

Utjecaj lasera na kvalitetu brtvljenja bioaktivnih materijala za retrogradno punjenje korijenskih kanala

Lucić, Ružica

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:597254>

Rights / Prava: [Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported](#) / [Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerađivanja 3.0](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-17**



Repository / Repozitorij:

[University of Zagreb School of Dental Medicine Repository](#)



Rad je ostvaren na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju u suradnji sa Zavodom za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb.

Voditelj rada: doc. dr. sc. Ivona Bago, Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor hrvatskog jezika: Sara Futač, mag. educ. philol. croat.

Lektor engleskog jezika: Iva Gugo, mag. educ. philol. angl.

Rad sadrži: 31 stranica

3 tablice

8 slika

1 CD

Zahvaljujem svojoj mentorici doc. Ivoni Bago na pomoći, strpljenju, korisnim savjetima i uloženom trudu tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Ani Budimir na sudjelovanju u realizaciji mikrobiološkog dijela istraživanja.

Zahvaljujem prof. dr. sc. Mati Sušiću na nesebičnoj pomoći u prikupljanju eksperimentalnih uzoraka.

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima koji su mi tijekom studija pružili bezuvjetnu podršku i razumijevanje.

1. UVOD.....	1
2. HIPOTEZA.....	4
3. MATERIJALI I METODE.....	5
3.1. Priprema uzoraka za istraživanje.....	5
3.2. Izrada retrogradnih kaviteta.....	6
3.3. Punjenje retrogradnih kaviteta s bioaktivnim materijalima.....	8
3.4. Testiranje propuštanja hrane za bakterije.....	11
3.5. Testiranje lančanom reakcijom polimeraze.....	14
3.6. Statistička obrada podataka.....	15
4. REZULTATI.....	16
4.1.PCR analiza sterilnih uzoraka.....	19
5. RASPRAVA.....	20
6. ZAKLJUČAK.....	23
7. SAŽETAK.....	24
8. SUMMARY.....	25
9. LITERATURA.....	26
10. ŽIVOTOPIS.....	31

KRATICE:

Er, Cr:YSSG - erbij-kromij: itrij-skandij-galij garnet (engl.: Erbium Chromium Yttrium Scandium Gallium Garnet)

UZV - ultrazvučni uređaj

MTA – mineral trioksid agregat (engl.: Mineral Trioxide Aggregate)

BC-RRM – biokeramičko punilo (engl.: Bioceramic Root Canal Repair Material)

PBS – fetalni bovin serum (engl.: Fetal bovine serum)

PCR – lančana reakcija polimeraze (engl.: Polymerase chain reaction, PCR)

1. UVOD

Periapikalna kirurgija uključuje uklanjanje patološkog tkiva oko apeksa korijena, izlaganje i resekciju apeksa, izradu retrogradnog kaviteta na reseciranom apeksu i punjenje s materijalom za retrogradno punjenje kaviteta (1). Indicirana je u slučajevima kada konzervativno endodontsko liječenje nije moguće provesti ili je bilo neuspješno (2). Cilj resekcije apeksa je uklanjanje apikalne trećine korijena zuba koje je najčešće mjesto perzistiranja bakterija u korijenskom kanalu (3). Izradom retrogradnog kaviteta eliminiraju se preostale bakterije, a materijalom za punjenje retrogradnog kaviteta sprečava reinfekcija korijenskog kanala (4).

Prema Cohen-u i Burns-u (5), idealan retrogradni kavitet izgleda kao kavitet Klase I s paralelnim zidovima i dubinom od minimalno 3 mm. Suvremeni načini izrade retrogradnih kaviteta uključuju upotrebu ultrazvučnih uređaja i laserskog zračenja (6).

Prednost je ultrazvučne tehnike izrade retrogradnih kaviteta bolja prilagodba ultrazvučnog nastavka anatomiji kanala čime se smanjuje mogućnost perforacija korijena te ostvaruje mikropreparacija s manjim brojem eksponiranih dentinskih tubulusa (7). Ultrazvučna tehnika ne zahtijeva opsežno uklanjanje okolnoga tkiva zbog zavnutog nastavka i boljeg pristupa apeksu korijena (8). U usporedbi sa svrdlom, stvara manje debrisa i zaostatnog sloja (8). Neki istraživači povezuju ultrazvučnu tehniku s većom incidencijom mikrofraktura u dentinskom zidu (9).

Za izradu retrogradnih kaviteta mogu se koristiti i laseri. Najčešće se koriste erbij laseri jer se njihove valne duljine dobro apsorbiraju u vodi i hidroksilnim ionima hidroksiapatita te tako uzrokuju površinsku ablaciju tvrdog zubnog tkiva. Ne

uzrokuju termička oštećenja tkiva, imaju površinski baktericidni učinak i uklanjanju zaostatni sloj čime se postiže bolja adaptacija materijala u kavitetu (10-13). Također, nekontaktni način rada smanjuje rizik od nastanka dentinskih pukotina (11). Klinička su istraživanja pokazala brži i lakši postoperativan tijek cijeljenja nakon uporabe erbij lasera u periapikalnoj kirurgiji (14).

Za retrogradno punjenje kaviteta koriste se sljedeći materijali: amalgam, materijali temeljeni na cink oksid eugenolu, gutaperka, kompoziti, epoksi smole, staklenoionomerni cementi, mineral trioksid agregat (engl.: Mineral Trioxide Aggregate, MTA), biokeramika (15-17). Kvaliteta materijala ovisi o sposobnosti apikalnog brtvljenja i sprečavanja curenja bakterija i bakterijskih nusprodukata u periapikalno tkivo (18). Osim toga, idealan materijal za retrogradno punjenje treba biti biokompatibilan, neresoptivan, dimenzijski stabilan, radioopak, lak za manipulaciju i imati antibakterijska svojstva (19). Poželjno je svojstvo sposobnost poticanja regeneracije tkiva parodontnog kompleksa, osobito cementa (20).

MTA je, zahvaljujući biološkim i fizikalnokemijskim svojstvima, materijal izbora za retrogradno punjenje kaviteta. Sastoji se od trikalcij silikata, trikalcij oksida, silicij oksida, trikalcij aluminija, kalcij sulfata te bizmutovog oksida, koji je dodan zbog radioopaknosti (21-23). Klinički uspjeh MTA-a je rezultat bioaktivnih svojstava materijala (24). Međutim, diskoloracija zuba, produženo vrijeme stvrdnjavanja, manipulativne poteškoće i visoka cijena otežavaju praktičnu primjenu (25, 26).

Biokeramička punila se sastoje od kalcij silikata, cirkonij oksida, tantal pentoksida, monobaznog kalcij fosfata i različitih punila (27). Bioaktivna su, biokompatibilna, kemijski stabilna u biološkom okruženju te posjeduju

antibakterijska svojstva (28-30). Biokompatibilnost i razina citotoksičnosti biokeramičkih materijala je slična kao kod MTA-a (31, 32).

Svrha ovog istraživanje je usporediti kvalitetu apikalnog brtvljenja MTA-a i biokeramičkog punila (engl.: Bioceramic Root Canal Repair Material, BC-RRM) u retrogradnim kavitetima izrađenim erbij, kromij: itrij-skandij-galij garnet (Er, Cr:YSGG) laserom i ultrazvučnom tehnikom (UZV).

2. HIPOTEZA

NULTA HIPOTEZA:

- nema razlika u kvaliteti apikalnog brtvljenja MTA-a i BC-RRM-a neovisno o tehnici izrade retrogradnih kaviteta: Er, Cr:YSGG laser i UZV.

RADNA HIPOTEZA:

- postoji razlika u kvaliteti apikalnog brtvljenja MTA-a i BC-RRM-a ovisno o tehnici izrade retrogradnih kaviteta: Er, Cr:YSGG laser i UZV.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Priprema uzoraka za istraživanje

Etičko povjerenstvo Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu odobrilo je provođenje istraživanja pod rednim brojem 05-PA-26-11/2015.

Za ispitivanje učinka izrade retrogradnih kaviteta laserom na kvalitetu brtvljenja bioaktivnih materijala za retrogradno punjenje korijenskih kanala odabrano je 48 humanih, ekstrahiranih, jednokorijenskih mandibularnih i maksilarnih inciziva i premolara. Zubi su izvađeni zbog parodontnih razloga ili opsežnih karijesnih lezija krune zuba. Svi zubi su imali potpuno razvijen korijen, bez znakova eksterne resorpcije, bez karijesa korijena i prethodnog endodontskog liječenja.

Zubi su nakon vađenja pohranjeni u 0,5% otopinu kloramina (Gradska ljekarna Zagreb, Republika Hrvatska) na 4°C. Parodontno meko tkivo i subgingivni kamenac su uklonjeni električnim mikromotorom i čeličnim okruglim svrdlom br. 018 (Komet, Rock Hill, SC, SAD). Kruna zuba je odrezana dijamantnim fisurnim svrdlom br. 016 (Komet, Rock Hill, SC, SAD) montiranim na turbine uz vodeno hlađenje. Radna duljina (RD) od 12 mm je standardizirana kod svih uzoraka i određena pomoću proširivača veličine # 10 ili # 15 (Maillefer, Ballaigues, Švicarska).

Svi korijenski kanali su instrumentirani sekvencom strojne ProTaper tehnike instrumentacije (Dentsply/Maillefer, Tulsa, OK, SAD) prema uputama proizvođača. Brzina rotacije bila je 300 okretaja u minuti. Korijenski kanali su instrumentirani do veličine # F2 (25/0.08). Između svakog instrumenta, korijenski kanali su isprani s 1

ml 2,5%-tnog NaOCl-a (pripremljeno na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu) pomoću 30G igle (BD, Microlance, Becton Dickinson, Madrid, Španjolska) i šprice od 5 ml. Nakon instrumentacije, kanali su napunjeni s 1 ml 15%-tne etilendiaminotetraoctene kiseline (EDTA, Calsinase, Lege artis, Dettenhausen, Njemačka), koja je ostavljena u kanalima 1 min te potom isprani s 1 ml 2,5%-tnog NaOCl-a i 1 mL fiziološke otopine (Zavod za transfuzijsku medicinu, Zagreb).

3.2. Izrada retrogradnih kaviteta

Apikalni dijelovi pripremljenih korjenova skraćeni su za 3 mm, okomito na uzdužnu os uzorka, pomoću dijamantnog fisurnog svrdla veličine # 016 (Komet, Rock Hill, SC, SAD) montiranim na turbinu uz vodeno hlađenje.

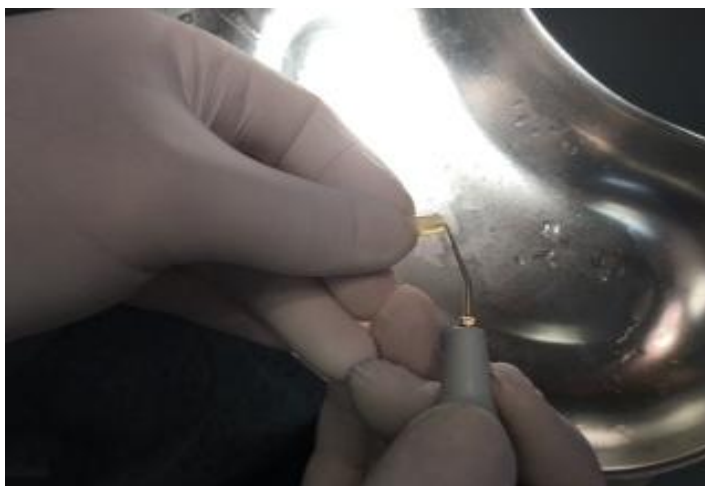
Pripremljeni uzorci su podijeljeni nasumično u dvije skupine (24 uzoraka u svakoj) ovisno o tehnici izrade retrogradnog kaviteta:

Skupina 1: Retrogradni kaviteti dubine 3 mm izrađeni su erbij, kromij:itrij-skandij-galij garnet (Er, Cr:YSGG) laserom (valna duljina 2780 nm) (Waterlase, Biolase, San Clemente, Kalifornija, SAD) pomoću MZ8 laserskog nastavka (promjer 800 μ m), koji je označen gumenim stoperom na trećem milimetru duljine. Parametri lasera su bili: snaga: 3,5 W; frekvencija: 25 Hz; vrijeme pulsa: 140 μ s; gustoća energije: 28 J/cm²; voda: 85%; zrak: 80% (Slika 1).



Slika 1. Izrada retrogradnih kaviteta s Er, Cr:YSGG laserom

Skupina 2: Retrogradni kaviteti dubine 3 mm izrađeni su kirurškim ultrazvučnim nastavkom montiranim na ultrazvučni uređaj (Piezon Master 400, EMS, Švicarska) (Slika 2).

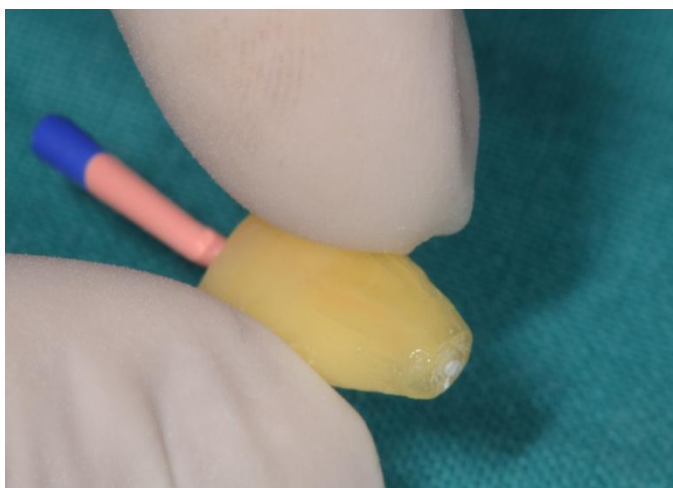


Slika 2. Izrada retrogradnih kaviteta s ultrazvučnim uređajem

Vrijeme izradbe retrogradnog kaviteta standardizirano je na 15 sekundi u obje skupine.

3.3. Punjenje retrogradnih kaviteta s bioaktivnim materijalima

U svakoj skupini, retrogradni kaviteti deset uzoraka su napunjeni biokeramičkim materijalom za retrogradno punjenje (Total Fill Root Repair Material-Putty, Brasseler, Savannah, SAD), a drugih deset MTA-om (Angelus, Londrina, Brazil) (Slika 3).



Slika 3. Punjenje retrogradnih kaviteta s biokeramičkim materijalom

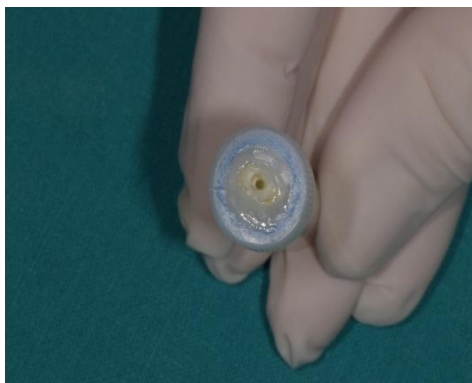
Prije punjenja retrogradnih kaviteta, u korijenske kanale su postavljeni F2 gutaperka štapići (ProTaper Universal, Maillefer, Švicarska), koji su prethodno skraćeni na vrhu za 3 mm. Tako postavljeni gutaperka štapići su poslužili kao matriks prilikom kondenzacije materijala za retrogradno punjenje kaviteta.

Oba materijala su pripremljena prema uputama proizvođača. U retrogradnim kavitetima, material je kondenziran ravnim nabijačem (Carl Martin, Solingen, Njemačka). Vanjska površina korijena, osim reseciranog apikalnog dijela s pripremljenim retrogradnim kavitetom, premazana je s dva sloja prozirnog laka za

nokte (Essence, Sulzbach, Njemačka).

U pozitivnoj kontrolnoj skupini pripremljeni retrogradni kaviteti su napunjeni s privremenim materijalom temeljenim na cink-oksidu (Cavit G, 3M ESPE, Neuss, Njemačka), koji je kondenziran ravnim nabijačem. U negativnoj kontrolnoj skupini, retrogradni kaviteti su napunjeni ružičastim voskom (Cavex, Haarlem, Nizozemska) te je čitava resecirana apikalna površina i retrogradni ispun premazan s dva sloja laka za nokte.

Svi zorci su fiksirani u plastične Eppendorf epruvete na navoj (Eppendorf, Hamburg, Germany) kroz otvor napravljen u čepu epruvete tako da je apikalni dio zuba okrenut prema dnu epruvete, a koronarni dio u razini čepa epruvete. U tom položaju uzorci su pričvršćeni tekućim kompozitnim materijalom, Universal Flo (GC, Tokyo, Japan), koji je polimeriziran lampom (Bluephase, Ivoclar Vivadent, Schaan, Lihtenštajn) 40 sekundi, i cijanoakrilatom (UHU, Bühl, Njemačka) (Slika 4 i 5).



Slika 4. Uzorak fiksiran u Eppendorf epruveti



Slika 5. Uzorak fiksiran u Eppendorf epruveti

Svi uzorci su sterilizirani u plazmi (PLASMA; Sterrad 100S, Johnson&Johnson, Irvine, Kalifornija, SAD).

3.4. Testiranje propuštanja hrane za bakterije

U istraživanju je korišten model bakterijskog propuštanja prema Antunesu i sur. (33), koji se temelji na informaciji primaju li intrakanalne bakterije hranu iz seruma kroz propuštanja retrogradnog materijala.

Svi postupci mikrobiološke analize provedeni su u sigurnosnom kabinetu tipa IIA na Zavodu za kliničku i molekularnu mikrobiologiju KBC-a Zagreb. Tijekom svih eksperimentalnih protokola korištene su nitrilne rukavice za istraživanje bez pudera (Micro-Touch® Nitrile™, Ansell Healthcare, Red Bank, NJ, SAD).

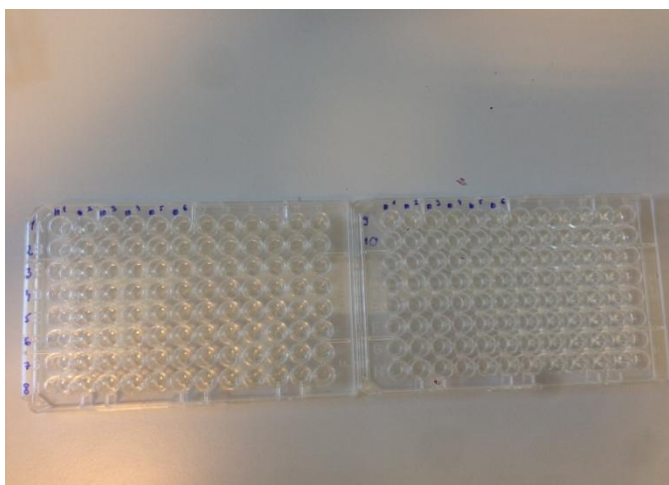
Epruvete s pričvršćenim uzorcima napunjene su fetalnim bovinim serumom (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Njemačka) pomoću sterilne 30G igle i špricom od 2 ml, tako da su 3 mm apikalne trećine korijena bile uronjene u serum (Slika 6).



Slika 6. Punjenje Eppendorf epruveta s fetalnim bovinim serumom

Pripremljena je bakterijska suspenzija miješanjem čiste kulture *Enterococcus faecalis*-a ATCC 29212, koja je rasla na krvnoj podlozi sa 7% konjske krvi (211037, Beckton Dickinson, Madrid, Španjolska) 24 sata, s trypticase soy broth (TSB) da se dobije suspenzija gustoće 0,5 McFarland izmjerena densitometrom (Densimat, BioMerieux, Marcy l'Etoile, Francuska), koja sadrži 10^8 E. faecalis. bakterija. Korijenski kanali su napunjeni s 10 µl pripremljene bakterijske suspenzije sterilnom inzulinskom špricom i iglom 0,3 x 8 mm, bez prelijevanja iz kanala. Nakon inokulacije, zubi su inkubirani na 37°C u 100% vlage tijekom 30 dana.

Nakon 30 dana inkubacije, iz korijenskih kanala su prikupljeni mikrobiološki uzorci za metodu kulture i PCR. Korijenski kanali su napunjeni s 10 µl sterilne fiziološke otopine (B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Njemačka) sterilnom inzulinskom špricom i iglom 0,3 x 8 mm. Nakon tri ciklusa aspiracije i injiciranja sadržaja korijenskog kanala, čitav sadržaj je unesen u prvu Eppendorf epruvetu mikrotitracijske pločice (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) od 0,5 ml koja je sadržavala 90 µl Mueller – Hinton bujona. Provedenim postupkom dobilo se prvo razrjeđenje od 1:10. Nadalje, iz prvog razrjeđenja pipetirano je Eppendorf pipetom (Eppendorf, Hamburg, Njemačka) 10 µl sadržaja i preneseno u drugu Eppendorf epruvetu mikrotitracijske pločice, istog volumena i s istom količinom bujona, te se dobilo razrjeđenje od 1:100. Opisanim postupkom uzorci su serijski razrjeđivani do $1:10^{10}$, pri čemu su kroz čitav postupak korištene Eppendorf epruvete mikrotitracijske pločice istog volumena i s istom količinom bujona (Slika 7).



Slika 7. Mikrotitracijske Eppendorf pločice

Iz svakog razrjeđenja pipetirano je 10 μ L sadržaja koji je nanesen na krvni agar (211037, Becton Dickinson, NJ, SAD). Inkubacija je trajala 24 h na 37°C na 100% vlage. Nakon perioda inkubacije, na pločama su izbrojene kolonije, te je konačan broj dobiven na temelju faktora razrjeđenja.

3.5. Testiranje lančanom reakcijom polimeraze (engl.: Polymerase chain reaction, PCR)

Kako bi se isključila mogućnost lažno negativnih rezultata, svi uzorci su dodatno analizirani lančanom reakcije polimeraze (engl.: polymerase chain reaction, PCR) da bi se potvrdila prisutnost *Enterococcus faecalis*-a u svim uzorcima. Lažno negativni rezultati mogu nastati zbog malog broja *Enterococcus faecalis*-a, ili ako je bakterija u stacionarnoj fazi. Sekvence primera su dizajnirane na osnovi cijelog genoma *Enterococcus faecalis*-a V583.. Sekvence primera bile su : CAA GGC ATC CAC CGT and GAA GTC GTA ACA AGG. Reakcijska mješavina je sadržavala 1 μ L svakog primera (konc. 10 pmol/ μ l), 12,5 μ l PCR Master-a i PCR pufer-a do konačne mješavine od 25 μ l.

Uvjeti PCR-a su bili: početna denaturacija 2 min 95°C, te nakon toga 40 ciklusa 95°C/60 sek; 55°C/60 sek i 72°C/60 sek. Nakon završenih ciklusa, dodatna ekstenzija je trajala 10 minuta na 72°C. Uvjeti za PCR su optimizirani uz pozitivnu kontrolu *Enterococcus faecalis*-a (ATCC 29212). Gel elektroforeza je napravljena u 1,5 % agaroznom gelu (Metaphor Agarose, Cambrex Bioscience, Rockland Inc., SAD) u trajanju od 60 minuta uz 80V u TAE puferu (uređaj Elchrom Scientific EPS/150/2000). Nakon završetka elektroforeze, gel se boji otopinom etidij bromida (Merck, Darmstadt, Njemačka). DNA vrpce se vizualiziraju pod UV svjetlom (UVP Gel Dokumentation, Upland, CA, USA). Uzorci koji sadrže genomsku DNA *Enterococcus faecalis*-a imaju 2 fragmenta : 320 i 420 parova baza. U svakoj reakciji je korištena pozitivna (*Enterococcus faecalis*, ATCC 29212) i negativna kontrola, te marker od 100 bp (Promega, Madison, Wisconsin, SAD).

3.6. Statistička obrada podataka

Zbog neravnomjerne raspodjele rezultata, korišten je Mann-Whitney U test. Stanje rezultata prikazano je i grafički (Box i Whiskerov plot).

Za usporedbu kvaliteta apikalnog brtvljena MTA-a i BC-RRM-a ovisno o tehnici izrade retrogradnih kaviteta (Er, Cr:YSGG laser i UZV), korišten je Kruskal-Wallisov test.

Za statističku analizu podataka korišten je programski paket IBM Statistics 19.0.0.1. (Statsoft, Tulsa, OK, SAD).

4. REZULTATI

Nakon 30 dana inkubacije, u svim uzorcima pozitivne kontrole su pronađene bakterije. Nisu otkrivene vitalne bakterije u uzorcima negativne kontrole.

Tablica 1 prikazuje broj kolonija bakterije *E. faecalis* (minimalan i maksimalni broj, medijan) i broj pozitivnih uzoraka u svim eksperimentalnim skupinama nakon 30 dana inkubacije, dobiven metodom kulture. Nije bilo značajne razlike između BC-RRM i MTA materijala u kavitetima izrađenim ultrazvučnim nastavkom, u smislu broja preostalih bakterija u korijenskom kanalu ($p > 0,05$). Slične rezultate pokazao je MTA u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom ($p > 0,05$). Značajno veći broj bakterija otkriven je u skupini BC-RRM materijala punjenog u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom ($p < 0.001$).

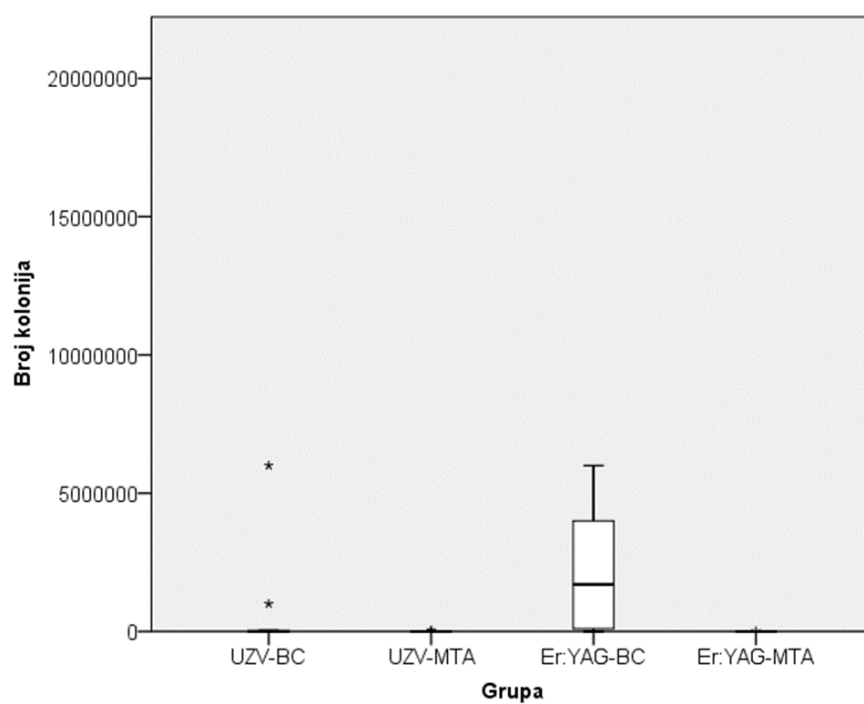
Tablica 1. Broj bakterija (kolonija E. Faecalis-a) i broj pozitivnih uzoraka u svim eksperimentalnim skupinama

Skupine	Pozitivni uzorci	Raspon broja kolonija	Percentile		
			25th	50th (Median)	75th
UZV-BC-RRM	4/10	$0 - 6 \times 10^6$	0	0	2.8×10^5
UZV-MTA	2/10	$0 - 4 \times 10^4$	0	0	1.0×10^3
Er,Cr:YSGG-BC-RRM	10/10	$1 \times 10^3 - 7 \times 10^7$	9.25×10^4	1.7×10^6	4.5×10^6
Er,Cr:YSGG-MTA	1/10	$0 - 6 \times 10^3$	0	0	0

UZV – ultrazvučna tehnika izrade retrogradnog kaviteta

MTA – Mineral trioksid agregat

BC-RRM – Bioceramic Root Canal Repair Material



Slika 8. Grafički prikaz broja kolonija *E. faecalis*-a u odnosu na eksperimentalne kombinacije (punjenje + metoda)

Usporedbom MTA i BC-RRM materijala, neovisno o tehnici izrade retrogradnog kaviteta, MTA se pokazao značajno uspješnijim ($p < 0.001$), što je i prikazano manjim brojem preostalih bakterija u kanalima nakon 30 dana (Tablica 2).

Tablica 2. Broj bakterija u korijenskim kanalima nakon 30 dana inkubacije za retrogradne materijale MTA i BC-RRM

Retrogradni materijali		N	Minimum	Maximum	Percentiles		
					25th	50th (Median)	75th
Broj	BC-RRM	20	0	70000000	0	85000	3000000
kolonija	MTA	20	0	40000	0	0	0

MTA – Mineral trioksid agregat

BC-RRM – Bioceramic Root Canal Repair Material

Ako se uspoređuje odnos između tehnika izrade retrogradnih kaviteta (Er, Cr:YSGG laser i UZV) nema statističke razlike ($p = 0,065$) (Tablica 3).

Tablica 3. Broj bakterija nakon 30 dana inkubacije za tehnike izrade retrogradnih kaviteta

Tehnike izrade kaviteta		N	Minimum	Maximum	Percentiles		
					25th	50th (Median)	75th
Broj kolonija	UZV	20	0	6000000	0	0	3750
	Er,Cr:YSGG	20	0	70000000	0	3500	2350000

4.1. PCR analiza sterilnih uzoraka

Svi pozitivni rezultati dobiveni metodom kulture potvrđeni su i PCR-om. DNK *E. faecalis*-a nije otkrivena u tri uzorka u eksperimentalnoj kombinaciji Er, Cr:YSGG-MTA te u šest uzoraka u kombinaciji UZV-MTA. U eksperimentalnim kombinacijama UZV-BC-RRM i Er, Cr:YSGG-BC-RRM nije bilo PCR negativnih uzoraka.

5. RASPRAVA

Cilj je ovog istraživanja bio usporediti kvalitetu apikalnog brtvljenja MTA-a i BC-RRM-a u retrogradnim kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom i UZV tehnikom pomoću testa propuštanja hrane za bakterije u kanalu. Model propuštanja hrane za bakterije je prvi puta opisan u radu Antunes-a i sur. (33) koji su istraživali kvalitetu apikalnog brtvljenja između MTA-a i biokeramičkog punila (EndoSequance Bioceramic Root Canal Repair Material-Fast Set, BC-RRM) u retrogradnim kavitetima izrađenim UZV-om. Test propuštanja hrane za bakterije se temelji na procjeni oprskbe inokuliranih bakterija u unutarnjoj komori (korijenski kanal) hranjivim tvarima iz vanjske komore (Eppendorf epruveta), kroz apikalne kanale propuštanja. Prema tome, kvalitetno apikalno brtvljenje onemogućava opskrbu bakterija te njihov broj opada ili doseže razinu u kojoj se ne mogu otkriti nakon perioda inkubacije. Učinkovitost testa propuštanja hrane za bakterije kao i njegova valjanost potvrđena je i u ovom istraživanju rezultatima pozitivne i negativne kontrolne grupe. U pozitivnoj kontrolnoj grupi u svim uzorcima je došlo do porasta bakterija, što je potvrda da je dolazilo do opskrbe bakterija hranjivim tvarima. U negativnoj kontrolnoj grupi svi uzorci su bili sterilni kao dokaz da smo mogli kontrolirati kojim kanalima propuštanja će hranjive tvari dolaziti do bakterija.

U ovom istraživanju, MTA i BC-RRM su pokazali slično apikalno brtvljenje u kavitetima izrađenim ultrazvukom. Međutim, u kavitetima izrađenim laserom, MTA je bio uspješniji. Sličan rezultat je objavljen u radu Antunesa i sur. (33), u kojem nije bilo razlike MTA i BC-RRM-a u kavitetima izrađenim ultrazvukom. U radu Hirschberga i sur. (34), retrogradni kaviteti izrađeni UZV-om i napunjeni

biokeramičkim materijalom imali su veći stupanj apikalnog propuštanja od kaviteta napunjenih MTA-om. Nair i sur. (35) nisu pronašli razliku u kvaliteti apikalnog brtvljenja između MTA i BC-RRM-a, unatoč različitoj pripremi uzoraka u navedenim istraživanjima. Za razliku od našeg istraživanja, u kojem je bakterijska suspenzija inokulirana u prethodno instrumentirane i očišćene kanale, Nair-a i sur. (35) su suspenziju *E. faecalis*-a inokulirali u kanale koji su bili revidirani nakon prethodnog punjenja gutaperkom. Veći porast bakterija u skupinama s BC-RRM-om, u ovom radu, se može objasniti nižim pH-om BC-RRM-a od MTA, što je mogući razlog izraženijeg antimikrobnog učinka MTA i samim time manjim porastom bakterija u retrogradnim kavitetima napunjenim MTA-om (36).

U ovom istraživanju lasersko zračenje nije utjecalo na kvalitetu brtvljenja MTA materijala, ali je smanjilo kvalitetu brtvljenja BC-RRM-a. Prethodni autori su dokazali prednost erbij lasera u periapikalnoj kirurgiji u smislu povećanja kvalitete apikalnog brtvljenja (6, 10). Karlović i sur. (6) su objavili smanjenje apikalnog propuštanja MTA-a, Super EBA-e i IRM-a u retrogradnim kavitetima izrađenim Er:YAG laserom u odnosu na ultrazvuk. U radu Kocaka i sur. (10), retrogradni kaviteti izrađeni Er, Cr:YSGG laserom su manje propuštali od kaviteta izrađenih UZV-om. Različiti rezultati u radovima se mogu objasniti različitim metodama ispitivanja apikalnog propuštanja materijala. U istraživanjima navedenih autora korištena je metoda prodiranja boje i metoda filtracije tekućine. Boje koje se koriste u metodi prodiranja boje imaju nisku molekularnu težinu i samim time mogu prodirati na mjesta gdje bakterije ne mogu (37, 38). U metodi filtracije tekućine promjene pritiska ili vremenskog intervala mogu utjecati na rezultate (39). Prema našim saznanjima ovo je prvo istraživanje koje je uspoređivalo kvalitetu brtvljenja

MTA i BC-RRM-a ovisno o tehnici izrade retrogradnih kaviteta (Er, Cr:YSGG laseri UZV) metodom propuštanja hrane za bakterije, koja je prvi puta opisana u radu Antunes-a i sur (33). Također, moguće je da lošiji rezultati BC-RRM-a u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom su posljedica slabije sveze i interakcije visoko viskoznog BC-RRM-a i nepravilne površinu dentina, koja je nakon laserskog djelovanja prekrivena tankim slojem karbonizacije (40-42). Osim toga, nedostatak vode uzrokovan termomehaničkim učinkom laserskog zračenja bi mogao uzrokovati strukturalne promjene biokeramičkog materijala kod kojeg je voda jako bitan faktor u stvrdnjavanju (43).

6. ZAKLJUČAK

1. Nema razlike u kvaliteti apikalnog brtvljenja MTA materijala u retrogradnim kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom i UZV-om. Slično apikalno brtvljenje pokazuje BC-RRM punjenje u kavitetima izrađenim UZV-om.
2. Najveće apikalno propuštanje zabilježeno je u kavitetima izrađenim laserom i punjenim BC-RRM-om.

7. SAŽETAK

Svrha ovog *in vitro* istraživanja je bila usporediti kvalitetu apikalnog brtvljenja mineral trioksid agregata (MTA) i biokeramičkog punila (Bioceramic, Root Repair Material, BC-RRM) u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom i UZV-om.

U istraživanju je korišteno 48 humanih, ekstrahiranih jednokorijenskih zuba. Nakon ProTaper Universal tehnike instrumentacije, apikalni dijelovi korijenova su odrezani za 3 mm. Uzorci su nasumično podijeljeni dvije skupine ovisno o tehnici izrade retrogradnog kaviteta: Skupina 1: Er, Cr:YSGG laser, Skupina 2: ultrazvučna tehnika. U svakoj skupini, retrogradni kaviteti su u polovine uzoraka napunjeni s MTA-om, a u druge polovine s BC-RRM-om. U pozitivnoj kontrolnoj skupini retrogradni kaviteti su napunjeni s privremenim materijalom, a u negativnoj ružičastim voskom te je čitava površina premazana lakom. Uzorci su fiksirani u plastične Eppendorf epruvete i sterilizirani u plazmi. Korijenski kanali su kontaminirani suspenzijom *E. faecalis*-a, a epruvete napunjene s fetalnim bovinim serumom. Nakon 30 dana inkubacije, iz korijenskih kanala su prikupljeni mikrobiološki uzorci za metodu culture i test reakcije lančane polimeraze (PCR).

Nije bilo značajne razlike između BC-RRM i MTA materijala u kavitetima izrađenim ultrazvučnim nastavkom ($p > 0,05$). Slične rezultate pokazao je MTA u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom ($p > 0,05$). Značajno veći broj bakterija otkriven je u skupini BC-RRM materijala punjenog u kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom ($p < 0.001$).

Nema razlike u kvaliteti apikalnog brtvljenja MTA materijala u retrogradnim kavitetima izrađenim Er, Cr:YSGG laserom i UZV-om. Najveće apikalno propuštanje zabilježeno je u kavitetima izrađenim laserom i punjenim BC-RRM-om.

8. SUMMARY

Effect of laser on the sealing ability of bioactive retrofilling materials.

The aim of the *in vitro* study was to compare the apical sealing ability of Total Fill Bioceramic Root Repair Material (BC-RRM) and Mineral Trioxide Aggregate (MTA) regarding the retrograde preparation technique used: ultrasonic and Er, Cr:YSGG laser. The study sample consisted of 48 human single-rooted teeth, which were instrumented with ProTaper Universal rotary technique. After root-end resection (3 mm), the root specimens were divided in two groups according the retrograde preparation technique used: Group 1: ultrasonic technique, Group 2: Er, Cr:YSGG laser. In each group, the half of the retrograde cavities was filled with BC-RRM and another half with MTA. The positive controls were filled with temporary material. In the negative controls, with utility wax. The outer root surfaces were covered with layers of nail varnish. The specimens were mounted in tubes and sterilized in plasma. The root canals were inoculated with *E. faecalis* suspension, and the tubes were filled with fetal bovine serum. After 30 days, the canals were sampled, cultured and the colony forming units (CFUs) were counted. The presence of *E. faecalis* was also determined by PCR.

There was no significant difference between BC-RRM i MTA in the ultrasonic groups ($p > 0,05$). Similar results showed MTA in cavities made with Er, Cr:YSGG laser ($p > 0,05$). A significantly higher number of bacteria was detected in the laser group with BC-RRM filling ($p < 0.001$).

There is no difference in the apical sealing ability of MTA in retrograde cavities made with Er, Cr: YSGG laser and ultrasound. BC-RRM showed more leakage when used in retro-cavities prepared by Er, Cr: YSGG laser.

9. LITERATURA

1. Asgary S, Eghbal MJ, Parirokh M. Sealing ability of a novel endodontic cement as a root-end filling material. *J Biomed Mater Res A*. 2008;87:706–9.
2. Kim S, Kratchman S. Modern endodontic surgery concepts and practice: a review. *J Endod*. 2006;32:601–23.
3. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Ricucci D, Hülsmann M. Causes and management of post-treatment apical periodontitis. *Br Dent J*. 2014;216:305-12.
4. Siqueira JF Jr. *Treatment of Endodontic Infections*. 1th ed. London: Quintessence Publishing. 2011.
5. Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp*. 8th ed. St. Louis: CV Mosby. 2002.
6. Karlovic Z, Pezelj-Ribaric S, Miletic I, Jukic S, Grgurevic J, Anic I. Erbium:YAG laser versus ultrasonic in preparation of root end cavities. *J Endod*. 2005;31:821–3.
7. Eliyas S, Vere J, Ali Z, Harris I. Micro-surgical endodontics. *Br Dent J*. 2014;216:169-77.
8. Aydemir S, Cimilli H, Hazar Yoruç AB, Kartal N. Evaluation of two different root-end cavity preparation techniques: A scanning electron microscope study. *Eur J Dent*. 2013;7:186-90.
9. Layton CA, Marshall JG, Morgan LA, Baumgartner JC. Evaluation of cracks associated with ultrasonic root-end preparation. *J Endod*. 1996;22:157–60.
10. Koçak MM, Koçak S, Aktuna S, Görücü J, Yaman SD. Sealing ability of retrofilling materials following various root-end cavity preparation techniques. *Lasers Med Sci*. 2011;26:427–31.

11. Komori T, Yokoyama K, Takato T, Matsumoto K. Clinical application of the Erbium: YAG laser for apicoectomy. *J Endod*. 1997;23:748–50.
12. Franzen R, Gutknecht N, Falken S, Heussen N, Meister J. Bactericidal effect of a Nd: YAG laser on *Enterococcus faecalis* at pulse durations of 15 and 25 ms in dentine depths of 500 and 1,000 μm . *Lasers Med Sci*. 2011;26:95–101.
13. Winik R, Araki AT, Negrão JA, Bello-Silva MS, Lage-Marques JL. Sealer penetration and marginal permeability after apicoectomy varying retrocavity preparation and retrofilling material. *Braz Dent J*. 2006;17:323–7.
14. De Freitas PM, Simões A. *Lasers in dentistry: guide for clinical practice*. 1th ed. Ames: Wiley J & Sons, Inc. 2015.
15. Torabinejad M, Pitt Ford TR. Root end filling materials: a review. *Endod Dent Traum*. 1996;12:161-78.
16. Vasudev SK, Goel BR, Tyagi S. Root end filling materials-A review. *Endodontology*. 2003;15:12-8.
17. Chong BS, Pitt Ford TR. Root-end filling materials: rationale and tissue response. *Endod Topics*. 2005;11:114-30.
18. Gartner AH, Dorn SO. Advances in endodontic surgery. *Dent Clin N Amer*. 1992; 36:357-78.
19. Johnson BR. Considerations in the selection of a root-end filling material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87:398-404.
20. Baek SH, Plenk H Jr, Kim S. Periapical tissue responses and cementum regeneration with amalgam, SuperEBA, and MTA as root-end filling materials. *J Endod*. 2005;31:444–9.

21. Torabinejad M, Hong CU, McDonald F, Pitt Ford TR. Physical and chemical properties of new root-end filling material. *J Endod.* 1995;21:349-53.
22. Camilleri J, Montesin FE, Brady K, Sweeney R, Curtis RV, Ford TR. The constitution of mineral trioxide aggregate. *Dent Mater.* 2005;21:297–303.
23. Tingey MC, Bush P, Levine MS. Analysis of Mineral Trioxide Aggregate Surface when Set in the Presence of Fetal Bovine Serum. *J Endod.* 2008;34:45-9.
24. Gandolfi MG, Taddei P, Tinti A, Prati C. Apatite-forming ability (bioactivity) of ProRoot MTA. *Int J Endod.* 2010;43:917-29.
25. Boutsoukis C, Noura G, Lambrianidis T. Ex vivo study of the efficiency of two techniques for the removal of mineral trioxide aggregate used as a root canal filling material. *J Endod.* 2008;34:1239–42.
26. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod.* 2009;35:777–90.
27. Best SM, Porter AE, Thian ES, Huang J. Bioceramics: past, present and for the future. *J Eur Ceram Soc.* 2008;28:1319-1913.
28. Ma J, Shen Y, Stojicic S, Haapasalo M. Biocompatibility of two novel root repair materials. *J Endod.* 2011;37:793–8.
29. Bósio CC, Felipe GS, Bortoluzzi EA, Felipe MC, Felipe WT, Rivero ER. Subcutaneous connective tissue reactions to iRoot SP, mineral trioxide aggregate (MTA) Fillapex, DiaRoot BioAggregate and MTA. *Int Endod J.* 2014;47:667–74.
30. Lovato KF, Sedgley CM. Antibacterial activity of endoSequence root repair material and proRoot MTA against clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2011;37:1542-6.

31. Ciasca M, Aminoshariae A, Jin G, Montagnese T, Mickel A. A comparison of the cytotoxicity and proinflammatory cytokine production of EndoSequence root repair material and ProRoot mineral trioxide aggregate in human osteoblast cell culture using reversetranscriptase polymerase chain reaction. *J Endod.* 2012;38:486–9.
32. Alanezi AZ, Jiang J, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Cytotoxicity evaluation of endosequence root repair material. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:122–5.
33. Antunes HS, Gominho LF, Andrade –Junior CV, Dessaune-Neto N, Alves FR, Rôças IN, Siquera JF Jr. Sealing ability of two root-end filling materials in bacterial nutrient leakage model. *J Endod.* 2015; [Ahead of print].
34. Hirschberg CS, Patel NS, Patel LM., Kadouri DE, Hartwell GR. Comparison of sealing ability of MTA and EndoSequence Bioceramic Root Repair Material: A bacterial leakage study. *Quintessence Int.* 2013;44:157-62.
35. Nair U, Ghattas S, Saber M, Natera M, Walker C, Pileggi R, Gainesville, A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: an in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:74-7.
36. Hansen SW, Marshall JG, Sedgley CM. Comparison of intracanal EndoSequence root repair material and ProRoot MTA to induce pH changes in simulated root resorption defects over 4 weeks in matched pairs of human teeth. *J Endod.* 2011;37:502-6.
37. Wu MK, Wesselink PR. Endodontic leakage studies reconsidered. Part I. Methodology, application and relevance. *Int Endod J.* 1993;26:37-43.

38. Barthel CR, Moshonov J, Shuping G, Orstavik D. Bacterial leakage versus dye leakage in obturated root canals. *Int Endod J*. 1999;32:370-5.
39. Pommel L, Camps J. Effects of pressure and measurement time on the fluid filtration method in endodontics. *J Endodon*. 2001;27:256–8.
40. Hibst R, Keller U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Laser Surg Med*. 1989;9:338–44.
41. Corona SA, Borsatto MC, Pecora JD, De SA Rocha RA, Ramos TS, Palma-Dibb RG. Assessing microleakage of different class V restoration after Er:YAG laser and our preparation. *J Oral Rehabil*. 2003;30:1008–14.
42. Yamazaki R, Goya C, Yu DG, Kimura Y, Matsumoto K. Effects of erbium, chromium: YSGG laser irradiation on root canal walls: a scanning electron microscopic and thermographic study. *J Endod*. 2001;27:9-12.
43. Candaiero GT, Correia FC, Duarte MA, Ribeiro-Siquera DC, Gavini G. Evaluation od radiopcity, pH, release od calcium ions, and flow of biocermic root canal sealer. *J Endod*. 2012;38:842-5.

10. ŽIVOTOPIS

Ružica Lucić, rođena 19. svibnja. 1991. godine u Gradačcu, u Bosni i Hercegovini. Pohađala je Osnovnu školu Braće Radić u Domaljevcu, a 2006. godine upisala je Srednju školu fra Martina Nedića u Orašju, gdje je maturirala 2010 godine. Iste godine je upisala Stomatološki fakultet u Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnica je dekanove nagrade za uspjeh na petoj godini studija. Tijekom studija sudjelovala je u znanstveno-istraživačkim radu koji je objavljen u časopisu Lasers in Medical Science [2016;31(2):332-342].