже у апикалној папили је слабија у односу на пулпу, што чини прогениторне ћелије у апикалној папили знатно хомогенијим по саставу и пореклу.



Слика 2. Ткиво апикалне папиле. (А) Хистолошки пресек предела врха корена (слој одонтобласта - црне стрелице, зона богата ћелијама - беле стрелице). (Б) Увећана зона уоквиреног дела претходне слике. Модификовано и преузето из рада *Huang* и сар. [13]

Досадашња истраживања потврђују хипотезу да матичне ћелије пореклом из апикалне папиле (*SCAP - stem cells from apical papilla*, енг.) представљају извор из кога настају примарни одонтобласти који граде примарни дентин корена, док су матичне ћелије пулпе зуба највероватније извор секундарних одонтобласта [12]. Услед апикалнијег положаја у односу на остала ткива развојног органа корена зуба, и постојања колатералне циркулације из суседних ткива, потенцијал очувања виталитета ткива апикалне папиле током запаљења пулпе младих сталних зуба је висок [13]. Пилот истраживање у *in vivo* условима на животињском моделу је спроведено у циљу проналажења улоге апикалне папиле у развоју корена [15]. Показано је да хируршко уклањање апикалне папиле у раним фазама развоја доводи до заустављања раста и развоја корена упркос постојању потпуно нетакнутог пулног ткива. Остаје још увек питање да ли до заустављања развоја корена долази због уклањања ткива апикалне папиле или услед оштећења Хертвигове дупликатуре која се налази у непосредној близини [13].

Биологија матичних ћелија постала је важан део поља истраживања у вези са регенерацијом ткива. Матичне ћелије се одликују способношћу самообнављања и усмеравања ка зрелој ћелији. У првим *in vitro* истраживањима седамдесетих година

19. века су описане као ћелије сличне фибробластима [16]. Затим су 1976. године испитиване ћелије описане као фибробласти са високим потенцијалом за стварање колонија, које су имале способност диференцијације ка остеобластима [17]. Наредна истраживања показала су способност циљаних ћелија за усмеравање ка остеогеној, хондрогеној и адипогеној ћелијској линији, услед деловања одређених биохемијских сигнала [18, 19]. Данас је познато да су ткива усне дупље добар извор мезенхималних матичних ћелија [20]. Најновија истраживањима у области ендодонције користе *SCAP* ћелије као најпогодније за испитивање биокомпатибилности терапијских средстава примењених у ендодонтском лечењу [21, 22]. Показано је да *SCAP* ћелије стимулисане индуктивним медијумима сазревају у остео/одонтобласте, адипоците, хондробласте и неуронима сличне ћелије [12, 15]. У поређењу са матичним ћелијама коштане сржи показана је квалитетнија остеогенеза при усмеравању *SCAP* ћелија [12, 23], што указује да *SCAP* ћелије представљају ћелије избора у студијама које истражују биоактивни потенцијал биоматеријала, лекова и средстава у медицини и стоматологији [24]. Додатну предност представља и релативно лака доступност ткива апикалне папиле из зуба индикованих за вађење, најчешће из ортодонтских разлога (умњаци, преткутњаци), у односу на значајно инвазивнију изолацију ткива коштане сржи.

Студије које говоре у прилог завршетка раста корена у случају некрозе пулпе, чак и након развоја периапикалне лезије, додатно истичу отпорност *SCAP* ћелија на инфекцију [25, 26]. Промена микроуслова средине, као што је случај у настанку и развоју дентогене инфекције, утичу на потенцијал минерализације *SCAP* ћелија. Показано је да при излагању *SCAP* ћелија високим концентрацијама липополисахарида изолованих из мембране бактерије *Porphyromonas gingivalis* потенцијал остеогеног усмеравања расте, док при нижим концентрацијама овог молекула нема промена у виду ћелијског умножавања, вијабилности и остеогеног усмеравања [27]. Ова појава може објаснити налазе из *in vivo* студија које показују најчешће развој кости-сличним или цементу-сличним ткивима на површини корена младих сталних зуба, у односу на жељено дентину-слично ткиво [28]. Чини се да се, иако *SCAP* ћелије имају способност преживљавања у условима инфекције, природа усмеравања ових ћелија мења, а тиме и ткиво које настаје сазревањем [29]. Присуство бактеријског биофилма, које се механичко-хемијским путем тешко

уклања у потпуности током ендодонтског лечења, неповољно утиче на потенцијал остео/одонтогеног усмеравања *SCAP* ћелија. Даља истраживања треба усмерити на проналажење адекватних и ефикасних антибактеријских средства уз истовремено испитивање утицаја тих средстава на биологију матичних ћелија [30].

## 1.2. Ендодонтско лечење сталних зуба

Ендодонтски третман зуба са дијагнозом запаљења пулпе представља профилактички третман у смислу заустављања инфекције и онемогућавања ширења бактерија у коренски систем зуба [31]. Са друге стране, у случају инфициране некротичне пулпе корена зуба или зуба у којима се већ развила периапикална инфекција, долази до ширења бактерија у сложени систем канала у корену зуба и ендодонтско лечење мора бити усмерено на елиминацију бактерија [32, 33]. Успех лечења зависи од ефикасности уклањања микроорганизама (МО) из главног коренског канала, рамификација, апексне делте и дентинских каналића [34]. Утицај заосталих МО након обраде канала корена на исход лечења представља важно питање у области ендодонције, јер је показано да су бактерије главни чиниоци упорних инфекција и настанка периапикалних лезија [34–38]. Исход лечења зависи од присуства бактерија у каналу корена непосредно пре оптурације канала [39, 40]. Заостале бактерије у каналу корена често остају вијабилне након оптурације, и касније доводе до поновног развоја инфекције. Из свега наведеног је произашао концепт по коме крајњи циљ ендодонтског лечења треба да буде потпуно уклањање МО из каналног система корена зуба [41].

Одређен број МО који је способан да доведе до оштећења ткива на месту деловања, или покретања имунолошког одговора домаћина и последично развоја запаљенске реакције, неопходан је услов да би бактерије могле да развију обољење у организму [42]. Пре достизања критичног броја МО (праг, кворум) клинички знаци и симптоми болести нису уочљиви. Познато је да је број бактерија неопходан за развој болести супротно пропорционалан њиховој вирулентности. Како су инфекције у ендодонцији узроковане мешовитом популацијом од око 10 до 20 врста бактерија са различитим степеном вируленције, није могуће одредити гранични број МО неопходан за изазивање обољења [41]. Отпорност домаћина на настанак обољења је још један важан чинилац у патогенези болести. Присуство истих

бактерија у једнаком броју може изазвати различите одговоре у организму зависно од имунолошког одговора домаћина. Уколико се има у виду утицај броја бактерија на настанак обољења, јасан је значај успешног антибактеријског лечења канала корена зуба на исход терапије. Идеално, процедуре током ендодонтског лечења требало би да доведу до потпуног обескличавања канала корена зуба [41]. Међутим, услед сложености грађе коренског система доступним инструментима, средствима, и техникама обраде канала, потпуно обескличење канала је готово немогуће постићи. Стога је реални циљ лечења умањити популацију МО испод нивоа који је неопходан да би изазвао инфекцију или одржао обољење [41]. Свакако, изазов постоји у дефинисању толеранције нивоа МО за постизање излечења и зарастања.

Квантификација МО ланчаном полимеразом умножавања гена у реалном времену (*qPCR*) или флуоресцентном *in situ* хибридизацијом помоћу универзалних прајмера данас су две најпоузданије методе за квантификацију МО [43, 44]. Међутим, још увек не постоје лонгитудиналне студије у којима су МО детектовани наведеним методама, а пацијенти затим клинички испраћени у значајном временском интервалу. Стога се препоручује комплементарна примена поуздане методе класичног засејавања узорака на хранљиве подлоге уз квантификацију формираних бактеријских колонија (CFU/ml), и истовремену примену наведених савремених метода. Претходно је показано да присуство вијабилних бактерија у каналима коренова непосредно пре оптурације говори у прилог лоше прогнозе и неповољног исхода лечења [39, 40]. Како је потпуно уклањање МО из каналног система још увек тешко спровести, сматра се да је редукција МО задовољавајућа уколико је испод нивоа неопходног да се оне идентификују култивацијом (од 1000 до 10 000 бактеријских ћелија у каналу). Поуздане анаеробне методе култивације нису доступне у свакодневној пракси, па је ослањање на најновије податке из литературе и спровођење квалитетних клиничких студија неопходно, како би протоколи у лечењу канала корена били у складу са савременим сазнањима [41].

Етиологија развоја периапикалних лезија је полимикробна, а бактеријска популација се значајно разликује од од особе до особе [45, 46]. Разлике постају још значајније уколико се упоређују налази између различитих популационих група [45, 47]. Услед наведених одлика ендодонтских инфекција, стратегија обескличења канала треба да буде усмерена на примену неспецифичних средстава са широким



спектром дејства на што више патогена. Бактерије локализоване у каналном систему зуба нису доступне ћелијама имунолошког система домаћина нити је омогућено системско дејство антибиотика. Стога је једини доступни начин деловања на узрочнике инфекције директно, путем механичке обраде канала и применом хемијских средстава са широким антибактеријским дејством [41]. Хемијско-механичка обрада канала је од изузетне важности и примарно делује на садржај у централном каналу, односно на смањење великог броја МО. Механичким дејством инструмената уклања се некротично ткиво, бактерије, као и распадни продукти ткива и МО. Средства за испирање канала са антимикробним дејством хемијски делују на МО и додатно механички уклањају МО и распадне продукте из канала корена. Бактерије заостале у апикалном делу корена, апикалној делти, и бочним каналима могу узроковати дуготрајне, хроничне инфекције. Како су ове бактерије у директном контакту са периапикалним ткивом, имају стално доступан извор хранљивих материја, што им омогућава одржавање инфекције и спречавање опоравка и зарастања ткива. Чињеница да зуби са позитивним налазом при култивацији бактерија имају значајно лошију прогнозу [34, 35, 39] указују да заробљавање преосталих МО материјалима за дефинитивну оптурацију не представља идеално терапијско решење, посебно када је количина присутних бактерија у главном каналу довољна за позитивну детекцију. Показано је да адекватна оптурација има ограничен утицај на успешност лечења [48]. Стога, даљи напори треба да буду усмерени ка потпуном уклањању МО из канала корена. Иако је утврђено да присуство заосталих бактерија условљава неповољан исход, до данас није идентификована једна одређена врста бактерија као фактор ризика. Ови налази су комплементарни са неспецифичном природом етиологије периапикалних лезија, и сугеришу да је настанак хроничних периапикалних лезија (ХАП) више везан за укупан број заосталих МО у каналу, у односу на присуство и број једне одређене врсте. Будући огледи у овом пољу истраживања треба да покажу да ли одређене врсте МО представљају етиолошки фактор за настанак ХАП [41].

Клиничка истраживања описују три тачке током лечења зуба када се може испитивати присуство микроорганизама у каналу корена: 1. након инструментације канала (брис непосредно након хемијско-механичких процедура), 2. након интерсеансне медијације (брис непосредно након уклањања интерсеанских

лекова), и 3. након оптурације (брис из зуба неколико месеци или година од примарног лечења) [41]. Испитивања присуства бактерија након хемијско-механичке обраде канала и интерсеансног лечења за циљ имају дефинисање потентности и утицаја заосталих бактерија на исход лечења. Бактерије детектоване непосредно након хемијско-механичке инструментације указују на потенцијалну резистенцију на средства за иницијално обескличење канала. Током хемијско-механичке обраде канала МО немају довољно времена за адаптацију на новонастале услове након обраде канала. Потенцијал заосталих МО ка адаптацији у промењеним условима средине након иницијалних фаза ендодонтског лечења одредиће дугорочни утицај детектованих бактерија на исход лечења. Примена антибактеријских средстава за интерсеансно лечење треба да обезбеди елиминацију заосталих МО. Бактерије детектоване након примене интерсеансних лекова показују отпорност и на хемијско-механичку обраду канала и примењене лекове, уз услов да појава МО у каналу није настала услед неадекватне привремене оптурације зуба између посета. Такође, МО које су детектоване након интерсеансног лечења показују да имају већу могућност адаптације на новонастале услове средине током лечења [41]. Студије које испитују присуство МО након завршетка лечења и развоја секундарне инфекције дефинишу бактерије које доводе до поновне инфекције и развоја секундарних запаљења. Бактерије узрочници ХАП се могу примарно налазити у каналу корена након завршеног примарног лечења или накнадно доспети у периапикални простор.

Да би се МО одржали у каналу након третмана и били детектовани у узорку након оптурације, морају бити резистентни на дезинфекционе процедуре и имати могућност адаптације на драстично промењене услове средине током лечења. До данас је описано неколико стратегија у понашању МО које доприносе њиховом одржању. МО се могу везати за зидове канала корена, размножити се и формирати организоване заједнице унутар биофилма [49]. Бактерије у рамификацијама, сужењима, и осталим ирегуларним анатомским просторима канала често преживљавају процес инструментације и иригације [50]. Бактерије у дентинским каналићима у великом проценту остају нетакнуте након хемијско-механичке обраде и интерсеансног лечења, уз тренд успешнијег обескличења дубљих слојева дентина уз примену новијих технологија [51, 52].

Неодговарајуће антибактеријско дејство раствора и лекова може бити последица њихове инактивације дентином, ткивним течностима, и органским материјама [53]. Неке бактеријске врсте, као што су *Enterococcus faecalis* и *Candida albicans*, показале су отпорност на калцијум-хидроксид [54, 55]. Адаптација је наредни важан корак у бактеријској перзистентној инфекцији. Током третмана МО губе извор хранљивих материја. Иако се већина некротичног ткива пулпе уклања током хемијско-механичке обраде канала, заостали делови ткива у рамификацијама, сужењима, бочним каналима могу послужити као извор хране МО. Чак и у главном каналу поједине површине зидова канала могу остати необрађене [56–58]. Заостало ткиво пулпе може послужити као привремени извор хране, док се стални извор хране за бактерије јавља уколико настане коронарно и апикално цурења након дефинитивне оптурације.

### **1.2.1. Анатомија каналног система корена сталних зуба**

Бочни канали и апикална делта се формирају у последњој фази развоја корена када остаци епителног покривача корена заостану у централном каналу. Такође, дентиногенеза заобилази мале крвне судове између денталне папиле и пулпе, те долази до стварања канала испуњених крвним судовима, а понекад и нервним завршецима. Одвајање мањих од централног канала се може уочити кроз читаву дужину корена. Рамификације се срећу у око три четвртине зуба. Иако се најчешће налазе у апикалној трећини корена, у 11% случајева описани су у средњој, и у 15% случајева у коронарној трећини [59]. У појам рамификације убрајају се грањања канала, бочни канали и апикална делта каналића. Рамификације представљају потенцијални пут МО и њихових продуката од централног канала до периодонталног ткива, и обрнуто, из пародонталних џепова до пулпног ткива. Бочни канали и апикална делта су тешко доступни инструментима за обраду канала, средствима за дезинфекцију и медикацију, и материјалима за дефинитивну оптурацију. Због анатомских карактеристика, инструментима је готово немогуће прићи у бочне просторе, док се хемијска средства за обескличавање канала брзо деактивишу у контакту са органским ткивом [41, 60, 61]. Истраживања су показала утицај постојања бочних канала и апикалних рамификација на неуспех ендодонтске терапије, уколико одговарајући број МО насељава ове анатомске структуре и имају

приступ перирадикуларном ткиву [60–62]. Стога, у случају некрозе пулпе и постојања периапикалног запаљења, циљ ендодонтске обраде треба да буде обескличење дубоких структура дентина, бочних канала и апикалне делте. Уз стандардну ендодонтску терапију овај циљ је тешко постићи. Уколико дође до некрозе пулпе у централном каналу, ткиво у бочним каналима и рамификацијама постаје делимично или потпуно некротично. Такође, колоније МО се делимично налазе у овим просторима, окружене ткивом у запаљењу или некрози. У даљем напредовању инфекције, МО потпуно испуњавају бочне просторе корена и формирају зрео биофилм [63]. Хемијско-механичком обрадом канала делимично се уклања некротично ткиво из бочних простора, обично у пределу споја са централним каналом, док преостали део ткива остаје. У случају хроничних, дуготрајних инфекција зуба сложене грађе коренског система, некротично ткиво и МО у бочним просторима остају нетакнути током лечења.

Пасте за дефинитивно пуњење канала делимично улазе у акцесорне канале и могу допринети антимикуробном дејству терапије. Међутим, антибактеријско дејство пасте обично траје само током времена везивања [64–66], док је предвидљивост уласка пасте у све бочне канале и рамификације веома дискутабилно. Када је испитиван садржај у бочним каналима код зуба након ендодонтског лечења, хистолошки налази су потврдили да заостало запаљенско и некротично ткиво остаје у бочним просторима готово нетакнуто ендодонтским лечењем, чак и код зуба који годинама након лечења нису показивали знаке и симптоме обољења [41, 50]. Заостало ткиво обично је у контакту са пастама за дефинитивну оптурацију у близини споја бочног канала са главним каналом корена. У случају поновних инфекција након ендодонтског лечења, бочни простори су потврђени хистолошким налазима након апикотомије или вађења зуба, иако нису били детектовани радиографски током лечења [34]. У овим случајевима бактерије су испуњавале готово читав садржај канала. Бактерије су понекад формирале биофилм на зидовима рамификација и увек су биле повезане са запаљењем у периодонталном простору у пределу отвора каналића на спољашњој површини корена. На основу наведених запажања може се закључити да постоји позитиван однос инфицираних бочних простора корена и неуспешног ендодонтског лечења [63].

### 1.2.2. Бактеријске врсте резистентне на стандардну ендодонтску терапију

Основни задатак ендодонтског лечења је уклањање патолошки промењеног ткива, обескличење канала корена и обезбеђивање херметичке оптурације, јер је и поред увођења нових технологија у ендодонтско лечење, заостајање појединих МО у сложену систему канала корена неизбежно [63]. Факултативни анаероби и Грам позитивне бактерије чине полимикробну, хетерогену групу МО која је често изолована из канала коренова након неуспешног ендодонтског лечења [67]. Бактерије које заостају у каналу корена, посебно врсте *Enterococcus* и *Streptococcus*, често се сматрају главним узрочницима неуспешног ендодонтског лечења и појаве реинфекције [68]. Утврђено је да *E. faecalis* поседује способност везивања за влакна колагена из дентинског матрикса и да у том стању може да преживи наредних 12 месеци без присуства супстрата [68].

Неколико студија је истраживало утицај заосталих бактерија у каналу на исход лечења, али нису са сигурношћу утврђене врсте које константно узрокују неуспех лечења [41]. У студијама које истражују успешност интраканалних процедура саветује се идентификација бактеријских врста у свим фазама лечења. Студије које осим броја МО детектују и присуство специфичних врста МО пружају више података о утицају МО на исход лечења [69]. Перзистентне бактерије су или резистентне на медијацију или не долазе у контакт са антибактеријским средствима. Од раније је познато да је број МО увек значајно умањен након адекватне обраде канала корена и интерсеансне медијације. Са друге стране, путем култивације виталних бактерија из канала, уочава се присуство од 1 до 5 врста МО [41]. До данас није описана једна одређена врста која увек заостаје као перзистентна пре оптурације. Грам негативне бактерије, чести узрочници примарних инфекција, обично се уклањају стандардном терапијом. Описано је присуство само појединих анаеробних врста, као што су *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* и врста *Prevotella*, у узорцима након инструментације [41, 70, 71]. Грам позитивне бактерије много чешће заостају у каналу након стандардне терапије [72]. Грам позитивни факултативни анаероби, стрептококе (*S. mitis*, *S. vestibularis*, *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *S. oralis*), *Parvimonas micra*, врсте *Actinomyces* и *Propionibacterium*, лактобацили и *E. faecalis* се често налазе у каналу након стандардне обраде [41, 70, 73, 74]. Ови подаци говоре у прилог способности Грам

позитивних бактерија да се лакше адаптирају на новонастале услове и развију резистенцију на стандардну терапију.

Новије студије указују да резистентни сојеви бактерија често припадају врстама које је тешко детектовати путем култивације [73, 75–77], за разлику од савремених молекуларних метода које пружају могућност детекције било које бактеријске врсте. Применом молекуларно биолошких метода и детекцијом универзалне бактеријске секвенце 16S *rDNK* гена, описано је да 56% сојева нађених у иницијалном узорку припада бактеријама које је готово немогуће идентификовати култивацијом [41]. Идентификација МО молекуларним методама показала је да је просечно 11 врста присутно у иницијалним узорцима, 4 врсте након инструментације и 5 врста након медијације [74]. *Streptococcus* врста је детектована у свим узорцима након третмана, док је око 40% врста из узорака након третмана припадало бактеријама које се тешко или никако не узгајају на подлогама. Ови налази указују на могућност да претходно недетектоване бактерије такође учествују у етиологији упорних и секундарних ендодонтских инфекција [41]. Иако је до сада детектовано око 100 врста/филотипова у узорцима након третмана, при чему Грам позитивне бактерије доминирају у налазу, потребне су нове, лонгитудиналне студије да би се показало да ли одређена врста има доминантни утицај на настанак упорних ендодонтских инфекција.

### **1.3. Ендодонтско лечење младих сталних зуба**

Млади стални зуби су у већем ризику за настанак некрозе пулпе услед склоности ка повредама зуба [78, 79] и развојним аномалијама [80, 81]. Уколико дође до обољења пулпе младих сталних зуба, традиционално лечење поразумева процедуре апексификације дуготрајном применом калцијум-хидроксида [82] или раним постављањем минералног триоксидног агрегата (МТА) у апикалном делу корена [83, 84]. У лечењу младих сталних зуба, као и у стандардној ендодонтској терапији, контрола инфекције је важан корак у обезбеђивању повољног терапијског исхода. Величина инструментације младих сталних зуба зависи од стадијума развоја корена, односно што је корен у ранијем стадијуму то је инструментација минималнија, те готово и да изостаје у почетном стадијуму [85]. Како је инструментација канала умањена или изостаје, примена средстава за обескличење

канала корена и дуготрајно антимикробно дејство материјала за трајну оптурацију имају доминантну улогу у стварању повољних услова за излечење и зарастање [86].

Насељавање бактерија у каналном систему корена доводи до стварања биофилма на зидовима канала, у анатомским сужењима, дентинским каналићима и у суседном периапикалном простору. Бактерије у биофилму су отпорније на дезинфекционе процедуре услед мање пропустљивости матрикса биофилма за дезинфекционе растворе и антибиотике. Већина МО у биофилму нису у фази активног умножавања, већ функционишу као целина у одржавању метаболизма, репликације појединих бактерија и одстрањења распаднутих продуката МО [86]. Бактерије су ситније у дијаметру од дентинских каналића, посебно на унутрашњем, пулпном крају каналића, те продиру дубоко у дентинске каналиће зуба са развијеном инфекцијом [87, 88]. У овом простору оне су заштићене од антибактеријског дејства раствора за испирање канала и интерсеанских паста на бази калцијум-хидроксида и антибиотика. Такође, показано је да је код младих сталних зуба бактеријско насељавање присутно у више дентинских каналића и на већој дубини у односу на зубе код одраслих пацијената [89]. Ово се може објаснити ширим дентинским каналићима код младих пацијената јер се депозиција секундарног дентина у каналићима одвија поступно током живота. Из претходно наведених чињеница проистиче потреба за потпуним обескличењем канала корена и акцесорних простора у ендодонтском лечењу младих сталних зуба. Присуство МО у овим условима се не може сматрати прихватљивим, услед велике могућности умножавања присутних МО и поновног развоја инфекције [86]. Асептични услови у каналном простору морају се одржати у дужем временском периоду, што последично подразумева да читав канални систем треба обескличити, како не би дошло до накнадне миграције МО из дентинских каналића и бочних простора.

Пре примене процедура дефинисаних у регенеративној ендодонтској терапији, као што је формирање крвног угрушка, примена фактора раста и носача са матичним ћелијама, пулпни простор и дентинске зидове треба адекватно обескличити како би се омогућила и стимулисала регенерација [86]. Захтевани ниво обескличења канала младих сталних зуба виши је него у стандардној ендодонтској терапији. Такође, стандардна средства за обраду и обескличење канала могу деловати на дентин, променити његова својства и умањити потенцијал за

регенерацију и даље форирање дентинских зидова [90, 91]. Неспецифични антимикробни раствори делују супресивно на велики број МО, али истовремено употреба ових раствора може омогућити резистентним и вирулентним врстама МО да превладају и населе пулпни простор [86]. Стога је неопходно применити молекуларне методе детекције МО како би се што прецизније детектовале све врсте МО. Такође, неопходно је утврдити најефикаснији протокол за обескличење каналног простора, са што мањим негативним утицајем на преостали дентин и периапикално ткиво. Различити протоколи који се тренутно испитују укључују локалну примену антибиотика, и нових супстанци које су претходно показале ефикасно дејство ка оралним патогенима [86, 92].

Показано је да уколико је бактеријска инфекција захватила ткиво пулпе пре почетка лечења, што се огледа у некрози пулпе и развоју периапикалних лезија, дуготрајни исход након ендодонтског лечења је умањен за 15 - 20% у односу на ендодонтске третмане у којима је пулпно ткиво било још увек витално и МО нису населили коренски део пулпе [93, 94]. Имајући у виду сложеност и дуготрајност ендодонтског лечења младих сталних зуба, дугорочна прогноза за ендодонтски лечене младе сталне зубе је још неповољнија [86]. Инструментација канала, обескличење и могућности успешне оптурације канала су технички теже за извођење. Важна чињеница је и да зидови коренова остају слаби и подложни прелому током функције, док дугорочна успешност лечења износи између 28 - 77% зависно од стадијума развоја корена у тренутку обољења пулпе [86]. Слабост зидова корена може бити последица дуготрајне примене калцијум-хидроксида, или је повезана са природно слабијом структуром дентина и цемента корена у развоју [86, 95]. Дуготрајна интерсеансна примена калцијум-хидроксида у новије време замењена је применом цемента на бази калцијум-силиката и раније дефинитивне оптурације зуба [96]. *Matsuo* и сар. [97] су у истраживању ендодонтског лечења младих сталних зуба, након две и по године од оптурације врха корена МТА цментом показали успешност лечења од 100% код зуба са виталном пулпом, док је код зуба са већ развијеним периапикалним лезијама забележена успешност од 78%, што наводи на закључак да је главни прогностички фактор био степен развоја инфекције у каналном систему корена.



### 1.3.1. Недостаци традиционалних неспецифичних дезинфекционих средстава у ендодонцији

На тржишту постоје различита средства са антибактеријским дејством, али је данас натријум-хипохлорит (*NaOCl*) најзаступљеније средство за испирање током ендодонтске обраде канала корена [98]. Повољна својства као што су одлично антибактеријско дејство [99] и способност разлагања органског ткива [100] чине га незаменљивим средством у ендодонтском лечењу. Ипак, неколико клиничких студија је показало да више концентрације *NaOCl*-а не доприносе побољшању антибактеријског дејства у клиничким условима [72, 98, 99, 101]. Мала запремина присутног *NaOCl* у каналу и немогућност проласка у бочне просторе и дентинске каналиће доприносе неефикасности у сложеном каналном систему. Студије су показале да применом *NaOCl* уз механичку обраду, 40 - 60% канала и даље остаје позитивно на присуство вијабилних култивишућих МО независно од примењене концентрације [39, 101, 102]. *NaOCl* је средство које се препоручује за хемијско-механичку обраду и током лечења младих сталних зуба [103]. Примена у регенеративној терапији покреће питања о нежељеним дејствима, јер је *NaOCl* веома нестабилан молекул, има краткорочно дејство у простору канала корена и не учествује у дуготрајном одржавању асептичних услова [86]. Претходно је описано негативно дејство *NaOCl* на везивање матичних и прогениторних ћелија и апозицију новоствореног ткива на дентинској површини [91], док услед израженог органолитичког дејства доводи до денатурације важних протеина дентинског матрикса који промовишу регенерацију ткива [90]. Такође, значајна токсичност према матичним и прогениторним ћелијама у апикалном простору корена сматра се изузетно неповољним својством [104]. Код младих сталних зуба повећан је и ризик од пребацивања раствора преко врха корена и директног излагања периапикалног ткива цитотоксичном дејству *NaOCl*. Све наведено говори у прилог иницијалној примени *NaOCl* у терапији како би се искористила добра антимикробна и органолитичка својства у уклањању некротичног пулпног ткива, МО и њихових распадних продуката, док касније треба применити средства која ће подстаћи зарастање и регенерацију. Са биолошке тачке гледишта, при обради и обескличењу канала младих сталних зуба неопходна је минимална механичка

обрада зидова, праћена најнижом бактерицидном концентрацијом *NaOCl* (0,5%), како би се уклонио биофилм и некротично ткиво пулпе [104].

Хлорхексидин је предложен као замена и допуна примени *NaOCl*-а, али студије показују да је антибактеријско дејство слично или нешто слабије од *NaOCl*-а [99, 105]. У ендодонцији се примењују раствор хлорхексидина у концентрацији од 2% за бактерицидно и 0.12% за бактериостатско дејство. Клиничке студије су показале да најефикасније делује када се користи као додаток уз основну примену нижих концентрација *NaOCl* [105, 106]. Међутим, ни хлорхексидин не доприноси потпуном обескличењу канала, ни у облику раствора за испирање током обраде, ни као интерсеансни медикамент [54, 99]. Такође, може утицати негативно на везивање ћелија за дентинску површину [91].

Услед могућности да заостале бактерије утичу неповољно на исход лечења, примењује се интерсеансна медикација како би се антибактеријско дејство одржало и између две сеансе. Као додатно антибактеријско средство најчешће се примењује интраканална медикација пастом калцијум-хидроксида [102, 106–108]. Пасте на бази калцијум-хидроксида се често користе у интерсеансној медикацији како би дошло до обескличења бочних простора. Међутим, студије показују да и калцијум-хидроксид има ограничено дејство на садржај у каналном систему корена [51, 52, 108]. Дејство је умањено услед ниске растворљивости, као и инактивације од стране дентина, ткивних течности и органских материја. Сви наведени фактори утичу на снижавање *pH* вредности калцијум-хидроксида, а тиме и умањење његовог антимикубног дејства [53, 109].

Локална примена антибиотика у ендодонтском лечењу се изучава и примењује дужи временски период. Широки спектар деловања постигнут синергистичким дејством три антибиотика у облику пасте се показао као ефикасан ка МО у каналу корена [105]. Трострука антибиотска паста која се састоји од ципрофлоксацина, миноциклина и метронидазола показала је успешно антимикубно дејство у каналу корена [108]. Иако је проценат успешности обескличења значајан, постоје мишљења да резултате треба критички посматрати јер је могуће да антибиотици заустављају репликацију МО, док бактерије задржавају вијабилност. Такође, антибиотска паста остаје активна и у брису узетом из канала корена, па може деловати антимикубно током култивације узорака и дати лажно позитивне резултате антимикубног

дејства у каналу корена [86, 110]. Нежељено дејство антибиотских пасти огледа се у израженој цитотоксичности ка ћелијама апикалне папиле [21]. Такође, триантибиотска паста има ограничено дејство према одређеним патогенима ендодонтских инфекција. Избор антибиотика може бити условљен осетљивошћу организма домаћина, општим здравственим статусом пацијента и осетљивошћу МО који се не детектују стандардним методама култивације, док је стотине врста МО до данас идентификовано у инфицираним каналима корена зуба [41].

Из угла регенеративних процедура јасно је да свако средство треба узети са резервом како би се увидело антимикубно дејство, али и дејство на матичне ћелије, преостало ткиво дентина и ткиво домаћина посебно у пределу око врха корена. Као један од циљева дефинитивног пуњења канала корена наводи се заробљавање заосталих бактерија у акцесорним каналима средствима за дефинитивну оптурацију [31]. За дефинитивну оптурацију младих сталних зуба често се примењују средства на бази калцијум-силиката, након краћег или дужег интерсеансног лечења антибиотским пастама или калцијум-хидроксидом [97]. Тиме се омогућава продужено антибактеријско дејство након дефинитивне оптурације и обезбеђује базна средина у пределу врха корена зуба која делује подстицајно на нарастање и регенерацију ткива. У досадашњим студијама примена МТА у лечењу младих сталних зуба показала је сличну успешност лечења као и традиционална дуготрајна примена калцијум-хидроксида, уз тренд бољих резултата током дугогодишњег клиничког праћења пацијената [83, 84, 96].

### **1.3.2. Даље поље истраживања контроле ендодонтске инфекције**

Како стандардно обескличење канала корена има ограничено дејство у контроли инфекције, јавила се потреба за додатним протоколом у ендодонтском лечењу младих сталних зуба. Нове технологије усмерене на обескличење бочних простора и дентинских каналића отварају нове могућности допуне протокола ендодонтског лечења [52, 111, 112]. Могућност комбинације традиционалних средстава и нових технологија како би се синергистичким дејством постигли задовољавајући резултати представља широко поље данашњих истраживања. Препоручује се ограничена примена традиционалних средстава због могућег цитотоксичног дејства, ометања везивања матичних ћелија за дентинску површину

и ослобађања фактора раста из дентинског матрикса. Избор додатних процедура се заснива на антимикуробној ефикасности, али и на минималном оштећењу матичних ћелија и фактора раста, како би се створили повољни услови за наставак раста и развоја корена зуба и регенерације периапикалног ткива [86, 113].

### 1.3.2.1. Примена ласера у ендодонтском лечењу

Реч ласер (*LASER - Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, енг.) означава акроним за амплификацију светла путем стимулисане емисије зрачења. Ласери су класификовани према активном медијуму који се користи за стварање енергије. Унутар ласера, активни медијум је стимулисан за стварање фотона енергије који се затим усмеравају у зрак дефинисане таласне дужине из спектра светлости [114]. Развој и примена ласера у медицини почела је шездесетих година прошлог века, првенствено у офтамологији и дерматологији. Први ласер у стоматологији примењен је 1971. године у ендодозији [115]. Зависно од таласне дужине ласера, одређена је примена ласера у различитим областима стоматологије. Дејство ласера на биолошка ткива зависи од више чинилаца [116]. На дејство ласера утичу: таласна дужина (дефинише ниво апсорпције ласера у ткиву), начин рада (континуирани или пулсни), испоручена енергија ( $W/cm^2$ ), време деловања, метода примене (контакт/одсуство контакта са ткивом, фокусиран или распршен зрак), медијум који окружује ткиво (ваздух, вода или крв), као и својство и састав ткива, присуство пигмената, коефицијент апсорпције и коефицијент преноса топлоте ткива. Најважнија интеракција између ласера и ткива је апсорпција ласерског зрака. Такође, ласерски зрак може бити одбијен од површине ткива (рефлексија), док део зрака може непромењено проћи кроз ткиво (трансмисија). Након уласка у ткиво поред трансмисије може доћи и до дифузије зрака кроз ткиво. Наведени феномени се често дешавају у одређеном проценту при деловању ласера [116]. Таласна дужина ласера је главни фактор који одређује место апсорпције зрака у ткиву на које делује, чиме се одређује природа интеракције ласерског зрака и ткива. Биолошка ткива се разликују по афинитету ка таласним дужинама ласера, зависно од присуства хромофора или ткивних елемената који су способни да апсорбују ласерски зрак [114, 117]. Орална ткива, мека и чврста, имају специфични афинитет ка апсорпцији енергије ласера одређених таласних дужина. Примарно дејство

диодних ласера велике снаге унутар ткива је фототермално [117]. Када се температура ткива које у себи садржи воду подигне изнад 100 °C долази до испаравања воде, што за резултат има аблацију самог ткива. Како мека ткива у себи садрже воду у великом проценту, овим механизмом могућа је ексцизија ткива. Параметри рада ласера утичу на њихову клиничку примену. Са друге стране, концентрација ткивних хромофора осетљивих на таласну дужину ласера значајно утиче на крајњи ефекат [117]. Диодни ласери, таласних дужина од 830 - 1064 nm, примењују се у више области стоматологије, са тенденцијом добрих резултата у постизању обескличења канала и дентина корена зуба [118, 119].

Једна од предности ласера у стоматологији, посебно у дечијој стоматологији, је селективна и прецизна интеракција са оболелим ткивом, или МО. Антимикробно дејство ласера на месту примене тако доприноси мањој употреби антибиотика и бољој деконтаминацији радног поља [117, 120, 121]. Бактерицидно дејство ласера велике снаге објашњава се на следећи начин: 1. директна апсорпција топлоте од стране бактерије, 2. загревање супстрата у ком се бактерија налази, и 3. оштећење светлом [122, 123]. Фототермално дејство ласера, које омогућава антимикробно дејство, може деловати потенцијално штетно на ткиво домаћина уколико пређе биолошки прихватљив праг загревања ткива. У ендодонцији се дејство загревања региструје на спољашњој површини корена зуба како би се пратио пренос топлоте на суседно ткиво периодонцијума и алвеоларне кости. Досадашња истраживања говоре у прилог доброг антибактеријског дејства ласера, посебно ка Грам позитивним микроорганизмима [124]. Показано је да диодни ласери велике снаге у *in vitro* условима делују бактерицидно у дубоким структурама дентинских зидова до 1 mm од пулног ка цементном зиду корена [125, 126]. Стога је препоручено даље испитивање примене ласера као додатног протокола за уклањање микроорганизама у каналу корена зуба. Ласерско светло делује на бактеријске ћелије директно, предајући им топлоту, и индиректно, загревајући околно чврсто зубно ткиво [127]. На овај начин је омогућено дејство ласера и у дубљим слојевима дентина. Услед показане потребе за применом диодних ласера у ендодонтској терапији, значајно је да се испита успешност ендодонтског лечења применом диодног ласера на младим сталним зубима, њихово антимикробно дејство, као и њихов утицај на *SCAP* ћелије.

Услед доброг антибактеријског потенцијала, предложена је употреба и фотодинамске терапије (*PDT - photodynamic therapy*, енг.), као додатак важећим протоколима ендодонтског лечења. Показано је да *PDT* може допринети обескличењу канала зуба као допуна конвенционалном лечењу [112, 128]. *PDT* се развија у медицини од седамдесетих година прошлог века, а последњих година велику пажњу задобија у различитим областима стоматологије. Дефинисана је као технологија која помоћу светла изазива инактивацију ћелија, микроорганизама или молекула. *PDT* се данас примењује у лечењу тумора, пародонталних обољења, оралних лезија и преканцероза, применом фотосензитивног агенса који се везује за циљано ткиво или ћелије [129]. Дејство *PDT* је засновано на интеракцији две компоненте, фотосензитивног агенса и ласерског светла диодног ласера мале снаге. При апликацији органског фотосензитивног агенса бактерије у главном коренском каналу, латералним каналима, сужењима и дентинским тубулима апсорбују агенс у својој цитоплазми. Затим, када се активира светло ласера ниске енергије, оно узрокује фотоактивацију фотосензитивног агенса, при чему се у присуству кисеоника стварају реактивни кисеоникови радикали у бактеријској ћелији. Након зрачења ласерским светлом дефинисане таласне дужине, фотосензитивни агенс везан за ћелије/ткива прелази из нижег енергетског стања (основно стање) у побуђено, високо енергетско стање. Молекули у побуђеном енергетском стању могу довести до стварања слободних радикала и јона. Реактивни слободни радикали, даље, делују на више места у бактеријској ћелији изазивајући оксидативни стрес и смрт МО [130]. Ове високореактивне супстанце могу довести до оксидације ћелијских елемената (плазма мембране, ДНК) и узроковати ћелијску смрт. Клинички, ове реакције се дефинишу као цитотоксичне и васкулотоксичне [131, 132].

Показано је да су и бактерије са веома развијеним механизмом поправке ДНК осетљиве на *PDT* [131]. Поред оштећења ДНК, *PDT* доводи до инактивације транспортног система, ензима ћелијске мембране, оксидације масти и других ефеката [133]. До данас су описана два механизма којима фотосензитивни агенс у високом енергетском стању реагује са биомолекулима. У првом типу механизма фотосензитивни агенс предаје или одузима електрон/водоник од молекула супстрата чиме се нарушава стабилност биомолекула и настају слободни радикали.

Слободни радикали брзо реагују са кисеоником чиме се стварају вискорективни кисеоникови радикали [134]. Други тип механизма подразумева реакцију побуђеног фотосензитивног агенса и кисеоника чиме настаје вицокорективни облик кисеоника ( $^1\text{O}_2$ ). Сматра се да други тип механизма доминира у антимикуробном дејству *PDT*. Оба механизма доводе до оштећења МО путем повећања концентрације вискорективних облика кисеоника и побуђеног фотосензитивног агенса у ћелији МО [134].

*PDT* је уведена у стоматологију као ново средство са антимикуробним дејством, са добрим резултатима у лечењу локализованих инфекција [112, 128, 133]. Показано је да *PDT* делује бактерицидно и на осетљиве, и на МО који су отпорни на стандардну антибиотску терапију. Поред тога, додатна предност јесте и то што вишеструка примена не утиче на развој резистенције МО [135]. Избор адекватног фотосензитивног агенса дефинише ефикасност терапије. Стога је важно одабрати агенс који није токсичан по ћелије домаћина, а да је високо апсортиван у региону на који очекујемо да делује ласерско светло. Идеалан агенс треба да има висок коефицијент апсорпције у делу спектра ласерског светла за екситацију, могућност достизања побуђеног стања енергије и адекватног преноса енергије на молекуле кисеоника, постизање високе концентрације молекула у побуђеном стању, довољно дуго полувреме остајања у побуђеном стању и високу фотостабилност [136]. Одабир фотосензитивног агенса и ласера из одређеног спектра зависни су један од другог. Већина агенаса је активисана светлом таласне дужине између 630 и 700 nm што даље одређује дубини проласка светла у ткиву. Светлост таласне дужине од 630 nm продире до 0,5 cm у ткиво, а таласна дужина од 700 nm пролази до 1,5 cm. Фенотијазини (толуидин плаво, метилен плаво) осетљиви су на светло из спектра таласне дужине од 620 - 700 nm [131]. Ласери мале снаге из пожељног спектра доводе до задовољавајућег бактерицидног дејства, те је закључено да нема потребе користити ласере велике снаге у *PDT* [133]. Још увек постоји недовољан број студија везан за примену *PDT* у ендодонтском лечењу. У студији *Fimple JL* и сар. [137] применом *PDT* са метилен плавим и ласером таласне дужине 665 nm деловано је бактерицидно у инфицираним каналима корена на *Actinomyces israelii*, *F. nucleatum*, *P. gingivalis* и *P. intermedia* уз показано смањење броја колонија за 80%. Досадашња истраживања говоре у прилог примени *PDT* као додатне терапије,

која делује бактерицидно на Грам позитивне врсте (као што је *E. faecalis*), а које су и означене као главни узрочници перзистентних и секундарних ендодонтских инфекција [129]. *PDT* примењена уз стандардну хемијско-механичку обраду канала корена делује антимикубно, посебно у случају развоја периапикалних лезија [138, 139]. Даље клиничке студије су потребне како би се испитао утицај *PDT* током ендодонтског лечења младих сталних зуба.

Као и при примени стандардних дезинфицијенаса, фотоактивна супстанца може доспети у периапикално ткиво и бити апсорбована од ћелија домаћина у одређеном степену. Током излагања ћелија светлости ласера, долази до екситације супстанце у бактеријским ћелијама, али и ћелијама домаћина које су је апсорбовале. Дејство метилен плавог и светла из видљивог, црвеног спектра, испитивано је на ћелијским културама хуманих фибробласта гингиве и остеобласта [130]. У зависности од концентрације метилен плавог и испоручене енергије ласера, након 24 сата уочена је блага цитотоксичност *PDT*, док је *NaOCl* као контролна група довела до потпуног одумирања ћелија. На основу показаних резултата закључено је да постоји терапеутски прозор при деловању *PDT* у коме долази до инактивисања бактеријских ћелија без негативног утицаја на вијабилност ћелија домаћина. У другој студији при дејству ласера велике снаге и *PDT* на хуманим фибробластима показано је да је вијабилност ћелија очувана, а при дејству ласера велике снаге описана је и пролиферација ћелија [140].

Антимикубно дејство средстава у ендодонтској терапији, почевши од примарне обраде до дефинитивне оптурације канала корена, утиче на крајњи исход лечења. У циљу унапређења терапије, неопходно је испитати биокомпатибилност нових технологија, као и њихово антимикубно дејство.

На основу свега наведеног, при примени *PDT* и диодног ласера велике снаге у ендодонтском лечењу младих сталних зуба важно је испитати њихов антимикубни ефекат, као и дејство *PDT* и диодног ласера велике снаге на *SCAP* ћелије. Антимикубни ефекат средстава за стандардно лечење канала корена, примена нових технологија (ласера), као и средстава у даљем ендодонтском лечењу све до дефинитивне оптурације канала значајно утиче на успешност лечења младих сталних зуба.



## ***2. Циљеви истраживања***

## 2.1. Радна хипотеза

Радна хипотеза је била да диодни ласер (940 nm) и *PDT*, као допуна стандардном протоколу ендодонтског лечења, доводе до успешнијег обескличења канала корена младих сталних зуба, и повољно утичу на усмеравање и сазревање матичних ћелија из апикалне папиле.

## 2.2. Циљеви истраживања

Циљ истраживања био је да се испита биокомпатибилност примене диодног ласера и фотодинамске терапије на матичним ћелијама из апикалне папиле зуба, као и антимикубно дејство традиционалних антимикубних средстава, ласера, и материјала за дефинитивну оптурацију канала корена у ендодонтском лечењу младих сталних зуба.

У складу са основним циљем истраживања постављени су циљеви за сваку фазу истраживања:

1. изолација и карактеризација матичних ћелија из ткива апикалне папиле зуба,
2. испитивање биокомпатибилности диодног ласера и фотодинамске терапије на ћелијама из ткива апикалне папиле зуба,
3. испитивање потенцијалног биостимулативног дејства диодног ласера и фотодинамске терапије на ћелијама из ткива апикалне папиле зуба,
4. испитивање успешности обескличења канала корена применом диодног ласера и фотодинамске терапије, у односу на стандардна антимикубна средства, методом култивације узорака на микробиолошким подлогама,
5. испитивање успешности обескличења канала корена применом диодног ласера и фотодинамске терапије, у односу на стандардна антимикубна средства и идентификација специфичних врста бактерија из узорака молекуларно-генетичким методама,
6. праћење успешности лечења младих сталних зуба, применом диодног ласера и фотодинамске терапије, у односу на стандардна антимикубна средства, на основу клиничких знакова и симптома, 6 месеци након терапије,
7. испитивање антимикубног дејства ендодонтских материјала за дефинитивну оптурацију на изолате из канала корена младих сталних зуба.

### ***3. Материјали и методе***

Етички одбор Стоматолошког факултета Универзитета у Београду дао је сагласност за спровођење истраживања у оквиру израде докторске дисертације под бројем 36/8, 19.04.2016. године. Сви огледи су спроведени у складу са Хелсиншком декларацијом из 1964., и Единбуршком ревизијом из 2000. године. Током спровођења клиничке студије поштоване су *CONSORT* смернице за рандомизоване контролисане клиничке студије. Од учесника у студији су након усменог објашњења добијене писане сагласности за учешће у студији, уз могућност да прекину учешће на лични захтев у било којој фази истраживања (Прилог А).

### **3.1. Изолација и култивација ћелија из ткива апикалне папиле**

У студију су укључена три пацијента Клинике за оралну хирургију, узраста од 16 до 18 година, без општих обољења и примене било каквих лекова, са индикацијом за вађење умњака са незавршеним растом корена из ортодонтских разлога. Фаза развоја корена је потврђена ортопантомографским снимком. Пацијенти или родитељи, зависно од узраста, су уз детаљну информисаност дали писани пристанак за коришћење ткива апикалне папиле у даљем истраживању.

Ткиво усне дупље сваког пацијента је пребрисано повидон јодом пре интервенције. Хируршко вађење импактираних умњака је спроведено по правилима добре клиничке праксе, у асептичним условима. Након вађења, зуб је стављен у свеже направљен транспортни медијум који се састојао од: *DMEM-a (Dulbecco modified Eagles medium, DMEM/Ham's F12 with Glutamax, 1:1 (DMEM/F12); Thermo Fisher Scientific, Inc., САД)*, са додатком 20% феталног говеђег серума (*FBS; Thermo Fisher Scientific, Inc.*) и 1% антибиотика/антимикотика (*ABAM; Thermo Fisher Scientific, Inc.*), а затим пренесен у Лабораторију за ћелијске културе. Све наредне манипулације ткивима су рађене у ламинару са сталним протоком стерилног ваздуха помоћу стерилних инструмената и посуда намењених раду са ћелијским културама. Изолација је даље рађена према протоколу *outgrowth* методе за изолацију матичних ћелија из ткива [141, 142]. Пола сата након вађења, зуби су испрани стерилним фосфатним пуфером (*PBS; Sigma-Aldrich, Сент Луис, САД*), нако чега је ткиво апикалне папиле локализовано на врху корена одвојено скалпелом и пребачено у стерилну Петри шољу. Ткиво апикалне папиле је скалпелом уситњено на фрагменте величине 1x1x1 mm, и потом пребачено у T25

фласк намењен узгајању ћелијских култура са свеже направљеним комплетним медијумом (DMEM/F12 са додатком 10% *FBS* и 1% *ABAM*). Фласк је затим стављен у инкубатор на 37 °C у 5% CO<sub>2</sub>. Комплетни медијум је мењан регуларно на 2 - 3 дана.

Пасажа ћелија је извођена регуларно при постизању ћелијске конфлуентности од 80 - 90%. Након одливања медијума, монослој ћелија је испран *PBS*-ом. Затим је у фласк додат ензим за одвајање мезенхималних ћелија од подлоге (*TrypLE Express* стабилни ензим као замена за трипсин без фенол црвеног, *Thermo Fisher Scientific, Inc.*) у запремини од 1 ml како би покрио читаву површину фласка монослојем ћелија. Након 7 min. деловања ензима у регулисаним условима средине у инкубатору, 4 ml комплетног медијума је додато у фласк. Механичким спирањем ћелија медијумом урађено је додатно одвајање преосталих ћелија од површине. Суспензија медијума и ћелија је центрифугирана 6 min. брзином 1700 об/min. Медијум је одливен, а талог ћелија ресуспендован у 1 ml новог комплетног медијума. За бројање ћелија, 20 µl суспензије ћелија је помешано са 20 µl 0.4% Трипан плавог (*Sigma-Aldrich*, Сент Луис, САД). Трипан плаво улази у цитоплазму мртвих ћелија, док код живих ћелија боји само њихову мембрану. На тај начин омогућено је бројање и живих и мртвих ћелија. Бројање ћелија је рађено на аутоматском бројачу ћелија (*Countess<sup>TM</sup>*, *Thermo Fisher Scientific*). Након бројања, 150 000 ћелија је даље засејавано у нови T25 фласк, док су преостале ћелије замрзаване и чуване за потребе даљих истраживања.

Замрзавање ћелија је рађено тако што су ћелије у комплетном медијуму центрифугиране, медијум одливен и талог ћелија ресуспендован у раствору за замрзавање и чување ћелија (*FBS* са додатком 10% диметил-сулфоксида (*DMSO*, *Sigma-Aldrich*)), да би затим ћелије биле пребачене у обележене тубице за замрзавање ћелија (криовајле). Просечно 2 милиона ћелија је замрзавано по криовајли, кроз пасаже. Криовајле су биле пребачене у посуде са изопропанолом који је омогућавао поступно замрзавање ћелија, а затим су посуде стављене у замрзивач на -80 °C. Наредног дана криовајле су пребачене у канистер са течним азотом на -195 °C.

Одмрзавање ћелија је рађено тако што је у криовајлу непосредно после вађења из течног азота додаван комплетни медијум како би се суспензија ћелија што пре

нашла у медијуму са сниженом концентрацијом токсичног *DMSO*-а. Оваква суспензија ћелија је пребачена у тубу са 10 ml свежег комплетног медијума и центрифугирана (1700 об/min., 6 min.) како би се *DMSO* потпуно одстранио. Након уклањања медијума талог ћелија је ресуспендован у свежем комплетном медијуму, ћелије су биле избројане на већ описан начин. Ћелије су затим засејане у флашкове и даље гајене у контролисаним условима средине.

### 3.1.1. Есеј формирања колонија

За доказивање способности ћелија ка умножавању и стварању видљивих колонија од појединачне ћелије, ћелије из друге пасаже су засејане у Петри шоље (35 mm) у концентрацији 100 ћелија/ml комплетног медијума. Ћелије су гајене у регулисаним условима средине у инкубатору, уз редовно мењање комплетног медијума свака 2 дана. Након 7, 10 и 14 дана медијум је одливан, ћелије испране *PBS*-ом, фиксирани 4% параформалдехидом (*PFA*) на собној температури, 15 min. Вишак *PFA* је уклоњан испирањем *PBS*-ом, 2 пута по 5 min. Ћелије су затим 30 min. биле у 0,05% раствору Кристал Виолета (Центрохем, Нови Сад). Вишак боје је уклоњен испирањем у дестилованој води, 2 пута по 5 min. Обојене колоније су фотографисане макроскопски.

### 3.1.2. Есеј пролиферације

За одређивање потенцијала ћелија за умножавањем кроз пасаже број живих ћелија по фласку је мерен током сваке пасаже, од 1. до 10. пасаже. За сваку наредну пасажу тачно одређен број ћелија је засејаван у флашкове. Ћелије су гајене у контролисаним условима, свеже припремљен комплетни медијум је мењан редовно на свака 2 - 3 дана, а ћелије редовно пасажирани након достизања 80 - 90% конфлуентности. Бројање ћелија је рађено на аутоматском бројачу ћелија (*Countess<sup>TM</sup>*, *Thermo Fisher Scientific*). Време дуплирања популације ћелија (ВД) кроз пасаже рачунато је по следећој формули

$$ВД = \frac{(t P_0 - P_1)(\log 2)}{\log P_1 - \log P_0}$$

где је  $P_0$  број ћелија у иницијалној пасажи,  $P_1$  број ћелија у наредној пасажи,  $t$   $P_0 - P_1$  број дана од иницијалне до наредне пасаже [143].

## 3.2. Карактеризација ћелија

Карактеризација ћелија у дефинисању матичности је урађена након пете пасаже према дефинисаним критеријумима за мезенхималне матичне ћелије [144]. Први критеријум је потврђен током култивације тиме што су ћелије показале веома добру адхерентност за пластичну подлогу.

Наредни критеријум је била провера мембранских маркера, при чему је неопходно да ћелије буду позитивне у високом проценту на маркере за мезенхималне матичне ћелије, CD73, CD90 и CD105, и негативне на бар два маркера хематопоезних матичних ћелија, CD34 и CD45. Ћелије у концентрацији  $1 \times 10^6/\text{ml}$  су испране PBS-ом, и обележене конјугованим моноклоналним антителима за мембранске маркере CD90 (FITC) (Life technologies, Калифорнија, САД), CD73 (PB) (Sony Biotechnology, Калифорнија, САД), CD105 (FITC) (Exbio, Праг, Чешка), CD34 (FITC) (Sony Biotechnology), CD45 (PE) (Exbio). Након 45 min. инкубације у мраку на  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , ћелије су испране PBS-ом 3 пута, фиксиране 2% PFA и остављене преко ноћи у мраку на  $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Наредног дана детекција наведених мембранских маркера је урађена проточном цитометријом (Partec, Минстер, Немачка). Подаци су анализирани софтвером CyFlow Space (Sysmex Partec, Görlitz, Немачка).

Трећи критеријум потврде матичности подразумевао је усмеравање ћелија ка остеогеној, адипогеној и хондрогеној ћелијској лози.

### 3.2.1. Усмеравање ћелија ткива апикалне папиле у три ћелијске лозе

Након 5. пасаже, ћелије су засејане у комплетном медијуму у бунарима плоча са 12 поља, у концентрацији  $1 \times 10^5/\text{ml}$ , као припрема ћелија за усмеравање ка остеогеној и адипогеној ћелијској лози. Два дана након засјавања, по постизању 80% конфлуентности, уместо комплетног медијума ћелије су изложене медијуму за усмеравање ка жељеној ћелијској лози. Независно, за хондрогену диференцијацију засејано је  $10\ \mu\text{l}$  суспензије ћелија по бунару, концентрације  $2.5 \times 10^7/\text{ml}$ , да би потом ћелије биле остављене у инкубатору 2 сата. Након инкубације додат је медијум за хондрогено усмеравање.

### 3.2.1.1. Квалитативно доказивање потенцијала ка остеогеном усмеравању

У циљу испитвања потенцијала ка остеогеном усмеравању ћелија ткива апикалне папиле, у одговарајуће бунаре је додат свеже припремљен медијум за остеогено усмеравање ћелија. Медијум за усмеравање је добијен обогаћивањем комплетног медијума са: 10 nM дексаметазон-динатријум-фосфата ( $C_{22}H_{28}FNa_2O_8P$ ), 1.8 mM калијум-дихидроген-фосфата ( $KH_2PO_4$ ), 10 mM бета-глицерофосфата, и 50  $\mu\text{g/ml}$  витамина C (све супстанце произведене од стране *Sigma-Aldrich*). Бунари у којима су ћелије биле изложене комплетном медијуму служиле су као контрола. Медијуми су мењани на свака 3 дана. Након 28 дана, медијуми су одливени, ћелије испране стерилним *PBS*-ом, и фиксирани 15 min. 4% *PFA*-ом на собној температури. Вишак *PFA* је уклоњен испирањем ћелијског монослоја *PBS*-ом, 2 пута по 5 min. Ћелије су затим обојене додавањем по 0.2 ml 2% Ализарин црвеног (*Alizarin Red S, Sigma-Aldrich*) у све бунаре, 20 min., у мраку на собној температури. Вишак боје је испиран бар 3 пута по 5 min. са 0.5 ml *PBS*-а. Калцификовани депозити у ванћелијском матриксу диферентованих ћелија везали су специфично ализарин боју. Ћелије су затим фотографисане на инвертном микроскопу (*BIB-100/T, BOECO, Немачка*), као и контролне ћелије изложене комплетном медијуму. Како би се квантификовао степен минерализације, боја везана специфично за минерализоване депозите је екстрахована инкубацијом 20 min. у 0.2 ml киселог алкохола (70% етанол са додатком 1.5% хидрохлорне киселине). По 100  $\mu\text{l}$  растворене боје пренето је у плочу са 96 бунара, након чега је апсорпција очитана на таласној дужини од 450 nm на ЕЛИЗА читачу плоча (*RT-2100c, Rayto, Кина*).

### 3.2.1.2. Квалитативно доказивање потенцијала ка адипогеном усмеравању

За испитвање потенцијала ка адипогеном усмеравању ћелије ткива апикалне папиле су биле изложене свеже припремљеном медијуму за адипогено усмеравање ћелија. Медијум за усмеравање састојао се од комплетног медијума који је обогаћен са: 100 nM дексаметазон динатријум фосфата, 250  $\mu\text{M}$  IBMX-а (3-изобутил-1-метилксантин), 200  $\mu\text{M}$  индометацина (све наведене супстанце произведене од стране *Sigma-Aldrich*), и 10  $\mu\text{g/ml}$  хуманог инсулина (*Thermo Fisher Scientific*). Ћелије изложене комплетном медијуму служиле су као контрола. Медијуми су



мењани на свака 3 дана. Након 15 дана, медијуми су одливени, ћелије испране стерилним *PBS*-ом, и фиксирани 15 min. са 4% *PFA*-ом на собној температури. Вишак *PFA* је уклоњен испирањем *PBS*-ом ћелијског монослоја, 2 пута по 5 min. Ћелије су обојене додавањем 0,2 ml *Oil red O* раствора у 0,2% изопропил алкохолу (*Sigma-Aldrich*), 15 min. на собној температури. Вишак боје је уклоњен испирањем ћелијског монослоја дестилованом водом, након чега су усмеравање ћелије и контролна група посматране и фотографисане на инвертном микроскопу на различитим увећањима (*BIB-100/T*, *BOECO*, Немачка).

### **3.2.1.3. Квалитативно доказивање потенцијала ка хондрогеном усмеравању**

За усмеравање ћелијске суспензије ка хондрогеној линији коришћен је готов медијум за усмеравање (*StemPro® Chondrogenesis* кит за усмеравање, *Life technologies*), док је комплетни медијум коришћен за контролну групу. Медијум је мењан на свака 3 дана. Одливање старог и додавање свежег медијума је рађено пажљиво како се не би пореметила суспензија ћелија у центру бунара. Након 28 дана ћелије су испране *PBS*-ом, и фиксирани 4% *PFA*-ом 20 min. на собној температури. Затим, вишак фиксатива је уклоњен испирањем *PBS*-ом 2 пута по 5 min., након чега су ћелије обојене додавањем Сафранин О боје (*SERVA Electrophoresis GmbH*, Немачка). Вишак боје је уклоњен додавањем *PBS*-а, 3 пута по 5 min., а обојене ћелије су фотографисане на инвертном микроскопу на различитим увећањима (*BIB-100/T*, *BOECO*). Како би се боље уочила пребојеност протеогликана у групацији ћелија лоптастог облика, направљен је хистолошки препарат након хондрогене диференцијације. Након фиксирања узорка 4% *PFA*-ом, урађена је дехидрација уз примену растућих концентрација етанола (30%, 50%, 70%, 90%, 100%), и то по 10 min. за сваку концентрацију. У следећим етапама, ћелије су биле изложене ксилолу 1 сат а затим уроњене у парафин. На крају процедуре, на микротому су направљени исечци дебљине 5  $\mu\text{m}$  и постављени на микроскопске плочице, а затим су препарати остављени 2 сата на 50 °C. Хистолошки препарати су затим обојени Сафранин О бојом и посматрани под инвертним микроскопом (*BIB-100/T*, *BOECO*).

### 3.3. *In vitro* испитивање биокомпатибилности диодног ласера и PDT на SCAP ћелије

У студији је коришћен диодни ласер велике снаге (класа 4), у начину рада за додатно обескличење канала корена зуба, таласне дужине 940 nm, максималне снаге до 7 W, и равним оптичким влакном дебљине 200  $\mu\text{m}$  на чијем дисталном крају излази ласерски зрак (*Biolase*, Сан Клементе, Калифорнија, САД). Ласер (940 nm) је калибрисан од стране произвођача пре спровођења истраживања.

За испитивање дејства фотодинамске терапије примењен је диодни ласер мале снаге, таласне дужине 660 nm, снаге 100 mW (*Helbo*<sup>®</sup> *TheraLite* ласер, *Bredent*, Зенден, Немачка), фотосензитивни агенс (*Helbo*<sup>®</sup> *Endo Blue*, *Bredent*, Зенден, Немачка), и оптичко влакно 450  $\mu\text{m}$  (*3D Helbo*<sup>®</sup> *Endo Probe*, *Bredent*, Зенден, Немачка). За контролну групу испитивања биокомпатибилности коришћен је *NaOCl* (*Chloraxid 2%*, *Cerkamed*, Пољска), разблажен у комплетном медијуму до концентрације 0,5%.

#### 3.3.1. Дизајн студије

За потребе испитивања биокомпатибилности примењених ласера укључене су следеће групе:

- контролна група коју су чиниле нетретиране ћелије гајене у комплетном медијуму,
- контролна група која је била изложена позитивном цитотоксичном агенсу (0,5% *NaOCl*),
- огледне групе изложене третманима ласера наведене у Табели 1.

Табела 1. Распоред третмана ласерима ћелија по групама

ласер	940 nm ласер				PDT		
групе	0,5 W CW	1 W CW	1.5 W CW	2 W CW	0,1% F + 660 nm	0,01% F + 660 nm	- F + 660 nm

Тестом Неутрално црвено испитана је цитотоксичност фотосензитивног агенса (F) у растућим концентрацијама, 0,01%, 0,1% и 1%, а који су разблажени у комплетном медијуму, како би се утврдиле концентрације за даља испитивања. На

основу добијених резултата утврђено је да концентрације од 0,1% и 0,01% показују минималну цитотоксичност, те су коришћене даље у огледима. Тестом пролиферације помоћу Трипан плавог утврђено је да *SCAP* ћелије након излагања комплетном медијуму са 2% *FBS* током 24 h престају са деобом, док не долази до одумирања ћелија. Такође, током наведена 24 h ћелије се међусобно хомогенизују уласком у G0 фазу ћелијског циклуса. Показано је да при испитивању биостимулативног дејства ласера у *in vitro* условима депривација ћелија излагањем комплетном медијуму са 2% *FBS* омогућује поузданије резултате утицаја ласера на биостимулацију. Стога су у свим тестовима, након достизања конфлуентности од 80% ћелије биле излагане комплетном медијуму са 2% *FBS* током 24 h, а затим биле изложене дејству ласера.

Оба ласера су примењена по упутству произвођача за ендодонтско лечење зуба у начину рада за додатно обескличење. Сваки бунар је засебно зрачен постављањем дисталног врха наставка непосредно изнад поклопца у правцу средине бунара. За диодни ласер (940 nm) расипање зрака износи од 8 - 22°, те је на основу удаљености дисталног краја наставка и монослоја ћелија у дну бунара утврђено да не долази до расипања зрака мимо зраченог бунара. Вlakно *PDT* ласера расипа зрак у свим правцима у пречнику 360°, те је влакно постављено у пластични непрозирни тубус пречника 0,5 mm пре зрачења, како би се спречило расипање зрака ван жељеног поља. Додатно, за групе зрачене *PDT* ласером око огледних бунара остављана су празна поља услед расипања зрака ван пречника једног бунара.

Ћелије су зрачене преко провидног поклопца плоче како би се заштитиле од могућности контаминације током трајања огледа. Током зрачења, 100 µl *PBS*-а је било додато у бунаре са ћелијама уместо комплетног медијума, како фенол црвено из медијума не би утицало на зрачење ћелија. Дистални крак влакна диодног ласера (940 nm) постављен је непосредно изнад поклопца у правцу средине бунара, након чега је ласер активиран у периоду од 5 s, у 4 циклуса, са паузама између циклуса од 20 s [145, 146]. На тај начин примењене снаге од 0,5 W, 1 W, 1,5 W и 2 W одговарају количини испоручене енергије од 10 J/cm<sup>2</sup>, 20 J/cm<sup>2</sup>, 30 J/cm<sup>2</sup>, односно 40 J/cm<sup>2</sup>. За испитивање другог типа ласера, фотодинамске терапије (*PDT*), у лабораторијским условима, одабран је протокол примене по упутству произвођача за клиничко ендодонтско лечење. Фотосензитивни агенс је додат у одговарајуће бунаре у

концентрацијама 0,1% и 0,01% и остављен да делује 2 min. Ћелије су затим испране *PBS*-ом 2 пута, и одговарајуће групе су озрачене 1 min. ласером мале снаге. Посебну групу чиниле су ћелије без излагања фотосензитивном агенсу, али озрачене ласером мале снаге 1 min. Након зрачења у бунаре је наливано по 100  $\mu$ l одговарајућег медијума, а плоче су стављене у инкубатор. Такође, у огледу су коришћене две контролне групе, и то: група изложена цитотоксичном средству (0,5% *NaOCl*) у трајању од 10 min., након чега су бунари испрани *PBS*-ом; као и група нетретираних ћелија у комплетном медијуму.

### 3.3.1.1. Директни тест вијабилности ћелија - есеј Неутрално црвено (*NR*)

Есеј *NR* је директни тест цитотоксичности у ком боја улази у ћелије са очуваном мембраном и таложи се у лизозомима. Есеј се заснива на способности живих ћелија да вежу и инкорпорирају црвену боју из реакције. Црвена боја се одликује slabим катјонским наелектрисањем, пролази ћелијску мембрану пасивном дифузијом и концентрише се у лизозомима. Способност ћелија да апсорбују боју зависи од способности ћелија да одрже стабилну *pH* вредност кроз синтезу аденозин-трифосфата (АТФ). При физиолошким вредностима *pH* наелектрисање боје блиско је нули, што јој омогућава пролаз у ћелију пасивном дифузијом. Када ћелија умире или је *pH* вредност снижена у ћелији, боја не може бити задржана унутар ћелије. Стога је количина апсорбоване боје у ћелијама директно пропорционална броју вијабилних ћелија. Боја се може екстраховати из ћелија раствором киселог алкохола, а апсорбанца растворене боје се читава спектрофотометријски.

За потребе огледа ћелије из 5. пасаже су засејане у бунаре плоче са 96 поља, у концентрацији 5 000/100  $\mu$ l комплетног медијума и остављене да адхерирају 24 h. Наредног дана медијум је замењен комплетним медијумом са 2% *FBS* и остављене у инкубатору наредна 24 h. Трећег дана огледа, уместо медијума у бунаре је додат *PBS*, и ћелије су третиране према унапред утврђеним групама у огледу.

Један сат, 24 h и 7 дана након излагања ћелија третманима, есеј *NR* је урађен како би се испитао утицај ласера на вијабилност ћелија. Дан пре саме детекције направљен је раствор *NR* у комплетном медијуму (40  $\mu$ g/ml), и остављен у мраку, у

инкубатору. Наредног дана раствор је центрифугиран на 1800 об/min., 10 min., како би се нерастворљиви кристали исталожили на дну раствора.

Након потребног времена инкубације ћелија, комплетни медијум је одливен из бунара плоче са третираним ћелијама, радни раствор *NR* (0,1 ml) је додат у све бунаре, а плоче су затим остављене 2 h у инкубатор. Радни раствор *NR* је додат и у бунаре без ћелија за потребе негативне контроле, како би се касније одузела вредност апсорпције самих хемикалија коришћених у огледу. Позитивну контролу су чиниле ћелије без третмана. Након истека инкубације раствор *NR* је одливен, 0,1 ml *PBS*-а је додат у бунариће како би се уклонио вишак боје, а затим је у бунаре додато 0,15 ml киселог алкохола (50% етанол са додатком 1% сирћетне киселине). Заштићена од светлости плоча је стављена на мешалицу 20 min., након чега је апсорпција екстраховане боје из ћелија очитавана на таласној дужини од 540 nm на ЕЛИЗА читачу плоча (*RT-2100c, Rayto*, Кина).

Вијабилност ћелија је рачуната по формули:

$$\% \text{ вијабилности} = \frac{OD \text{ огледне групе} - OD \text{ негативне контроле}}{OD \text{ позитивне контроле} - OD \text{ негативне контроле}} \times 100$$

### 3.3.1.2. Индиректни тест вијабилности ћелија - есеј митохондријске активности (*MTT*)

Есеј митохондријске активности, *MTT* тест (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолиум бромид), представља индиректни тест цитотоксичности. Служи за одређивање осетљивости ћелија на различите супстанце и третмане у *in vitro* условима. Сам тест се заснива на уласку тетразолијумских соли у метаболички активне ћелије, да би се у митохондријама под утицајем ензима дехидрогеназе редуковала до формазана. Љубичасти кристали формазана таложе се у митохондријама. Што су ћелије метаболички активније долази до таложења веће количине формазана у њиховим митохондријама. Према томе, *MTT* тест је показатељ метаболичке активности испитиваних ћелија, а индиректно тест њихове вијабилности. Пошто су формазански кристали нерастворљиви у води, екстракција наталожених соли може се извести додавањем натријум-додецил-сулфата (*SDS*), изопропанола, или диметил-сулфоксида (*DMSO*). Након екстракције створени продукт различитог спектра жуте боје се може квантификовати спектрофотометријски.

*SCAP* ћелије из 5. пасаже су засејане у бунаре плоче са 96 поља по идентичном протоколу за испитивање директне вијабилности ћелија (Неутрално црвено), а који је описан у претходном тексту. Ћелије су затим третиране према унапред утврђеним групама у огледу.

Након 1 h, 1 и 7 дана мерена је количина митохондријске активности. Наиме, из бунара је одливен комплетни медијум, потом додато 100µl раствора *MTT* у комплетном медијуму (5 mg/ml), а затим су плоче стављене 4 сата у инкубатор. Након инкубације, одливен је *MTT* раствор и додато 100 µl *DMSO*-а у бунаре. У оглед је била укључена и група негативне контроле, односно бунари без ћелија, како би се одузела вредност апсорпције самих хемикалија коришћених у огледу. Позитивну контролу су чиниле ћелије без третмана. Заштићена од светлости плоча је стављена на мешалицу 20 min., након чега је апсорпција екстраховане боје из ћелија очитана на таласној дужини од 540 nm на ЕЛИЗА читачу плоча (*RT- 2100c, Rayto*).

Митохондријска активност ћелија (МА) је рачуната по формули

$$\% \text{ MA} = \frac{OD \text{ огледне групе} - OD \text{ негативне контроле}}{OD \text{ позитивне контроле} - OD \text{ негативне контроле}} \times 100$$

### 3.3.2. Тест потенцијала миграције озрачених ћелија

Ради испитивања утицаја зрачења ћелија на њихову миграцију примењен је такозвани тест „огреботине" у *in vitro* условима. Ћелије су засејане у бунаре плоче са 24 поља у концентрацији 20 000/500 µl у комплетном медијуму и стављене у инкубатор. Након 2 дана постигнута је жељена конфлуентност од 80%, те је комплетни медијум замењен медијумом са 2% *FBS*, а плоча је враћена у инкубатор на 24 h. Следећег дана огледа по средини бунара са ћелијама је пажљиво стерилним наставком направљена праволинијска огреботина ширине 1.2 mm како би се формирала површина по средини поља у коју ћелије могу мигрирати. Ћелије су затим испране 2 пута *PBS*-ом како би се уклониле огребане ћелије и фактори раста ослобођени из повређених ћелија, и у бунаре са ћелијама је додато по 0,3 ml *PBS*-а. По средини бунара у три тачке, у пројекцији направљене огреботине, деловано је ласерима по већ утврђеним протоколима и распоређеним групама. Након зрачења *PBS* је одливен, а 0,5 ml свежег комплетног медијума са 2% *FBS* је додато у све

бунаре како би се искључила могућност пролиферације ћелија током трајања огледа и омогућило да резултат попуњавања огребане површине ћелијама буде резултат миграције ћелија из суседства. Контролну групу чиниле су неозрачене ћелије које су током зрачења огледних група биле изложене *PBS*-у као и огледне групе, да би затим био додат медијум са 2% *FBS* као и огледним групама. Плоча је остављена у инкубатор (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>). Фотографије бунара са ћелијама су направљене 0 h, 24 h, и 48 h након постављеног огледа, у унапред одређеним фиксним тачкама, под константним увеличењем од 40x под инвертним микроскопом (*BIB-100/T*, *BOECO*), са *HDCE-90D* камером (*BOECO*, Немачка). *Score Image 9.0* софтвером је мерена површина огреботине неиспуњена ћелијама у свим временским интервалима (0 h, 24 h и 48 h). Одузимањем вредности површина након 24 h и 48 h од почетних вредности добијена је површина коју су ћелије испуниле у временским интервалима.

#### **3.4. Испитивање утицаја ласера на остеогени потенцијал *SCAP* ћелија**

За испитивање остеогеног потенцијала озрачених ћелија у односу на нетретираних ћелије испитивала се способност синтезе ензима алкалне фосфатазе као раног знака остеогене диференцијације, експресија гена специфичних за одонто/osteобластну диференцијацију, квалитативно доказивање стварања минерализованог ванћелијског матрикса, као и потврда експресије протеина специфичних за одонто/osteобласте. У огледу су коришћене групе наведене у дизајну студије, без групе са цитотоксичним агенсом. Зависно од потреба теста, *SCAP* ћелије из 5. пасаже су засејане у комплетном медијуму и стављене на инкубацију. Након 2 - 3 дана и постизања 80% конфлуентности комплетни медијум је замењен 2% *FBS* медијумом, а ћелије су враћене на инкубацију наредна 24 h. Наредног дана из бунара са ћелијама одливан је медијум, и додат *PBS*. У следећем кораку, бунари са ћелијама, унапред подељени по групама зависно од примењеног третмана зрачени су по протоколу описаном у дизајну студије. Након третмана, *PBS* је замењен свеже припремљеним медијумом за остеогено усмеравање у свим бунарима. У одређеним временским периодима, ћелије су гајене у медијуму за остеогено усмеравање, зависно од одабраног теста, уз редовно мењање медијума на свака 2 - 3 дана. Пред сваку промену прављен је свеж остеогени медијум.

### **3.4.1. Одређивање активности алкалне фосфатазе након дејства ласера на SCAP ћелије**

Ензим *ALP* представља рани показатељ усмеравања ћелија ка одонто/остеобластима. За испитивање активности ензима *ALP* примењен је тест за квалитативно доказивање стварања *ALP*-а у ћелијама, као и квантитативни колориметријски тест.

#### **3.4.1.1. *In situ* хистолошко бојење алкалне фосфатазе**

За квалитативно доказивање потенцијала стварања *ALP*-а ћелије су засејане у бунаре плоче са 24 поља у концентрацији 30 000/бунару у комплетном медијуму. Након описаног третирања ћелија ласерима, свеже направљени медијум за одонто/остеогено усмеравање је додат у бунаре, и ћелије су гајене наредних седам дана у медијуму за остеоогено усмеравање. Остеогени медијум је одливен, ћелијски монослој је испран *PBS*-ом, а затим је у бунаре додат 4% *PFA* ради фиксирања ћелија. Након 10 min., вишак фиксатива је уклоњен испирањем ћелија *PBS*-ом 3 пута по 5 min. Ћелијски монослој је обојен *BCIP/NBT* супстратом за бојење алкалне фосфатазе (*Sigma-Aldrich*) по упутству произвођача. Бојење ћелија је урађено додавањем по 100 µl свеже направљеног *BCIP/NBT* супстрата (*5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/Nitroblue tetrazolium, pH 9.8.*) у сваки бунар. Плоча је остављена у мраку на собној температури наредних 10 min. Раствор супстрата је затим уклоњен, ћелије су испране 2 пута дестилованом водом, а обојене ћелије су фотографисане макроскопски.

#### **3.4.1.2. Квантитативни есеј активности алкалне фосфатазе**

За квантитативно доказивање потенцијала стварања *ALP*-а ћелије су засејане у бунаре плоче са 96 поља, у концентрацији 10 000/100 µl комплетног медијума. Колориметријски есеј који омогућава детекцију и квантификацију активности *ALP*-а у ћелијама урађен је 3, 7 и 14 дана након третмана ћелија ласерима и излагања ћелија медијуму за остеогену диференцијацију. Након наведених дана индукције, медијум је уклоњен из бунара, ћелијски слој је испран од остатака медијума 3 пута *PBS*-ом, и затим је урађена пермеабиланизација ћелија додавањем 55 µl 0,1% *Triton X-100*, и плоче су остављене преко ноћи на +4 °C. Наредног дана под микроскопом



је уочена потпуна пермеабилитет мембране ћелија. У следећем кораку, плоче су стављене на мешалицу 15 min. ради хомогенизације, након чега је колориметријски измерена концентрација укупних протеина по бунару користећи *BioSpec-nano Microvolume UV-Vis* спектрофотометар (*Shimadzu Scientific Instruments*, Колумбија, САД). За детекцију је коришћен *pNPP* кит за детекцију активности алкалне фосфатазе (*Sigma-Aldrich*) према упутству произвођача, тако што је у свеже направљен *pNPP* супстрат (1 М пуфера диетаноламина (*pH* 9,8) и 0,5 mM  $MgCl_2$ ) додат 1 mg/ml *pNPP* супстанце (4-нитрофенил-фосфат-динатријум-хексахидрат). Затим, 100  $\mu$ l *pNPP* раствора додато је у сваки бунар са лизираним ћелијама. Плоче су инкубиране 30 min. на собној температури у мраку ради стварања реакционог продукта жуте боје, растворљивог у води. Реакција је заустављена додавањем 50  $\mu$ l 3M NaOH, и плоче су очитане на таласној дужини од 405 nm на ЕЛИЗА читачу плоча (*RT- 2100c, Rayto*). Активност *ALP*-а је израчуната тако што су се вредности добијене спектрофотометријски нормализовале према измереним концентрацијама укупних протеина у свако бунару засебно.

### **3.4.2. Одређивање експресије гена маркера одонто/остеогеног усмеравања након дејства ласера на *SCAP* ћелије**

За анализу експресије одабраних гена, маркера одонто/остеогене диференцијације, ћелије су засејане у бунаре плоче са 6 поља у концентрацији  $1 \times 10^5$ /ml комплетног медијума. Након излагања ћелија третману, *PBS* је одливен из бунара, а свеже направљен остеогени медијум је додат у бунаре. Медијум је мењан свака 3 дана. Након 21 дана остеогеног усмеравања, укупна РНК је изолована из ћелија користећи тризол реагенс (*TRIzol reagent, Thermo Fisher Scientific*) према упутству произвођача. Применом ове методе добијена је РНК одговарајућег квалитета и концентрације, која је даље коришћена за молекуларно-генетичке анализе. Концентрација изоловане РНК из сваког бунара је измерена спектрофотометријски користећи *BioSpec-nano Microvolume UV-Vis* спектрофотометар (*Shimadzu Scientific Instruments*, Колумбија, САД).

Методом реверзне транскрипције синтетисана је дволанчана комплементарна ДНК (*cDNK*) користећи кит за синтезу комплементарне ДНК (*Thermo Scientific RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, Thermo Fisher Scientific*). За реакцију је

узето од сваког узорка по 1  $\mu$ г укупне РНК, док су од потенцијалних прајмера коришћени олиго(*dT*) прајмери. Након реверзне транскрипције и добијања *cDNK* генска експресија остеогених маркера је анализирана квантитативном анализом реакције умножавања полимеразом у реалном времену, односно квантитативном анализом која се означава - *qPCR* (*quantitative PCR*).

Прецизније, користећи *SensiFAST<sup>tm</sup> SYBR<sup>®</sup> Hi-ROX* кит (*Bioline*, Лондон, Велика Британија), по упутству произвођача, овом методом амплификовани су одређени генски региони одабраних маркера одонто/остеогене диференцијације (Табела 2.). У свим реакцијама, ген глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа (*GAPDH*) је коришћен као *housekeeping* ген (ген константно активан у свим ћелијама), односно ген за нормализацију вредности сви остеогених маркера.

Табела 2. Секвенце хуманих прајмера коришћених за умножавање специфичних генских региона одабраних маркера одонто/остеогене диференцијације \*

Прајмери	Секвенце	Број базних парова
<b><i>ALP</i></b>	Fwd CCACGTCTTCACATTTGGTG	99
	Rv ATGGCAGTGAAGGGCTTCTT	
<b><i>BSP</i></b>	Fwd AAAGTGAGAACGGGGAACCT	95
	Rv ACCATCATAGCCATCGTAGCC	
<b><i>RUNX2</i></b>	Fwd ACAACAACCACAGAACCACAAGT	111
	Rv GTCTCGGTGGCTGGTAGTGA	
<b><i>OCN</i></b>	Fwd TTGGACACAAAGGCTGCAC	107
	Rv CTCACACTCCTCGCCCTATT	
<b><i>DSPP</i></b>	Fwd TCACAAGGGAGAAGGGAATG	187
	Rv CTGGATGCCATTTGCTGTGA	
<b><i>BMP-2</i></b>	Fwd CACTGTGCGCAGCTTCC	107
	Rv CCTCCGTGGGGATAGAACTT	
<b><i>MTNR-4</i></b>	Fwd GCGGCAACTTCAGGCAGAT	101
	Rv TTTGTGGACGCACGCTCTT	
<b><i>GAPDH</i></b>	Fwd TCATGACCACAGTCCATGCCATCA	445
	Rv CCCTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	

\**ALP* - алкална фосфатаза, *BSP* - сијалопротеин кости, *RUNX2* - транскрипциони фактор повезан са протеином „*run1*” 2, *OCN* - остеокалцин, *DSPP* - дентин сијалофосфопротеин, *BMP-2* - морфогенетски протеин кости 2, *MTNR-4* - матрилин 4, *GAPDH* - глицералдехид 3-фосфат дехидрогеназа

Укупна запремина реакционе смеше за појединачну *qPCR* реакцију је била 15  $\mu\text{l}$ , и садржала је *SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (7,5  $\mu\text{l}$ ), одговарајући пар прајмера (по 1  $\mu\text{l}$  у радној концентрацији 0,3  $\mu\text{M}$ ), *cDNK* узорка (2  $\mu\text{l}$ ) и  $\text{H}_2\text{O}$  (3,5  $\mu\text{l}$ ). Сви узорци су анализирани у дупликату. *qPCR* реакција је урађена у *Line gene K* квантитативном флуоресцентном *PCR* систему детекције (*BIOER Technology Co., Hangzhou*, Кина). Након завршене *qPCR* реакције, урађена је анализа криве топљења, како би се потврдила специфичност амплификације свих тестираних генских маркера. Резултати добијени у свакој реакцији изражени су путем *Ct*-вредности (*Cycle Threshold*) која представља број циклуса у току *qPCR* реакције када ниво амплификације прелази праг, након чега долази до експоненцијалног пораста продуката који се умножавају. Наиме, након завршене *qPCR* реакције релативни ниво експресије гена је одређен  $2^{-\Delta C_t}$  методом тако што је од *Ct*-вредности анализираних гена одузета *Ct*-вредност гена за нормализацију (*GAPDH*). Добијене вредности су изражене као средње вредности дупликата узорака за сваку реакцију. Да би се уочило одступање релативне експресије анализираних гена после третмана са ласером, у односу на контролну групу ћелија нетретираних ласером, добијена вредност експресије контролног узорка је послужила за нормализацију. Прецизније, ниво експресије експерименталних узорака ( $2^{-\Delta C_t}$ ) подељен је са нивом експресије контролног узорка ( $2^{-\Delta C_t}$ ), при чему је ниво експресије контроле означен као јединична вредност (1).

### **3.4.3. Квалитативно доказивање остеогеног усмеравања ћелија озрачених ласерима**

За бојење Ализарин црвеним ћелије су засејане у бунаре плоче са 96 поља у концентрацији 10 000/100  $\mu\text{l}$  комплетног медијума. Након ласерских третмана свеже припремљен медијум за остеогено усмеравање ћелија додат је у одговарајуће бунаре. Ћелије гајене у комплетном медијуму служиле су као контрола диференцијације. Медијуми су мењани на свака 3 дана. Након 21 дана медијуми су одливени, ћелије испране стерилним *PBS*-ом, фиксирани 4% *PFA* 15 min. на собној температури. Вишак *PFA* је уклоњен испирањем ћелијског монослоја *PBS*-ом, 2 пута по 5 min. Ћелије су затим обојене додавањем по 0,2 ml 2% Ализарин црвеног у све бунаре, а затим остављене на инкубацију 20 min., у мраку, на собној

температури. Вишак боје је испиран бар 3 пута по 5 min. са 0,5 ml *PBS*-а. Калцификовани депозити у ванћелијском матриксу који су специфично везали Ализарин боју су фотографисани на инвертном микроскопу (*BIB-100/T, BOECO*, Немачка), као и контролне ћелије изложене комплетном медијуму. Како би се квантификовао степен минерализације, боја везана специфично за минерализоване депозите је екстрахована инкубацијом у 0,2 ml киселог алкохола (70% етанол са додатком 1.5% хидрохлорне киселине) 20 min. Након инкубације по 100  $\mu$ l растворене боје пренето је на плочу са 96 поља, да би се очитала апсорпција на таласној дужини од 450 nm, на ЕЛИЗА читачу плоча (*RT- 2100c, Rayto*).

#### **3.4.4. Имуноцитохемијска анализа испољавања одабраних протеина - маркера одонто/остеогеног усмеравања ћелија након дејства ласера**

Ћелије из 5. пасаже су засејане на стерилна стакалаца 7 mm у пречнику, у концентрацији 5 000 ћелија/10  $\mu$ l, у плочи од 12 бунара, и остављене у инкубатор. Један сат након засејавања у бунаре је додато по 0,5 ml комплетног медијума. Након 2 дана и достизања конfluентности од 80% у бунаре је додат комплетни медијум са 2% *FBS*. Наредног дана у бунаре је додато по 0,5 ml *PBS*-а и ћелије су озрачене по претходно описаном протоколу. Након дејства ласера *PBS* је одливен из бунара, а свеж медијум за остеогено усмеравање је додат у бунаре. Ћелије без третмана ласером, у остеогеном медијуму служиле су као контрола. Посебну групу чиниле су ћелије без третмана ласерима, у остеогеном медијуму, а које су служиле као контрола релевантности огледа, за бојење само секундарним антителом на крају експеримента. Медијум је мењан редовно на свака 3 дана. Након 21 дана ћелије су испране *PBS*-ом и фиксиране 4% *PFA* 20 min. на собној температури. Вишак *PFA* је уклоњен испрањем у *PBS*-у, 2 пута по 5 min. Ћелије су затим биле изложене раствору за блокирање и пермебиизацију (0,1% тритон са 3% говеђим серумским албумином (*BSA, Sigma-Aldrich*) у *PBS*-у) 45 min. у инкубатору. Раствор за пермеабилizацију је затим одливен, а вишак течности са ивица стакалаца пажљиво уклоњен помоћу папирног убруса. Маркери одонто/остеогеног усмеравања за имуноцитохемијско бојење ћелија коришћени у огледу су примарна антитела за остеокалцин (*OCN*), морфогенетски протеин кости 2 (*BMP2*), и остеопонтин (*OPN*). По 15  $\mu$ l раствора примарних антитела (*Thermo Fisher Scientific*; разблажења 1:200,

1:100, и 1:100, у 1% BSA) је додато у одговарајуће групе како би ћелијски монослој био потпуно прекривен раствором антитела. Узорци су остављени на инкубацију са примарним антителима, 24 h у мраку, на +4 °C, и у влажној средини. Наредног дана примарна антитела су испрана PBS-ом 3 пута по 5 min., а затим је додато по 15 µl секундарног конјугованог антитела *Alexa Fluor 488* (*Thermo Fisher Scientific*; разблажење 1:500 у 1% BSA) у све групе и инкубирано 2 h у мраку на собној температури. Секундарно антитело је испирано PBS-ом 5 пута по 5 min. Затим су ћелијска једра бојена са *DAPI* (*Invitrogen*, разблажење 1:4000 у PBS-у) на собној температури, 10 min. у мраку. Вишак боје је испран PBS-ом 5 пута по 5 min., а вишак течности са ивица стакалаца пажљиво уклоњен помоћу папирног убруса. Стакала су монтирана на микроскопска стакла са 5 µl раствора мовиола (*Mowiol*, *Sigma-Aldrich*) између. Након сушења мовиола обојене ћелије су посматране и фотографисане на конфокалном микроскопу (*Laser Scanning Microscope, LSM META 510, Carl Zeiss, САД*).

### **3.5. Прелиминарно испитивање безбедности примене ласера велике снаге на младим сталним зубима *in vitro* условима**

Пре примене диодног ласера велике снаге (940 nm) у клиничкој студији, било је неопходно испитати *in vitro* сигурност његове примене у ендодонтском лечењу, узимајући у обзир фототермално дејство.

#### **3.5.1. Припрема узорака**

Двадесет интактних доњих секутића, индикованих за вађење због унапредовалог стадијума пародонтопатије на Клиници за оралну хирургију, уз писану сагласност пацијената, коришћени су у испитивању. Након вађења, зуби су остављани у PBS-у на +4 °C, не дуже од 15 дана. Површине коренова су очишћене од остатака ткива и меких и чврстих зубних наслага ултразвуком (*Woodpecker Dte D1 Ultrasonic Scaler*, Кина), и скраћени на стандардну дужину од 10 mm дијамантским диском (*NTIKahla GmbH, Kahla*, Немачка). Затим, стандардна ендодонтска обрада канала корена је урађена. Врхови коренова су проширени до #40 уз примену проширивача (*K-files, FKG Dentaire SA*, Швајцарска), 1% NaOCl и физиолошког раствора између инструмената. Радна дужина је одређена на 1 mm од

анатомског врха корена. На крају инструментације канали су испрани 18% EDTA (*Ultradent*, Келн, Немачка) 1 min., а затим 1% *NaOCl* и физиолошким раствором. Канали су посушени папирним поенима, и даље изложени третманима ласером.

За потребе мерења количине загревања спољашње површине корена модела младих сталних зуба, након стандардне обраде канала и мерења загревања спољашње површине зуба са завршеним растом корена, канали су додатно обрађени. Под сталним млазом физиолошког раствора, машинским проширивачем *Peeso*, ISO 130 (*FKG Dentaire SA, La Chaux-de-Fonds*, Швајцарска) обрађени су канали до паралелних зидова, 1.3 mm у пречнику, целом дужином канала, и притом је направљен модел зуба са незавршеним растом корена [147]. На крају инструментације канали су испрани 18% EDTA (*Ultradent*, Келн, Немачка) 1 min., а затим 1% *NaOCl* и физиолошким раствором. Радна дужина је такође одређена на 1 mm од анатомског врха корена.

Дигитални рендген снимци свих узорака након стандардне ендодонтске обраде, и након стварања модела зуба са незавршеним растом корена, направљени су у вестибуло-оралном правцу како би се мерила дебљина мезијалне површине корена (*Trophy RadioVisioGraphy, Trophy Radiologie, Croissy-Beaubourg*, Француска).

### 3.5.2. Симулација ендодонтског ласерског третмана

Након стандардне обраде, коренски канали су посушени, рендген снимци су направљени, и случајним одабиром коренови су подељени у 4 групе, зависно од примењене снаге, 0,5 W, 1 W, 1,5 W, 2 W, у континуираном начину рада (5 зуба по групи). Вlakно ласера је уведено у канал на радну дужину, а ласер је активиран у тренутку кад се влакно у хеликоидном покрету померало од апикалног ка цервикалном крају канала при приближној брзини од 1-2 mm/s, 5 s, у 4 циклуса понављања зрачења, са паузама између од 20 s. По упутству произвођача континуирани начин рада је примењен, и влакно је мењано при зрачењу сваког наредног корена.

Узорци модела зуба са незавршеним растом корена су након рендген снимања случајним одабиром распоређени у 4 групе, и потпуно исти протокол ласерског

ендодонтског лечења је примењен као на узорцима након стандардне обраде канала коренова, како би резултати могли бити упоређени.

### 3.5.3. Мерење температуре

Пре зрачења, узорци су постављени на пластичне држаче у стандардизованој усправној позицији како би мезијална површина корена била усмерена ка термографској камери (*Varioscan® high-resolution model 3021, Jenoptik*, Дрезден, Немачка). Камера са топлотном резолуцијом од  $0,03^{\circ}\text{C}$  и спектралним рангом од 8–12  $\mu\text{m}$  постављена је на 0,5 m од узорка. Фабрички калибрисана апсолутна прецизност мерења на собној температури од  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , била је нижа од  $\pm 2\text{ K}$ . Температура је мерена на читавој спољашњој мезијалној површини корена током зрачења и пауза између зрачења. Оптички систем камере детектовао је инфрацрвено зрачење са површине корена, потом су фото сензори трансформисали енергију у електричне импулсе, тако да су температурне вредности конвертоване у виду слике на екрану. Добијени термограми су анализирани софтвером *IRBIS Professional 2.2. (InfraTec GmbH*, Дрезден, Немачка). Мерења су вршена у контролисаним условима средине при температури ваздуха између 22 и  $24^{\circ}\text{C}$ .

## **3.6. Рандомизована контролисана клиничка студија**

Истраживање је спроведено на Клиници за дечију и превентивну стоматологију Стоматолошког факултета, у Лабораторији за базична испитивања и Лабораторији за микробиологију, Института Стоматолошког факултета Универзитета у Београду, према *CONSORT* смерницама за рандомизоване контролисане клиничке студије.

### **3.6.1. Клиничка фаза истраживања утицаја примене диодног ласера (940 nm) и PDT у ендодонтском лечењу младих сталних зуба**

#### 3.6.1.1. Величина узорка

Укупан број пацијената који је учествовао у студији био је 45. Према претпостављеним вредностима израчуната величина узорка по групи била је 12, при чему је свака група проширена за 25% могућих пацијената, који би

потенцијално били изостављени из праћења услед дуготрајног лечења, те је коначан број пацијената по групи износио 15. Величина узорка за анализу, одређена је на основу претходе студије у којој је успешност у обескличењу канала корена зуба након примене *NaOCl*-а и додатне дезинфекције применом *PDT* зуба са завршеним растом корена била за 45% успешнија у односу на контролну групу [148]. Како не постоје подаци из литературе о успешности дезинфекције канала након примене диодног ласера (940 nm), узето је да и ту групу чини број пацијената једнак претходним двама групама. Величина узорка је одређена за снагу студије од 80%, ризиком од  $\alpha$  грешке 5%, и ризиком од  $\beta$  грешке 20%. Величина узорка израчуната је према формули

$$N = \frac{P1 (100 - P1) + P2 (100 - P2)}{(P2 - P1)^2} \times f(\alpha, \beta)$$

где је *P1* – контролна група (%), *P2* – огледна група (%), вредност  $f(\alpha = 0,05, \beta = 0,20) = 7,9$

#### 3.6.1.2. Критеријуми за укључење у студију:

- пацијнти узраста од 6 до 18 година,
- пацијнти са примарном ендодонтском инфекцијом на младим сталним зубима,
- пацијнти са дијагнозом некрозе пулпе зуба или апикалног периодонтитиса,
- зуби без претходно започетог ендодонтског лечења,
- пацијнти са писаним пристанком родитеља/пацијента за учествовање у студији.

#### 3.6.1.3. Критеријуми за искључење из студије:

- пацијнти који болују од системских обољења – неконтролисане шећерне болести, имуносупресије, узнапредовале астме,
- пацијнти који користе антибиотике, антиинфламаторну, или имуносупресивну терапију до 6 месеци пре почетка студије,
- уколико је неопходна примена антибиотика у лечењу зуба, који по осталим критеријумима испуњавају услове за улазак у студију,



- присуство системског обољења које захтева заштиту антибиотцима пре ендодонтске терапије,
- ако је немогуће обезбедити суво радно поље,
- обољења пародонцијума.

#### 3.6.1.4. Клинички рад и праћење пацијената

Пре започињања интервенције родитељима и пацијентима који су испунили критеријуме за улазак у студију дато је објашњење о учествовању у студији, а затим је прибављена писана сагласност родитеља/пацијента (Прилог Б). Методом случајног избора пацијент је распоређен у једну од три групе: контролну групу са стандардним протоколом ендодонтског лечења, као и једну од две огледне групе у којима је након стандардног протокола ендодонтског лечења, била примењена ласерска терапија: *PDT* или диодни ласер (940 nm) (Табела 3.).

Стоматолошки картон Клинике уз податке о општем здравственом статусу је попуњаван за сваког пацијента (Прилог В). Стоматолошки подаци садржали су статус зуба, ниво оралне хигијене, стање меких ткива уста, постојање ортодонтских аномалија. Постављање дијагнозе се се одређивало на основу анамнезе, клиничког прегледа и ретроалвеоларног рендген снимка.

Табела 3. Протокол обескличења канала корена по групама

група	1	2	3
протокол обескличења	0,5% <i>NaOCl</i>	0,5% <i>NaOCl</i> + диодни ласер (940 nm)	0,5% <i>NaOCl</i> + <i>PDT</i>

У првој посети, након распоређивања пацијента у једну од три групе, зуб је пребрисан ватом натопљеном 3% водоник-пероксидом и 2% *NaOCl*-ом, затим су карбидним сврдлима уклоњене каријесне масе, а суво поље рада је обезбеђено кофердамом. Потом је формиран приступни кавитет и проширивачем је урађена експлорација канала. У случају постојања остатака некротичног ткива пулпе, урађена је екстирпација заосталог ткива нерва иглама и садржај је убачен у 1 ml транспортног медијума (Тиогликолатни бујон, *Sigma-Aldrich*) који омогућава

одржавање вијабилности аероба, факултативних и стриктних анаероба. У следећем кораку, за потребе микробиолошке анализе у канал су се уносила 3 стерилна папирна поена (величине 20) до иницијално одређене радне дужине, и то сваки по 1 min. У случају непостојања остатака ткива пулпе, уносила се минимална количина стерилног физиолошког раствора у канал корена, након чега су се у канал постављали папирни поени на већ описан начин. Папирни поени су постављани у транспортни медијум непосредно након уклањања из канала корена. Радна дужина је одређена рендгенолошки на 1 mm од физиолошког сужења. Хемијско-механичка обрада канала је урађена ручним инструментима, минималном препарацијом, уз коришћење 15 ml свеже разблаженог *NaOCl*-а у концентрацију од 0,5% (*pH* 12) на собној температури. На крају обраде, канал је испиран са 5 ml 0,5% *NaOCl*-а, 2 ml 20% лимунске киселине (*Cerkamed*, Пољска), и 5 ml физиолошког раствора. Затим је узиман други брис за микробиолошку анализу канала (група 1, 2 и 3), применом стерилних папирних поена (на већ описан начин).

У огледној групи 2 за додатно обескличење је примењен диодни ласер таласне дужине 940 nm, снагом од 1 W, у континуираном начину рада по препоруци произвођача за инфициране канале. Канал корена је посушен пре уношења влакна у канал. Зрачење је рађено тако што се стерилно, неактивирано влакно за ендодонцију уносило у канал до радне дужине, након чега се ласер активирао и влакно се истовремено померало од врха корена ка круници у хеликоидним покретима, просечном брзином 1 - 2 mm/s. Зрачење је урађено у четири циклуса са паузама од 20 s између.

У огледној групи 3, за примену *PDT* након стандардне обраде канала зуба, крунични део пулпе се премазивао заштитом зубног ткива од пребојавања и затим полимеризовао лампом 20 s (*Helbo Endo Seal*, *Bredent*, Зенден, Немачка), уз привремено постављање папирног поена на улазу у канал како средство не би доспело и у канал корена. Након тога, у каналу корена се помоћу стерилног шприца и игле уносио фотосензитивни агенс до улаза у канал, а стерилиним инструментом се течност додатно распоређивала у каналу. Након 2 min. фотосензитивни агенс је уклањан папирним поенима, а канал испиран са 5 ml физиолошког раствора. Канал је потом био посушен папирним поенима и влакно *PDT* ласера је унето у канал, да би се затим ласерско зрачење активирало у трајању од 1 min. Канали из групе 2 и 3

су затим испирани са 5 ml физиолошког раствора, након чега је узиман трећи микробиолошки брис, на већ описан начин.

Затим је примењено стандардно ендодонтско лечење зуба у све три групе. Интерсеансно лечење је подразумевало примену стерилне суспензије калцијум-хидроксида. Након губитка знакова и симптома инфекције, канала корена је дефинитивно пуњен гутаперкама и пастом за дефинитивно пуњење канала корена (*Acroseal, Septodont*, Француска). Пацијенти су долазили на обавезне контролне прегледе након 15 и 21 дана, 3 месеца и 6 месеци. Ретроалвеоларни снимци зуба су направљени на почетку лечења, и након 6 месеци. На основу рендген снимака и клиничким прегледом праћена је успешност лечења, и периапикално зарастање ткива.

### **3.6.2. Лабораторијска анализа микробиолошких узорака**

#### **3.6.2.1. Стандардна култивација микробиолошких узорака**

Брисеви у транспортном медијуму су се преносили у микробиолошку лабораторију у року од 1 h након узимања узорака, а до тада су чувани на +4 °C. Непосредно по доношењу у лабораторију, узорци су хомогенизовани вортексовањем 1 min. (*Vortex Classic, VELP Scientifica*, Италија), а затим су направљена разблажења у течной подлози (*BBL Шедлер бујон (Becton Dickinson)*) уз додавање 10% раствора витамина К1 и хемина (*BD Biosciences*). Разблажења брисева била су 10 и 100 и 1000 пута мања од почетне концентрације. За засејавање узорака коришћене су свеже припремљене стерилне подлоге *BBL* бруцела агар (*Becton Dickinson*) које су обогаћене 5% стерилном овчијом крвљу, и 1% раствором витамина К1 и хемина. По 50 µl основне концентрације, као и три разблажења ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ) наношено је на подлогу и равномерно распређено по подлози у танком слоју. Након засејавања, подлоге су одмах постављане у анаеробне услове обезбеђене помоћу *GasPak* система (*GasPak™ EZ Gas Generating Container Systems, Becton, Dickinson and Company*, САД). Херметички затворена транспортна анаеробна комора са обезбеђеним условима средине (*Gas-pak*) остављана је у инкубатор на 37 °C на 2 недеље како би се омогућило детектовање и спорорастућих

бактерија. Након периода инкубације избројане су присутне колоније из свих узорака и прерачунате у број колонија у 1 ml (CFU/ml).

### **3.6.2.2. Анализе микробиолошких узорака молекуларно-генетичким методама**

Након засејавања узорака на микробиолошким подлогама, узорци у основној концентрацији су чувани на  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Пре изолације бактеријске ДНК узорци су одмрзавани на собној температури, вортексовани по један min., а затим је 0,5 ml суспензије бактерија у транспортном медијуму узето за изолацију бактеријске ДНК. Изолација укупне бактеријске ДНК (Грам позитивних и Грам негативних) је урађена сетом за изолацију бактеријске ДНК (*PureLink Genomic DNA Mini Kit, Life Technologies*) по упутству произвођача. Изолована ДНК је растварана у 75  $\mu\text{l}$  стерилне воде.

#### **3.6.2.2.1. Одређивање укупне бактеријске ДНК у узорцима**

За процену заступљености укупног броја бактеријске ДНК коришћена је *qPCR* метода. Тачније, процена укупне бактеријске ДНК изражена је бројем копија гена за 16S *rDNK* по ml узорка (генске копије/ml узорка). Овај вид квантификације базиран је на чињеници да различите бактеријске врсте унутар мешовите бактеријске популације у узорку могу имати различит број гена за 16S *rDNK*, а који се налазе у склопу генских јединица - оперона (16S, 23S, 5S *rDNK*) [149]. Број оперона са генима за *rDNK* по бактерији износи између 1 и 15 зависно од бактеријске врсте. Прајмери који су коришћени у овој квантитативној анализи хибридизују са конзервираним секвенцом гена за 16S *rDNK* (*rDNK* гени) и дају *PCR* продукт величине 466 базних парова [150]. Прајмери за регион субјединице рибозома 16S *rDNK* наведени су у Табели 4.

Амплификација универзалне секвенце 16S *rDNK* урађена је користећи *SensiFAST<sup>tm</sup> SYBR<sup>®</sup> Hi-ROX* кит (*Bioline*, Лондон, Велика Британија), по упутству произвођача. Укупна запремина реакционе смеше за појединачну *qPCR* реакцију била је 15  $\mu\text{l}$ , и садржала је следеће компоненте: 7,5  $\mu\text{l}$  *SYBR Green qPCR Master Mix*, по 1  $\mu\text{l}$  прајмера (у радној концентрацији 0,3  $\mu\text{M}$ ), 3,5  $\mu\text{l}$  воде и 2  $\mu\text{l}$  бактеријске ДНК. Температурни профил *qPCR* реакције био је следећи: иницијално загревање смеше на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$  10 min., затим 40 циклуса денатурације на  $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 1 min.,

хибридизације на 60 °C, 1 min., и елонгације на 72 °C, 90 s. Завршна елонгација је трајала 5 min. на 72 °C. *qPCR* реакција је урађена у *Line gene K* квантитативном флуоресцентном *PCR* систему детекције (*BIOER Technology Co., Hangzhou, Кина*).

Након завршене *qPCR* реакције, анализирана је крива топљења како би се потврдила специфичност сваке реакције. Такође, сваки узорак је анализиран два пута. За процену заступљености укупног броја гена *rDNK* у анализираним узорцима коришћен је референтни бактеријски сој *Prevotella melaninogenica* (АТСС 25845), за добијање стандардне криве. На основу базе података (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), геном *P. melaninogenica*-е величине 3,17 Мб конвертован је у тежину 3,24 fg (тежина једне копије генома). Претпостављајући да једна геномска копија представља једну бактеријску ћелију и да врста *Prevotella spp.* има 2 ДНК оперона са *16S rDNK*, направљена је серија разблажења стандарда од 32,4 fg ДНК (20 гена *16S rDNK*) до 32,4 ng ДНК ( $2 \times 10^7$  гена *16S rDNK*). За процену броја копија *16S rDNK* у узорцима из студије, у свакоу *qPCR* реакцију били су укључени и стандардни узорци познатих концентрација стандарда у наведеним серијским разблажењима, са фактором разблажења 10x. Анализа добијених вредности урађена је у софтверу *Line Gene K* (*Hangzhou Bioer Technology Co., Шангај, Кина*). Број генских копија сваког узорка одређен је поређењем са бројем генских копија стандарда (гена *16S rDNK*), односно на основу корелације између добијених *St*-вредности и познатих генских копија стандарда.

#### **3.6.2.2.2. Одређивање укупног броја бактеријских генома за *Streptococcus spp.* и *Enterococcus faecalis***

Како би се утврдио укупан број бактеријских генома специфичних бактеријских врста, *Streptococcus spp.* и *Enterococcus faecalis*, примењена је *qPCR* метода. Одређивање броја специфичних бактеријских врста урађено је по сличној методологији за одређивање броја укупне бактеријске ДНК (Поглавље 3.7.2.2.1.), с тим што су вредности укупног броја специфичних бактеријских генома доведене у директну корелацију са бројем бактерија.

За квантитативну анализу бактерија *Streptococcus spp.* коришћена је врста *Streptococcus mitis* (NCIMB 13770). На основу базе података о величини генома *Streptococcus mitis*, одговарајућом конверзијом добијена је тежина генома једне

ћелије од 2,35 fg ДНК. На основу ове вредности, направљена је серија разблажења стандарда од 23,5 fg/μl ДНК (10<sup>2</sup> копија генома) до 23,5 ng/μl ДНК (10<sup>7</sup> копија генома). Међутим, пошто је *qPCR* реакцијом амплификована специфична секвенца *16S rDNK*, а којих у геному *Streptococcus mitis* има 4, коришћене вредности стандарда биле су у распону од 4x10<sup>2</sup> копија гена *16S rDNK* до 4x10<sup>7</sup> копија гена *16S rDNK*. Добијен број генских копија након реакције подељен је са 4, да би се добио укупан број генома ове врсте (копија генома/ml узорка или број ћелија/ml).

По истом принципу, одређен је број копија генома (броја ћелија) за бактерију *Enterococcus faecalis*. За добијање стандардне криве коришћен је референтни сој (АТСС 29123). Серија разблажења стандарда кретала се од 33 fg/μl ДНК (10<sup>2</sup> копија генома) до 33 ng/μl ДНК (10<sup>7</sup> копија генома). Такође, и геном *Enterococcus faecalis*-а поседује 4 гена за *16S rDNK*, па су након *qPCR* реакције добијене вредности укупног броја генома ове бактерије, односно укупног броја ћелија израчунате на исти начин као за *Streptococcus spp.*

### **3.6.2.2.3. Квалитативно испитивање микробиолошких узорака**

#### **3.6.2.2.3.1. *PCR* метода идентификације бактерија**

Са циљем да се докаже присуство специфичних бактеријских врста у каналу корена зуба (Табела 4.), у свакој од три огледне групе, пре и после одговарајућих терапијских приступа, примењен је метод ланчане реакције полимеразе (*PCR* реакција). Реакциону смешу за *PCR* реакцију у запремини од 15 μl чиниле су следеће компоненте: 7,5 μl *DreamTaq Green PCR Master Mix*-а (*Thermo Fisher Scientific*), по 0,5 μl специфичних прајмера за дату бактерију, 4,5 μl воде и 2 μl укупне бактеријске ДНК. *PCR* реакција је урађена у апарату за умножавање ДНК (*Peqlab PeqSTAR 2X*, Ерлангер, Немачка). За свих 8 анализираних бактерија програми су подешени на следећи начин: почетна денатурација на 95 °C 3 min., затим 35 циклуса денатурације на 95 °C, 45 s, хибридизација 1 min. на температури специфичној за сваки пар прајмера (Табела 4.), елонгација на 72 °C, 1 min. и коначна елонгација на 72 °C, 5 min. За позитивну контролу у свакој реакцији је коришћена ДНК изолована из референтног соја одговарајуће бактерије, док је за негативну контролу у реакционој смеси уместо ДНК узорка коришћена дестилована вода.

### 3.6.2.2.3.2. Гел електрофореза

Како би умножени продукти бактеријских ДНК након *PCR* реакције били уочени, коришћена је метода гел електрофорезе. Након завршене *PCR* реакције, направљен је 8% полиакриламидни гел (ПАА гел) следећег састава: дестилована вода (3,9 ml), 5X ТБЕ пуфер (Трис-борна киселина-*EDTA*) (1,3 ml), 40% акриламид/бис-акриламид (1,3 ml), 10% амонијум персулфат - *APS* (46  $\mu$ l), и тетраетилметилендиамин - *TEMED* (8,4  $\mu$ l). Стаклени калуп димензија 10x10 cm наливан је свеже припремљеном смешом за гел. Полимеризација гела је трајала око 30 min. на собној температури. Након полимеризације, формирану бунарићу ширине 5 mm су испирани дестилованом водом и припремљени за наливање узорка. Стаклени калуп са везаним ПАА гелом постављан је у вертикалну електрофорезу (*PerfectBlue™ Twin S system, Peqlab, Немачка*) и прикључен на уређај за напајање струјом (250 V *Electrophoresis Power Source, VWR International, САД*). Калуп је затим наливан ТБЕ пуфером за електрофорезу, а у бунариће гела су наливани *PCR* продукти, позитивна и негативна контрола. У току сваке реакције коришћен је ДНК маркер (*GeneRuler 100 bp DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific*) са *PCR* фрагментима величине од 100 до 1000 базних парова. Електрофореза је активирана при волтажи од 230 V у трајању од 30 min. Током трајања електрофорезе негативно наелектрисани делови *PCR* продукта у успостављеном електричном пољу кретали су се кроз поре полиакриламидног гела од катоде ка аноди. Брзина којом се умножени делови ДНК кретали кроз гел зависила је од дужине сегмената умножених *PCR* продукта (броја базних парова), и што су фрагменти били краћи брже су се кретали кроз гел. По завршетку процеса електрофорезе, гелови су на 10 min. потопани у раствор интеркалирајућег агенса (*Etidijum bromide, Life technologies, Њујорк, САД*) након чега су посматрани под ултравиолетним светлом УВ трансилуминатора (*Vilber Lourmat TCX-15 MX®; Eberhardzell, Немачка*). Под УВ светлом интеркалирајући агенс везан за ДНК флуоресцира и омогућује видљивост *PCR* продукта. У односу на ДНК лествицу уочавано је присуство *PCR* продукта испитиване бактерије по унапред познатој и дефинисаној величини ДНК фрагмента бактерије - број базних парова (bp) наведених у Табели 4. Анализом гелова забележено је присуство/одсуство

умножених *PCR* продуката, затим су гелови фотографисани и одложени као биохазардни отпад.

Табела 4. Секвенце прајмера 8 бактеријских врста и универзалних прајмера код *E.coli*, величина умножених сегмената (*bp*) и температуре хибридизације за различите *PCR* продукте и универзалних прајмера *16S rDNK*

МО	Секвенца прајмера	<i>bp</i>	T (°C)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Fwd GTTTATGCCGCATGGCATAAGAG	310	58
	Rv CCGTCAGGGGACGTTTCAG		
<i>Tannerella forsythia</i>	Fwd GCGTATGTAACCTGCCCCGCA	641	55
	Rv TGCTTCAGTGTTCAGTTATACCT		
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	Fwd AGGCAGCTTGCCATACTGCG	400	55
	Rv ACTGTTAGCAACTACCGATGT		
<i>Prevotella intermedia</i>	Fwd CGTGGACCAAAGATTCATCGGTGGA	259	55
	Rv CCGCTTTACTCCCCAACAAA		
<i>Treponema denticola</i>	Fwd TAATACCGAATGTGCTCATTTACA	316	60
	Rv TCAAAGAAGCATTCCCTCTTCTTTA		
<i>Peptostreptococcus micros</i>	Fwd AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	207	55
	Rv ATATCATGCGATTCTGTGGTCTC		
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	Fwd GCTGCAGCTCAACTGTAGTC	672	55
	Rv CCGCTTCATGTCACCATGTC		
<i>Streptococcus spp</i>	Fwd AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	500	60
	Rv GTACCGTCACAGTATGAACTTTCC		
<i>16S rDNK*</i>	Fwd TCCTACGGGAGGCAGCAGT	466	60
	Rv GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT		

\* *E.coli* (331-797 *bp*)

### 3.6.2.3. Изолација и идентификација аеробних и анаеробних бактерија из клиничких узорака

По 0,1 ml бактеријске суспензије у транспортном медијуму (тиогликолатни бујон) клиничких брисева је узето, додато 0,1 ml *BHI* агара (*BHI, Becton Dickinson*), а затим је суспензија остављена у инкубатор на 37 °C наредна 24 h. Наредног дана културе су засејаване на одговарајуће хранљиве подлоге: аеробне културе на Колумбија агар обогашен 5% овчијом крви (*COS, bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Француска*) и *MacConkey* агар (*Becton Dickinson*), а затим инкубиране у аеробним условима наредна 24 h. За изолацију анаеробних култура коришћен је Колумбија агар обогашен 5% овчијом крви. Након засејавања инкубација је обављена у анаеробним условима *Gas-pak* система. Херметички затворена транспортна анаеробна комора са обезбеђеним условима средине (*Gas-pak*) одложена је у



инкубатор на 37 °C у току 2 - 5 дана. Додатно, колоније развијене на подлогама у анаеробним условима су даље засејане на Колумбија агар обогачен 5% овчијом крви, а затим преко ноћи инкубиране на 37°C у аеробним условима ради идентификације стриктних анаероба. Прелиминарна идентификација урађена је бојењем по Граму, хемолизом и COS (каталаза, оксидаза и коагулаза тест) анализом (*Oxidase Reagent Droppers, Becton Dickinson*; Зечија плазма, Ветеринарски медицински институт, Земун, Србија). Додатна потврда Грам позитивних бактерија урађена је помоћу *BD BBL Crystal™* система идентификације Грам позитивних бактерија (*Becton Dickinson*).

### **3.6.2.3.1. Антибактеријско дејство ендодонтских материјала на бактеријске изолате из канала корена**

Након изолације и идентификације, следећи бактеријски изолати су изабрани за анализу антибактеријског дејства ендодонтских материјала: *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus anginosus* и *Streptococcus vestibularis*, уз две бактеријске линије: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) и *Enterococcus faecalis* (ATCC 14506). Микроорганизми су засејани преко ноћи у течној подлози *Cation Adjusted Mueller-Hinton Broth (CAMHB, Becton Dickinson)*, а затим пресејани на агар подлоге *Cation Adjusted Mueller-Hinton* агар (*CAMHA, Becton Dickinson*) и остављени на 37°C у току 24 h.

Испитивање антимикуробног дејства урађено је методом двослојног агар дифузионог теста (*ADT*) на стерилним 90 mm Петри шољама. Основни слој је направљен од 10 ml стерилног *CAMHA*. Након 24 h, наредни слој од 10 ml стерилног *CAMHA* инокулисаног тестираним бактеријама у концентрацији 10<sup>8</sup> CFU/ml, што је одговарало вредности 0,5 на *McFarland* скали. Четири униформна бунарића (пречника 5 mm) су направљена помоћу стерилних пластичних туба, сваки за одговарајући испитивани ендодонтски материјал, и напуњени свеже замешаним материјалима. Ендодонтски материјали који су коришћени у истраживању су калцијум-хидроксид (*CH, UltraCal XS, Ultradent*, Јужни Јордан, САД), комерцијално доступан минералтриоксид агрегат (*MTA+, Cerkamed*, Пољска), калцијум силикат (*CS*), и калцијум силикат обогачен бизмут оксидом (*ALBO-MPCA*). Дискови свеже замешаних материјала су распоређени на двоструке агар

плоче и остављени у току 2 h на собној температури како би се омогућила предифузија материјала. Након тога, двоструке агар плоче са постављеним дисковима су стављене на инкубацију, на 37 °C, у три временска периода (1 h, 3 h и 24 h). Негативну контролу представљале су плоче без постављених дискова материјала. Пречник инхибиционе зоне бактеријског раста мерен је за сваку плочу у наведеним временским интервалима.

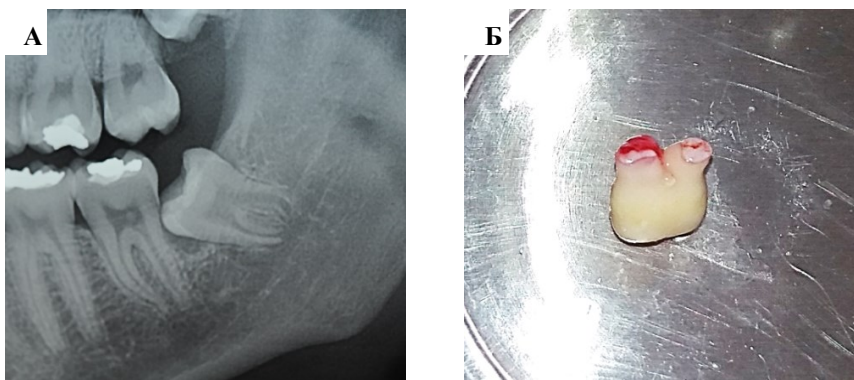
### 3.7. Статистичка анализа

За статистичку анализу резултата коришћен је софтвер Призма верзија 6 (*GraphPad Software, San Diego, CA, САД*). Нормалност расподеле испитана је тестом Конгломоров-Смирнов. Резултати су представљени као средње вредности ± стандардна девијација. За квантитативну заступљеност бактерија у узорцима резултати су представљени и у виду минималних, максималних вредности и медијане. За анализу података из огледа на ћелијској култури примењена је једносмерна и двосмерна анализа варијансе праћена пост хок *Tukey's* или Данетовим тестом, зависно од анализираних података. За анализу зависности промене температуре на површини корена и дебљине дентина корена коришћена је линеарна регресиона анализа. У анализи квалитативне заступљености бактерија у узорцима из клиничке студије коришћен је  $\chi^2$ - тест (Chi квадрат тест), док су за квантитативну заступљеност примењени Т-тест и једносмерна анализа варијансе праћена пост хок *Tukey's* или Данетовим тестом. Сви огледи су урађени у трипликату у три независна понављања, уколико није другачије наглашено. Разлике су сматране значајним за вредност  $p < 0,05$ .

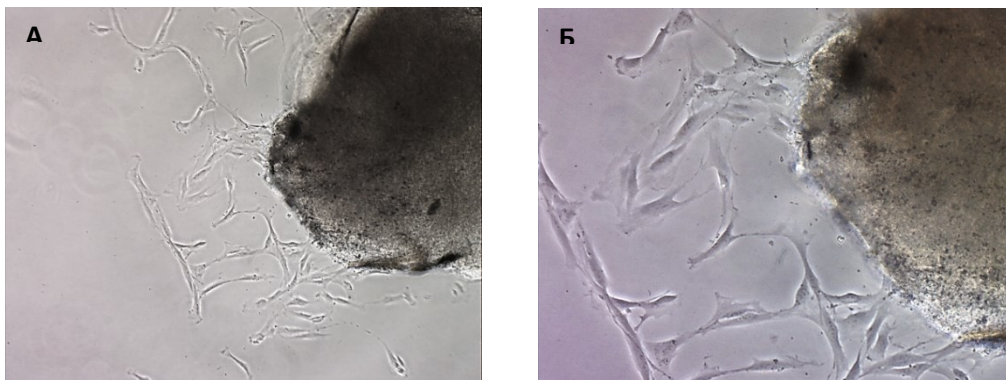
## *4. Резултати*

#### 4.1. Изолација и култивација ћелија из ткива апикалне папиле

На слици 3. А приказан је зуб са незавршеним растом корена на ортопантомографском снимку једног од пацијената укључених у студију. Након вађења зуба у стерилним условима ткиво апикалне папиле је одвојено од врха коренова (Слика 3. Б), да би потом из ткива биле изоловане ћелије (Слика 4).

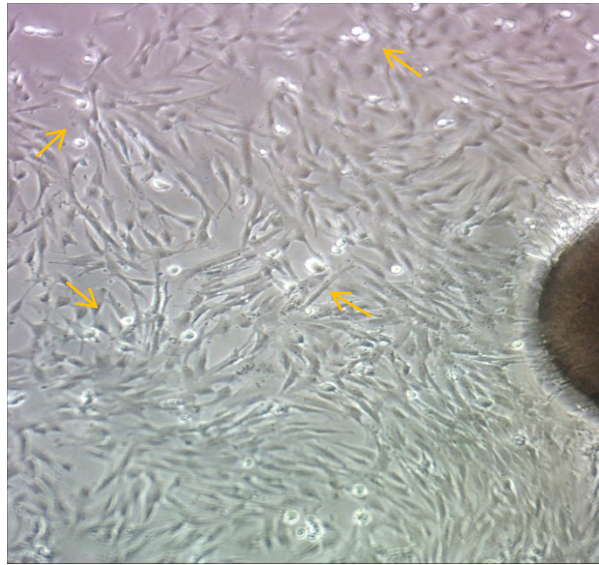


Слика 3. Исечак ОПТ снимка на ком се уочава полуимпактирани зуб 38, са незавршеним растом коренова (А); умњак 38 након хируршког вађења уз видљиво присуство ткива апикалне папиле на врху коренова (Б)



Слика 4. Фрагмент ткива апикалне папиле залепљен за пластичну подлогу флашка, 3 дана након изолације; уз ткиво се уочавају ћелије које су мигрирале из ткива и атхерирале за пластичну подлогу флашка; инвертни микроскоп, 40x (А), 100x (Б).

Након миграције ћелија из ткива апикалне папиле, активне деобе ћелија и постизања конфлуентности од 80% (Слика 5), ћелије су редовно пасажиране (Слика 6).



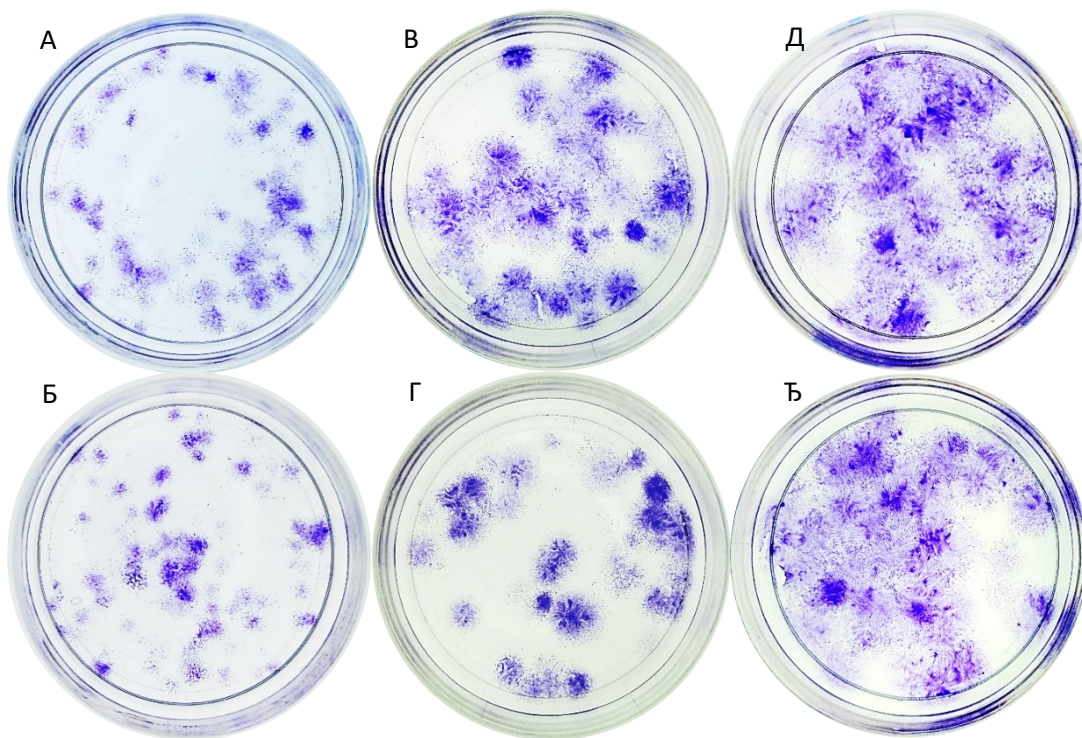
Слика 5. Седам дана након изолације поред миграције ћелија из ткива апикалне папиле уочава се активна деоба ћелија (стрелице); инвертни микроскоп, 40x



Слика 6. Ћелије апикалне папиле након пете пасаже; инвертни микроскоп, 100x

#### 4.1.2. Есеј формирања колонија

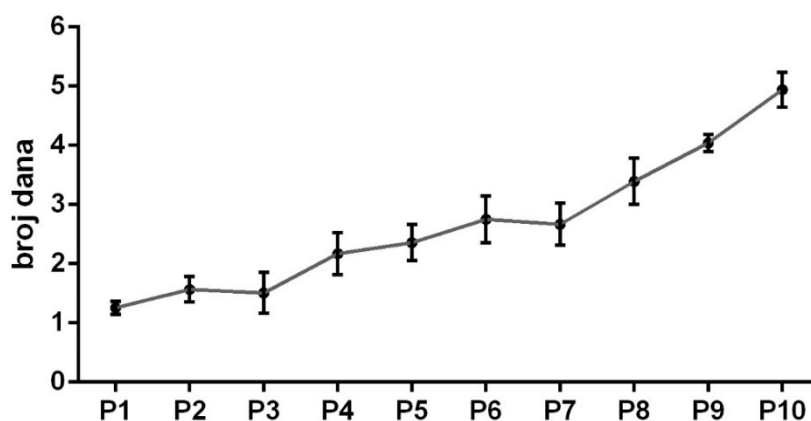
На слици 7. приказане су ћелије апикалне папиле обојене 7, 10 и 14 дана од почетка огледа. Висок клоногени потенцијал уочен је већ након 7 дана (Слика 7. А и Б) када се макроскопски уочавао значајан број колонија. Након 10 дана (Слика 7. В и Г) број ћелија које чине колонију се увећао, па је дошло до пораста величине колонија и међусобног спајања, док је након 14 дана (Слика 7. Д и Ђ) дошло до међусобног спајања скоро свих колонија.



Слика 7. Макроскопски видљиве колоније након 7 дана (А, Б), 10 дана (В, Г) и 14 дана (Д, Ђ).

### 4.1.3. Есеј пролиферације

Од прве до десете пасаже потенцијал ћелија да дуплирају свој број се мењао. Током прве три пасаже ћелије су дуплирале свој број током једног дана, док је од 4. до 7. пасаже потенцијал за дуплирањем и даље био јако изражен (просечно 2 дана). Међутим, након 7. пасаже потенцијал ка пролиферацији се умањивао током сваке наредне пасаже (Графикон 1).

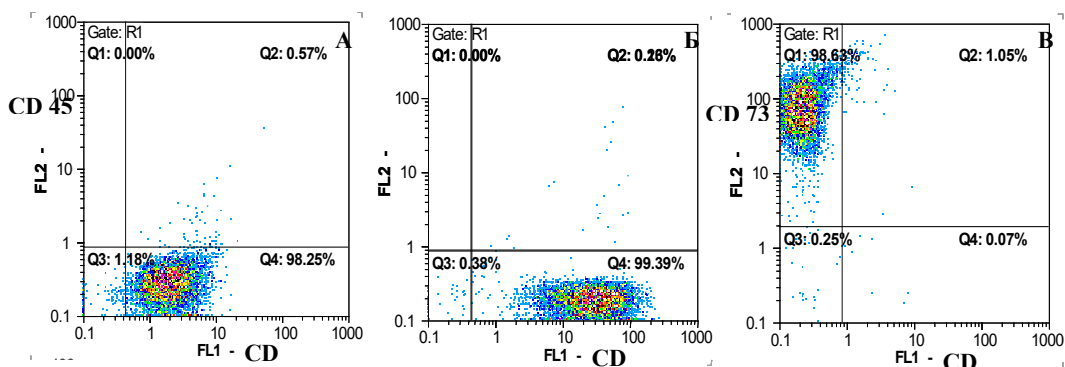


Графикон 1. Број дана потребан да ћелије апикалне папиле дуплирају своју популацију од прве (P1) до десете пасаже (P10).

#### 4.1.4. Карактеризација ћелија из ткива апикалне папиле

##### 4.1.4.1. Проточна цитометрија

На слици 8. приказани су резултати провере експресије мембранских маркера специфичних за матичне ћелије методом проточне цитометрије. Маркери мезенхималних матичних ћелија (CD 105, CD 90 и CD 73) су били високо позитивно испољени (98 - 99%) на мембранама ћелија из узорка, док су маркери хематопоезних матичних ћелија (CD 45 и CD 34) били готово потпуно одсутни (0%, односно 0.07%) у узорку.



Слика 8. Приказ заступљености протеинских мембранских маркера на површини ћелија апикалне папиле након пете пасаже

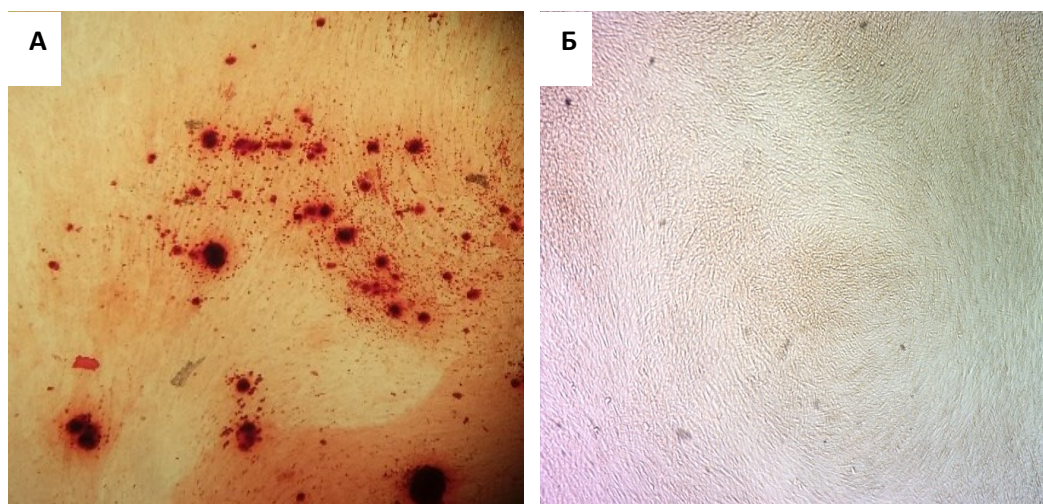
##### 4.1.4.2. Усмеравање ћелија апикалне папиле у три ћелијске лозе

Како мезенхималне матичне ћелије имају способност усмеравања и сазревања ка различитим ћелијским лозама у присуству посебних медијума, ћелије апикалне папиле су биле изложене медијумима за усмеравање као одонто/остеогеној, адипогеној и хондрогеној лози.



#### 4.1.4.2.1. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка одонто/остеобластима

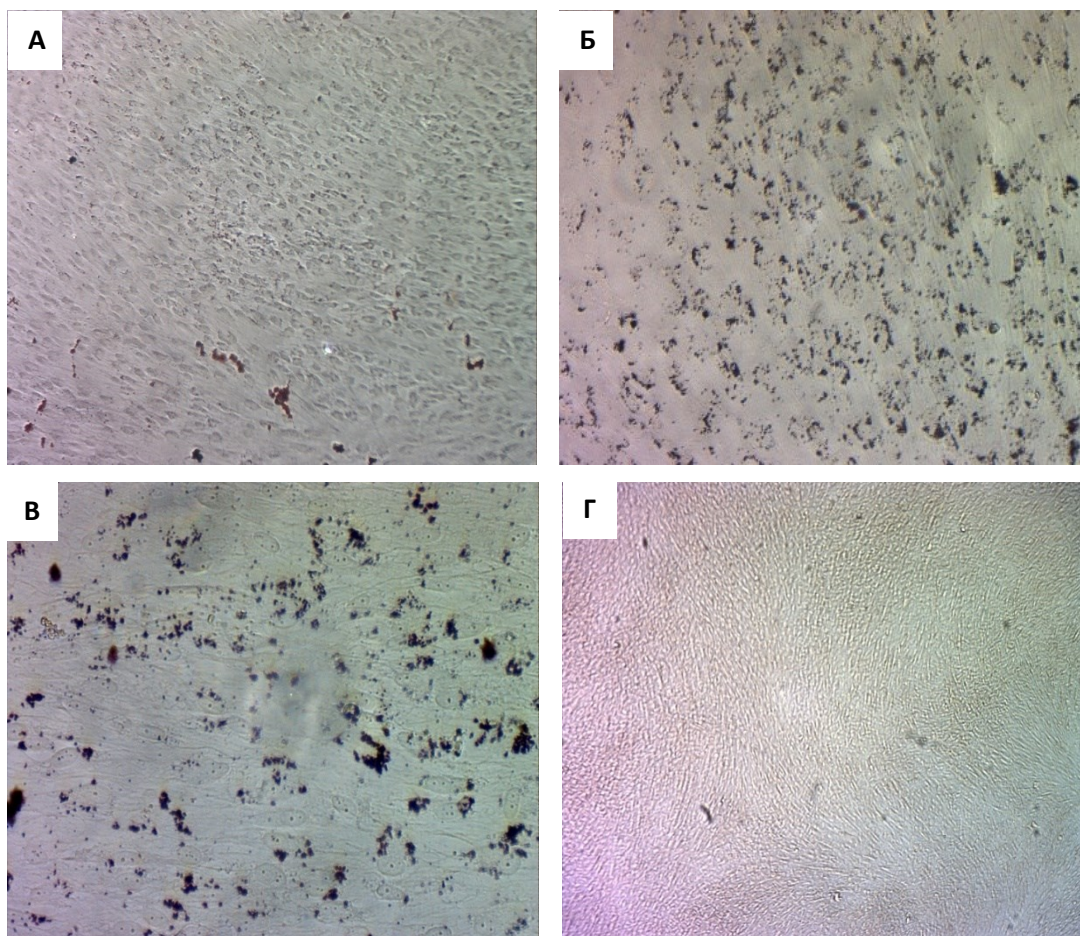
Након 28 дана гајења у медијуму за одонто/остеогено усмеравање, ћелије апикалне папиле су сазреле у одонто/остеобласте, са јасном способношћу старања минерализованих депозита у ванћелијском матриксу (Слика 9. А), у односу на контролу (Слика 9. Б). Као потврда присуства кацијумских депозита у ванћелијском матриксу уочава се везана боја Ализарин црвено за минерализоване депозите.



Слика 9. Усмеравање ћелија апикалне папиле ка одонто/остеобластима у присуству медијума за усмеравање (А) и контролна група гајена у комплетном медијуму (Б); инвертни микроскоп 40x

#### 4.1.4.2.2. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка адипоцитима

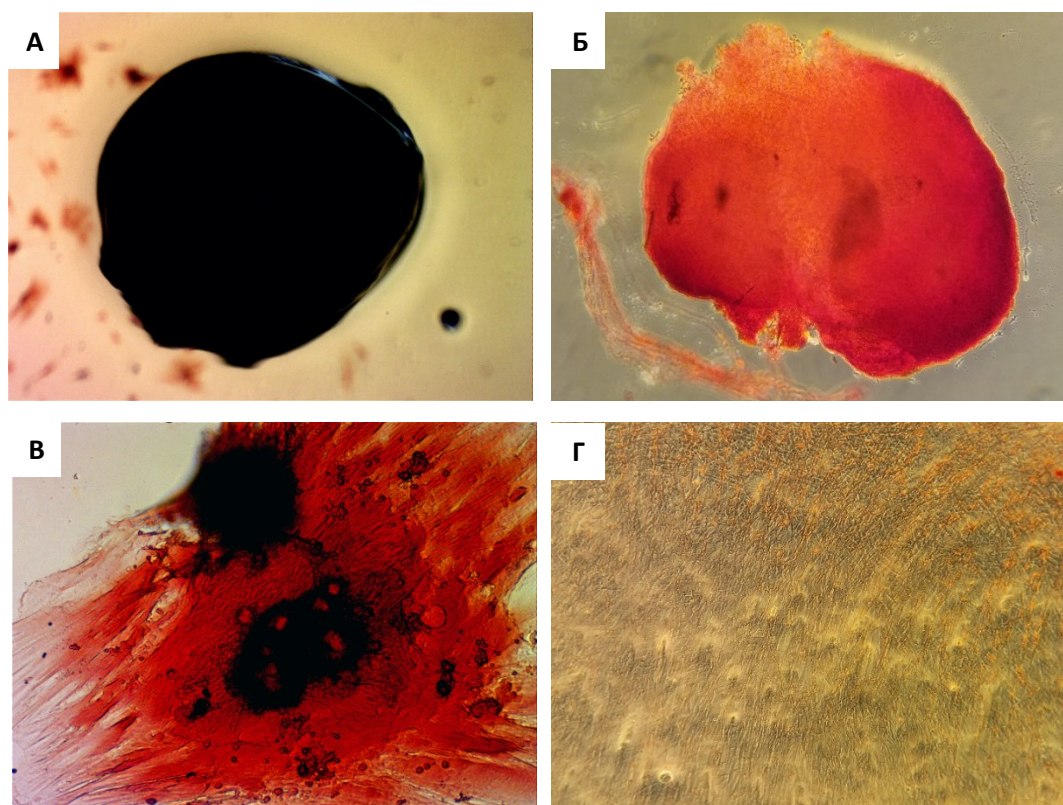
Гајене у медијуму за адипогено усмеравање, ћелија апикалне папиле су диферентовале у адипоците са јасно видљивим цитоплазматским вакуолама испуњеним масним капљицама (Слика 10. А, Б, В). Саме обојене вакуоле уочавају се у виду поумесеца уз мембрану ћелија.



Слика 10. Усмеравање ћелија апикалне папиле ка адипоцитима у присуству медијума за усмеравање (А, Б, В) и контролна група гајена у комплетном медијуму (Г); инвертни микроскоп А, Г 40x; Б 200x; В 400x

#### 4.1.4.2.3. Квалитативно доказивање усмеравања ћелија апикалне папиле ка хондроцитима

У присуству медијума за хондрогено усмеравање, ћелије апикалне папиле у густој ћелијској суспензији у виду капи формирале су компактну лоптасту формацију на крају периода усмеравања (Слика 11. А), која на хистолошком пресеку јасно показује пребојеност гликозаминогликана (Слика 11. Б). Ћелије у виду монослоја у присуству медијума за хондрогену диференцијацију такође показују јасну диферентованост ка хондроцитима (Слика 11. В).

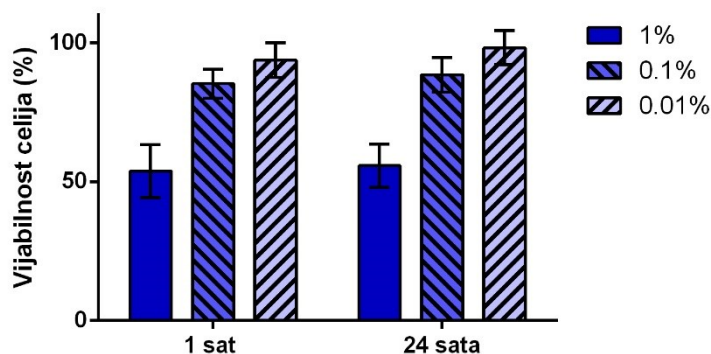


Слика 11. Усмеравање ћелија апикалне папиле ка хондроцитима у присуству медијума за усмеравање (А, Б, В) и контролна група гајена у комплетном медијуму (Г); инвертни микроскоп А, Б, Г 40x; В 100x

## 4.2. *In vitro* истраживање утицаја ласера на *SCAP* ћелије

### 4.2.1. Испитивање биокомпатибилности диодног ласера и *PDT* на *SCAP* ћелије - есеј митохондријске активности (*MTT*) и есеј вијабилности ћелија (*NR*)

Прелиминарно, током испитивања дејства фотодинамске терапије (*PDT*) на *SCAP* ћелије било је неопходно испитати вијабилност ћелија након излагања различитим концентрацијама фотосензитивног агенса фенотијазина (1%, 0,1% и 0,01%) након 1 и 24 сата (Графикон 2).

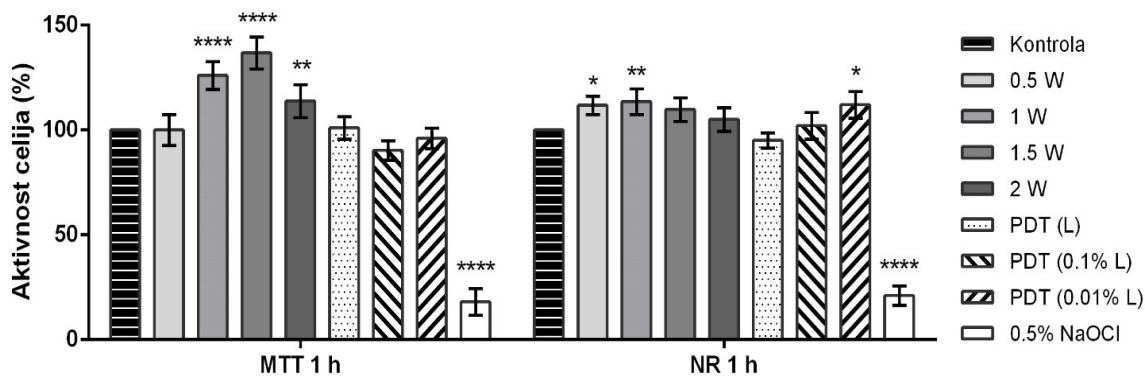


Графикон 2. Тест вијабилности ћелија (Неутрално црвено) након 1 сата и 24 сата од излагања ћелија растућим концентрацијама фенотијазина.

Након утврђених одговарајућих концентрација фенотијазина које не делују цитотоксично на *SCAP* ћелије (0,1% и 0,01%) (Графикон 2), испитана је митохондријска активност и вијабилност ћелија после 1 сата, 1 дана и 7 дана од дејства ласера велике снаге (940 nm), као и дејства фотодинамске терапије (*PDT*).

У периоду након једног сата од излагања ћелија диодном ласеру (940 nm), уочена је појачана митохондријска активност, у односу на нетретиране ћелије. Митохондријска активност је зависила од примењене снаге. Снаге ласера од 1 W и 1,5 W изазвале су највећу побуђеност митохондријске активности ћелија, док је побуђеност митохондријске активности била значајно већа у односу на нетретиране ћелије и код снаге од 2W. Након једног сата од зрачења ћелија примећена је и значајна вијабилност ћелија озрачених ласером велике снаге (940 nm) при снагама од 0.5 W и 1 W, у односу на нетретиране ћелије (Графикон 3).

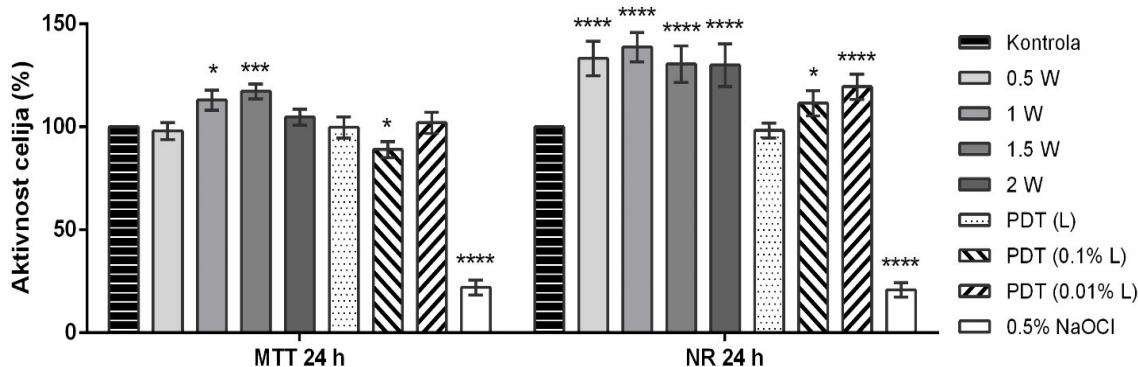
У периоду након једног сата од излагања ћелија *PDT* третману није уочено одступање у митохондријској активности у односу на нетретирание ћелије. Истовремено посматрајући резултате *NR* теста након *PDT* третмана уочена је значајна пролиферација ћелија у групи 0.01% фенотијазин уз зрачење ласером мале снаге (Графикон 3).



Графикон 3. Митохондријска активност (*MTT*) и пролиферација ћелија (*NR*), након 1 сата од излагања ћелија ласерима по описаним протоколима. Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретирание ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Након 24 сата, митохондријска активност ћелија је била значајно повећана у групама третираним 940 nm ласером, снагама 1 W и 1,5 W, док се у групама третираним снагама 0,5 W и 2 W митохондријска активност није значајно разликовала од нетретираних ћелија. Тест вијабилности ћелија након 24 сата показао је значајно повећану пролиферацију ћелија у свим групама третираним 940 nm ласером (Графикон 4).

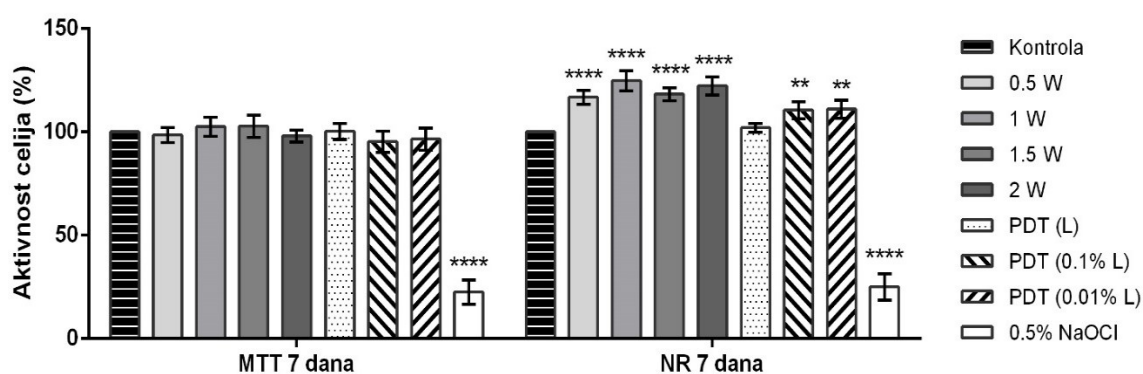
Са друге стране, анализирајући резултате дејства *PDT* на ћелије после 24 сата од третмана, уочена је статистички значајно нижа митохондријска активност ћелија након третмана фенотијазином у концентрацији 0,1% уз зрачење ласером мале снаге. Есеј вијабилности ћелија изложених *PDT* третману показао је статистички значајну пролиферацију ћелија изложених фенотијазину у обе испитиване концентрације (0,1% и 0,01%) (Графикон 4).



Графикон 4. Митохондријска активност (*MTT*) и пролиферација ћелија (*NR*) 24 сата од излагања ћелија ласерима по описаним протоколима. Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретирание ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

Када је у питању трећи временски интервал, седам дана након зрачења ћелија ласером, уочено је да се митохондријска активност ћелија, у обе огледне групе, није статистички значајно разликовала од нетретираних ћелија.

Анализа есеја вијабилности (*NR*) показала је статистички значајно повећану вијабилност матичних ћелија у обе огледне групе, и то код свих примењених снага ласера 940 nm, као и након *PDT* третмана код обе примењене концентрације фенотијазина (Графикон 5).

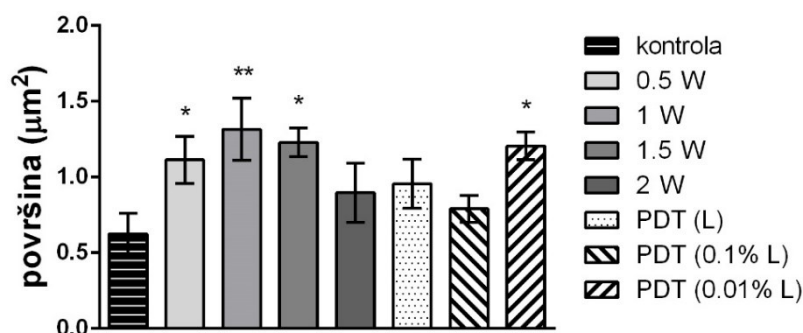


Графикон 5. Митохондријска активност (*MTT*) и пролиферација ћелија (*NR*) 7 дана након излагања ћелија ласерима по описаним протоколима. Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретиране ћелије) означене су симболима, (\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

#### 4.2.2. Потенцијал миграције *SCAP* ћелија након зрачења - есеј огреботине

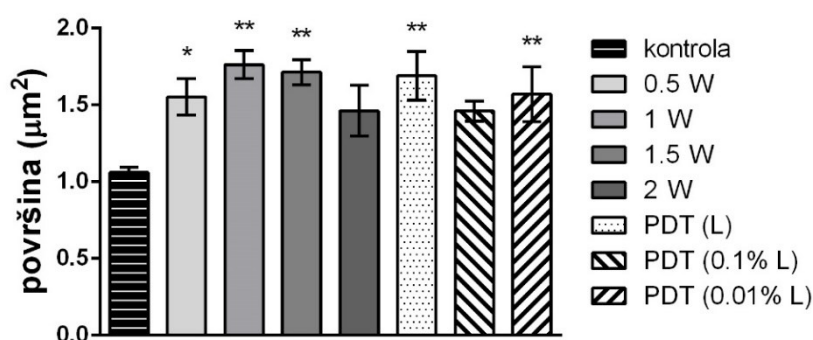
Утицај ласера (940 nm и *PDT*) на потенцијал миграције *SCAP* ћелија, измерен након 24 сата и 48 сати у огледним групама и групи без третмана приказан је на графикону 6. А и 6. Б.

Након 24 сата уочен је позитивни утицај зрачења ћелија на њихов потенцијал миграције. Значајно већа површина испуњена ћелијама након 24 сата миграције из суседног простора забележена је у групама третираним 940 nm ласером, при снагама 0,5 W, 1 W и 1,5 W, као и при дејству *PDT* у нижој испитиваној концентрацији фенотијазина (0,01%) уз зрачење ласером мале снаге (Графикон 6. А).



Графикон 6. А. Површина коју су ћелије попуниле након 24 сата од прављења огреботине у средини бунарића и дејства ласера по утврђеним протоколима. Једносмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретиране ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).

Након 48 сати од почетка огледа позитиван утицај ласера на миграцију ћелија забележен је у свим огледним групама у односу на нетретиране ћелије, изузев код снаге од 2 W ласера велике снаге, и PDT терапије у концентрацији фенолтијазина 0,1% (Графикон 6. Б).



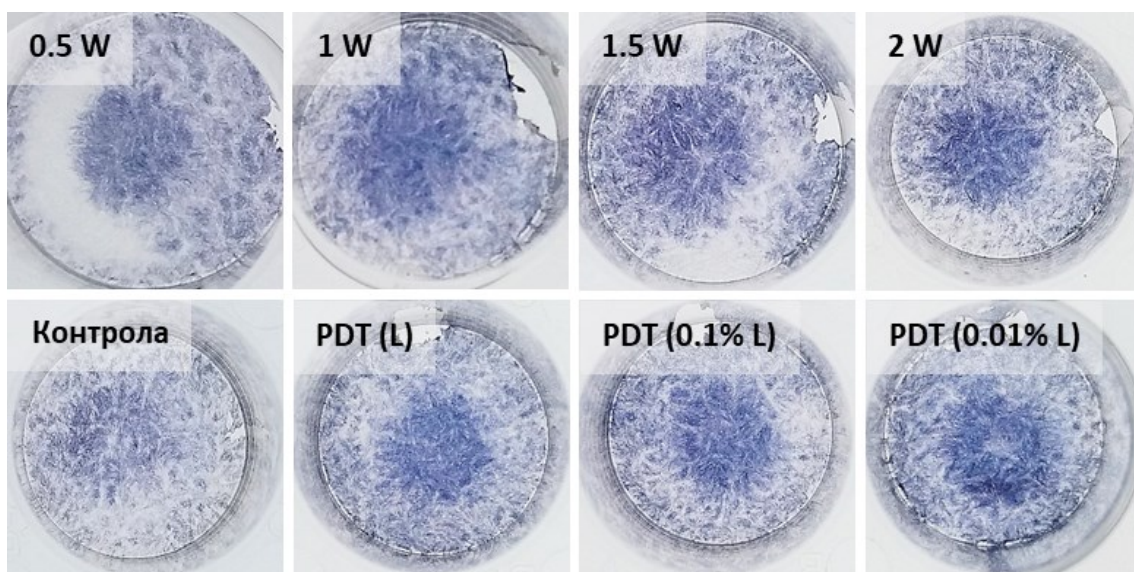
Графикон 6. Б. Површина коју су ћелије попуниле након 48 сати од прављења огреботине у средини бунарића и дејства ласера по утврђеним протоколима. Једносмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретиране ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ).



### 4.2.3. Усмеравање *SCAP* ћелија након зрачења ка одонто/остеогеној ћелијској линији

#### 4.2.3.1. Потенцијал стварања алкалне фосфатазе у ћелијама након зрачења

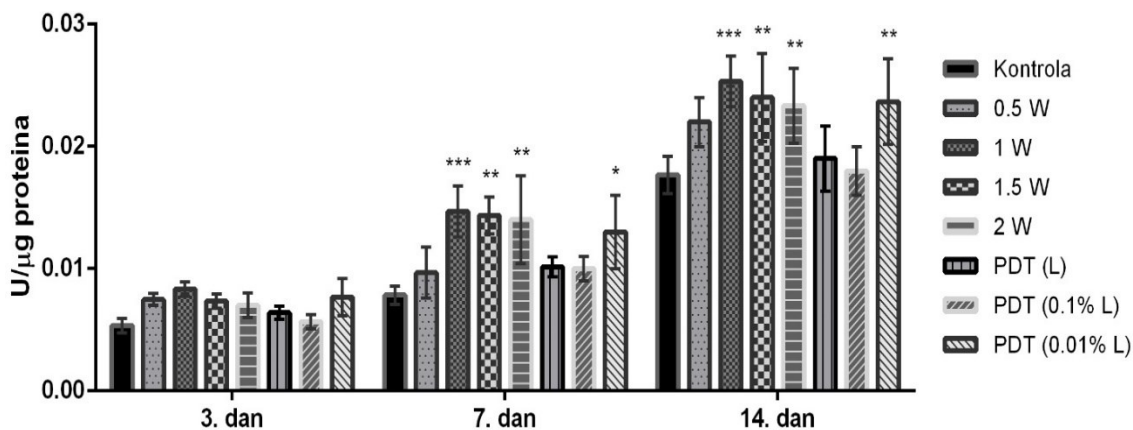
Бојење ензима алкалне фосфатазе (*ALP*) у ћелијама након излагања третманима ласера и култивације 7 дана у медијуму за остеогено усмеравање приказано је на слици 12.



Слика 12. Макроскопски приказ бојења алкалне фосфатазе у монослоју ћелија након 7 дана од третмана и гајења у медијуму за усмеравање.

Истовремено, приказан је и измерени ниво *ALP*-а у ћелијама, и то 3, 7 и 14 дана након излагања ћелија третманима ласера и гајења у медијуму за индукцију остеогеног усмеравања (Графикон 7). Три дана након третмана и почетка одонто/остеогеног усмеравања, ниво *ALP*-а није се разликовао међу групама и одговарао је вредностима *ALP*-а у контролној групи (нетретирание ћелије). Седмог дана ниво *ALP*-а у ћелијама био је статистички значајно већи у групама изложеним 940 nm ласеру, при снагама 1 W, 1,5 W и 2 W, као и при дејству *PDT* у нижој испитиваној концентрацији фенотијазина (0,01%) уз зрачење ласером мале снаге. Након 14 дана од третмана уочен је сличан ефекат оба ласера као и после 7 дана, с

тим што је забележен и већи ниво *ALP*-а у третираним ћелијама у обе огледне групе (Графикон 7).



Графикон 7. Ниво *ALP*-а измерен у ћелијама у одређеним временским интервалима у огледним групама. Приказане вредности *ALP*-а нормализоване су у односу на концентрацију укупних протеина у ћелијама. Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретиране ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

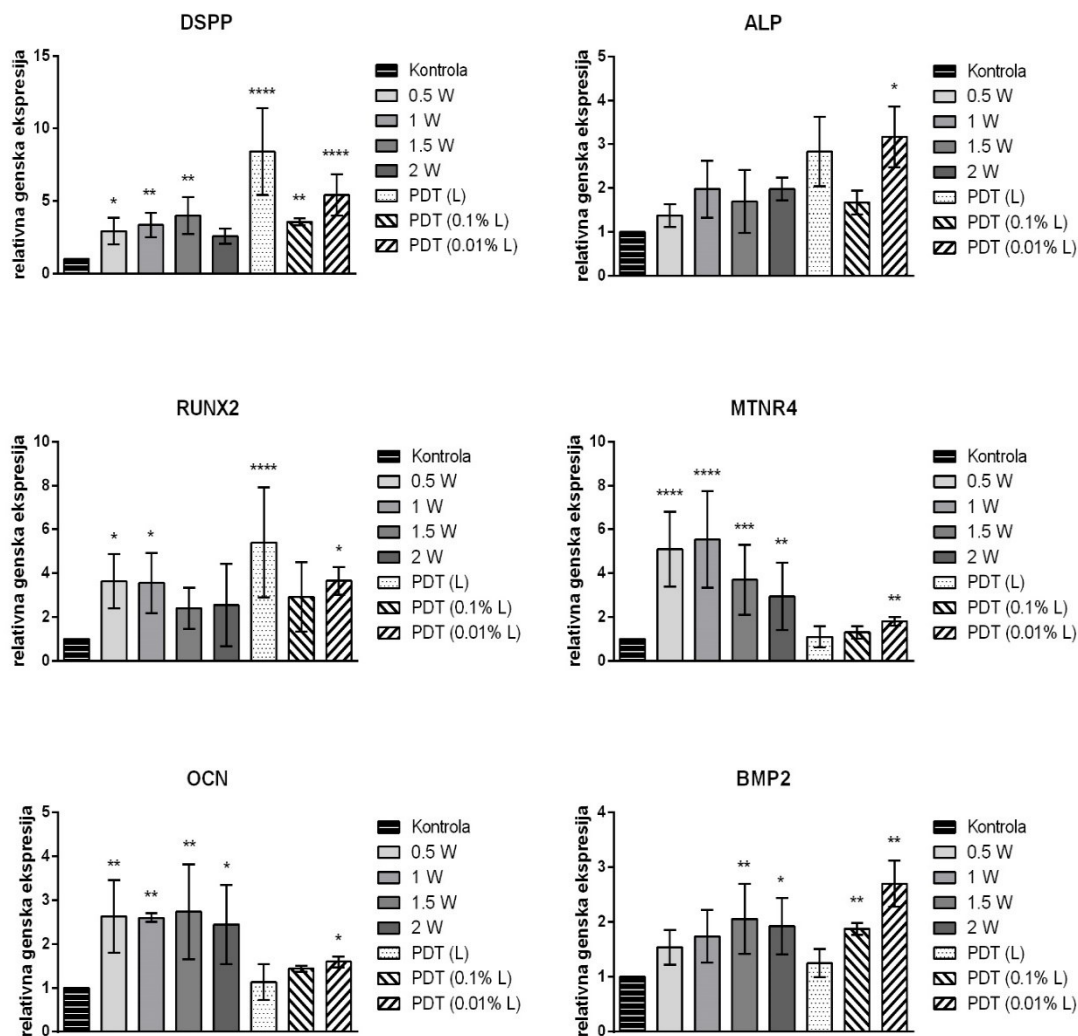
#### 4.2.3.2. Експресија гена - маркера одонто/остеогеног усмеравања након дејства ласера на *SCAP* ћелије

Ниво експресије маркера одонто/остеогеног усмеравања након 3 недеље од третмана ћелија ласерима и гајења у медијуму за индукцију одонто/остеогеног усмеравања, приказан је на графикону 8.

Ниво експресије гена *DSPP* и *RUNX2* био је значајно већи након дејства *PDT* третмана на ћелије. Значајно повећана експресија свих испитиваних гена је забележена након примене фенотијазина (0,01%) уз зрачење ласером мале снаге (Графикон 8).

При дејству ласера од 940 nm значајно повећање нивоа испољавања гена је забележено при испитивању гена *MTNR4* и *OCN* при дејству свих испитиваних

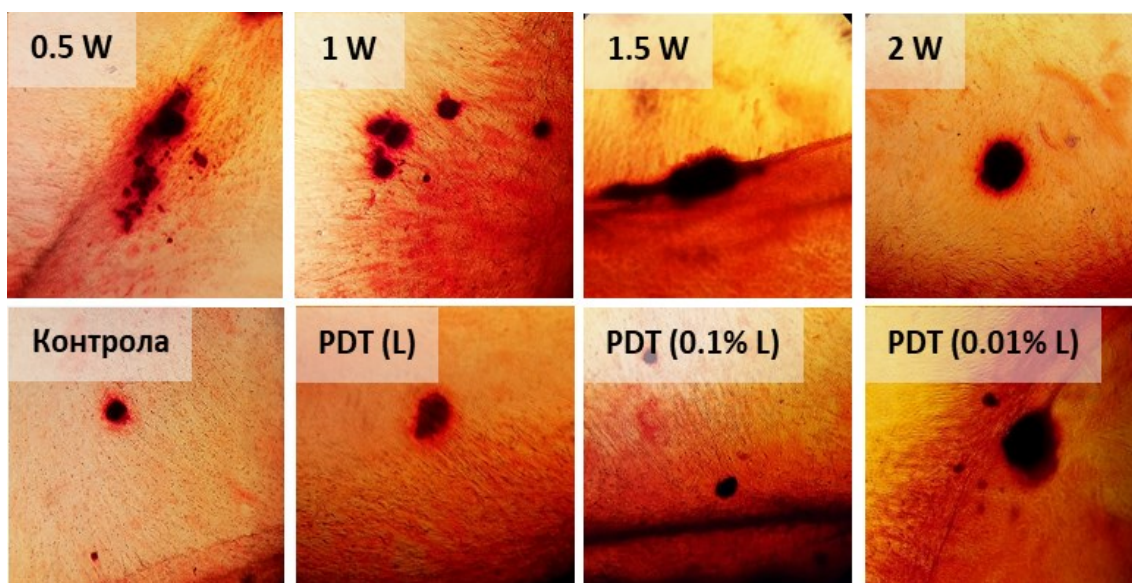
снага, док је ниво испољавања гена *DSPP*, *RUNX2* и *BMP2* било значајно веће при дејству појединих снага, зависно од маркера (Графикон 8).



Графикон 8. Ниво релативне генске експресије након 3 недеље од излагања ћелија третманима и гајења у медијуму за одонто/остеогено усмеравање. Представљене вредности генске експресије анализираних маркера добијене су дељењем добијених вредности за огледну групу у односу на остеогено усмерене ћелије без третмана ласером (контрола). Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на контролну групу (нетретиране ћелије) означене су симболима (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ).

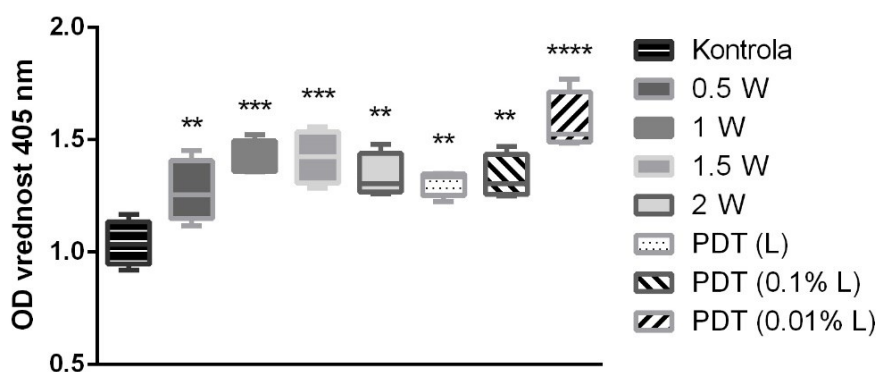
#### 4.2.3.3. Квалитативно доказивање остеогеног усмеравања ћелија озрачених ласерима бојењем Ализарин црвеним

Три недеље након третмана ласерима, и усмеравања *SCAP* ћелија као одонто/остеогеној ћелијској линији, ванћелијске глобуле калцијума бојене су Ализарин црвеним (Слика 13). Количина створених калцијумских депозита директно је пропорционална успешности усмеравања и зрелости ћелија.



Слика 13. Ћелије обојене Ализарин црвеним након третмана ласерима и 21 дана гајења у медијуму за усмеравање; инвертни микроскоп 100x

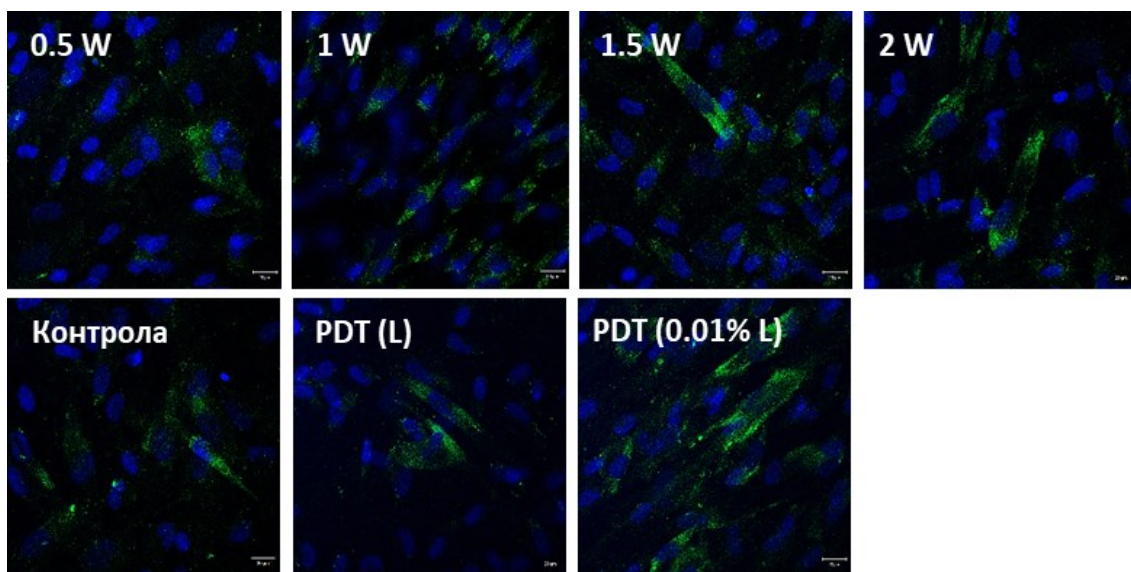
Специфично везана боја је растворена и спектрофотометријски квантификована. Све огледне групе показале су статистички значајну разлику у способности депоновања калцијума на површини, у односу на нетретиране ћелије (контролу). У огледним групама, код 940 nm ласера зависност од примењене снаге показана је и у овом тесту, док је у групама са *PDT* третманом нижа концентрација боје (0,01%) уз примену ласера мале снаге показала веома значајну количину депонованог калцијума (Графикон 9).



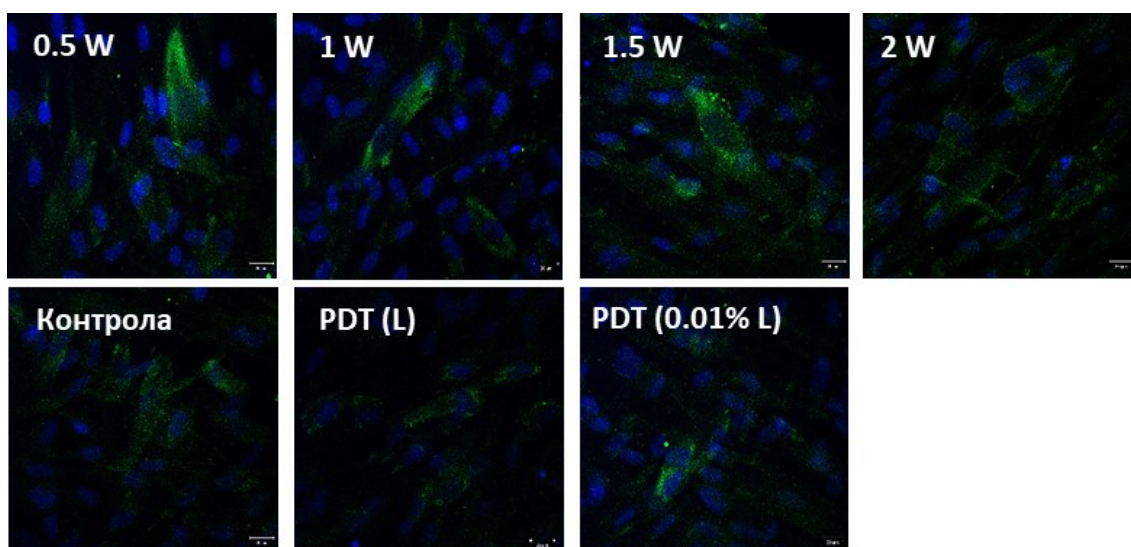
Графикон 9. Вредности растворене специфично везане боје Ализарин црвено, у контролној и огледним групама. Једносмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне разлике у односу на нетретиране ћелије (контролу) означене су симболима (\*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

#### 4.2.3.4. Имуноцитохемијска анализа испољавања одабраних протеина - маркера одонто/остеогеног усмеравања ћелија након дејства ласера

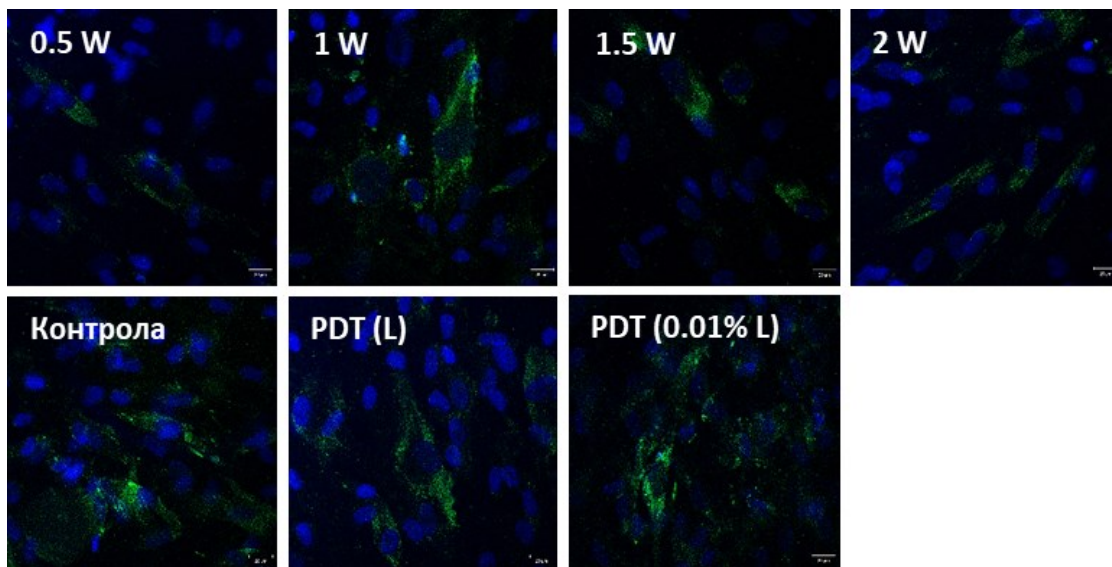
Специфично бојење антителима за *BMP2*, *OCN* и *OPN* протеине урађено након 21 дана од третмана ласерима и гајења у медијуму за одонто/остеогено усмеравање *SCAP* ћелија приказано је на сликама 14, 15 и 16. Контролну групу чиниле су ћелије без третмана ласером, гајене у медијуму за одонто/остеогено усмеравање. Испољавање *BMP2* и *OCN* протеина показало се интензивнијим, у односу на испољавање *OPN* протеина у огледним групама,



Слика 14. Квалитативно бојење анти-*BMP2* антитела *SCAP* ћелија по групама



Слика 15. Квалитативно бојење анти-*OCN* антитела *SCAP* ћелија по групама

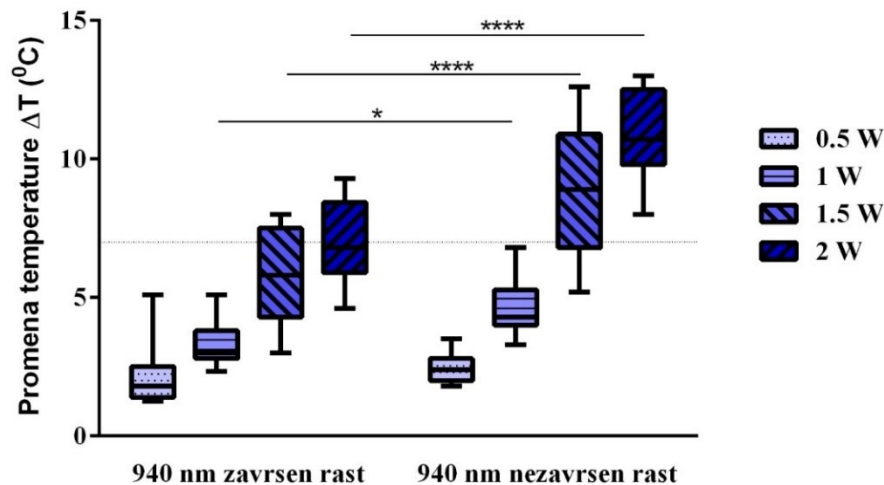


Слика 16. Квалитативно бојење анти-*OPN* антитела *SCAP* ћелија по групама

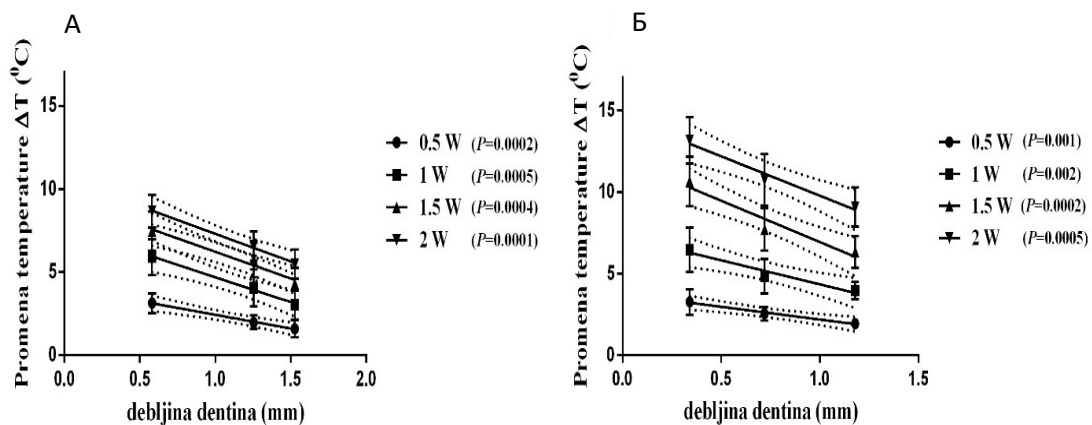
#### 4.3. Испитивање безбедности примене ласера велике снаге (940 nm)

Пре клиничке примене ласера велике снаге (940 nm), било је потребно испитати сигурност клиничке примене на младим сталним зубима, у погледу раста температуре на спољашњој површини корена зуба током зрачења.

Примењене снаге од 0,5 W и 1 W показале су се као безбедне за примену протокола зрачења канала корена зуба током ендодонтске терапије. Снага од 1,5 W показала се безбедном на зубима са завршеним растом корена, док на зубима са незавршеним растом корена прелази безбедну границу загревања од 7 °C. Снага од 2 W није се показала безбедном за примену у обе испитиване групе (Графикони 10). Зависност повећања температуре од дебљине дентина корена по трећинама показала се значајном у свим испитиваним групама (Графикон 11).



Графикон 10. Вредности промене температуре на спољашњој површини корена након зрачења зуба растућим снагама ласера 940 nm. Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајне промене температура између група при примењеним истим снагама ласера означене су симболима; \*  $p < 0,5$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$



Графикон 11. Линеарна регресиона анализа вредности промене температуре на спољашњој површини корена у зависности од дебљине дентина корена у вратној, средњој и апикалној трећини. Промена температуре је праћена при зрачењу растућим снагама ласера 940 nm зуба са завршеним (А) и незавршеним растом корена (Б).



#### 4.4. Рандомизована контролисана клиничка студија

##### 4.4.1. Клиничка фаза истраживања примене дидоног ласера (940 nm) и PDT у ендодонтском лечењу младих сталних зуба

Приближно једнак проценат предњих и бочних зуба је био заступљен у групама. У свим групама су била заступљена иреверзибилна обољења пулпе зуба: некроза, гангрена, и хронични апикални пародонтитис (ХАП). Процентуална заступљеност обољења пулпе у групама приказана је у Табели 5.

Табела 5. Заступљеност денталних група и дијагноза зуба по групама, приказана у процентима (%)

група зуба (%)	Група 1 (Контрола)		Група 2 (940 nm)		Група 3 (PDT)	
	предњи	бочни	предњи	бочни	предњи	бочни
	70	30	75	25	75	25
некроза (%)	50		56		6	
гангрена (%)	40		31		50	
ХАП (%)	10		13		44	

##### 4.4.2. Резултати антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији

###### 4.4.2.1. Резултати квантитативних анализа антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији

Примарна микробиолошка анализа брисева узетих током иницијалног лечења показала је заступљеност великог броја микроорганизама у свим узорцима узетим пре обраде канала корена. Након стандардне механичко-медикаментозне обраде канала број микроорганизама се значајно смањио у свим групама што је потврђено молекуларном методом (*qPCR*) и култивацијом (*CFU/ml*) узорака (Табеле 6, 7 и 8).

Поређењем броја микроорганизама унутар узорка пре обраде канала (брис I), између свих експерименталних група, није нађена статистички значајна разлика. Такође, поређењем броја микроорганизама након обраде канала коренова (брис II) између свих експерименталних група, није нађена статистички значајна разлика. Тиме је показано да је стандардна обрада канала довела је до сличног смањења броја микроорганизама у свим групама, односно да је стандардни протокол обраде канала коренова примењен подједнако у свим групама.

Табела 6. Квантификација укупних бактерија *qPCR* методом (генске копије *16S rDNK/ml*) и култивацијом (*CFU/ml*) узорака код контролне групе (група 1), у узорцима пре (брис I) и након обраде канала корена третираних зуба (брис II). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике средњих вредности у односу на брис I означене су одговарајућим симболима.

<b>Група 1 (Контрола)</b>			
<i>qPCR</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	<i>Min. - Max.</i>
<b>брис I</b>	$7 \times 10^5$ ( $6 \times 10^5$ )	$5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^3 - 1,8 \times 10^6$
<b>брис II</b>	$6 \times 10^3$ ( $4 \times 10^3$ ) <sup>a</sup>	$6 \times 10^3$	$1,1 \times 10^3 - 1,2 \times 10^3$
<i>CFU/ml</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	<i>Min. - Max.</i>
<b>брис I</b>	$1,5 \times 10^6$ ( $1,7 \times 10^6$ )	$7,3 \times 10^5$	$6,2 \times 10^4 - 5,2 \times 10^6$
<b>брис II</b>	$3 \times 10^2$ ( $3 \times 10^2$ ) <sup>b</sup>	$2,7 \times 10^2$	0 - $8 \times 10^2$

<sup>a</sup>  $p < 0,0001$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$

Након третмана ласерима у одговарајућим групама, анализом добијених резултата из узорака (брис III) забележено је додатно смањење броја МО (Табеле 7 и 8). Број МО је значајно умањен у односу на број МО пре обраде канала коренова (брис I), док статистички значајно смањење укупног броја микроорганизама није забележено између стандардне обраде канала коренова (брис II) и након примене ласера у групи 2 и 3 (брис III).

Табела 7. Квантификација укупних бактерија *qPCR* методом (генске копије *16S rDNK/ml*) и култивацијом (*CFU/ml*) узорака код огледне групе (група 2), из узорака пре (брис I), након обраде канала корена третираних зуба (брис II), и након третмана 940 nm ласером (брис III). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике средњих вредности у односу на брис I означене су одговарајућим симболима.

Група 2 (940 nm)			
<i>qPCR</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	Min. - Max.
брис I	$6,6 \times 10^5$ ( $5,8 \times 10^5$ )	$5,9 \times 10^5$	$6,6 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^6$
брис II	$5,5 \times 10^3$ ( $3,6 \times 10^3$ ) <sup>a</sup>	$4,1 \times 10^3$	$6 \times 10^2$ - $1,3 \times 10^4$
брис III	$2,2 \times 10^3$ ( $2 \times 10^3$ ) <sup>a</sup>	$1,8 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$ - $5,8 \times 10^3$
<i>CFU/ml</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	Min. - Max.
брис I	$1,4 \times 10^6$ ( $1,9 \times 10^6$ )	$3,5 \times 10^5$	$6 \times 10^4$ - $6,2 \times 10^6$
брис II	$4 \times 10^2$ ( $4,8 \times 10^2$ ) <sup>b</sup>	$2 \times 10^2$	0 - $1,7 \times 10^3$
брис III	$6 \times 10^1$ ( $8 \times 10^1$ ) <sup>a</sup>	$1 \times 10^1$	0 - $2 \times 10^2$

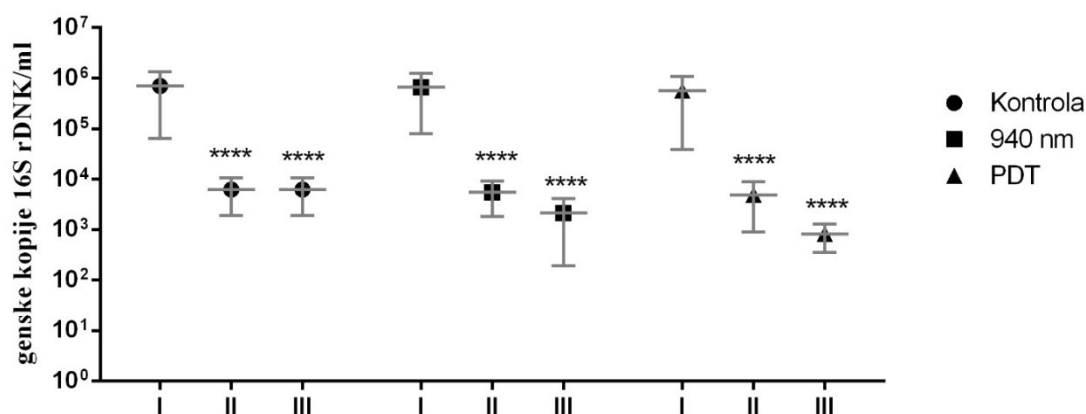
<sup>a</sup>  $p < 0,0001$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$

Табела 8. Квантификација укупних бактерија *qPCR* методом (генске копије *16S rDNK/ml*) и култивацијом (*CFU/ml*) узорака код огледне групе (група 3) из узорака пре (брис I), након обраде канала корена третираних зуба (брис II), и након дејства PDT (брис III). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике средњих вредности у односу на брис I означене су одговарајућим симболима.

Група 3 (PDT)			
<i>qPCR</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	Min. - Max.
брис I	$5,6 \times 10^5$ ( $5,2 \times 10^5$ )	$4,4 \times 10^5$	$2,3 \times 10^4$ - $1,5 \times 10^6$
брис II	$4,9 \times 10^3$ ( $4 \times 10^3$ ) <sup>a</sup>	$2 \times 10^3$	$4,2 \times 10^2$ - $1,4 \times 10^4$
брис III	$8,2 \times 10^2$ ( $4,7 \times 10^2$ ) <sup>a</sup>	$3,8 \times 10^2$	$2,5 \times 10^2$ - $1,7 \times 10^3$
<i>CFU/ml</i>	Средња вредност ( $\pm$ SD)	Медијана	Min. - Max.
брис I	$1,2 \times 10^6$ ( $1,3 \times 10^6$ )	$5,3 \times 10^5$	$3,4 \times 10^4$ - $4 \times 10^6$
брис II	$4,2 \times 10^2$ ( $5,1 \times 10^2$ ) <sup>b</sup>	$2,7 \times 10^2$	0 - $2 \times 10^3$
брис III	$5,6 \times 10^1$ ( $1,1 \times 10^2$ ) <sup>a</sup>	0	0 - $4 \times 10^2$

<sup>a</sup>  $p < 0,0001$ , <sup>b</sup>  $p < 0,01$

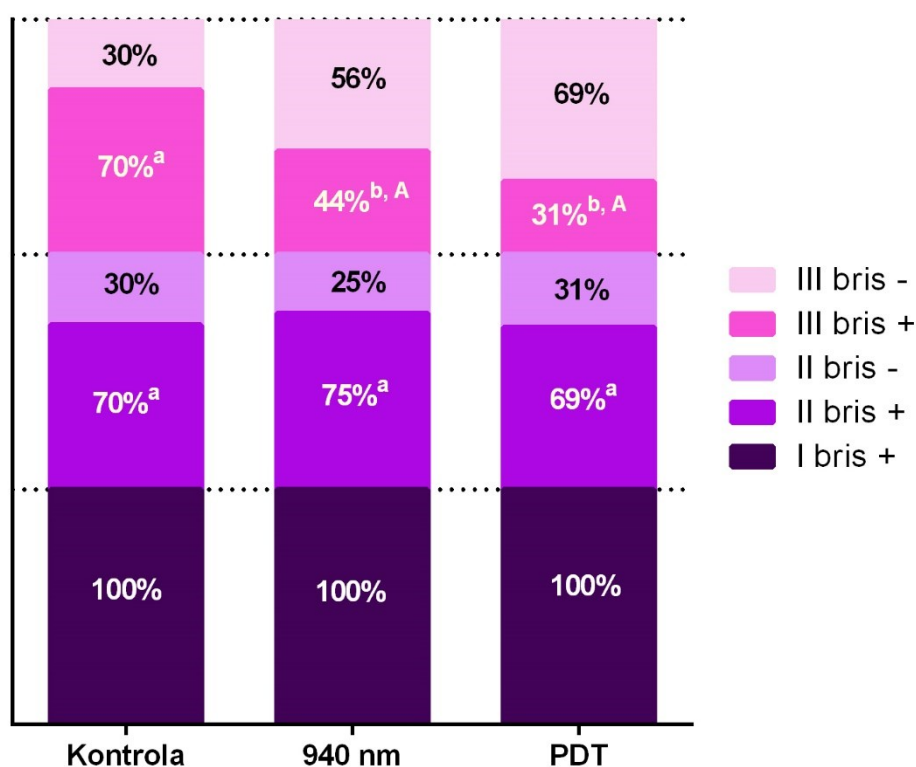
Анализом резултата добијених *qPCR* методом у све три огледне групе забележено је статистички значајно смањење укупног броја 16S бактеријских гена у узорцима из брисева II и III, у односу на брис I. Из узорака бриса III заступљен је тренд опадања укупног броја 16S бактеријских гена у огледној групи 2 (940 nm) и огледној групи 3 (PDT), у којој су заступљене најниже вредности. Међутим, није нађена статистички значајна разлика између вредности бриса II и бриса III у групама 2 и 3 након третмана одговарајућим ласерима (Графикон 12).



Графикон 12. Средње вредности ( $\pm$ SD) укупног броја генских копија (*16S rDNK/ml*) бактеријске ДНК из свих узорака током лечења зуба контролне групе (група 1), огледне групе са применом диодног ласера (940 nm) (група 2), и огледне групе са применом фотодинамске терапије (група 3). Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајно смањење укупног броја генских копија бактеријске ДНК у узорцима у односу на почетне вредности (брис I) означено је одговарајућим симболом: \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Анализом резултата након култивације узорака на микробиолошким подлогама (*CFU/ml*) из брисева пре обраде канала корена (брис I) раст бактерија је забележен у свим групама из засејаних узорака. Након стандардне механичко-медикаментозне обраде канала (брис II), број узорака са вијабилним бактеријама у узорцима се смањило у све три експерименталне групе. У све три испитиване групе након стандардне обраде канала коренова уочен је статистички значајно мањи број зуба позитивних на присуство вијабилних бактерија је ( $p < 0,01$ ). Након обраде канала, показано је да не постоји статистички значајна разлика између испитиваних група.

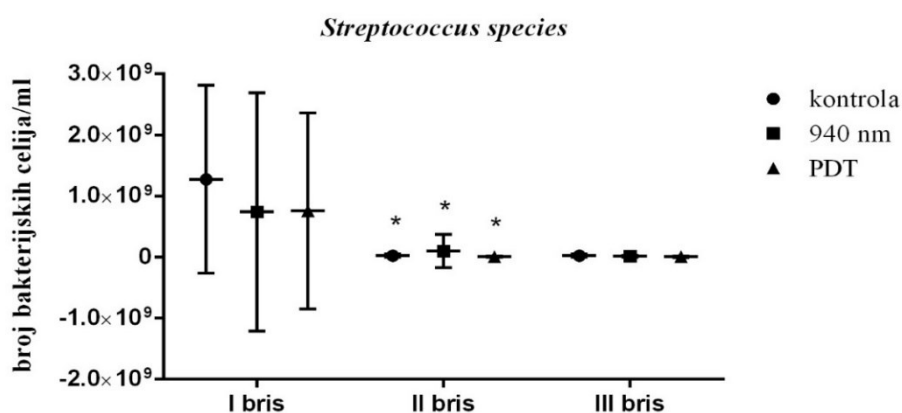
У узорцима након третмана ласерима у одговарајућим групама (брис III), број зуба позитивних на присуство вијабилних бактерија се додатно смањило у групама 2 и 3. У огледним групама 2 и 3 статистички значајна разлика је показана између броја позитивних узорака на присуство бактерија у узорцима пре обраде канала (брис I) и након третмана ласерима (брис III), ( $p < 0,0001$ ). Значајна разлика у групи 2 и групи 3 нађена је и између броја позитивних узорака на присуство бактерија у узорцима након обраде канала (брис II) и и након третмана ласерима (брис III), ( $p < 0,01$ ) (Графикон 13).



Графикон 13. Заступљеност позитивних (+) и негативних (-) узорака након стандардне микробиолошке култивације узорака током лечења зуба контролне групе (група 1), огледне групе са применом 940 nm диодног ласера (група 2), и огледне групе са применом фотодинамске терапије (група 3). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике у односу на узорке пре обраде канала (брис I) означене су малим словима (<sup>a</sup>  $p < 0,01$ , <sup>b</sup>  $p < 0,0001$ ), док су значајне разлике између узорака након обраде канала (брис II) и након третмана ласерима (брис III) означене великим словима (<sup>A</sup>  $p < 0,01$ ).

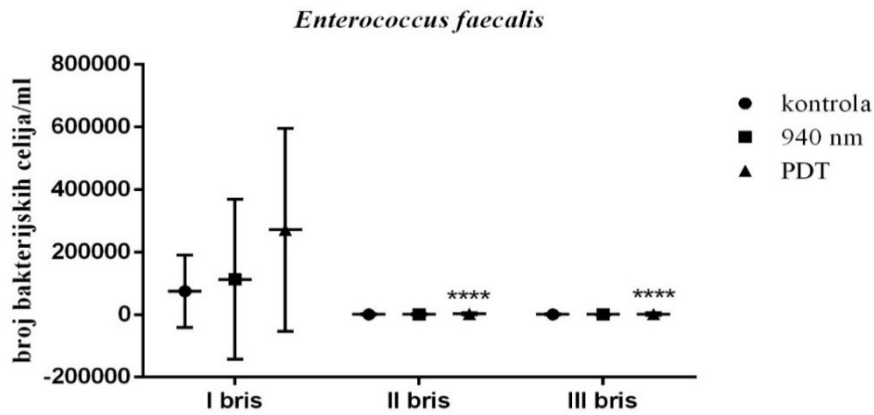
#### 4.4.2.2. Резултати квалитативних анализа антимикробног дејства испитиваних ласера у клиничкој студији

Бактеријска врста *Streptococcus spp* је детектована *qPCR* методом у готово свим узорцима пре и после третмана. Примећен је тренд смањења укупног броја бактеријских ћелија након стандардне механичко-медикаментозне обраде канала корена, као и након третмана ласерима, али без статистички значајних разлика између узорака (Графикони 14).



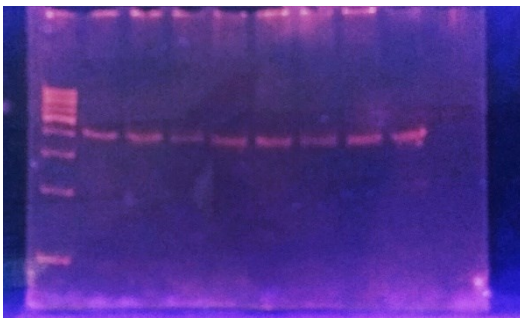
Графикон 14. Средње вредности ( $\pm$ SD) укупног броја бактеријских генома (ћелија) у ml узорка, бактеријске врсте *Streptococcus spp* из узорака током лечења зуба контролне групе (група 1), огледне групе са применом 940 nm диодног ласера (група 2), и огледне групе са применом фотодинамске терапије (група 3). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике у односу на узорке пре обраде канала (брис I) означене су симболом, \*  $p < 0,05$ .

Квантификација *E. faecalis* показала је тренд смањења броја бактеријских генома у узорцима након механичко-медикаментозне обраде канала корена у свим групама. Статистички значајна разлика забележена је између узорака пре обраде канала коренова и након обраде канала коренова, као и између узорака пре обраде канала коренова и након дејства PDT,  $p < 0,0001$ . У контролној групи и групи са применом диодног ласера (940 nm) уочен је пад броја бактеријских генома између узорака пре и после терапијских третмана, али без статистичке значајности (Графикон 15).

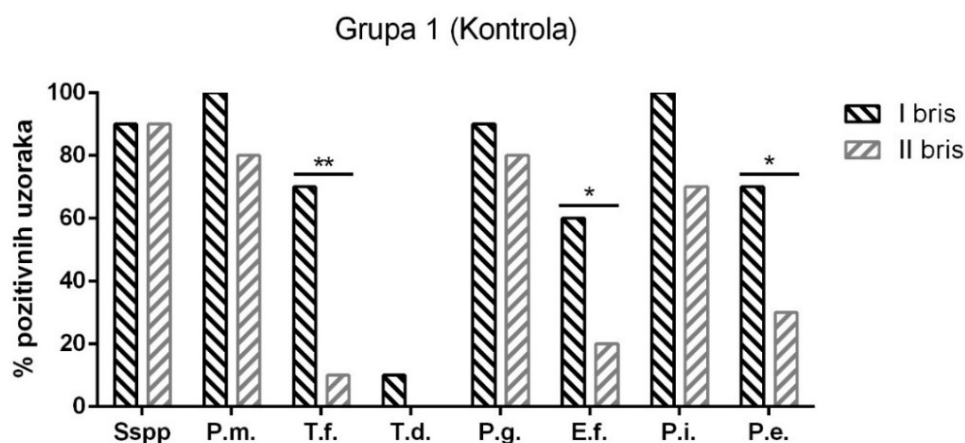


Графикон 15. Средње вредности ( $\pm$ SD) укупног броја бактеријских генома (ћелија) у ml узорка, за *E. faecalis* из узорака током лечења зуба контролне групе (група 1), огледне групе са применом 940 nm диодног ласера (група 2), и огледне групе са применом фотодинамске терапије (група 3). Т-тест и једносмерна анализа варијансе су коришћени, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике у односу на узорке пре обраде канала (брис I) означене су симболом, \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

Поред квантитативне анализе, путем класичног *PCR*-а урађена је и квалитативна анализа одабраних бактеријских врста током сва три третмана (слика 17). Пре терапијских третмана у све три огледне групе (брис I) показано је да у узорцима доминирају врсте *Streptococcus spp*, *Peptostreptococcus micros*, *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*. Бактеријске врсте *Tannerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis* и *Enterococcus faecalis* били су заступљени у узорцима у нешто нижем проценту, док је најмање заступљена бактеријска врста била *Treponema denticola* (Графикони 16, 17 и 18).



Слика 17. *PCR* производи *P. gingivalis* на полиакриламидном гелу.



Графикон 16. Заступљеност специфичних бактеријских врста у узорцима пре (брис I) и после (брис II) стандардне ендодонтске обраде канала корена изражена у процентима. Хи квадрат тест је коришћен, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајно смањење заступљености означено је одговарајућим симболима, (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

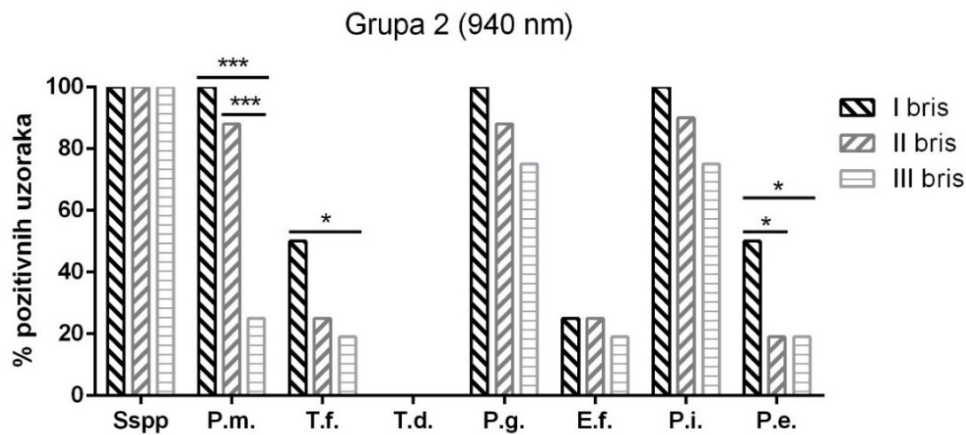
Након механичко-медикаментозне обраде канала коренова статистички значајно смањење присуства бактерија у каналима је доказана за *T. forsythia*-у, *P. endodontalis* и *E. faecalis* у групи 1. У групи 2 смањење у узорцима након обраде канала (брис II) је забележено за врсте *P. micros* и *P. endodontalis*, док је у групи 3 смањен број позитивних узорака за *T. forsythia*-у (Графикони 17 и 18).

Након дејства диодног ласера (940 nm) у групи 2 и фотодинамске терапије у групи 3 је нађено значајно смањење позитивних узорака на бактеријске врсте *P. micros*, *T. forsythia* и *P. endodontalis* (Графикони 17 и 18).

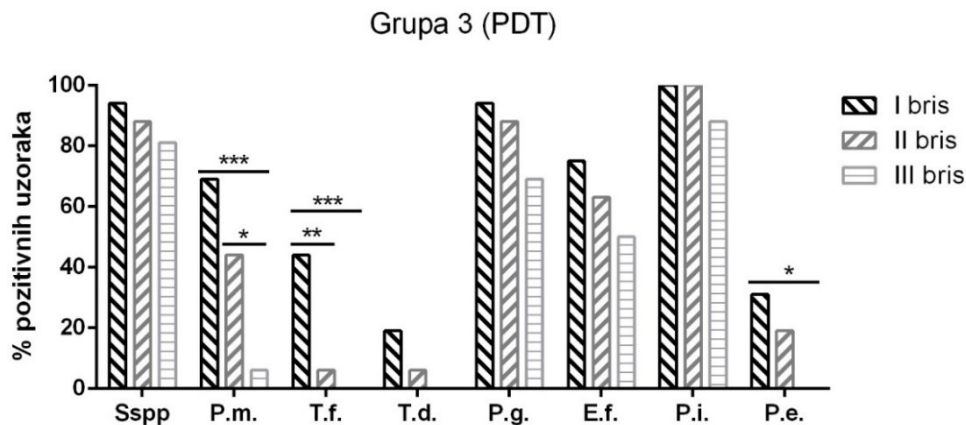
Прецизније, у огледној групи 2 потврђен је и додатни антибактеријски ефекат ласера 940 nm (од бриса 2 до бриса 3), јер је уочено значајно смањење врсте *P. micros*, док су остале врсте (осим *Streptococcus spp.*) показале тренд смањења заступљености.

Исто тако, у огледној групи 3 потврђен је и додатни антибактеријски ефекат фотодинамске терапије (од бриса 2 до бриса 3), јер је уочено значајно смањење врсте *P. micros*, док су остале врсте показале тренд смањења заступљености или потпуно одсуство у случају врста *T. forsythia* и *P. endodontalis* (Графикони 17 и 18).





Графикон 17. Заступљеност специфичних бактеријских врста у узорцима пре (брис I) и после (брис II) стандардне ендодонтске обраде канала корена, и након третмана 940 nm ласером (брис III), изражена у процентима. Хи квадрат тест је коришћен, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Статистички значајно смањење заступљености означено је одговарајућим симболима, (\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

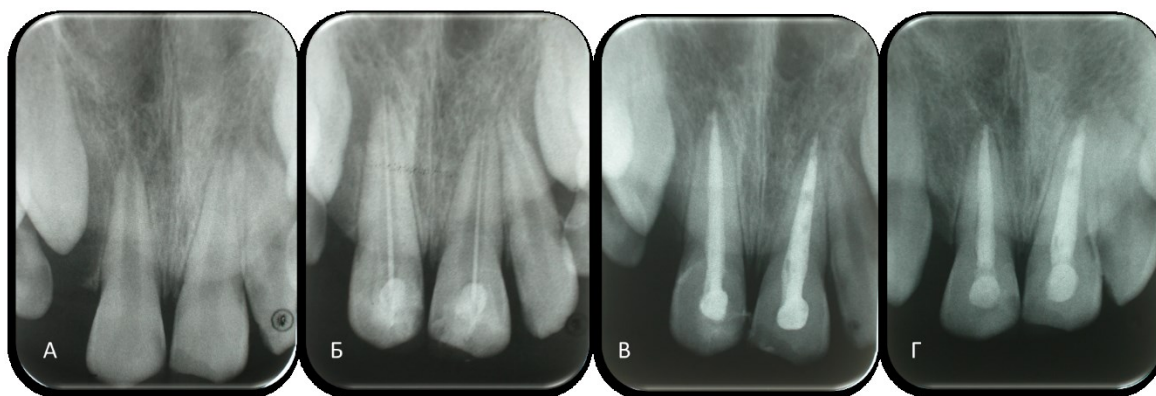


Графикон 18. Заступљеност специфичних бактеријских врста у узорцима пре (брис I) и после (брис II) стандардне ендодонтске обраде канала корена, и након третмана фотодинамском терапијом (брис III), изражена у процентима. Хи квадрат тест је коришћен, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Значајне разлике у односу на узорке пре обраде канала (брис I) означене су Статистички значајно смањење заступљености означено је одговарајућим симболима, (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ).

#### 4.4.2.3. Клиничко праћење пацијената

Након деловања *PDT*-ом, било је видљиво благо пребојавање зуба фенотијазином на спољашњој површини крунице у вратном делу, упркос примени заштитног средства по препоруци произвођача. Пребојеност је била пролазног карактера и нестајала је у првој недељи лечења. Нису забележене друге нелагодности од стране пацијената везане за третмане ласерима.

Након 6 месеци, клиничким прегледом и на рендген снимцима лечени зуби нису показивали знаке и симптоме ендодонтског обољења нити друге патолошке промене на корену зуба. Код зуба са развијеном периапикалном лезијом на почетку лечења уочени су знаци смањења периапикалних лезија уз формирање новог коштаног ткива (Слика 18).

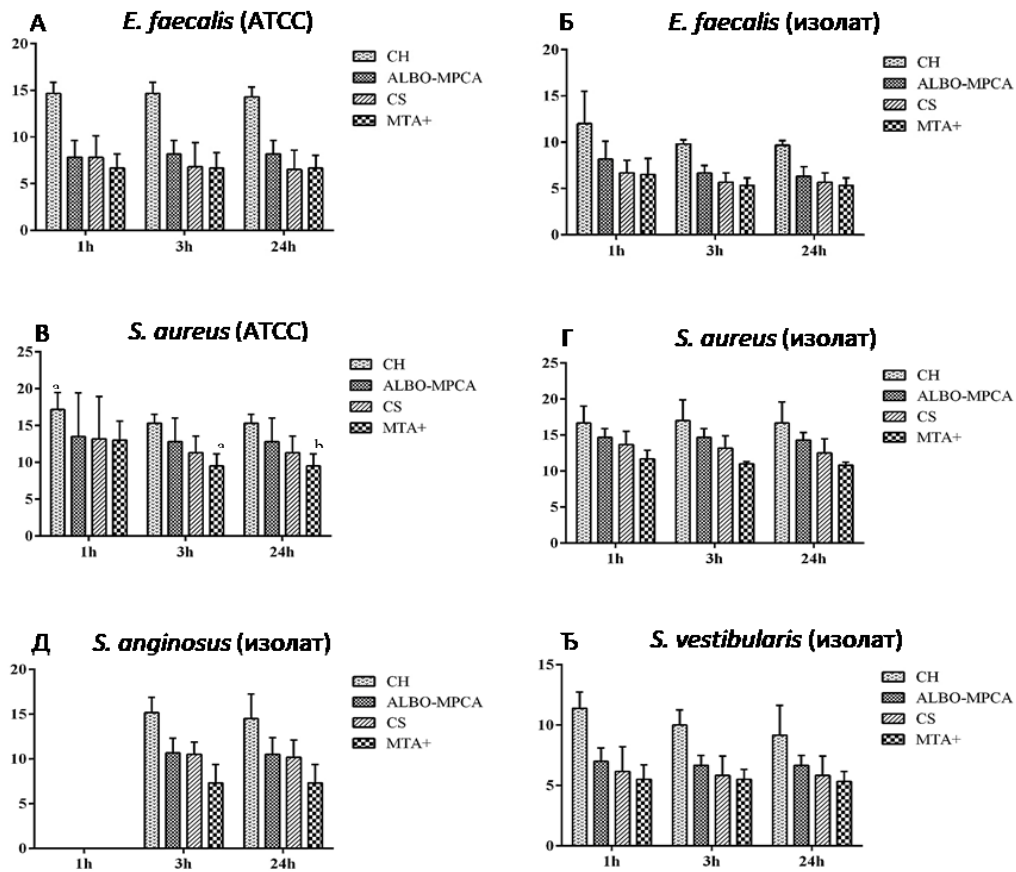


Слика 18. Рендген снимци на почетку терапије диодним ласером велике снаге (зуб 11) и стандардном ендодонтском терапијом (зуб 21) (А), током ендодонтског лечења зуба 11 и 21 (Б), након дефинитивног пуњења 3 месеца након почетка лечења (В), и контролни снимак након 6 месеци од почетка лечења (Г).

#### 4.4.3. Антибактеријско дејство ендодонтских материјала на бактеријске изолате из канала корена

Највеће инхибиционе зоне за све испитиване бактерије уочене су око кацијум-хидроксида (*CH*). Потпуна инхибиција раста *S. anginosus* у присуству испитиваних материјала уочена је након 1 сата. Након 24 сата најјаче антимикубно дејство на *S. aureus* АТСС уочено је код *CH* ( $16.67 \pm 2.34$  mm) и *ALBO-MPCA* ( $14.67 \pm 1.21$  mm), док је ослабије антимикубно дејство показано за калцијум-силикат (*CS*) на *E. faecalis* АТСС ( $6.50 \pm 1.76$  mm).

Примећен је тренд умањења инхибиционих зона током времена. Међутим, инхибиционе зоне су остале исте или су се увећале током испитиваних периода за испитиване материјале *ALBO-MPCA* ( $8.17 \pm 1.47$ ) и *CH* ( $14.83 \pm 2.64$ ) у случају дејства на *E. faecalis* АТСС, и дејства *CH* на *S. aureus* ( $16.67 \pm 2.94$ ). У случају поређења клиничких изолата и бактеријских АТСС линија, материјали су у 1. сату показали нешто боље антибактеријско дејство на комерцијално доступне културе, али без статистички значајне разлике у случају дејства на *E. faecalis*. У случају дејства на *S. aureus* у првом сату нешто боље антибактеријско дејство уочено је на клиничким изолатима, али такође без статистички значајне разлике.



Графикон 19. Зоне инхибиције (mm) раста одабраних микроорганизама у присуству калцијум-хидроксида (CH), минералтриоксид агрегата (MTA<sup>+</sup>), калцијум-силиката (CS) и калцијум-силиката обогаћеног бизмут-окидом (ALBO-MPCA). Двосмерна анализа варијансе је коришћена, уз значајност одређену за  $p < 0,05$ . Различитим симболима означене су статистички значајне разлике између материјала.

## ***5. Дискусија***

Пре примене нових материјала, средстава и уређаја у медицини и стоматологији, неопходно је испитати њихов потенцијални утицај на ткиво домаћина према добро дефинисаној међународној регулативи (*ISO* стандард 10993). Диодни ласер (940 nm) и *PDT* су регистровани и одобрени за клиничку примену од стране Агенције за лекове и медицинска средства Србије. Како би се испитале потенцијалне предности и недостаци њихове клиничке примене на младим сталним зубима била су потребна додатна *in vitro* истраживања на мезенхималним матичним ћелијама (*ISO* стандард 10993-5). *In vitro* истраживања, иако ограничена у смислу имитирања *in vivo* услова и природне нише матичних ћелија, омогућавају прецизна истраживања на тачно одређеној култури ћелија. Према утврђеним процедурама, *in vitro* истраживања представљају први корак у дефинисању предности и недостатака испитиваних материјала и средстава, док у каснијим фазама истраживања *in vivo* и клиничке студије дефинишу и објашњавају забележене промене. На основу *in vitro* истраживања у овој студији дефинисан је протокол потенцијалне сигурне примене ласера за даље клиничко истраживање. Тиме је омогућено да се у клиничким условима, поред антимиembroног дејства искористи и потенцијално биостимулативно дејство ласера на завршетак раста и развоја корена сталних зуба.

### **5.1. Дискусија резултата изолације и карактеризације матичних ћелија из апикалне папиле**

Биологија матичних ћелија у фокусу је водећих истраживања у свету. До данас је откривено присуство матичних ћелија у многим хуманим ткивима. Њихов потенцијал за ткивну регенерацију се активно истражује. Орална ткива представљају извор великог броја различитих матичних, односно прогениторних ћелија [20]. Међусобно се разликују по потенцијалу самообнављања, пролиферативном капацитету и квалитету диференцијације у више ћелијских линија.

Ткиво апикалне папиле, локализовано на врху корена у развоју, током раста последње трећине корена представља идеалну ћелијску популацију за испитивања у области ендодонције. Значајно је поменути да без присуства *SCAP* ћелија, раст и развој корена престаје што говори о значају и улози ткива апикалне папиле [12, 13].

У случају оштећења пулпе зуба са незавршеним растом корена, услед повреде или напредовања каријеса, уколико се пулпно ткиво екстирпира, ткиво апикалне папиле у пределу врха корена често остаје нетакнуто. У клиничким условима је у овим случајевима описан наставак раста корена, након ендодонтске терапије [13, 151]. Као потврда клиничког запажања, будућа хистолошка истраживања треба да појасне да ли је новоформирано минерализовано ткиво у пределу корена новостворени примарни дентин или је дошло до стварања ткива сличног цементу или кости [151]. Од када су матичне ћелије апикалне папиле описане 2006. године као засебна група матичних ћелија, значајно се увећава број истраживања усмерен на њихову изолацију, карактеризацију, примену у ендодонтским истраживањима, али и у ткивном инжињерингу [15]. *SCAP* ћелије, дефинисане као засебна група ћелија, са јасним разликама у односу на матичне ћелије зубне пулпе по анатомском положају и својствима матичности, одабране су као најпогодније за истраживање у овој студији.

До данас су описана два начина изолације матичних ћелија, ензимском дигестијом и *outgrowth* методом (*OG*). Ензимском дигестијом се разлаже везиво ткиво чиме се добија суспензија ћелија, док се *OG* методом ткиво механички уситни чиме се омогућава миграција ћелија из ткива током култивације. Ензимском дигестијом ћелије се уочавају под микроскопом већ 24 h након изолације, док су за уочавање првих ћелија након изолације *OG* методом потребна 2 - 4 дана. Међутим, више истраживања је показало да се након ензимске дигестије уочава хетерогенија култура ћелија [141, 142]. Наиме, поред ћелија издуженог облика сличног фибробластима са више цитоплазматских продужетака, изгледа специфичног за мезенхималне ћелије, описано је и присуство кубоидалних и полигоналних ћелија. Овај налаз потврђује претпоставку да се ензимском дигестијом везивног ткива, поред изолације матичних ћелија, омогућава и изолација ендотелних ћелија и перицита у култури. На основу наведених упоредних параметара, опште је прихваћено становиште да *OG* метода омогућава добијање хомогеније популације мезенхималних матичних ћелија [141]. У овој студији, изолација ћелија из ткива апикалне папиле урађена је *OG* методом да би се добила хомогена популација ћелија. Сама *OG* метода се заснива на миграцији матичних ћелија из ткивних исечака које се затим лепе за пластичну подлогу и даље пролиферишу, док ћелије

без способности миграције остају у ткиву и временом се дезинтегришу [152, 153]. На овај начин контаминација културе матичних ћелија хематопоезним ћелијама знатно је умањена. Обе поменуте методе изолације, уколико се ћелије гаје под једнаким условима, омогућавају изолацију ћелија сличног пролиферативног капацитета и успешности диференцијације [141].

У овом истраживању је забележен изражен клоногени потенцијал ћелија из апикалне папиле. Након седам дана култивације могао се уочити значајан број макроскопски видљивих колонија, док је већ 10. дана, а посебно 14. дана од засејавања, дошло до још већег раста броја и величине колонија, као и њиховог међусобног спајања. Такође, пролиферативни капацитет се мењао кроз пасаже. Веома брзо дуплирање популације током само 24 сата забележено је у прве три пасаже. Од 4. до 7. пасаже потребно време за дуплирање популације је било у просеку око 48 сати, док је након седме пасаже забележен постепени пад потенцијала пролиферације. Из наведених разлога ћелије пете пасаже су одабране за даљу карактеризацију. Карактеризација у смислу потврде матичности изолованих ћелија апикалне папиле урађена је према критеријумима за дефинисање мезенхималних матичних ћелија из 2006. године [144]. Први критеријум матичности који се односи на потенцијал миграције, пролиферације, клоногени потенцијал и способност лепљења за пластичну подлогу, био је потврђен током култивације и претходно описаних тестова формирања колонија и пролиферативног капацитета кроз пасаже. Наредни критеријум је провера позитивно испољених мембранских маркера за мезенхималне матичне ћелије, уз истовремено одуство испољавања мембранских маркера специфичних за хематопоезне матичне ћелије. Резултати ове студије су показали високо позитивну испољеност (98 - 99%) маркера мезенхималних матичних ћелија из узорка (CD 105, CD 90 и CD 73), док су маркери хематопоезних матичних ћелија (CD 45 и CD 34) били готово потпуно одсутни (0%, односно 0.07%) у узорку. Диференцијација ћелија из апикалне папиле у три различите ћелијске линије мезенхималних ћелија (остео/одонтобласте, хондорците и адипоците), као трећа потврда матичности, показала је значајан потенцијал изолованих ћелија за диференцијацију, посебно као остео/одонтобластима и хондорцитима. Добијени резултати су у сагласности са претходним истраживањима у којима су ћелије апикалне папиле окарактерисане



као засебна група мезенхималних матичних ћелија [12, 13, 15]. На основу сва три анализирана критеријума, добијена ћелијска култура имала је све одлике потребне за дефиницију матичних ћелија пореклом из апикалне папиле (*SCAP*), те се под тим именом и помињу у даљем тексту.

## **5.2. Дискусија резултата биокомпатибилности ласера на *SCAP* ћелије током ендодонтске терапије**

Истраживања ендодонтских материјала и средстава у последњој деценији користе *SCAP* ћелије и ћелије пулпе као адекватне ћелијске културе за *in vitro* испитивања. [91]. Ризик од доспевања раствора за обескличење канала корена у периапикални простор повећан је код зуба у развоју са широко отвореним врхом корена. Тиме развојно ткиво у пределу врха корена може бити изложено директном цитотоксичном дејству *NaOCl*. Стога се у иницијалним фазама терапије препоручује примена нижих концентрација *NaOCl* како би се искористила добра антимикробна и органолитичка својства у уклањању некротичног пулног ткива, МО и њихових распадних продуката, док касније треба применити средства која ће подстаћи зарастање и регенерацију [104]. Са биолошке тачке гледишта, при обради и обескличењу канала младих сталних зуба неопходна је минимална механичка обрада зидова, праћена нижим концентрацијама *NaOCl*, да би се у првој посети уклонио биофилм и некротично ткиво пулпе [104]. Због тога је у овом истраживању испитивано дејство раствора *NaOCl* у концентрацији 0,5%, као најнижа бактерицидна концентрација која се препоручује за ендодонтско лечење младих сталних зуба [154]. У испитивању биокомпатибилности ласера за контролну групу са цитотоксичним агенсом коришћен је 0,5% *NaOCl*. Након дејства 0.5% *NaOCl* на *SCAP* ћелије у периоду од 10 минута, забележена је ниска вијабилност (испод 30%), уз губитак способности преосталих ћелија за опоравак, те се и након 7 дана вијабилност задржала на око 30%.

Слично нашем истраживању, *Simbula* и сар. [155] истичу значајно цитотоксично дејство 0,5% *NaOCl* на фибробласте, а које је забележено тестовима ћелијске вијабилности и митохондријске активности, чиме је показано да ни ћелије строме и везивног ткива не могу бити значајна заштита прогениторним ћелијама од дејства органолитичких средстава у ендодонцији. Такође, у студији *Essner*-а и сар.

[154] на ћелијама пулпе испитивано је цитотоксично дејство 0.5% *NaOCl* као највеће концентрације и серијских разблажења. Показано је да је тек концентрација *NaOCl* од 0.04% нетоксична, док је основна испитивана концентрација (0.5%) изазвала значајне промене у грађи ћелија и потпуно одсуство вијабилних ћелија 24 сата након излагања. У истој студији је испитан и утицај времена излагања ћелија *NaOCl*-у. Након 5 минута, забележене су промене у структури ћелија и смањење вијабилности већ при дејству 0.08% *NaOCl*-а, док је вијабилност била значајно нижа након 10 и 15 минута од излагања [154]. Висока цитотоксичност, чак и најниже бактерицидне концентрације *NaOCl*-а, говори у прилог могућег неповољног дејства поменутог раствора на развојно ткиво у пределу врха корена. Стога је са аспекта регенерације и апексогенезе било неопходно испитати дејство стандардних средстава за обескличење канала коренова и ласера на вијабилност *SCAP* ћелија.

Према резултатима овог истраживања, *SCAP* ћелије након третмана ласером велике снаге (940 nm) показале су појачану митохондријску активност у првом сату након третмана, при примењеним снази ласера од 1 W до 2 W. Митохондријска активност је била праћена благом пролиферацијом ћелија. Након 24 сата, забележено је смањење митохондријске активности у односу на први сат, али је она и даље била значајна при примењеним снагама од 1 W и 1,5 W, док је пролиферација ћелија при свим примењеним снагама забележила значајан пораст. Пратећи исти тренд, и након 7 дана од излагања дејству ласера задржао се висок пролиферативни капацитет при свим снагама ласера, али супротно времену од 1 и 24 сата, митохондријска активност је била слична вредностима код нетретираних ћелија. Значајан пораст пролиферације ћелија током времена уочен је након примене *PDT* при нижој вредности фенотијазина после 1 сата, односно обе примењене концентрације фенотијазина после 1 и 7 дана. Митохондријска активност је била нешто нижа у односу на нетретирание ћелије током прва 24 сата, док је након примене само ласерског светла и ниже концентрације фенотијазина била слична вредностима нетретираних ћелија. Након 7 дана, митохондријска активност ћелија у свим групама третираним *PDT* терапијом митохондријска активност је била приближна вредностима нетретираних ћелија. Добијени резултати могу бити последица незнатног цитотоксичног ефекта веће концентрације

фенотијазина након једног сата од дејства, док је након 1 и 7 дана од третмана вероватно дошло до опоравка ћелија и њихове пролиферације. Митохондријска активност је била ниска у првом сату услед оксидативног стреса на ћелије након фотохемијског дејства *PDT*. Ови резултати показују да се *SCAP* ћелије могу опоравити од почетног цитотоксичног дејства фотосензитивног агенса, и да се у дужем времену постиже вијабилност ћелија слична нетретираним ћелијама.

У складу са резултатима овог истраживања, у раду *Basso* и сар. [156] утврдили су да је, при испитивању фотобиомодулације, неопходно довести ћелије у стање стреса непосредно пре третмана како би се испитао стварни биостимулативни ефекат. Изазивање стреса у ћелијама постиже се њиховим излагањем липопротеинима пореклом из бактерија или смањењем процента серума у медијуму за гајење на 2% [156]. *Chen* и сар. [157] смањени проценат серума у медијуму доводе у везу са хомогенизацијом ћелија и њиховим враћањем у  $G_0$  фазу ћелијског циклуса. Стога су *SCAP* ћелије у овој студији гајене у медијуму са 2% серума 24 сата пре третмана, како би се извршила додатна хомогенизација ћелија и испитао стварни биостимулативни ефекат ласера. У литератури је до данас описан позитиван утицај ласера мале снаге на биостимулацију ћелија [158], док је дејство ласера велике снаге на хумане ћелије слабо истражено. Показано је да зрачење ћелија ласером мале снаге повољно утиче на вијабилност, пролиферацију, генску експресију и стварање протеина мезенхималних матичних ћелија [159]. Са друге стране, у литератури је забележено да се антибактеријско дејство ласера велике снаге заснива на фототермалом дејству [122]. Као додатна потврда фототермалног ефекта ласера могу се издвојити и подаци студије у којој је испитиван утицај изложености ћелија пулпе топлоти од  $42^{\circ}\text{C}$  током 30 минута [160]. Према наводима ове студије, забележено је присуство апоптозе појединих ћелија непосредно након дејства топлоте, док је наредног дана уочена пролиферација преосталих ћелија.

У овом истраживању примењен је протокол ендодонтске терапије ласером за инфициране канале, по упутству произвођача и подацима из литературе [145, 146], како би се имитирали клинички услови и испитало могуће дејство на витално ткиво у пределу врха корена. Протокол примене ласера у каналу корена који је описан раније као најпогоднији у ендодонтском ласерском третману инфицираних

каланала [176] је коришћен током лабораторијских и клиничких истраживања у овом истраживању.

У овој студији забележена је појачана митохондријска активност ћелија у првом сату након дејства ласера велике снаге, док је пролиферација ћелија била изражена након 1 и 7 дана од третмана. Такође, дејство *PDT* је довело до пролиферације ћелија након 1 и 7 дана, уз ниже вредности митохондријске активности уз примењену већу концентрацију фенотијазина током првих 24 сата. Краткотрајно дејство ласера на *SCAP* ћелије може бити разлог повећане пролиферације ћелија. Ови резултати указују да при протоколу којим се антимиembroбно делује на патогене у каналу корена, истовремено, на ћелије домаћина предата енергија из ласера делује стимулативно. *Stein* и сар. [161] испитали су биостимулативни ефекат ласера мале снаге и фенотијазина на ћелијској линији остеосаркома (*SaOS-2*), при чему су показали да на стимулацију ћелија најзначајнији утицај има временски период зрачења. Краће време зрачења имало је већи биостимулативни ефекат. Наведени резултати су делимично у корелацији са добијеним резултатима на *SCAP* ћелијској култури. Зрачење *SCAP* ћелија ласером мале снаге у трајању од 1 минута није довело до значајних промена у броју ћелија у односу на нетретиране ћелије. Са друге стране, на вијабилност *SCAP* ћелија најзначајнију улогу у овом истраживању имала је концентрација примењеног фенотијазина. Утицај концентрације фотоактивног агенса на вијабилност ћелија у корелацији је са описаним негативним утицајем фенотијазина на функцију митохондрија [162], а која је директно зависна од његове концентрације.

У студији на ћелијама хуманих фибробласта и остеобласта показано је да се *PDT* може користити у ендодонтској терапији уз сигуран терапеутски прозор у коме не долази до значајног оштећења ћелија [130]. Такође, показано је да се, у зависности од концентрације метилен плавог и испоручене енергије ласера, након 24 сата уочава блага цитотоксичност *PDT*. Описани подаци су у корелацији са резултатима ове студије, при чему је показано да концентрација фотосензитивне супстанце у извесној мери може утицати на очување вијабилности ћелија у прва 24 сата, као и њено задржавање након 7 дана од третмана.

До данас није у литератури описан утицај ласера на *SCAP* ћелије, док је утицај *NaOCl*-а у току ендодонтске терапије на *SCAP* ћелије био предмет бројних истраживања. Недавно је показано да у случају засејавања *SCAP* ћелија на дентинску површину корена, претходно третирану стандардним средствима за обескличење канала корена, долази до одумирања ћелија на дентинској површини [22]. Полазећи од претпоставке да је *NaOCl* индиректно дејловао на *SCAP* ћелије, показано је постоји зависност цитотоксичности од концентрације ириганса [163]. Прецизније, након што 6% *NaOCl* коришћен за испирање канала коренова, а затим *SCAP* ћелије засејане, забележена је изразита цитотоксичност ириганса. Истовремено, *NaOCl* при нижим концентрацијама изазвао је нижу цитотоксичност. Са друге стране, примена *EDTA* након *NaOCl* показала се значајном за очување вијабилности ћелија након обраде канала корена, услед повољног утицаја на адхезију ћелија и ослобађање фактора раста из околине [163]. У намери да тестирају различите цитотоксичне агенсе, *Trevino* и сар. [22] поредили су утицај завршног испирања канала корена хлорхексидином и *NaOCl*-ом у комбинацији са минералолитицима на вијабилност *SCAP* ћелија и забележили потпуно одсуство вијабилних ћелија у каналу корена након испирања 2% хлорхексидином. Такође, примена *EDTA* након хлорхексидина није успела да ублажи цитотоксично дејство, те је забележено потпуно одумирање ћелија у каналу корена, засејаних након испирања хлорхексидином са или без *EDTA* [22]. Исто тако, показано је да уз цитотоксично дејство, антибактеријска средства додатно негативно утичу и на адхезију ћелија и миграцију у предео канала корена [91]. Претходне студије, као и резултати ове студије, говоре у прилог примене нижих концентрација антибактеријских раствора, у краћем временском периоду, како би се умањило њихово цитотоксично дејство ка матичним и прогениторним ћелијама у пределу врха корена зуба. Истовремено, наведени услови омогућавају ефикаснију миграцију, адхезију и пролиферацију ћелија у пределу канала корена зуба.

Са друге стране, *Nagayoshi* и сар. [140] показали су да третирање корена зуба ласером велике снаге и фотодинамском терапијом пре засејавања ћелија у канал корена индиректно утиче на повећану вијабилност ћелија након 24 сата. Према наводима ове студије, третирање дентина ласером велике снаге доводи до боље адхезије и раста ћелија у каналу корена. Између осталог, сматра се да је ослобађање

јона калцијума и фосфора из дентина у медијум након зрачења ласерима велике снаге један од могућих разлога позитивног утицаја на миграцију, адхезију и пролиферацију фибробласта на третираној површини дентина [140]. Важно је имати у виду потенцијални позитиван утицај ласера на миграцију, пролиферацију и усмеравање ћелија из околног ткива у канални простор.

### **5.3. Дискусија резултата биостимулативног дејства ласера на SCAP ћелије током ендодонтске терапије**

У клиничким условима, након ендодонтске терапије, пожељна је миграција матичних и прогениторних ћелија у пределу врха корена како би што пре дошло до зарастања и опоравка ткива у том пределу. У прилог овој хипотези говори и чињеница да је ово истраживање показало да SCAP ћелије озрачене ласерима значајно брже мигрирају ка вештачки направљеној огреботини, те да током 48 сати активно попуњавају простор миграцијом из околине. Зависност овог ефекта од испоручене енергије из ласера велике снаге показана је и тестом миграције, док је испитивање утицаја PDT на миграцију показало да само светло ласера мале снаге, као и његова комбинација са фенотијазином ниже концентрације, повољно утиче на ћелијску миграцију.

У литератури је описано да ласери мале снаге са доказаним биостимулативним дејством доводе до убрзане миграције мезенхималних ћелија, што значајно утиче на брзину зарастања ткива на месту примене у *in vivo* условима [158, 164]. Регенеративни потенцијал може бити последица фотобиомодулације која доводи до стварања слободних кисеоникових радикала, а који су одговорни за продукцију нуклеарног фактора капа Б (*NF-κB*) [165]. Као што је познато, *NF-κB* је један од кључних транскрипционих фактора који регулише експресију различитих гена за бројне ћелијске функције. Између осталог, повећана количина *NF-κB* подстиче ћелијску пролиферацију и миграцију [165], тако да *NF-κB* може бити један од сигналних молекула који се експримира услед дејства обе врсте ласера.

Имајући у виду широк енергетски дијапазон ласера, он може утицати на количину створених слободних радикала у ћелији након зрачења, односно испоручена енергија може индиректно утицати на вијабилност и миграцију ћелија [165]. Док до одређене концентрације слободни радикали делују

стимулативно на стварање транскрипционих фактора и њима активираних протеина који подстичу ћелијску вијабилност и миграцију, велика количина енергије доводи до екстремног стварања слободних радикала и стреса ћелија услед чега долази до ћелијске смрти [165]. Дефинисање количине енергије потребне за стимулацију различитих ћелијских линија предмет је савремених истраживања [158, 164].

Резултати ове студије показују да се са високом поузданошћу могу издвојити снаге од 1 W и 1,5 W за ласер велике снаге, као и зрачење ласером мале снаге из PDT третмана уз примену ниже концентрације фенотијазина, а који доводе до пролиферације и миграције SCAP ћелија. Користећи претходна сазнања, може се претпоставити да испоручена енергија при наведеним снагама ласера, доводи до стварања слободних кисеоникових радикала у концентрацији која делује биостимулативно, односно подстиче опоравак и регенерацију ткива. Наведени параметри рада ласера, примењени у клиничким условима, могу деловати биокомпатибилно на ткиво у пределу врха корена како би стимулисали ћелије на пролиферацију и миграцију, а самим тим на брже зарастање и сазревање ткива.

Поред пролиферативног и миграторног потенцијала, у овој студији је испитиван и утицај дејства ласера на одонто/остеогено усмеравање SCAP ћелија. Алкална фосфатаза, као рани маркер остеогене диференцијације, била је позитивно испољена у све три огледне групе. До стварања значајно веће концентрације алкалне фосфатазе дошло је након 7. и 14. дана огледа, приликом примене ласера велике снаге од 1 W до 2 W, као и при примени фенотијазина у нижој концентрацији уз дејство ласера мале снаге. Ови резултати су у корелацији са забележеном пролиферацијом SCAP ћелија, након дејства оба типа ласера уз наведене примењене параметре. Резултати овог истраживања потврђују резултате претходно спроведених студија *Xu* и сар. [130] и *Stein* и сар. [161] у којима је показан позитиван утицај фотодинамске терапије на вијабилност ћелија и стварање алкалне фосфатазе.

Као додатни показатељ одонто/остеогене диференцијације, у овој студији анализирана је генска експресија, као и експресија специфичних одонто/остеогених протеина 21. дана након зрачења. Показан је позитиван однос између зрачења ћелија и потенцијала ка диференцијацији. Тенденција повећаног нивоа генске

експресије установљена је код свих 6 анализираних гена у обе огледне група, независно од типа ласера. При дејству ласера од 940 nm, забележено је значајно повећање нивоа експресије *MTNR4* и *OCN* гена током зрачења свих испитиваних снага. Применом ласера мале снаге, независно и/или уз нижу концентрацију фенотијазина, уочен је значајан пораст експресије *DSPP*, *RUNX2* и *BMP2* гена.

Повећање експресије *DSPP* и осталих дентин матрикс протеина описано је и при дејству инфрацрвеног светла на матичне ћелије из пулпе млечних зуба [166]. Доминантна експресија различитих гена, зависно од примењеног ласера говори у прилог сложенем сигналном путу током диференцијације матичних ћелија у остеобласте [24, 167]. Тачан механизам дејства ласера на ћелију, а пре свега на ДНК молекулу, још увек није довољно истражен. Гени специфични за одонтогену диференцијацију, *DSPP* и *MTNR4*, који су били позитивно експримирани након дејства оба ласера у овој студији, могу бити означени као важни маркери одонто/остеогеног усмеравања путем различитих утицаја на сигналне молекуле [24]. Такође, поред позитивне генске експресије *BMP2* и *OCN* маркера, уочена је и њихова значајна протеинска експресија, па се самим тим са високом поузданошћу може тврдити да су *BMP2* и *OCN* протеини у односу на *OPN* испољени у ћелијама које се налазе у унапредовалом стадијуму диференцијације ка одонто/остеобластима [168].

Биостимулативни ефекат ласера мале снаге и *PDT* описан је у литератури и на другим ћелијским линијама [159, 161, 166]. Са друге стране, истраживања везана за ласере велике снаге до сада су била више усмерена ка испитивању антибактеријског дејства [125, 169, 170]. Показано биостимулативно дејство ласера велике снаге у овом истраживању може бити објашњено реакцијом ћелија на количину испоручене снаге ћелијама [165]. Још увек није позната идеална количина испоручене енергије ласера која делује стимулативно на ћелије. Познато је да количина енергије потребна за стимулацију ћелија значајно варира између студија, протокола и коришћене ћелијске линије и ласерског система [158]. Док се терапија ласерима мале снаге у којима се енергија испоручује у mW одвија у великим временским интервалима, често и више дана за редом, зрачење ласером велике снаге у W ограничено је на неколико секунди, првенствено због фототермалног дејства. Ограничавајући фактор у испоруци енергије путем ласера



може бити количина митохондрија у ћелијској линији која значајно може да утиче на биостимулацију [158]. Претпоставка је да уколико ћелије имају већи број митохондрија, енергија ласера потребна за биостимулацију је нижа, па самим тим уколико се делује превише великим енергијама може доћи до презасићења и негативног дејства на ћелије.

У овом истраживању, кроз огледе вијабилности и митохондријске активности, миграције и остеогене диференцијације, показано је да биостимулативно дејство директно зависи од количине испоручене енергије. Снаге од 1 W и 1,5 W су се показале најподеснијим за стимулацију *SCAP* ћелија уколико се 940 nm ласер користи према предложеном протоколу за ендодонтско антибактеријско дејство.

Као што је познато, генерисани оксидативни стрес у бактеријској ћелији основни је механизам антибактеријског дејства *PDT* терапије, али и ласера велике снаге [171]. Истовремено, показано је да оксидативни стрес има значајну улогу и у остеогеној диференцијацији мезенхиманих хуманих ћелија [172]. Иако није прецизирана тачна улога и идеална концентрација слободних радикала који делују стимулативно на процес диференцијације, показано је да слободни радикали директно утичу на путеве остеогене и адипогене диференцијације мезенхималних матичних ћелија [172]. Може се закључити да ниво оксидативног стреса произведен у бактеријској ћелији и хуманим мезенхималним матичним ћелијама, након дејства *PDT* и ласера велике снаге, путем специфичних механизма утиче на крајњи исход третмана [165]. Док на бактеријске ћелије ниво створених слободних радикала делује цитотоксично, у хуманим матичним ћелијама могуће је да створени слободни радикали стимулишу пролиферацију и диференцијацију ћелија.

Исто тако, у овој студији је показано да *PDT* доводи до нешто снижене митохондријске активности при примени веће концентрације фенотијазина, након 1 и 24 сата од третмана, док у дужем временском периоду, после 7 дана, долази до опоравка ћелија. Истовремено, *PDT* уз нижу концентрацију фенотијазина довео је до значајног биостимулативног дејства на *SCAP* ћелије, јер свих 6 гена специфичних за одонто/остеогено усмерене ћелије бележе значајан пораст у експресији после три недеље усмеравања. Слично нашим налазима, у студији *Xi* и *сар*. [130] која је пратила утицај *PDT* на фибробласте и остеобласте, показано је да постоји оптимална вредност при којој *PDT* делује бактерицидно, док истовремено

не делује цитотоксично на хумане фибробласте и остеобласте. Према подацима наведене студије, изведени су закључци да концентрација и дужина експозиције фотосензитивног агенса, дужина трајања зрачења ласера, количина испоручене енергије, као и третирана ћелијска линија, свеобухватно одређују крајњи исход терапије [130]. Наведени резултати говоре у прилог примени *PDT* и диодног ласера (940 nm) у ендодонтском лечењу да би се, пред антимикуробног дејства, повољно утицало на зарастање, миграцију ћелија у периапикални предео, као и наставак раста и развоја ткива.

#### **5.4. Дискусија резултата еодонтске ласерске терапије**

Контрола инфекције у каналу корена зуба важан је корак у регенерацији и зарастању ткива. Разноврсни МО су у стању да населе ткиво пулпе, формирају биофилм на зидовима канала, и инфилтрирају се у дентинске каналиће [88]. Како би се антибактеријско дејство ендодонтске терапије побољшало, различити ласери су уведени у употребу у ендодонцији [111, 125, 129, 170]. У овој студији одабрана су два различита ласерска система за испитивање антимикуробног и биостимулативног дејства, *PDT* која првенствено антимикуробно делује фотохемијским путем, и диодни ласер велике снаге (940 nm) са основним антимикуробним дејством насталим током развоја топлоте - фототермално дејство.

##### **5.4.1. Дискусија резултата фототермалног дејства диодног ласера (940 nm)**

Основна предност ласера велике снаге је антимикуробно дејство дубљих структура дентина који су недоступни конвенционалним антимикуробним средствима [170, 173]. Таласна дужина ласера, примењена снага, дужина зрачења и природа озраченог ткива утичу на загревање дентина у каналу корена и преносу топлоте ка пародонцијуму [174]. Пре примене ласера велике снаге било је потребно испитати сигурност примене са аспекта загревања потпорних структура корена. Истраживање утицаја уношења топле гутаперке у канале коренова зуба [175] показало је да су доњи секутићи осетљивији на загревање спољашње површине корена при ендодонтском третману од горњих секутића. Резултати наведене студије указују да дебљина дентина значајно утиче на преношење топлоте и развој температуре на спољашњој површини корена. Зуби са незавршеним растом корена,

зависно од стадијума развоја, имају знатно тање зидове корена. Због тога је било неопходно испитати утицај дебљине дентина на моделима зуба са завршеним и незавршеним растом корена на преношење топлоте након зрачења ласера у каналу корена на спољашњу површину корена и пародонцијум.

Гранична вредност загревања од  $7^{\circ}\text{C}$  предложена је као прихватљиви биолошки лимит за *in vitro* истраживања [145, 146], па је из тог разлога и у нашој студији ова вредност постављена као гранична за тумачење добијених резултата.

Резултати *in vitro* истраживања на моделима зуба са завршеним и незавршеним растом корена указују да је температура на спољашњој површини корена расла са повећањем примењене снаге. Ови резултати у складу су са студијом *Otsuki* и сар. [177] у којој је показано да количина енергије ласера која је прешла у фототермалну при интеракцији са дентинским ткивом расла са повећањем примењене снаге. У односу на граничну вредност загревања спољашње стране корена од  $7^{\circ}\text{C}$ , зуби са завршеним растом корена били су мање подложни прегревању од модела зуба са незавршеним растом корена. Такође, значајна разлика у порасту температуре је забележена између зуба са завршеним и незавршеним растом корена када је примењена иста снага. Посматрајући вредности температуре по трећинама корена зуба, линеараном регресионом анализом уочена је зависност промене температуре од дебљине дентина, по трећинама коренова зуба, у све 4 групе (0,5W - 2W). Док је за зубе са завршеним растом корена у овој студији снага од 1,5 W била потенцијално безбедна за примену, снага од 1 W је забележена као безбедна за модел зуба са незавршеним растом корена. Како су ови резултати добијени у контролисаним условима *in vitro* испитивања, ове вредности се могу узети као индикативне за клиничку примену.

Резултати овог истраживања говоре у прилог значајном утицају дебљине зида корена на пренос енергије ласера и топлоте кроз бочне површине корена. Добијени резултати су у складу са истраживањима *Lipski* и сар. [175] и *Otsuki* и сар. [171] у којима је показано да дебљина дентина утиче на пренос топлоте из канала ка пародонцијуму, као и да количина пренете енергије у виду топлоте директно зависи од примењене снаге ласера. Преоперативно рендгенско снимање зуба и мерење дебљине мезијалног зида корена, као најтањег, може се препоручити како би се зависно од дебљине зида подесила примењена снага ласера.

#### 5.4.2. Дискусија антимикробног дејства ласера у рандомизованој контролисаној клиничкој студији

У спроведеној клиничкој студији микробиолошки брисеви су узети на почетку лечења, након стандардне обраде канала корена и након примене ласера. Микробиолошки брисеви су узети стерилним папирним поенима, постављањем сваког од 3 папирна поена до радне дужине по 1 минут у каналу. Описан начин узимања бриса, иако не идеалан јер се микробиолошки узорак у највећем делу добија из главног канала корена док су заостале бактерије у акцесорним каналима и делти слабо обухваћене оваквим налазом, представља стандардни начин узорковања у клиничким студијама [67, 178–180]. У овом истраживању плоче са узорцима су анализирани 14 дана након засејавања као што је раније описано [67], за разлику од других студија у којима су резултати анализирани 48 сати након засејавања [178–180]. На овај начин је било омогућено детектовање и спорорастућих бактерија, чиме су се створили услови за добијање реалнијих резултата о микробиолошкој култури узорака.

За снагу ласера велике снаге у овој клиничкој студији одабран је 1 W како би се осигурала безбедна зона примене ласера током рада са пацијентима, уз истовремено потенцијално биостимулативно дејство наведене снаге.

У овом истраживању анализирано је антибактеријско дејство *PDT* и диодног ласера (940 nm) у првој посети након стандардне обраде канала уз обилну примену 0,5% *NaOCl*. Стандардна ендодонтска терапија у све 3 огледне групе, показала је значајно смањење заступљености бактерија. Просечна вредност вијабилних бактерија по групама била је  $10^5$  CFU/ml пре обраде канала, док је после хемијско-механичке обраде та вредност пала на  $10^2$  CFU/ml. Истовремено, применом *qPCR*-а у циљу квантификације укупних бактерија забележен је пад са  $10^5$  копија гена/ml пре обраде канала корена, на  $10^3$  копија гена/ml након обраде канала корена зуба. Након примене диодног ласера (940 nm), количина вијабилних бактерија од минималног до максималног броја бактерија је била у рангу од 0 -  $2 \times 10^2$  CFU/ml, док је након примене *PDT* такође забележен пад, уз ранг вредности од 0 -  $4 \times 10^2$  CFU/ml. Посматрајући ефекте ласерских третмана на присуство вијабилних МО у каналу корена уочено је значајно смањење броја узорака позитивних на присуство МО након дејства ласера, у односу на присуство МО након хемијско-механичке

обrade канала. Након дејства диодног ласера (940 nm) у 56% канала није забележен раст бактерија, док је након *PDT* 69% канала било без вијабилних МО. Применом *qPCR*-а, после третмана са оба типа ласера забележен је благ пад вредности броја укупне бактеријске ДНК (просечно са  $10^3$  на  $10^2$ ). Нешто веће вредности укупног броја бактерија пронађене су након молекуларних метода детекције, што се може објаснити осетљивошћу саме методе, детекцијом МО које није могуће култивисати, као и могућом детекцијом бактерија које нису преживеле третман али чији је геном био присутан током узимања бриса [181–183].

Као што је познато, златни стандард у досадашњем антимикробном ендодонтском лечењу представља примена *NaOCl* (0,5–6%) и хлорхексидина за испирање канала корена, односно калцијум-хидроксида за интерсеансну медијацију [74, 105, 106, 184]. Већина бактерија у каналу је осетљива на стандардне процедуре током хемијско-механичке обраде канала. Ипак, преживљавање појединих бактерија представља фактор ризика за настанак периапикалних лезија и реинфекције након оптурације [35–37]. Нове методе обескличења канала корена различитим ласерским системима испитиване су претходних година [118, 138, 179]. *PDT* се посебно издвојила као нова метода антимикробног дејства са омогућеном циљаном терапијом на резистентне сојеве [128, 129]. Слично нашим резултатима, *Rabello* и сар. [185] су показали да након обраде канала корена помоћу 2.5% *NaOCl* долази до значајног смањења броја колонија са  $1.9 \times 10^5$  CFU/ml на  $7 \times 10^2$  CFU/ml, док се након примене *PDT* број бактерија додатно смањено на  $1 \times 10^2$  CFU/ml. У истој студији, забележено је присуство бактерија након обраде 2.5% *NaOCl* у 50% канала, док је након примене *PDT* проценат позитивних канала био 25%. Ови резултати су у сагласности са нашим резултатима, који показују смањење броја позитивних узорака са 70% на 30% после примене *PDT*. Наведени резултати показују оправдану примену *PDT* као методе додатног обескличења канала корена у првој посети. *Rabello* и сар. [185] посматрали су и дејство *PDT* на ендотоксине у каналу, као и антибактеријско дејство у другој посети након интраканалног пуњења. Показано је да *PDT*, иако делује антибактеријски, не доводи до смањења концентрације ендотоксина, нити делује додатно антибактеријски у другој посети. На основу добијених резултата аутори закључују да се оптимални антибактеријски

потенцијал *PDT* постиже у првој посети након хемијско-механичке обраде канала корена стандардним средствима [185].

У овом истраживању проценат канала коренова без присутних вијабилних МО у узорку након стандардне обраде канала износио је од 25 - 31%. Нешто нижи проценат стерилних канала након стандардне обраде канала, у односу на студију *Rabello*-а и сар. [185], може се објаснити применом ниже концентрације *NaOCl* (0.5% у односу на 2.5%) као и начином узимања брисева из канала. *Rabello*-а и сар. користили су само један папирни поен за узимање бриса из канала корена, док је у овом истраживању за узимање бриса одабран строжији критеријум примене 3 папирна поена једног за другим, по 1 минут у каналу, по узору на претходне студије [67, 178–180]. Наведени резултати указују на потребу да се брисеви из канала узимају помоћу више папирних поена, у дужем временском интервалу, како би се избегло добијање лажно позитивних стерилних узорака. У студији *Garcez*-а и сар. [180], код пацијената са дијагнозом секундарне ендодонтске инфекције након обраде канала помоћу 2.5% *NaOCl* уз 3% водоник-пероксид само трећина канала (10/30) је била без вијабилних МО. Супротно, у студији *Garcez* и сар. [179] на примарно инфицираним каналима након стандардне обраде помоћу 2.5% *NaOCl* уз 3% водоник-пероксид, сви узорци су били позитивни на присуство вијабилних МО.

Након стандардне обраде канала корена код пацијената са дијагнозом секундарне ендодонтске инфекције, примена *PDT* третмана довела је до потпуног одсуства раста бактерија [180], док је након примене *PDT* у примарно инфицираним каналима описано значајно смањење броја укупних бактерија, док је потпуно одсуство бактерија забележено у 10% узорака [179]. Ови резултати говоре у прилог важности комбиноване терапије. Слабије антимикубно дејство *PDT* на зубима са примарном ендодонтском инфекцијом [179] може се објаснити протоколом рада током примене *PDT*. Померање влакна током зрачења довео је до неједнаког зрачења бактерија обележених фотосензитивним агенсом, те је тиме вероватно било умањено и време за стварање слободних радикала током дејства ласерског зрака и активације фотохемијске реакције у бактеријској ћелији [131, 134]. Наведена студија [179] говори у прилог оправданој примени *PDT* у случају некрозе и развоја периапикланих лезија јер значајно доприноси смањењу укупног броја МО. Међутим, у случају великог броја узорака позитивних на МО након

хемијско-механичке обраде канала корена, применом *PDT* није дошло до значајног повећања броја потпуно обескличених канала коренова [179]. Наведени резултати говоре у прилог неопходног спровођења адекватне хемијско-механичке обраде канала корена како би затим додатно антимикубно дејство *PDT* на преостале МО било што ефикасније.

Антимикубно дејство диодног ласера (940 nm) довело је до значајног смањења присуства вијабилних МО, у односу на стандардну терапију. Према нашим сазнањима, у литератури није описана студија која је паралелно испитивала антимикубно дејство ласера велике снаге и *PDT*, уз микробиолошку анализу броја виабилних МО (CFU/ml), као и процену МО статуса путем *qPCR*-а.

Забележена редуција броја МО помоћу обе методе детекције потврђује антибактеријско дејство примењених ласера, и истовремено оправдава потребу за испитивањем додатних метода обескличења канала корена. *Ferreira* и сар [107] описали су сојеве МО резистентне на стандардна антимикубна средства која се примењују у ендодонцији и закључили да су неходна истраживања нових антимикубних средстава у клиничким студијама. Оно што посебно издваја резултате ове студије су подаци о антимикубним ефектима ласера велике снаге у клиничким условима. До данас је антимикубно дејство ласера велике снаге испитано *in vitro* условима, при чему је показано да ласери велике снаге, зависно од таласне дужине, начина рада и испоручене енергије делују антимикубно на површини, као и у дубљим структурама дентина на културама Грам позитивних бактерија [118, 119, 170, 173]. Међутим, до данас није испитано антимикубно дејство ласера велике снаге у клиничким условима у којима је значајно већа разноврсност МО, као и сложеност функционисања различитих МО унутар биофилма.

Последњих година поред стандардних метода култивације узорака, постоји све већа потреба за додатним методама како би се идентификовале врсте које се тешко култивишу. Поред култивације узорака, како би се проценио број вијабилних бактерија у каналу, у широкој употреби су молекуларне методе путем којих се идентификују врсте које је тешко узгајати [181]. Показано је да око половине бактерија у ендодонтским инфекцијама није могуће детектовати стандардним методама култивације. Просечно 40 - 50% бактерија присутних у оралној дупљи

може бити култивисано на микробиолошким подлогама [181, 182]. Молекуларне методе идентификације могу створити јаснију слику о разноврсности ендодонтске флоре и утицају антимикуробних средстава на МО. Студије које су, уз култивацију, користиле и молекуларне методе показале су да је разноврсност ендодонтских инфекција значајно већа него што се раније сматрало. Применом молекуларних техника независних од култивисања, уз анализу бактеријских генома, омогућена је прецизнија анализа врста МО заступљених у инфицираним каналима коренова [181, 186]. Недостатак молекуларних метода огледа се у идентификацији генома свих бактерија у узорку, независно од њихове вијабилности. Тако се може добити лажно позитиван резултат присуства МО. У студији *Young*-а и сар. [183] годину дана након бактеријске смрти било је могуће детектовати и умножити ДНК из *E. faecalis*-а, што говори у прилог чињеници да ДНК детектована молекуларним методама не значи и истовремено присуство вијабилних МО у узорку. Стога је важно применити и стандардну методу култивације као проверене методе доказивања присуства вијабилних МО.

Спроведена клиничка студија у оквиру овог истраживања показала је велику разноврсност МО присутних у узорцима, уз детектовање већег укупног броја МО применом молекуларне методе, у односу на стандардну култивацију узорака. У прилог овом запажању говоре и друге студије које показују да је присуство бактерија у леченим каналима коренова методом култивације забележено у 44 - 85% узорака [67, 187], као и у 65 - 100% узорака молекуларним методама [182, 188]. У случају примене обе методе квантификације и идентификације МО, закључено је да су методе комплементарне, да се допуњују и при томе дају комплетнију слику разноликости ендодонтске флоре [181, 188].

Полимикробна етиологија ендодонтских инфекција, посебно у случају развоја периапикалних лезија, сложенија је него што се мислило. Утицај МО које је немогуће култивисати могу имати значајну улогу у развоју ендодонтских инфекција [189]. Развој биофилма у ком свака бактерија има значајну улогу у одржању система и развоју инфекције, различитост заступљених МО у зависности од дијагнозе, али и индивидуалне карактеристике домаћина, доприносе разноврсности бактеријских врста идентификованих у бактеријским ендодонтским инфекцијама. Применом молекуларних метода добија се шира слика биолошког



диверзитета заступљеног у ендодонтским инфекцијама [189]. Ове чињенице треба узети у обзир при дефинисању нових протокола ендодонтског лечења.

*PCR* методом детекције специфичних бактерија показана је висока резистентност врсте *Streptococcus spp.* на примењене протоколе лечења. *Streptococcus spp.* је детектован у готово свим узорцима пре и након обраде канала коренова, као и након дејства ласера, с тим што је дејство *PDT* третмана било незнатно ефикасније. Услед налаза великог процента позитивних узорака, даље је *qPCR* методом анализирано присуство укупног броја *Streptococcus spp.* Квантификацијом је показано да долази до значајног пад броја МО након стандардне обраде канала корена у свим узорцима, док је додатни пад забележен након примене оба ласера, али без значајне разлике у односу на хемијско-механичку обраду. Ови налази у складу су са претходним истраживањима којима је показано да *Streptococcus* врста представља једну од најрезистентнијих бактерија на ендодонтско лечење и чест је узрочник реинфекције [68, 74].

*Peptostreptococcus micros* је друга бактеријска врста по учесталости у овој студији. Након стандардне обраде број канала позитиван на *P. micros* се смањило, али без статистички значајне разлике, док је значајно смањење присуства *P. micros* у узорцима забележено између другог и трећег бриса након дејства *PDT*, и након дејства диодног ласера велике снаге. Ови резултати потврђују да и диодни ласер велике снаге и *PDT* делују бактерицидно на Грам позитивне анаеробне бактерије, за разлику од стандардних хемијских средстава за антимикубно дејство у ендодонцији [124, 129].

Грам негативне анаеробне бактерије, *Tannerella forsythia* и *Porphyromonas endodontalis*, показале су осетљивост на стандардну обраду канала корена зуба. Након третмана ласером велике снаге, број позитивних узорака се значајно смањило у односу на стандардну терапију, док су након дејства *PDT* сви узорци били негативни на присуство ове две бактерије. Слични подаци описани су и у студији *Fimple* и сар. [137] у којој је, уз примену *PDT*, забележен значајан пад раста анаеробних бактерија, посебно црно пигментних. Овим налазима се потврђује антимикубно дејство *PDT* и ласера велике снаге на честе узорчнике примарних бактеријских инфекција.

Мањи број узорака у овом истраживању био је позитиван на *E. faecalis* што је у складу са претходним студијама у којима се потврђује њихово значајније присуство у реинфекцијама и секундарним инфекцијама [67, 68]. У узорцима у којима је *E. faecalis* детектован, након стандардне обраде канала њихов број је значајно смањен, док је у појединим узорцима и потпуно елиминисан. Након дејства ласера велике снаге и *PDT*, дошло је до додатног смањења укупног броја *E. faecalis* у узорцима, али није дошло до потпуног уклањања из канала корена. Овим се потврђује велика резистенција *E. faecalis* у клиничким условима. Док се у *in vitro* условима полимикробне инфекције, дејство ласера показало као ефикасно на *E. faecalis* [137] у овој студији у клиничким условима није забележено потпуно уклањање из канала корена након дејства ласера велике снаге и *PDT*.

Такође, у овој студији анализирани су врсте *Porphyromonas gingivalis* и *Prevotella intermedia*. Њихова заступљеност у великом проценту у узорцима задржала се и након механичко-медикаментозне обраде, али и након дејства ласера. Забележен је тренд смањења броја позитивних узорака након примењених терапија, али без статистичке значајности. У недавној студији *de Miranda* и сар. [190] забележени су слични резултати на узорцима примарне инфекције и испитивања антимикробног дејства фотодинамске терапије, на род *Prevotella* и бактерију *P. gingivalis*. Резистентност наведених бактеријских врста на интраканалну медикацију описана је и у студији *Ferreira* и сар. [107] у којој је, након примене молекуларних метода детекције, значајан број узорака био позитиван на наведене бактеријске врсте пре и након механичко-медикаментозне обраде канала коренова, али и након интерсеансне медикације. Интересантна је и чињеница да у ни у једној од три огледне групе није забележено значајно присуство врсте *Treponema denticola* што је у сагласности са студијом *de Miranda RG* и сар. [190]. Разлог мале заступљености врсте *T. denticola* у узорцима може се објаснити повезаношћу присуства ове бактерије и специфичне клиничке слике ендодонтског обољења. Наиме, *Cavrini* и сар. [191] су показали да се *T. denticola* специфично детектује у узорцима примарне и секундарне ендодонтске инфекције уколико су присутни знаци и симптоми акутне инфекције. У нашој студији, као и у студији *de Miranda* и сар. [190] лечене ендодонтске инфекције су биле хроничног тока. Неопходан је бољи увид у састав микроболошке флоре канала корена, како би се боље разумела

етиологија и унапредила стратегија лечења, у циљу потпуног уклањања МО из коренског система канала корена зуба [38, 75].

### 5.5. Дискусија резултата антимикуробног дејства ендодонтских материјала

Како би се испитало антибактериско дејство материјала за дефинитивну оптурацију апикалног дела канала корена зуба, као и синергистично антибактеријско дејство *NaOCl*-а, диодног ласера велике снаге, *PDT* и МТА, спроведена је и *in vitro* студија на изолатима из канала корена зуба. Уз изолате бактеријских врста из канала корена које су показале отпорност на стандардну ендодонтску терапију и/или ласерску ендодонтску терапију, у студији је испитано и антибактеријско дејство на референтним сојевима. Како је циљ истраживања био да се испита антибактериско дејство материјала за дефинитивну оптурацију апикалног дела канала корена (МТА), за проверу његовог ефекта изабрана је *in vitro* метода двоструког агар теста. Агар двоструки тест је широко коришћен метод испитивања антибактеријског дејства растворљивих материјала. Резултати добијени овим тестом зависе од растворљивости материјала и њихове способности да дифундују у агар и хранљиви медијум [192]. Један од недостатака овог теста је немогућност разликовања бактериостатског од бактерицидног дејства испитиваних материјала [193].

У литератури су доступни контрадикторни подаци о антибактеријском дејству средстава за дефинитивну оптурацију канала, зависно од тога да ли је испитивано антибактеријско дејство свеже замешаних материјала, или дејство након њиховог потпуног везивања [192–194]. Иако је значајније антибактеријско дејство описано у форми свеже замешаних материјала, описано је да ови материјали отпуштају елементе са антибактеријским дејством и након везивања, те у продуженом времену делују на заостале МО [195]. Како се у свакодневној клиничкој пракси материјали за дефинитивну оптурацију канала корена зуба уносе свеже замешани, у овом истраживању је њихово антибактеријско дејство испитано у описаном облику. Дискови веже замешаних материјала, постављених на двоструком агару, примарно су остављене на 2 сата на собној температури како би се дозволила предифузија тестираних материјала, јер је показано да је то важан корак у *in vitro* испитивању антибактеријског дејства материјала [196]. Оптимизација методе 0,05% ТТС-ом је

урађена како би се јасно одредио раст бактеријских колонија. Тиме је постигнуто прецизно одређивање инхибиционих зона раста бактерија, чиме се избегло потенцијално тумачење дифузије самих материјала у агар као инхибиционих зона раста МО [196].

Према нашим сазнањима, испитивање антибактеријског дејства МТА на клиничке изолате није значајно заступљено у литератури [194]. Стога је у овој студији антибактеријско дејство датог материјала испитивано упоредо на клиничким изолатима и референтним сојевима. Као што је показано у нашој студији, врсте *Enterococcus* и *Streptococcus* описане су и у литератури као значајне за настанак реинфекције, односно показале су одређен степен отпорности на стандардну ендодонтску терапију и ласерски третман. Са друге стране, претходна истраживања су показала да је најосетљивија бактерија на дејство МТА *S. aureus*, док је најотпорнија *E. faecalis* [196, 197]. Услед наведених резултата клинички изолати и референтни сојеви наведених бактерија коришћени су за испитивање антибактеријског дејства МТА. У току првог сата испитивања антибактеријског дејства, показан је благи тренд испитиваних материјала ка бољем антимикуробном дејству на клиничким изолатима него на одоварајућем референтном соју бактерије *S. aureus*.

Антибактеријско дејство на бази калцијум-хидроксида заснива се на отпуштању хидроксилних јона као јаким слободних радикала, и способности везивања угљен-диоксида [198]. У случају материјала на бази калцијум-силиката (као што је МТА) може се претпоставити постојање сличног механизма узимајући у обзир њихов процес везивања [199]. Познато је да вредности  $pH$  средине изнад 12 инхибишу раст МО, укључујући и *E. faecalis* [200]. Стога, ограничено антибактеријско дејство материјала на бази калцијум-хидроксида на *E. faecalis*, за које је познато да поседују високе  $pH$  вредности (изнад 12), није довољно разјашњено. Једно од објашњења наводи у специфичност грађе ових бактерија. Протонске пумпе присутне у бактеријској ћелијској мембрани могу деловати протективно на високе вредности  $pH$  калцијум-хидроксида [201]. Резултати овог истраживања потврђују чињеницу да високе вредности  $pH$  средине коју испитивани материјали обезбеђују нису довољан разлог да би дошло до значајог антимикуробног дејства на *E. faecalis*.

Сви материјали у овој студији испољили су најјаче антимикурно дејство на *S. aureus*, док је најслабије антимикурно дејство забележено на *E. faecalis*, што су потврдиле и претходне студије [196, 197]. Супротно нашим резултатима, у одређеним истраживањима забележено је да МТА не утиче на инхибицију раста *E. faecalis* [197]. У овој студији показано је одржање величине зоне инхибиције између првог и 24 сата од излагања *E. faecalis*-а дејству пасте на бази калцијум-хидроксида и комерцијално доступном МТА+ материјалу. Добијени резултати су супротни резултатима студије *Mohammadi* и сар. [197] у којој је описано да дуже време инкубације материјала и МО доводи до смањења зоне инхибиције. Разлике у резултатима могу се објаснити дужином периода посматрања у коме су описане промене. У овом истраживању зона инхибиције раста је посматрана између 1 и 24 сата, док у студији *Mohammadi* и сар. поређена разлика између 1 дана и 7 дана, хемијски састав испитиваних материјала се разликовао, као и врста бактеријских изолата коришћених у истраживањима. Приликом хемијског везивања материјала на бази калцијум-силиката, током реакције хидратације долази до стварања калцијум-хидроксида, док се потпуно сазревање и дужина фазе везивања разликују у зависности од састава испитиваних материјала на бази калцијум-силиката [199]. Добијени супротни резултати могу бити последица различитог хемијског састава испитиваних материјала у овој студији, у односу на материјале испитиване у студији *Mohammadi* и сар. [197]. Антибактеријско дејство материјала на бази калцијум-силиката претходно је показано на бактеријским врстама *S. aureus* и *E. faecalis* [186, 192]. Такође, додатно антибактеријско дејство је објашњено и стварањем аеробних услова након настанка слободних кисеоникових радикала [203, 204]. Исти тако, ослобађање различитих елемената из испитиваних материјала током времена такође може утицати на антибактеријско дејство. Јони алуминијума за које је показано да делују антибактеријски ослобађају се у значајној количини из испитиваног материјала МТА+ [205]. У нашој студији је забележен веома значајан антибактеријски потенцијал ка стрептококама у првом сату након деловања, посебно за врсту *S. anginosus*. Са друге стране, натријум, који се отпушта током времена из испитиваних материјала на бази калцијум-силиката, представља значајан нутријент за бројне оралне стрептококе. Калцијум-хидроксид показује најниже отпуштање натријума током времена [198]. Док је отпуштање натријума

ниско, отпуштање алкалног метала калцијума током времена је значајно и веома постојано услед велике атомске масе овог елемента [198]. Овим се може објаснити висок антибактеријски потенцијал пасте на бази калцијум-хидроксида добијен у нашој студији, у односу на све остале испитиване материјале за дефинитивну оптуруацију.

Антимикробно дејство материјала на бази калцијум-хидроксида и МТА цемента говори у прилог синергистичном антибактеријском дејству ниских концентрација *NaOCl*-а, диодног ласера (940 nm), односно *PDT* у првој сеанси ендодонтског лечења када се антимикробно делује на највећи број МО и касније примене ендодонтских материјала са продуженим антибактеријским дејством. На овај начин, омогућено је уклањање или барем смањење броја МО отпорних на стандардну ендодонтску терапију, чиме се утиче на смањење појаве реинфекције и развоја периапиалних лезија након дефинитивне оптурације канала корена зуба. Неопходне су дуготрајне клиничке студије да би се извели поуздани закључци о утицају ласерске ендодонтске терапије на успешност ендодонтског лечења, зарастање периапикалног ткива и наставка раста и развоја корена током лечења младих сталних зуба.

## ***6. Закључци***

На основу спроведених *in vitro* истраживања и клиничке студије о примени диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије у ендодонтском лечењу младих сталних зуба може се закључити следеће:

- карактеризацијом изолованих ћелија из ткива апикалне папиле методама проточне цитометрије и усмеравањем у три ћелијске лозе, показано је да су изоловане ћелије мултипотентне мезенхималне матичне ћелије,
- тестовима митохондријске активности и вијабилности ћелија показана је задовољавајућа биокомпатибилност примењених ласера, при параметрима рада током ендодонтске ласерске терапије; пролиферација ћелија након дејства диодног ласера (940 nm) показала се зависном од примењене снаге ласера, док је у случају примене фотодинамске терапије концентрација фотосензитивне супстанце имала значајан утицај на митохондријску активност ћелија,
- биостимулативно дејство диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије огледа се у стварању важних протеина и експресији гена карактеристичних за зреле ћелије одонто/остеогене лозе, као и депоновањем минерализованог ванћелијског матрикса у значајно већој мери у односу на нетретиране ћелије; према приказаним резултатима снаге од 1 и 1,5 W диодног ласера (940 nm) доводе до максималног биостимулативног дејства, док се у случају фотодинамске терапије најбоље дејство постиже уз нижу концентрацију фотосензитивног агенса,
- примена култивације микробиолошких узорака и истовремена анализа молекуларно-генетичким методама показала се комплементарном и веома значајном у тумачењу добијених резултата антимикубног дејства у клиничким условима,
- примена диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије показала се веома значајном у смањењу броја узорака позитивних на присуство вијабилних бактерија у клиничким условима; оба ласера су довела до значајно већег броја стерилних канала у односу на стандардну ендодонтску терапију; према приказаним резултатима најбоље антимикубно дејство се постиже применом фотодинамске терапије као додатне методе обескличења у ендодонтском лечењу,



- антимикробно дејство диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије огледа се и у значајном смањењу укупне бактеријске популације у каналима коренова зуба у којима су бактерије биле детектоване и након свих терапијских процедура,
- антимикробно дејство диодног ласера (940 nm) и фотодинамске терапије утицало је и на значајну редукцију Грам позитивних врста бактерија које су показале отпорност на стандардна средства обескличења у каналима коренова,
- у периоду клиничког праћења пацијената показало се да примена ласера у ендодонтском лечењу младих сталних зуба представља безбедну методу, која уколико се поштују прописани протоколи лечења не доводи до нежељених, патолошких промена на корену зуба и пародонцијуму, већ омогућава излечење и зарастање ткива на месту примене, и
- испитивани материјали за дефинитивну оптурацију канала корен зуба делују додатно антимикробно на изолате из канала корена младих сталних зуба у дужем временском периоду, те представљају значајан део синергистичког антимикробног дејства током ендодонтског лечења младих сталних зуба.

## Литература

1. Kumar GS (2014) Orban's Oral Histology and Embryology. Elsevier Health Sciences APAC
2. Cvek M (1992) Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Dent Traumatol* 8:45–55. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x>
3. Plascencia H, Diaz M, Gascon G, et al (2017) Management of permanent teeth with necrotic pulps and open apices according to the stage of root development. *J Clin Exp Dent* 9:0–0. <https://doi.org/10.4317/jced.54287>
4. Provenza DV (Dominic V, Seibel W (1986) Oral histology : inheritance and development. Lea & Febiger
5. Andreasen JO, Andreasen FM (Frances M., Andersson L (Lars), Andreasen JO (2007) Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. Blackwell Munksgaard
6. Xu L, Tang L, Jin F, et al (2009) The apical region of developing tooth root constitutes a complex and maintains the ability to generate root and periodontium-like tissues. *J Periodontal Res* 44:275–282. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0765.2008.01129.x>
7. Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR, Seltzer S Seltzer and Bender's dental pulp
8. Linde A, Goldberg M (1993) Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med* 4:679–728
9. Ruch J V, Lesot H, Bègue-Kirn C (1995) Odontoblast differentiation. *Int J Dev Biol* 39:51–68
10. Owens PD (1978) Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch Oral Biol* 23:91–104
11. Diekwisch TG (2001) The developmental biology of cementum. *Int J Dev Biol* 45:695–706
12. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, et al (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 34:166–71. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
13. Huang GT-J, Sonoyama W, Liu Y, et al (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 34:645–51. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.001>
14. Diogenes A, Hargreaves KM (2017) Microbial Modulation of Stem Cells and Future Directions in Regenerative Endodontics. *J Endod* 43:S95–S101. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.07.012>
15. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, et al (2006) Mesenchymal Stem Cell-Mediated Functional Tooth Regeneration in Swine. *PLoS One* 1:e79. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000079>
16. Cohnheim J (1867) Ueber Entzündung und Eiterung. *Arch für Pathol Anat und Physiol und für Klin Med* 40:1–79. <https://doi.org/10.1007/BF02968135>
17. Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol* 4:267–74
18. Caplan AI (1991) Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res* 9:641–650. <https://doi.org/10.1002/jor.1100090504>
19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al (1999) Multilineage potential of adult

- human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143–7
20. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S (2009) Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res* 88:792–806.  
<https://doi.org/10.1177/0022034509340867>
  21. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A (2012) Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A (2012) Direct Effect of Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod* 38:1372–1375.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.018>  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.018>
  22. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, et al (2011) Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 37:1109–1115.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.013>
  23. Huang GT-J, Yamaza T, Shea LD, et al (2010) Stem/progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A* 16:605–15.  
<https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0518>
  24. Nada OA, El Backly RM (2018) Stem Cells From the Apical Papilla (SCAP) as a Tool for Endogenous Tissue Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 6:103.  
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2018.00103>
  25. Chrepa V, Pitcher B, Henry MA, Diogenes A (2017) Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *J Endod* 43:561–567.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.09.024>
  26. Lin LM, Kim SG, Martin G, Kahler B (2018) Continued root maturation despite persistent apical periodontitis of immature permanent teeth after failed regenerative endodontic therapy. *Aust Endod J* 44:292–299.  
<https://doi.org/10.1111/aej.12252>
  27. Lertchirakarn V, Aguilar P (2017) Effects of Lipopolysaccharide on the Proliferation and Osteogenic Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. *J Endod* 43:1835–1840. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.06.024>
  28. Nosrat A, Kolahdouzan A, Hosseini F, et al (2015) Histologic Outcomes of Uninfected Human Immature Teeth Treated with Regenerative Endodontics: 2 Case Reports. *J Endod* 41:1725–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.004>
  29. Yoo Y-J, Oh J-H, Lee W, Woo KM (2016) Regenerative Characteristics of Apical Papilla-derived Cells from Immature Teeth with Pulpal and Periapical Pathosis. *J Endod* 42:1626–1632. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.004>
  30. Vishwanat L, Duong R, Takimoto K, et al (2017) Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. *J Endod* 43:916–922. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.023>
  31. Ørstavik D, Pitt Ford TR (2008) *Essential endodontology : prevention and treatment of apical periodontitis*. Blackwell Munksgaard
  32. Orstavik D (2003) Root canal disinfection: a review of concepts and recent developments. *Aust Endod J* 29:70–4
  33. Siqueira JF (2001) Strategies to treat infected root canals. *J Calif Dent Assoc*

- 29:825–37
34. Wu M-K, Dummer PMH, Wesselink PR (2006) Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 39:343–356. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01092.x>
  35. Rôças IN, Siqueira JF, Aboim MCR, Rosado AS (2004) Denaturing gradient gel electrophoresis analysis of bacterial communities associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 98:741–9. <https://doi.org/10.1016/S1079210404006183>
  36. Pereira RS, Rodrigues VAA, Furtado WT, et al (2017) Microbial analysis of root canal and periradicular lesion associated to teeth with endodontic failure. *Anaerobe* 48:12–18. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2017.06.016>
  37. Gomes BPF, Pinheiro ET, Jacinto RC, et al (2008) Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod* 34:537–40. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.01.016>
  38. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, et al (2014) Microbial Diversity in Persistent Root Canal Infections Investigated by Checkerboard DNA-DNA Hybridization. *J Endod* 40:899–906. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.02.010>
  39. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G (1997) Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 30:297–306
  40. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005) Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 31:863–6
  41. Siqueira JF, Rôças IN (2008) Clinical Implications and Microbiology of Bacterial Persistence after Treatment Procedures. *J Endod* 34:1291–1301.e3. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.028>
  42. Siqueira JF, Rôças IN (2007) Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 18:267–80
  43. Persing DH *Molecular microbiology : diagnostic principles and practice*
  44. Siqueira JF, Rôças IN (2005) Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 31:411–23
  45. Machado de Oliveira JC, Siqueira JF, Rôças IN, et al (2007) Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. *Oral Microbiol Immunol* 22:14–8. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00311.x>
  46. Zoletti GO, Carmo FL, Pereira EM, et al (2010) Comparison of endodontic bacterial community structures in root-canal-treated teeth with or without apical periodontitis. *J Med Microbiol* 59:1360–1364. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.018887-0>
  47. Siqueira JF, Rôças IN, Debelian GJ, et al (2008) Profiling of Root Canal Bacterial Communities Associated with Chronic Apical Periodontitis from Brazilian and Norwegian Subjects. *J Endod* 34:1457–1461. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.08.037>
  48. Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, et al (2006) Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of

- experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 114:278–285.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2006.00380.x>
49. DISTEL J, HATTON J, GILLESPIE M (2002) Biofilm Formation in Medicated Root Canals. *J Endod* 28:689–693. <https://doi.org/10.1097/00004770-200210000-00003>
  50. Nair PNR, Henry S, Cano V, Vera J (2005) Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after “one-visit” endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 99:231–252. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2004.10.005>
  51. Pereira TC, Vasconcelos LRSM De, Graeff MSZ, et al (2017) Intratubular disinfection with tri-antibiotic and calcium hydroxide pastes. *Acta Odontol Scand* 75:87–93. <https://doi.org/10.1080/00016357.2016.1256427>
  52. ARIAS MPC, MALIZA AGA, MIDENA RZ, et al (2016) Effect of ultrasonic streaming on intra-dentinal disinfection and penetration of calcium hydroxide paste in endodontic treatment. *J Appl Oral Sci* 24:575–581. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150553>
  53. Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T (2007) Effects of Dentin on the Antimicrobial Properties of Endodontic Medicaments. *J Endod* 33:917–925. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.008>
  54. Saatchi M, Shokraneh A, Navaei H, et al Antibacterial effect of calcium hydroxide combined with chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*: a systematic review and meta-analysis. *J Appl Oral Sci* 22:356–65
  55. Mohammadi Z, Shalavi S Antifungal effects of root canal irrigants and medicaments. An update review. *N Y State Dent J* 80:58–63
  56. Barbizam JVB, Fariniuk LF, Marchesan MA, et al (2002) Effectiveness of manual and rotary instrumentation techniques for cleaning flattened root canals. *J Endod* 28:365–6
  57. Fornari VJ, Silva-Sousa YTC, Vanni JR, et al (2010) Histological evaluation of the effectiveness of increased apical enlargement for cleaning the apical third of curved canals. *Int Endod J* 43:988–994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2010.01724.x>
  58. Angerame D, De Biasi M, Brun F, et al (2018) Computed microtomography study of untreated, shaped and filled mesiobuccal canals of maxillary first molars. *Aust Endod J*. <https://doi.org/10.1111/aej.12286>
  59. Vertucci FJ (1984) Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 58:589–99
  60. Ricucci D, Siqueira JF, Bate AL, Pitt Ford TR (2009) Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 35:493–502. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.12.014>
  61. Ricucci D, Siqueira JF (2008) Anatomic and microbiologic challenges to achieving success with endodontic treatment: a case report. *J Endod* 34:1249–54. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.07.002>
  62. Ricucci D, Candeiro GTM, Bugea C, Siqueira JF (2016) Complex Apical Intraradicular Infection and Extraradicular Mineralized Biofilms as the Cause of Wet Canals and Treatment Failure: Report of 2 Cases. *J Endod* 42:509–515.

- <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.014>
63. Ricucci D, Siqueira Jr. JF (2010) Fate of the Tissue in Lateral Canals and Apical Ramifications in Response to Pathologic Conditions and Treatment Procedures. *J Endod* 36:1–15. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.038>
  64. Cobankara FK, Altinöz HC, Ergani O, et al (2004) In vitro antibacterial activities of root-canal sealers by using two different methods. *J Endod* 30:57–60
  65. Siqueira JF, Favieri A, Gahyva SM, et al (2000) Antimicrobial activity and flow rate of newer and established root canal sealers. *J Endod* 26:274–7. <https://doi.org/10.1097/00004770-200005000-00005>
  66. AlShwaimi E, Bogari D, Ajaj R, et al (2016) In Vitro Antimicrobial Effectiveness of Root Canal Sealers against *Enterococcus faecalis*: A Systematic Review. *J Endod* 42:1588–1597. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.001>
  67. Gomes BFA, Zaia A, Almeida JA, et al (2013) Quantitative and qualitative analysis of microorganisms in root-filled teeth with persistent infection: Monitoring of the endodontic retreatment. *Eur J Dent* 7:302. <https://doi.org/10.4103/1305-7456.115414>
  68. Peciuliene V, Reynaud AH, Balciuniene I, Haapasalo M (2001) Isolation of yeasts and enteric bacteria in root-filled teeth with chronic apical periodontitis. *Int Endod J* 34:429–34
  69. Figdor D, Sundqvist G (2007) A big role for the very small--understanding the endodontic microbial flora. *Aust Dent J* 52:S38-51
  70. Narayanan LL, Vaishnavi C (2010) Endodontic microbiology. *J Conserv Dent* 13:233–9. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.73386>
  71. Gomes BPF, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, et al (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 19:71–6
  72. Siqueira JF, Rôças IN, Paiva SSM, et al (2007) 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* 104:122–30. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.01.027>
  73. Siqueira JF, Rôças IN (2009) Diversity of Endodontic Microbiota Revisited. *J Dent Res* 88:969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>
  74. Sakamoto M, Siqueira JF, Rôças IN, Benno Y (2007) Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiol Immunol* 22:19–23. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00315.x>
  75. Munson MA, Pitt-Ford T, Chong B, et al (2002) Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. *J Dent Res* 81:761–6. <https://doi.org/10.1177/0810761>
  76. Keskin C, Demiryürek EÖ, Onuk EE (2017) Pyrosequencing Analysis of Cryogenically Ground Samples from Primary and Secondary/Persistent Endodontic Infections. *J Endod* 43:1309–1316. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.03.019>
  77. Rôças IN, Siqueira JF (2018) Frequency and levels of candidate endodontic pathogens in acute apical abscesses as compared to asymptomatic apical periodontitis. *PLoS One* 13:e0190469. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190469>
  78. Lam R (2016) Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review

- of the literature. *Aust Dent J* 61:4–20. <https://doi.org/10.1111/adj.12395>
79. Petti S, Glendor U, Andersson L (2018) World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dent Traumatol* 34:71–86. <https://doi.org/10.1111/edt.12389>
  80. Zhu J, Wang X, Fang Y, et al (2017) An update on the diagnosis and treatment of dens invaginatus. *Aust Dent J* 62:261–275. <https://doi.org/10.1111/adj.12513>
  81. Flanagan TA (2014) What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth. *Aust Endod J* 40:95–100. <https://doi.org/10.1111/aej.12087>
  82. Ghosh S, Mazumdar D, Ray P, Bhattacharya B (2014) Comparative evaluation of different forms of calcium hydroxide in apexification. *Contemp Clin Dent* 5:6. <https://doi.org/10.4103/0976-237X.128652>
  83. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues J-J (2015) MTA versus Ca(OH)<sub>2</sub> in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clin Oral Investig* 19:1381–1388. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1348-5>
  84. Duggal M, Tong HJ, Al-Ansary M, et al (2017) Interventions for the endodontic management of non-vital traumatised immature permanent anterior teeth in children and adolescents: a systematic review of the evidence and guidelines of the European Academy of Paediatric Dentistry. *Eur Arch Paediatr Dent* 18:139–151. <https://doi.org/10.1007/s40368-017-0289-5>
  85. Harlamb S (2016) Management of incompletely developed teeth requiring root canal treatment. *Aust Dent J* 61:95–106. <https://doi.org/10.1111/adj.12401>
  86. Fouad AF (2011) The Microbial Challenge to Pulp Regeneration. *Adv Dent Res* 23:285–289. <https://doi.org/10.1177/0022034511405388>
  87. MATSUO T, SHIRAKAMI T, OZAKI K, et al (2003) An Immunohistological Study of the Localization of Bacteria Invading Root Pulpal Walls of Teeth with Periapical Lesions. *J Endod* 29:194–200. <https://doi.org/10.1097/00004770-200303000-00008>
  88. BRITTAN JL, SPRAGUE S V., MACDONALD EL, et al (2016) In vivo model for microbial invasion of tooth root dentinal tubules. *J Appl Oral Sci* 24:126–135. <https://doi.org/10.1590/1678-775720150448>
  89. Kakoli P, Nandakumar R, Romberg E, et al (2009) The effect of age on bacterial penetration of radicular dentin. *J Endod* 35:78–81. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.004>
  90. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, et al (2010) Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 89:603–8. <https://doi.org/10.1177/0022034510364487>
  91. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, et al (2008) The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod* 34:1474–9. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.09.001>
  92. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, et al (2010) Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 36:536–41. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.006>
  93. Ng Y-L, Mann V, Rahbaran S, et al (2007) Outcome of primary root canal treatment: systematic review of the literature – Part 2. Influence of clinical

- factors. *Int Endod J* 0:071011095702005-??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01323.x>
94. de Chevigny C, Dao TT, Basrani BR, et al (2008) Treatment outcome in endodontics: the Toronto study--phase 4: initial treatment. *J Endod* 34:258–63. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.10.017>
  95. Rafter M (2005) Apexification: a review. *Dent Traumatol* 21:1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2004.00284.x>
  96. Lin J-C, Lu J-X, Zeng Q, et al (2016) Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide for apexification of immature permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *J Formos Med Assoc* 115:523–30. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.01.010>
  97. Mente J, Hage N, Pfefferle T, et al (2009) Mineral trioxide aggregate apical plugs in teeth with open apical foramina: a retrospective analysis of treatment outcome. *J Endod* 35:1354–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.05.025>
  98. Zehnder M (2006) Root Canal Irrigants. *J Endod* 32:389–398. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.09.014>
  99. Gonçalves LS, Rodrigues RCV, Andrade Junior CV, et al (2016) The Effect of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine as Irrigant Solutions for Root Canal Disinfection: A Systematic Review of Clinical Trials. *J Endod* 42:527–532. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.12.021>
  100. Naenni N, Thoma K, Zehnder M (2004) Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 30:785–7
  101. Rôças IN, Provenzano JC, Neves MAS, Siqueira JF (2016) Disinfecting Effects of Rotary Instrumentation with Either 2.5% Sodium Hypochlorite or 2% Chlorhexidine as the Main Irrigant: A Randomized Clinical Study. *J Endod* 42:943–947. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.03.019>
  102. McGurkin-Smith R, Trope M, Caplan D, Sigurdsson A (2005) Reduction of intracanal bacteria using GT rotary instrumentation, 5.25% NaOCl, EDTA, and Ca(OH)<sub>2</sub>. *J Endod* 31:359–63
  103. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM (2013) An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Top* 28:2–23. <https://doi.org/10.1111/etp.12040>
  104. Hauman CHJ, Love RM (2003) Biocompatibility of dental materials used in contemporary endodontic therapy: a review. Part 1. Intracanal drugs and substances. *Int Endod J* 36:75–85
  105. Zandi H, Rodrigues RCV, Kristoffersen AK, et al (2016) Antibacterial Effectiveness of 2 Root Canal Irrigants in Root-filled Teeth with Infection: A Randomized Clinical Trial. *J Endod* 42:1307–1313. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.06.006>
  106. Paiva SSM, Siqueira JF, Rôças IN, et al (2013) Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J* 46:225–233. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02111.x>
  107. Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, et al (2015) Microbiological Profile Resistant to Different Intracanal Medications in Primary Endodontic Infections. *J Endod* 41:824–830. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.031>



108. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, et al (2014) Microbial Evaluation of Traumatized Teeth Treated with Triple Antibiotic Paste or Calcium Hydroxide with 2% Chlorhexidine Gel in Pulp Revascularization. *J Endod* 40:778–783. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.038>
109. Siqueira JF, Lopes HP (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 32:361–9
110. Fouad AF, Barry J (2005) The effect of antibiotics and endodontic antimicrobials on the polymerase chain reaction. *J Endod* 31:510–3
111. Beer F, Buchmair A, Wernisch J, et al (2012) Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals--an in vitro study. *Lasers Med Sci* 27:361–364. <https://doi.org/10.1007/s10103-011-0884-3>
112. Soukos NS, Chen PS-Y, Morris JT, et al (2006) Photodynamic Therapy for Endodontic Disinfection. *J Endod* 32:979–984. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.04.007>
113. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM (2014) Translational Science in Disinfection for Regenerative Endodontics. *J Endod* 40:S52–S57. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.015>
114. Fasbinder DJ (2008) Dental laser technology. *Compend Contin Educ Dent* 29:452–4, 456, 458–9; quiz 460, 462
115. Weichman JA, Johnson FM (1971) Laser use in endodontics. A preliminary investigation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 31:416–20
116. Saydjari Y, Kuypers T, Gutknecht N (2016) Laser Application in Dentistry: Irradiation Effects of Nd:YAG 1064 nm and Diode 810 nm and 980 nm in Infected Root Canals—A Literature Overview. *Biomed Res Int* 2016:1–10. <https://doi.org/10.1155/2016/8421656>
117. Martens LC (2011) Laser physics and a review of laser applications in dentistry for children. *Eur Arch Paediatr Dent* 12:61–7
118. Bago I, Plecko V, Gabric Panduric D, et al (2013) Antimicrobial efficacy of a high-power diode laser, photo-activated disinfection, conventional and sonic activated irrigation during root canal treatment. *Int Endod J* 46:339–347. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02120.x>
119. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, et al (2000) Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. *J Clin Laser Med Surg* 18:57–60. <https://doi.org/10.1089/clm.2000.18.57>
120. Boj JR, Poirier C, Hernandez M, et al (2011) Review: laser soft tissue treatments for paediatric dental patients. *Eur Arch Paediatr Dent* 12:100–5
121. Olivi G, Genovese MD, Caprioglio C (2009) Evidence-based dentistry on laser paediatric dentistry: review and outlook. *Eur J Paediatr Dent* 10:29–40
122. Pirnat S, Lukac M, Ihan A (2011) Study of the direct bactericidal effect of Nd:YAG and diode laser parameters used in endodontics on pigmented and nonpigmented bacteria. *Lasers Med Sci* 26:755–761. <https://doi.org/10.1007/s10103-010-0808-7>
123. Mirsaidov U, Timp W, Timp K, et al (2008) Optimal optical trap for bacterial viability. *Phys Rev E* 78:021910. <https://doi.org/10.1103/PhysRevE.78.021910>
124. Sadik B, Arıkan S, Beldüz N, et al (2013) Effects of Laser Treatment on Endodontic Pathogen *Enterococcus faecalis* : A Systematic Review. *Photomed*

- Laser Surg 31:192–200. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3479>
125. Schoop U, Kluger W, Dervisbegovic S, et al (2006) Innovative wavelengths in endodontic treatment. *Lasers Surg Med* 38:624–630. <https://doi.org/10.1002/lsm.20331>
  126. Schoop U, Kluger W, Moritz A, et al (2004) Bactericidal effect of different laser systems in the deep layers of dentin. *Lasers Surg Med* 35:111–116. <https://doi.org/10.1002/lsm.20026>
  127. Alfredo E, Marchesan MA, Sousa-Neto MD, et al (2008) Temperature variation at the external root surface during 980-nm diode laser irradiation in the root canal. *J Dent* 36:529–534. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2008.03.009>
  128. Chrepa V, Kotsakis GA, Pagonis TC, Hargreaves KM (2014) The effect of photodynamic therapy in root canal disinfection: a systematic review. *J Endod* 40:891–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.03.005>
  129. Gursoy H, Ozcakir-Tomruk C, Tanalp J, Yılmaz S (2013) Photodynamic therapy in dentistry: a literature review. *Clin Oral Investig* 17:1113–1125. <https://doi.org/10.1007/s00784-012-0845-7>
  130. Xu Y, Young MJ, Battaglino RA, et al (2009) Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod* 35:1567–72. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.08.002>
  131. Jori G, Fabris C, Soncin M, et al (2006) Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med* 38:468–481. <https://doi.org/10.1002/lsm.20361>
  132. Juarranz A, Jaén P, Sanz-Rodríguez F, et al (2008) Photodynamic therapy of cancer. Basic principles and applications. *Clin Transl Oncol* 10:148–54
  133. Takasaki AA, Aoki A, Mizutani K, et al (2009) Application of antimicrobial photodynamic therapy in periodontal and peri-implant diseases. *Periodontol 2000* 51:109–140. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2009.00302.x>
  134. Baptista MS, Cadet J, Di Mascio P, et al (2017) Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. *Photochem Photobiol* 93:912–919. <https://doi.org/10.1111/php.12716>
  135. Wainwright M, Crossley KB (2004) Photosensitising agents—circumventing resistance and breaking down biofilms: a review. *Int Biodeterior Biodegradation* 53:119–126. <https://doi.org/10.1016/J.IBIOD.2003.11.006>
  136. DeRosa MC, Crutchley RJ (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* 233–234:351–371. [https://doi.org/10.1016/S0010-8545\(02\)00034-6](https://doi.org/10.1016/S0010-8545(02)00034-6)
  137. Fimple JL, Fontana CR, Foschi F, et al (2008) Photodynamic treatment of endodontic polymicrobial infection in vitro. *J Endod* 34:728–34. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.011>
  138. Silva LAB, Novaes AB, de Oliveira RR, et al (2012) Antimicrobial Photodynamic Therapy for the Treatment of Teeth with Apical Periodontitis: A Histopathological Evaluation. *J Endod* 38:360–366. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.12.023>
  139. Nagayoshi M, Nishihara T, Nakashima K, et al (2011) Bactericidal Effects of Diode Laser Irradiation on *Enterococcus faecalis* Using Periapical Lesion Defect Model. *ISRN Dent* 2011:870364. <https://doi.org/10.5402/2011/870364>

140. Karam PSBH, Ferreira R, Oliveira RC, et al (2017) Stimulation of human gingival fibroblasts viability and growth by roots treated with high intensity lasers, photodynamic therapy and citric acid. *Arch Oral Biol* 81:1–6. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.04.012>
141. Hilkens P, Gervois P, Fanton Y, et al (2013) Effect of isolation methodology on stem cell properties and multilineage differentiation potential of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Res* 353:65–78. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1630-x>
142. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, et al (2011) Assessment of the impact of two different isolation methods on the osteo/odontogenic differentiation potential of human dental stem cells derived from deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 88:130–41. <https://doi.org/10.1007/s00223-010-9438-0>
143. Fazzina R, Iudicone P, Fioravanti D, et al (2016) Potency testing of mesenchymal stromal cell growth expanded in human platelet lysate from different human tissues. *Stem Cell Res Ther* 7:122. <https://doi.org/10.1186/s13287-016-0383-3>
144. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315–317. <https://doi.org/10.1080/14653240600855905>
145. Gutknecht N, Franzen R, Meister J, et al (2005) Temperature evolution on human teeth root surface after diode laser assisted endodontic treatment. *Lasers Med Sci* 20:99–103. <https://doi.org/10.1007/s10103-005-0347-9>
146. Nammour S, Kowaly K, Powell GL, et al (2004) External temperature during KTP-Nd:YAG laser irradiation in root canals: an in vitro study. *Lasers Med Sci* 19:27–32. <https://doi.org/10.1007/s10103-004-0303-0>
147. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, et al (2011) Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. *J Endod* 37:1109–1115. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.013>
148. Jurič IB, Plečko V, Pandurić DG, Anić I (2014) The antimicrobial effectiveness of photodynamic therapy used as an addition to the conventional endodontic re-treatment: A clinical study. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 11:549–555. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2014.10.004>
149. Vianna ME, Horz HP, Gomes BPFA, Conrads G (2006) In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 39:484–92. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2006.01121.x>
150. Hunter N, Nadkarni MA, Jacques NA, Martin FE (2002) Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 148:257–266. <https://doi.org/10.1099/00221287-148-1-257>
151. CHUEH L, HUANG G (2006) Immature Teeth With Periradicular Periodontitis or Abscess Undergoing Apexogenesis: A Paradigm Shift. *J Endod* 32:1205–1213. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.07.010>
152. Gronthos S, Brahim J, Li W, et al (2002) Stem Cell Properties of Human Dental Pulp Stem Cells. *J Dent Res* 81:531–535.

- <https://doi.org/10.1177/154405910208100806>
153. Huang GT-J, Sonoyama W, Chen J, Park SH (2006) In vitro characterization of human dental pulp cells: various isolation methods and culturing environments. *Cell Tissue Res* 324:225–236. <https://doi.org/10.1007/s00441-005-0117-9>
  154. Essner MD, Javed A, Eleazer PD (2011) Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 112:662–666. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.04.030>
  155. Simbula G, Dettori C, Camboni T, Cotti E (2010) Comparison of Tetraacetylenediamine + Sodium Perborate and Sodium Hypochlorite Cytotoxicity on L929 Fibroblasts. *J Endod* 36:1516–1520. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.05.010>
  156. Basso FG, Turrioni APS, Almeida LF, et al (2016) Nutritional deprivation and LPS exposure as feasible methods for induction of cellular — A methodology to validate for in vitro photobiomodulation studies. *J Photochem Photobiol B Biol* 159:205–210. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.04.001>
  157. Chen M, Huang J, Yang X, et al (2012) Serum Starvation Induced Cell Cycle Synchronization Facilitates Human Somatic Cells Reprogramming. *PLoS One* 7:e28203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028203>
  158. Fekrazad R, Asefi S, Allahdadi M, Kalhori KAM (2016) Effect of Photobiomodulation on Mesenchymal Stem Cells. *Photomed Laser Surg* 34:533–542. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4029>
  159. Marques MM, Diniz IMA, de Cara SPHM, et al (2016) Photobiomodulation of Dental Derived Mesenchymal Stem Cells: A Systematic Review. *Photomed Laser Surg* 34:500–508. <https://doi.org/10.1089/pho.2015.4038>
  160. Lee M-W, Muramatsu T, Uekusa T, et al (2007) Heat stress induces alkaline phosphatase activity and heat shock protein 25 expression in cultured pulp cells. *Int Endod J* 0:071204000232001–??? <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01331.x>
  161. Stein E, Koehn J, Sutter W, et al (2009) Phenothiazine Chloride and Soft Laser Light Have a Biostimulatory Effect on Human Osteoblastic Cells. *Photomed Laser Surg* 27:71–77. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2265>
  162. de Faria PA, Bettanin F, Cunha RLOR, et al (2015) Cytotoxicity of phenothiazine derivatives associated with mitochondrial dysfunction: A structure-activity investigation. *Toxicology* 330:44–54. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2015.02.004>
  163. Martin DE, De Almeida JFA, Henry MA, et al (2014) Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. *J Endod* 40:51–55. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.026>
  164. Ash C, Dubec M, Donne K, Bashford T (2017) Effect of wavelength and beam width on penetration in light-tissue interaction using computational methods. *Lasers Med Sci* 32:1909–1918. <https://doi.org/10.1007/s10103-017-2317-4>
  165. de Freitas LF, Hamblin MR (2016) Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE J Sel Top Quantum Electron* 22:348–364. <https://doi.org/10.1109/JSTQE.2016.2561201>
  166. Turrioni APS, Basso FG, Montoro LA, et al (2014) Phototherapy up-regulates dentin matrix proteins expression and synthesis by stem cells from human-

- exfoliated deciduous teeth. *J Dent* 42:1292–1299.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2014.07.014>
167. PENG S, GAO D, GAO C, et al (2016) MicroRNAs regulate signaling pathways in osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (Review). *Mol Med Rep* 14:623–629. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5335>
  168. Granéli C, Thorfve A, Ruetschi U, et al (2014) Novel markers of osteogenic and adipogenic differentiation of human bone marrow stromal cells identified using a quantitative proteomics approach. *Stem Cell Res* 12:153–165.  
<https://doi.org/10.1016/J.SCR.2013.09.009>
  169. Asnaashari M, Safavi N (2013) Disinfection of Contaminated Canals by Different Laser Wavelengths, while Performing Root Canal Therapy. *J Lasers Med Sci* 4:8–16
  170. Vatkar NA, Hegde V, Sathe S (2016) Vitality of *Enterococcus faecalis* inside dentinal tubules after five root canal disinfection methods. *J Conserv Dent* 19:445–449. <https://doi.org/10.4103/0972-0707.190019>
  171. Lubart R, Lipovski A, Nitzan Y, Friedmann H (2011) A possible mechanism for the bactericidal effect of visible light. *Laser Ther* 20:17–22.  
<https://doi.org/10.5978/ISLSM.20.17>
  172. Atashi F, Modarressi A, Pepper MS (2015) The Role of Reactive Oxygen Species in Mesenchymal Stem Cell Adipogenic and Osteogenic Differentiation: A Review. *Stem Cells Dev* 24:1150–1163. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0484>
  173. Borges CC, Estrela C, Lopes FC, et al (2017) Effect of different diode laser wavelengths on root dentin decontamination infected with *Enterococcus faecalis*. *J Photochem Photobiol B Biol* 176:1–8.  
<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2017.09.009>
  174. Steiner R (2011) Laser-Tissue Interactions. In: *Laser and IPL Technology in Dermatology and Aesthetic Medicine*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 23–36
  175. Lipski M (2006) In Vitro Infrared Thermographic Assessment of Root Surface Temperatures Generated by High-Temperature Thermoplasticized Injectable Gutta-Percha Obturation Technique. *J Endod* 32:438–441.  
<https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.10.047>
  176. da Costa Ribeiro A, Nogueira GE, Antoniazzi JH, et al (2007) Effects of diode laser (810 nm) irradiation on root canal walls: thermographic and morphological studies. *J Endod* 33:252–255. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.002>
  177. Otsuki M, Kijima M, Tagami J (2010) Transmission of Diode Laser through Dentin. *J Japanese Soc Laser Dent* 21:18–21.  
<https://doi.org/10.5984/jjpnsoclaserdent.21.18>
  178. Garcez AS, Núñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS (2008) Antimicrobial comparison on effectiveness of endodontic therapy and endodontic therapy combined with photo-disinfection on patients with periapical lesion: a 6 month follow-up. In: Hamblin MR, Waynant RW, Anders J (eds). *International Society for Optics and Photonics*, p 68460G
  179. Garcez AS, Núñez SC, Hamblin MR, Ribeiro MS (2008) Antimicrobial Effects of Photodynamic Therapy on Patients with Necrotic Pulps and Periapical Lesion. *J Endod* 34:138–142. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.10.020>

180. Garcez AS, Nuñez SC, Hamblim MR, et al (2010) Photodynamic Therapy Associated with Conventional Endodontic Treatment in Patients with Antibiotic-resistant Microflora: A Preliminary Report. *J Endod* 36:1463–1466. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.06.001>
181. Anderson AC, Hellwig E, Vespermann R, et al (2012) Comprehensive Analysis of Secondary Dental Root Canal Infections: A Combination of Culture and Culture-Independent Approaches Reveals New Insights. *PLoS One* 7:e49576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049576>
182. Sakamoto M, Siqueira Jr JF, Rôças IN, Benno Y (2008) Molecular analysis of the root canal microbiota associated with endodontic treatment failures. *Oral Microbiol Immunol* 23:275–281. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.2007.00423.x>
183. Young G, Turner S, Davies JK, et al (2007) Bacterial DNA Persists for Extended Periods after Cell Death. *J Endod* 33:1417–1420. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.09.002>
184. Fedorowicz Z, Nasser M, Sequeira-Byron P, et al (2012) Irrigants for non-surgical root canal treatment in mature permanent teeth. *Cochrane Database Syst Rev* Cd008948. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008948.pub2>
185. Rabello DGD, Corazza BJM, Ferreira LL, et al (2017) Does supplemental photodynamic therapy optimize the disinfection of bacteria and endotoxins in one-visit and two-visit root canal therapy? A randomized clinical trial. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 19:205–211. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2017.06.005>
186. Ward DM, Weller R, Bateson MM (1990) 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature* 345:63–65. <https://doi.org/10.1038/345063a0>
187. Pinheiro ET, Gomes BPF, Ferraz CCR, et al (2003) Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J* 36:1–11
188. Schirrmeister JF, Liebenow A-L, Braun G, et al (2007) Detection and Eradication of Microorganisms in Root-filled Teeth Associated With Periradicular Lesions: An In Vivo Study. *J Endod* 33:536–540. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.01.012>
189. Siqueira Jr JF, Rôças IN (2009) Distinctive features of the microbiota associated with different forms of apical periodontitis. *J Oral Microbiol* 1:2009. <https://doi.org/10.3402/jom.v1i0.2009>
190. de Miranda RG, Colombo APV (2018) Clinical and microbiological effectiveness of photodynamic therapy on primary endodontic infections: a 6-month randomized clinical trial. *Clin Oral Investig* 22:1751–1761. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2270-4>
191. Cavrini F, Pirani C, Foschi F, et al (2008) Detection of *Treponema denticola* in root canal systems in primary and secondary endodontic infections. A correlation with clinical symptoms. *New Microbiol* 31:67–73
192. Leonardo MR, da Silva LA, Tanomaru Filho M, et al (2000) In vitro evaluation of antimicrobial activity of sealers and pastes used in endodontics. *J Endod* 26:391–4
193. Zhang H, Pappen FG, Haapasalo M (2009) Dentin Enhances the Antibacterial

- Effect of Mineral Trioxide Aggregate and Bioaggregate. *J Endod* 35:221–224. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.11.001>
194. Lovato KF, Sedgley CM (2011) Antibacterial Activity of EndoSequence Root Repair Material and ProRoot MTA against Clinical Isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 37:1542–1546. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.06.022>
  195. Vivian RR, Zapata RO, Zeferino MA, et al (2010) Evaluation of the physical and chemical properties of two commercial and three experimental root-end filling materials. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 110:250–256. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.04.021>
  196. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JMG, Barros DB, et al (2007) In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *J Oral Sci* 49:41–5
  197. Mohammadi Z, Giardino L, Palazzi F, Shalavi S (2012) Antibacterial activity of a new mineral trioxide aggregate-based root canal sealer. *Int Dent J* 62:70–73. <https://doi.org/10.1111/j.1875-595X.2011.00090.x>
  198. Kim D, Kim E (2014) Antimicrobial effect of calcium hydroxide as an intracanal medicament in root canal treatment: a literature review - Part I. In vitro studies. *Restor Dent Endod* 39:241–52. <https://doi.org/10.5395/rde.2014.39.4.241>
  199. Camilleri J, Sorrentino F, Damidot D (2013) Investigation of the hydration and bioactivity of radiopacified tricalcium silicate cement, Biodentine and MTA Angelus. *Dent Mater* 29:580–593. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.03.007>
  200. MCHUGH C, ZHANG P, MICHALEK S, ELEAZER P (2004) pH Required to Kill *Enterococcus faecalis* in Vitro. *J Endod* 30:218–219. <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00008>
  201. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 35:221–8
  202. Asgary S, Kamrani FA (2008) Antibacterial effects of five different root canal sealing materials. *J Oral Sci* 50:469–74
  203. HOLT D, WATTS J, BEESON T, et al (2007) The Anti-microbial Effect Against *Enterococcus faecalis* and the Compressive Strength of Two Types of Mineral Trioxide Aggregate Mixed With Sterile Water or 2% Chlorhexidine Liquid. *J Endod* 33:844–847. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.006>
  204. Ribeiro CS, Scelza MFZ, Hirata Júnior R, Buarque de Oliveira LM (2010) The antimicrobial activity of gray-colored mineral trioxide aggregate (GMTA) and white-colored MTA (WMTA) under aerobic and anaerobic conditions. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* 109:e109–e112. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.02.008>
  205. Ansari MA, Khan HM, Alzohairy MA, et al (2015) Green synthesis of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and their bactericidal potential against clinical isolates of multi-drug resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *World J Microbiol Biotechnol* 31:153–64. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1757-2>





нових протокола којима би се проценат успешности повећао. Диодни ласери и фотодинамска терапија показују позитивно дејство у лечењу, те је неопходно испитати њихов утицај и на поменути матичне ћелије.

Након хируршког вађења умњака, матичне ћелије ће бити издвојене из меког ткива корена зуба. Узимање зуба (умњака) за потребе описаног истраживања не подразумева никакву додатну процедуру, нити претходну припрему, већ примену стандардног хируршког вађења зуба на Клиници за оралну хирургију. Након што се зуб извади, у медијуму за пренос ткива биће пренет у лабораторију ради издвајања ћелија и даљих истраживања.

**Ризици по испитаника** - У литератури не постоје подаци о ризицима везаним за овакве процедуре.

**Документација о испитанику** - Сви узорци биолошког материјала, као и подаци испитаника биће чувани у шифрованој форми. Само ограничен број истраживача/техничара ће имати приступ, и биће обавезни да поштују тајност података. Сви подаци који се односе на Ваше дете, а прикупљени су овим испитивањем, биће искључиво безимено анализирани. Прикупљање и анализа података из медицинских студија третира се као обрада личних података у оквиру европских и државних закона о заштити података, те се примењују оштре законске контроле. Публиковање резултата ове студије укључује поштовање анонимности пацијената.

**Добровољно учествовање, могућност повлачења** - Учешће Вашег детета у истраживању је на добровољној основи. Уколико одлучите да дете не учествује у истраживању, Ви и Ваше дете нећете сносити никакве последице нити изгубити привилегије на које иначе имате права. На Ваш захтев, дете може у било ком тренутку одустати од учешћа у студији без икаквих последица или губитка привилегија на које иначе имате права.

#### **Кога питати**

Уколико у било ком тренутку пожелите више информација о овом истраживању, молимо Вас да се обратите:

име лекара \_\_\_\_\_

број телефона \_\_\_\_\_

**Информисани пристанак пацијента за узимање узорка ткива зуба са незавршеним растом корена у случају индикуваног хируршког вађења зуба – испитивање утицаја фотодинамске терапије и диодног ласера на биостимулацију матичних ћелија пореклом из апикалне папиле**

Уколико сте сагласни са учешћем Вашег детета у описаном истраживању, молимо Вас да потпишете овај образац.

**Писани пристанак родитеља/старатеља**

Прочитао/ла сам и потпуно разумео/ла све наведене информације у документу о сагласности (или ми их је неко прочитао).

Дајем пристанак за учешће свог детета

\_\_\_\_\_  
(име и презиме детета)

у испитивању и одобравам употребу свих прикупљених података под условом да се не открива идентитет детета.

У потпуности разумем да је учешће у овом испитивању ствар мог личног избора и да у било ком тренутку, из било којих разлога могу да повучем свој пристанак, без кажњавања, последица, или губитка привилегија на које иначе имамо право дете и ја.

Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће, и добио/ла задовољавајуће одговоре.

1. \_\_\_\_\_  
име и презиме родитеља/старатеља

2. \_\_\_\_\_  
име и презиме родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис детета (опционо)

Особа која тражи информисани пристанак

Дао/ла сам објашњење о истраживању, усмено и писмено, пацијент и родитељи јасно разумеју и пристају на учешће у истраживању.

\_\_\_\_\_  
име и презиме истраживача

\_\_\_\_\_  
потпис истраживача

\_\_\_\_\_  
датум

## Прилог Б

Универзитет у Београду  
Стоматолошки факултет  
Клиника за дечју и превентивну стоматологију  
ул. Др Суботића бр. 11  
тел. 011/2684-581, 011/2684-944

### **Обавештење за пацијента за узимање бриса из канала корена младих сталних зуба – испитивање утицаја фотодинамске терапије и диодног ласера на обескличење канала корена зуба током ендодонтског лечења**

.....	.....	.....
иницијали пацијента	број евиденционог картона	датум рођења

Поштовани,

од Вас се тражи да одобрите учешће Вашег детета у клиничкој студији јер је стоматолошким прегледом дијагностикован:

- авитални једнокорени млади стални зуб,
- без претходног ендодонтског лечења,
- дете је узраста 6 до 18 година,

те је неопходно ендодонтско лечење зуба.

Резултати истраживања биће употребљени у научне сврхе са циљем доприноса већем знању о унапређењу ендодонтске терапије употребом ласера. У студију ће искључиво бити укључена деца чији родитељи дају писани добровољни пристанак за учешће у студији. Истраживање се спроводи на Клиници за дечју и превентивну стоматологију, у оквиру израде докторске дисертације. За учешће у студији не постоји новчана накнада. Не постоји сукоб интереса од стране истраживача укључених у студију.

Циљ овог истраживања јете да истражи повољно дејство диодног ласера и фотодинамске терапије, као допуне стандардном протоколу лечења, на обескличење канала корена младих сталних зуба, утицај на завршетак раста корена и периапикално зарастање. Диодни ласери и фотодинамска терапија су нашли примену у више области медицине и стоматологије, као и у дечијој стоматологији.

У базичним и клиничким исраживањима показано је да делују бактерицидно на микроорганлизме. Са друге стране, студије показују могуће повољно дејство на људско ткиво, тако што смањују запаљење, и подстичу зарастање. Протоколи обескличења канала ће се спровести на почетку лечења. Биће узимани микробиолошки брисеви из канала корена, пре ендодонтског лечења, после стандардног протокола обраде канала, и након примене ласера. Брисеви се узимају стандардним ендодонтским папирним поенима, што представља безболну неинвазивну процедуру. Наставак лечења је исти у свим групама, и спроводи се по стандардном протоколу који се примењује на Клиници. Ради лечења биће неопходно долазити на обавезне контролне прегледе.

**Ризици по испитаника** - У литератури не постоје подаци о ризицима везаним за овакве процедуре.

**Документација о испитанику** - Сви подаци који се односе на Ваше дете, а прикупљени су овим испитивањем, биће искључиво безимено анализирани. Прикупљање и анализа података из медицинских студија третира се као обрада личних података у оквиру европских и државних закона о заштити података, те се примењују оштре законске контроле.

**Добровољно учествовање, могућност повлачења** - Учешће Вашег детета у истраживању је на добровољној основи. Уколико одлучите да дете не учествује у истраживању, Ви и Ваше дете нећете сносити никакве последице нити изгубити привилегије на које иначе имате права. На Ваш захтев, дете може у било ком тренутку одустати од учешћа у студији без икаквих последица или губитка привилегија на које иначе имате права.

**Кога контактирати**

Уколико у било ком тренутку пожелите више информација о овом истраживању, молимо контактирајте:

име лекара \_\_\_\_\_

број телефона \_\_\_\_\_

**Информисани пристанак пацијента за узимање бриса из канала корена младих сталних зуба - испитивање утицаја фотодинамске терапије и диодног ласера на обескличење канала корена зуба током ендодонтског лечења**

Уколико сте сагласни са учешћем Вашег детета у описаном истраживању, молимо Вас да потпишете овај образац.

Писани пристанак родитеља/старатеља

Прочитао/ла сам и потпуно разумео/ла све наведене информације у документу о сагласности (или ми их је неко прочитао).

Дајем пристанак за учешће свог детета

\_\_\_\_\_  
(име и презиме детета)

у испитивању и одобравам употребу свих прикупљених података под условом да се не открива идентитет детета.

У потпуности разумем да је учешће у овом испитивању ствар мог личног избора и да у било ком тренутку, из било којих разлога могу да повучем свој пристанак, без кажњавања, последица, или губитка привилегија на које иначе имамо право дете и ја.

Поставио/ла сам питања да решим било какве нејасноће, и добио/ла задовољавајуће одговоре.

1. \_\_\_\_\_  
име и презиме родитеља/старатеља

2. \_\_\_\_\_  
име и презиме родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис родитеља/старатеља

\_\_\_\_\_  
потпис детета (опционо)

Особа која тражи информисани пристанак

Дао/ла сам објашњење о истраживању, усмено и писмено, пацијент и родитељи јасно разумеју и пристају на учешће у истраживању.

\_\_\_\_\_  
име и презиме истраживача

\_\_\_\_\_  
потпис истраживача

\_\_\_\_\_  
датум

# Прилог В

Обр. бр. 1 - 06 - Ср.

ЈМБГ

Знак упозорења

1. Број картона

2.

## СТОМАТОЛОШКИ КАРТОН - ЗА ДЕЦУ И ОМЛАДИНУ -

Лични подаци

Презиме (име једног од родитеља) и име \_\_\_\_\_

(Презиме и име лица од кога се изводи право на здравствену заштиту)

(Дан, месец и година рођења) \_\_\_\_\_

(Место становања и општина) \_\_\_\_\_

(Улица и број) \_\_\_\_\_

Телефон: \_\_\_\_\_ (стан) \_\_\_\_\_ (Организација - предузеће)

М

 ПОЛ 

Ж

Категорија корисника здравствене заштите	Први податак	Промена
Чланови породице радника		
Пензионери и чланови њихових породица		
Земљорадници и чланови њихових породица		
Војни осигураници и чланови њихових породица		
Остали		

Школа: \_\_\_\_\_ Предшколска установа за децу \_\_\_\_\_

Разред: \_\_\_\_\_

Одељење: \_\_\_\_\_

### ПОДАЦИ О ЗАПОСЛЕЊУ И ЗАНИМАЊУ РОДИТЕЉА

Ред. број	Организација - предузеће	Место рада	Регистарски број	Шифра делатности	Посао који обавља	Општински фонд здрав. заштите

### ПРЕГЛЕД

Датум прегледа: \_\_\_\_\_

Стање млечних зуба

Д

Л

Обрада млечних зуба

Д	V	IV	III	II	I	I	II	III	VI	V	Л
---	---	----	-----	----	---	---	----	-----	----	---	---

ХИГИЈЕНА УСТА И ЗУБА: \_\_\_\_\_

СТАЊЕ ДЕСНИ: \_\_\_\_\_

СТАЊЕ ОСТАЛЕ СЛУЗОКОЖЕ: \_\_\_\_\_

ОРТОДОНТСКА ДИЈАГНОЗА: \_\_\_\_\_

ДИЈАГНОЗА (ШИФРА) ПО МКБ: \_\_\_\_\_

Стање млечних зуба

Д

Л

Обрада млечних зуба

Д	V	IV	III	II	I	I	II	III	VI	V	Л
---	---	----	-----	----	---	---	----	-----	----	---	---

Стање сталних зуба

Д

Л

Обрада сталних зуба

Д	7	6	5	4	3	2	1	1	2	3	4	5	6	7	Л
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ХИГИЈЕНА УСТА И ЗУБА: \_\_\_\_\_

СТАЊЕ ДЕСНИ: \_\_\_\_\_

СТАЊЕ ОСТАЛЕ СЛУЗОКОЖЕ: \_\_\_\_\_

ОРТОДОНТСКА ДИЈАГНОЗА: \_\_\_\_\_

ДИЈАГНОЗА (ШИФРА) ПО МКБ: \_\_\_\_\_

Стоматолошки факултет  
Универзитет у Београду

Клиника за децу  
и превентивну стоматологију

Молимо Вас да одговорите на следећа питања, која се односе на опште здравље вашег детета. Ове информације су нам неопходне у циљу спровођења најбољег могућег стоматолошког третмана за ваше дете. Неопходно је да их сазнамо пре почетка било какве интервенције. Ако било које питање не разумете, питајте стоматолога.

### МЕДИЦИНСКА ИСТОРИЈА

Име и презиме: \_\_\_\_\_ Број картона: \_\_\_\_\_

Датум рођења: \_\_\_\_\_ Адреса, број телефона: \_\_\_\_\_

- Да ли пацијент има:
 

Обољење срца	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не	5. Да ли пацијент има:	<input type="checkbox"/> Да <input type="checkbox"/> Не
Шум на срцу	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Несвестице	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Реуматску грозницу	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Епилепсију/конвулзије	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Анемiju	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ноћно мокрење	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Продужено кривљење	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ослабљена палца	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
- Да ли је пацијент алергичан:
 

Пеницилин	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	6. Да ли је пацијент:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Аспирин	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Слеп/ослабљеног вида	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Локални анестетик	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Глув/ослабљеног слуха	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Антибиотике	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	7. Да ли је пацијент:	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Остале лекове	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Икада био у болници	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
- Да ли пацијент има:
 

Болести јетре	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Био у општој анестезији	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Жутицу	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ако јесте, навести разлог	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Хепатитис	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	8. Да ли је ваше дете примало	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Обољења бубрега	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	трансфузију или крвене деривате	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Дијабетес	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	у последњих 10 година?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Друге инфекције	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	9. Да ли је ваше дете у скорбије време?	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
- Да ли је пацијент некада имао:
 

Астму/поленску грозницу	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Примало лекове	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Бронхитис	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Било код лекара током протекле године	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Пнеумонију	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>	Ако јесте, навести разлог	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
Енфемем	<input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>		

Ако постоји још нешто у вези са вашим дететом што мислите да је важно а што може помоћи у планираном третману, наведите: \_\_\_\_\_

## Биографија

Др Дијана Тришић је рођена 12.11.1987. у Мостару. Стоматолошки факултет Универзитета у Београду уписала је 2006. године, а дипломирала 2012. године са просечном оценом 9,18. Након завршених студија, обавила је приправнички стаж и положила стручни испит. Докторске академске студије на Стоматолошком факултету Универзитета у Београду уписала је 2013. године, изборно подручје Базична и клиничка истраживања у стоматологији. Положила је све испите предвиђене планом и програмом докторских академских студија са просечном оценом 10,00. Школске 2015/2016 и 2016/2017 била је ангажована у обављању практичне наставе на предмету Општа и орална патологија. Од 2018. године запослена је као истраживач сарадник на пројекту Министарства просвете, науке и технолошког развоја Републике Србије, ев. бр. 1720126: Хемијско и структурно дизајнирање наноматеријала за примену у медицини и инжењерству. До сада је публиковала 6 радова на *SCI* листи, 3 рада у часописима од националног значаја, 18 саопштења на међународним скуповима, и 6 саопштења на домаћим скуповима. Члан је Српског лекарског друштва, Стоматолошке коморе Србије и Друштва генетичара Србије.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Дијана Тришић

број индекса 4011/2013

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај фотодинамске терапије и диодног ласера на успешност ендодонтског лечења младих сталних зуба и биостимулацију матичних ћелија пореклом из апикалне папиле

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Дијана Тришић

Број индекса 4011/2013

Студијски програм Докторске студије – Базична и клиничка истраживања у  
стоматологији

Наслов рада Утицај фотодинамске терапије и диодног ласера на успешност  
ендодонтског лечења младих сталних зуба и биостимулацију матичних ћелија  
пореклом из апикалне папиле

Ментор проф. др Дејан Марковић, проф. др Бранка Поповић

Потписани/а Дијана Тришић

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Утицај фотодинамске терапије и диодног ласера на успешност ендодонтског лечења младих сталних зуба и биостимулацију матичних ћелија пореклом из апикалне папиле

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

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

**Потпис докторанда**

У Београду, \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_