

# Ispitivanje učinkovitosti poliheksametilen bigvanida na mikroorganizme u korijenskom kanalu zuba

---

**Medvedec Mikić, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2013**

*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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:127:074868>

*Rights / Prava:* [Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International/Imenovanje-Nekomercijalno-Dijeli pod istim uvjetima 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-18**



*Repository / Repozitorij:*

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





UNIVERSITY OF ZAGREB  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ivana Medvedec Mikić

**TESTING THE EFFECTIVENESS OF  
POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE ON  
MICROORGANISMS IN THE ROOT  
CANAL**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2013.



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
STOMATOLOŠKI FAKULTET

Ivana Medvedec Mikić

**ISPITIVANJE UČINKOVITOSTI  
POLIHEKSAMETILEN BIGVANIDA NA  
MIKROORGANIZME U KORIJENSKOM  
KANALU ZUBA**

DOKTORSKI RAD

MENTORI:

prof. dr. sc. Arjana Tambić Andrašević

prof. dr. sc. Paris Simeon

Zagreb, 2013.



University of Zagreb  
SCHOOL OF DENTAL MEDICINE

Ivana Medvedec Mikić

**TESTING THE EFFECTIVENESS OF  
POLYHEXAMETHYLENE BIGUANIDE ON  
MICROORGANISMS IN THE ROOT  
CANAL**

DOCTORAL THESIS

Supervisors:

prof. dr. sc. Arjana Tambić Andrašević

prof. dr. sc. Paris Simeon

Zagreb, 2013.

Rad je izrađen na Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu , Zavodu za kliničku mikrobiologiju Sveučilišne klinike za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević" u Zagrebu te Zavodu za molekularnu biologiju, Laboratorij za genotoksične agense Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu.

**Voditelj rada:** prof. dr. sc. Paris Simeon

Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

**Suvoditelj rada:** prof. dr. sc. Arjana Tambić Andrašević

Zavod za kliničku mikrobiologiju

Sveučilišna klinika za infektivne bolesti "Dr. Fran Mihaljević"

**Lektor hrvatskog jezika:** Jelena Pezelj, prof.

Istarska 4, 21000 Split

**Lektor engleskog jezika:** Jelena Pezelj, prof.

Istarska 4, 21000 Split

**Rad sadrži:** 82 stranice

14 tablica

15 slika

1 CD

*Zahvaljujem mentorima prof.dr.sc. Arjani Tambić Andrašević i prof.dr.sc. Parisu Simeonu na pomoći i savjetima pri izradi ovog doktorskog rada.*

*Veliko hvala prof.dr.sc. Goranki Prpić- Mehičić i prof.dr.sc. Silvani Jukić- Krmek na trudu i pomoći oko dotjerivanja ove konačne verzije rada.*

*I na kraju najveće hvala mojim roditeljima i suprugu na podršci, strpljenju i ljubavi.*

## SAŽETAK

Uklanjanje mikroorganizama, upalno promijenjenog i nekrotičnog sadržaja iz endodontskog prostora ključno je za uspjeh endodontskog tretmana. Anatomska građa endodontskog prostora je izrazito kompleksna, stoga sama mehanička obrada nije dovoljna. Potrebna su nam kemijska sredstva koja djeluju na dijelove korijenskog kanala nedostupne endodontskim instrumentima. Takva sredstva, osim što trebaju imati antimikrobni učinak, trebaju biti i biološki sigurna.

Svrha ovoga istraživanja bila je utvrditi ima li poliheksametilen bigvanid (PHMB) u koncentraciji od 0,2% antimikrobni učinak na rezistentne mikroorganizme specifične za endodontski prostor zuba unutar nezrelog (48 sati) i zrelog biofilma (4 tjedna), usporediti rezultate s djelovanjem 2,5%-tnog natrijevog hipoklorita (NaOCl) te ispitati citotoksični učinak PHMB-a i NaOCl-a. Zatim je napravljeno istraživanje na mješovitoj kulturi mikroorganizama unutar četiri tjedna starog plaka u kojoj je umjesto *P. aeruginosa* odabran *Staphylococcus epidermidis*. Rezultati su uspoređivani s rezultatima dobivenim nakon tretiranja zubi 2,5%-tnim NaOCl-om i 0,2%-tnim klorheksidinom (CHX). Ispitivanje citotoksičnosti PHMB-a i NaOCl-a provodilo se uz pomoć spektrofotometrijskog MTT testa na fibroblastima kineskog hrčka V-79. Rezultati u ovom radu pokazali su da 0,2%-tni PHMB ima jednako antimikrobno djelovanje na *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *S. epidermidis* kao i 2,5%-tni NaOCl, ali bolje djeluje na *C. albicans*. Obje otopine imaju statistički značajno bolje antimikrobno djelovanje od 0,2%-tnog CHX-a. Rezultati biološkog ispitivanja (citotoksičnost) pokazuju da su oba sredstva citotoksična s tim da PHMB uzrokuje nekrozu, a NaOCl apoptozu V-79 stanica. Za eventualnu kliničku primjenu PHMB-a potrebna su daljnja *in vitro* i *in vivo* ispitivanja.

## EXTENDED SUMMARY

### The purpose

One of the primary objectives in the root canal treatment is to reduce the microbial population in the root canals of infected teeth. This is usually accomplished by mechanical preparation along with the use of irrigant solutions. Antimicrobial irrigant solutions may reach canal ramifications and inaccessible areas and permeate completely through dentinal tubules. This is even more important if we consider the penetration depth of some very resistant and small bacteria such as *Enterococcus faecalis* which can penetrate dentinal tubules to the depth of 1483.33µm (nutrient-rich aerobic condition) or 620µm (nutrient-deprived anaerobic conditions). It is present as “mushroom shaped“ microcolonies.

The most frequently used irrigant in the treatment of infected root canals is sodium hypochlorite (NaOCl). It has a solvent activity for both necrotic and vital tissues, but at the same time has a cytotoxic effect when injected in the periapical tissues, leaves a bad smell and taste, has a corrosive potential and may cause allergic reactions.

Polyhexamethylene biguanide (PHMB), active component of Bigvasan IB10 (Arch Chemicals. Inc. UK), (C<sub>8</sub>H<sub>19</sub>N<sub>5</sub>) biocide of biguanidine family, has been developed as a disinfectant for surfaces, objects, instruments. It is also used in wound treatment, promoting wound healing, in mouthwash formulations and in soft lenses care solutions.

*Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Staphylococcus epidermidis* are considered to be the most resistant species in infected root canals and are often associated with endodontic treatment failures.

The aim of this study was to test *ex vivo* the effectiveness of 0.2% PHMB and compare it with the effectiveness of 2.5% NaOCl in the elimination of monocultures of resistant microorganisms such as *E. faecalis*, *P. aeruginosa* and *C. albicans*. Our interest also was the effectiveness of those components including 0.2 % chlorhexidine (CHX) on mixed four-week culture of *E. faecalis*, *S. epidermidis* and *C. albicans*. The third part of this thesis was to determine whether PHMB and NaOCl are cytotoxic to cells, and if so, which type of cell death they induce.



## Materials and methods

Single-rooted human teeth, extracted for orthodontic or periodontal reasons, were collected. The crowns and the apical parts were removed, the root canals were enlarged with Hedström files to the size 40. Overnight broth cultures of *E. faecalis* (ATCC 51299), *P. aeruginosa* (ATCC27853) and *C. albicans* (clinical isolate) were prepared in tryptic soy broth (Tryptic Soy Broth, Difco), specimens for *P. aeruginosa*, *E. faecalis* and *C. albicans* were immersed into 2 ml of broth culture. After the incubation, the root canals were irrigated with saline, and the dentine samples were collected from the inner root canal walls with Hedström files size 50 (sample A). The specimens were treated with 0.2% PHMB, 2.5% NaOCl or with 0.2% CHX. Sample A presented negative control (rinsed only with saline) and sample B presented results after irrigation with 0.2% PHMB and 2.5 % NaOCl. The samples were subcultured on three blood agar plates each. After 48 h incubation at 37 °C, visible colonies from appropriated dilutions were counted and the average colony forming units per milliliter (CFU/mL) was calculated and log<sub>10</sub>-transformed for each sample.

The same procedure was done with four-week old culture of *E. faecalis*, *S. epidermidis* and *C. albicans* and the samples were subcultured on selective agars.

To determine the cytotoxicity of PHMB and NaOCl, MTT test was used. Two different concentrations of each solution and saline as control were tested on chinese hamster fibroblasts V-79. The concentrations tested on microorganisms were 0.2% and 0.1% for PHMB and 2.5% and 1.25% for NaOCl. In order to reproduce the clinical conditions, contact time was a few seconds, five and ten minutes.

Since the cytotoxic assay showed that both, NaOCl and PHMB, caused the cell death in V-79 cells, the following experiment was made to investigate the type of cell death that was induced by those compounds. The loss of membrane integrity was examined by measuring the massive influx of trypan blue in the cells in order to determine if necrosis has occurred. The cells that have lost the membrane integrity, i. e. necrotic cells, were clearly stained blue. The induction of apoptosis was determined by observing the morphological features of the cells treated with NaOCl. The cells were stained with DNA intercalators, acridine orange (AO) and ethidium bromide (EtBr). Acridine orange enters both, the living and the dead cells. Ethidium bromide does not penetrate through the cell membrane of the living

cells, only through the damaged membrane of the dead cells. The red color of ethidium bromide prevails over green acridine orange so that the dead cells fluoresce red. Thus, simultaneous staining of the cells with acridine orange and ethidium bromide allows distinguishing between the living and the dead cells.

## Results

In the study of immature biofilm after the treatment with PHMB, *P. aeruginosa* was eradicated from all the specimens, *E. faecalis* was also reduced and *C. albicans* was not grown in seven out of eleven specimens. NaOCl showed weaker results on *E. faecalis* and *P. aeruginosa*, especially in the case of *C. albicans*. As for four-week old culture of *E. faecalis*, *S. epidermidis* and *C. Albicans*, PHMB and NaOCl showed similar results in the case of *E. faecalis*. CHX showed weaker results on all microorganisms, especially on *S. epidermidis*. In the case of *C. Albicans*, the input values were significantly lower than in the bacteria tested, therefore the results should be taken with caution. From the results obtained it is possible to conclude that PHMB shows better antimicrobial effect compared to CHX in the case of both bacteria and the results are comparable to those obtained by the treatment with NaOCl. The obtained results show that these compounds after a few seconds, 5 or 10 minutes of incubation with 0.1% and 0.2% PHMB or 1.25% and 2.5% NaOCl destroyed most of the cells. The types of cell death that were induced with NaOCl and PHMB were different. After rinsing the cells with 0.2% and 0.1% PHMB, all the cells were dead due to the necrosis. After the treatment with 1.25 or 2.5% NaOCl all the cells were dead due to the apoptosis.

## Significance

The results of this study indicate that PHMB in concentration of 0.2% has good antimicrobial effects on microorganisms in immature and mature biofilm. The results are comparable to those obtained by the treatment with NaOCl. Both solutions showed statistically significant better results compared to CHX. Both solutions are cytotoxic to chinese hamster fibroblasts V-79, with a difference in the type of cell death; PHMB caused the necrosis and NaOCl the apoptosis of the cell. Promising antimicrobial results of PHMB suggest further experiments to introduce the PHMB as an endodontic irrigant.

**Key words**

Microorganisms in the root canal, endodontic space disinfection, sodium-hypochlorite, polyhexamethylene biguanide, cytotoxicity, V-79, MTT

**POPIS OZNAKA I KRATICA:**

PHMB- (engl. polyhexamethylene biguanide)	Poliheksametilen bigvanid
NaOCl	Natrijev hipoklorit
CHX- (engl.chlorhexidin)	Klorheksidin
EDTA- (engl. ethylenediaminetetraacetic acid)	Etilendiaminotetraoctena kiselina
CFU/mL- (eng. colony forming Units)	Broj bakterija u jednom mililitru
<i>E. faecalis</i>	Enterococcus faecalis
<i>P. aeruginosa</i>	Pseudomonas aeruginosa
<i>C. albicans</i>	Candida albicans
<i>S. epidermidis</i>	Staphylococcus epidermidis
MTT- 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)	2,5-difeniltetrazolium bromide
AO- (engl.acridine orange)	Akridin narančasta boja
EtBr- (engl.ethidium bromide)	Etidij bromidna boja
CZŠ	Centralni živčani sustav
DNK	Dezoksiribonukleinska kiselina
okr/min	Broj okretaja u minuti
DMEM- (engl.Dulbecco's modification Eagle's medium)	Dulbekova modifikacija Eaglova medija
FBS-(engl. fetal bovine serum)	Fetalni serum teleta
μM	Mikromol
nm	Nanometar
RNK	Ribonukleinska kiselina

**SADRŽAJ**

1.0. UVOD.....	2
1.1. ANATOMIJA ENDODONTSKOG PROSTORA .....	3
1.2. MIKROBIOLOGIJA ENDODONTSKOG PROSTORA .....	5
1.2.1. Mikroflora inficirane i neliječene nekrotične pulpe.....	8
1.2.2. Mikroflora endodontskog prostora u prethodno endodontski liječenim zubima .	8
1.2.3. <i>Staphylococcus epidermidis</i> .....	8
1.2.4. <i>Enterococcus faecalis</i> .....	9
1.2.5. <i>Porphyromonas endodontalis</i> .....	10
1.2.7. <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	10
1.2.8. <i>Actinomyces spp.</i> .....	11
1.2.9. <i>Propionibacterium spp.</i> .....	11
1.2.10. <i>Candida albicans</i> .....	12
1.2.6. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	13
1.2.7. Biofilm .....	13
1.2.8. Zreli/nezreli biofilm .....	16
1.3. ENDODONTSKO LIJEČENJE .....	16
1.3.1. Klinički protokoli – preporuke .....	16
1.3.2. Mehanička obrada endodontskog prostora.....	17
1.3.3. Kemijska obrada endodontskog prostora .....	18
1.4. POLIHEKSAMETILEN BIGVANID ( PHMB) .....	22
1.5. CITOTOKSIČNOST .....	23
2.0. SVRHA I CILJ RADA .....	27
3.0. MATERIJALI I METODE.....	29
3.1. MATERIJALI.....	30

---

3.1.1. Priprema uzoraka za ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na nezreli biofilm.....	30
3.1.2. Priprema uzoraka za ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na zreli biofilm .....	30
3.1.3. Priprema uzoraka za ispitivanje citotoksičnosti PHMB-a.....	31
3.2. METODE.....	31
3.2.1. Ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na nezreli biofilm.....	31
3.2.2. Ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na zreli biofilm.....	32
3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti.....	33
3.3. STATISTIČKA ANALIZA .....	34
4.0. REZULTATI .....	35
4.1. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA PHMB-A NA NEZRELI BIOFILM .....	36
U KORIJENSKOM KANALU .....	36
4.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI .....	47
5.0.RASPRAVA.....	51
6.0. ZAKLJUČAK.....	62
7.0. LITERATURA .....	64
8.0. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA.....	81

## **1.0. UVOD**

Endodoncija je grana dentalne medicine koja se obuhvaća znanost i kliničku disciplinu, a bavi se morfologijom, fiziologijom, patologijom, dijagnostikom i terapijom zubne pulpe i periradikularnog tkiva (1).

Nizozemski znanstvenik van Leeuwenhoek u 17. stoljeću pomoću mikroskopa otkrio je unutar korijenskog kanala zuba "nešto što se činilo živim" i to je nazvao "*animalcules*".

Američki stomatolog W.D. Miller, radeći u laboratoriju Roberta Kocha, 1894. godine opisao je mikroorganizme unutar inficiranih korijenskih kanala i to kao koke, bacile i spirohete. Upravo je on bio među prvima koji su povezali bolesti i upalna stanja čeljusti s inficiranim endodontskim prostorom (2). Kakehashi i sur. u svom radu (3) 1965. su istraživali odgovor zubnih pulpi kod konvencionalnih i sterilnih miševa pri izlaganju usnoj šupljini. Histološki su utvrdili da su se nekroza pulpe kao i apikalni parodontitis razvili kod konvencionalnih miševa dok kod sterilnih nije došlo do promjena vitaliteta pulpe.

Endodontska infekcija razvija se jedino kod zubi koji su bez obrambenih mehanizama što može biti posljedica nekroze pulpe koja pak može biti posljedica karijesa, traume, parodontne bolesti, jatrogeno otvorene pulpe ili same endodontske terapije. Iako su gljive, a prema novijim istraživanjima araahe i virusi povezani s endodontskim infekcijama, bakterije i dalje ostaju primarni mikroorganizmi odgovorni za razvoj apikalnog parodontitisa. Više od 460 bakterijskih vrsta pronađeno je u različitim vrstama endodontskih infekcija gdje se organiziraju u biofilmove čvrsto vezane za dentinske zidove. Apikalni parodontitis spada u skupinu bolesti uzrokovanih biofilmom. Bakterije koloniziraju korijenski kanal preko apikalnih i lateralnih kanalića i raznih perforacija na samom korijenu zuba. Kao posljedica "sudara" bakterija i obrambenog sustava domaćina u periapikalnom području dolazi do razvoja upalnog i imunološkog odgovora. Iako su zaštitni, ti mehanizmi mogu djelovati razorno na periradikularno tkivo i dovesti do razvoja apikalnog parodontitisa. Ovisno o vrsti i virulenciji bakterija može se razviti akutna ili kronična forma navedenog upalnog procesa. Kada jednom dođe do razvoja bolesti njeno napredovanje, oblik, ozbiljnost kao i reakcija na terapiju ovisi o samim mikroorganizmima i obrambenom sustavu domaćina (4,5).

Endodontska terapija je način na koji se mogu ukloniti mikroorganizmi iz korijenskog kanala. Potrebno je endodontski liječiti zube s ireverzibilno upalno promijenjenom pulpom kako bi se spriječilo naseljavanje mikroorganizama na takvo tkivo i razvoj nekroze, te prijelaz upale u periapikalno tkivo (6). Isto tako je potrebno endodontski sanirati i zube s već postojećim periapikalnim promjenama, bilo da su u akutnom i kroničnom obliku, kako bi se onemogućio



pristup novim mikroorganizmima iz korijenskog kanala te omogućilo cijeljenje kosti i parodontnog ligamenta.

Dakle cilj endodontske terapije je postići ili održati zdravo stanje periapikalnog tkiva što se postiže smanjenjem broja ili uklanjanjem mikroorganizama iz korijenskog kanala. Potpuno uklanjanje mikroorganizama iz korijenskog kanala još nije postignuto (7,8). Stoga i dalje postoji potreba za istraživanjem novih tehnika instrumentacije i otopina za irigaciju korijenskih kanala (9,10).

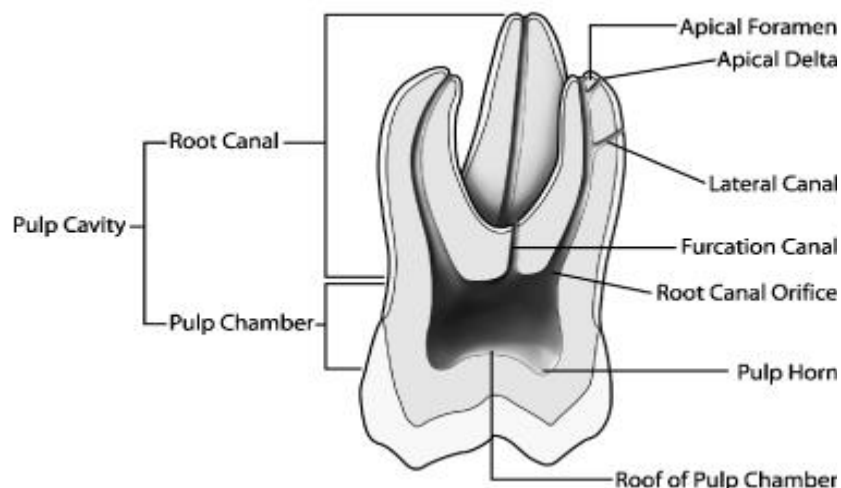
## 1.1. ANATOMIJA ENDODONTSKOG PROSTORA

Pulpa zuba smještena je u samom središtu zuba i svojim oblikom prati vanjsku morfologiju zuba. Okružena je dentinom, osim u području apeksa zuba gdje dentin prelazi u cement (slika1). Dentin je tubularne strukture; dentinski tubulusi protežu se cijelom širinom dentina i koničnog su oblika. Najširi su u području pulpe (promjer 2,5  $\mu\text{m}$ ) a najuži na periferiji blizu cakline ili cementa (0,9  $\mu\text{m}$ ). Pod normalnim uvjetima dentin je sterilan i izoliran od usne šupljine caklinom i cementom. U slučajevima izostanka te prirodne zaštite dentina ( karijes, trauma, atricija, abrazija ili ne prekrivanje cementa caklinom na zubnom vratu) dentin je izložen slini i oralnom okolišu. Sve dok je pulpa vitalna i postoje odgovori pulpodentinskog kompleksa (sklerozacija dentina, reparatorni i reakcijski dentin) neće doći do prolaska bakterija do pulpe.

Pulpni prostor dijelimo na:

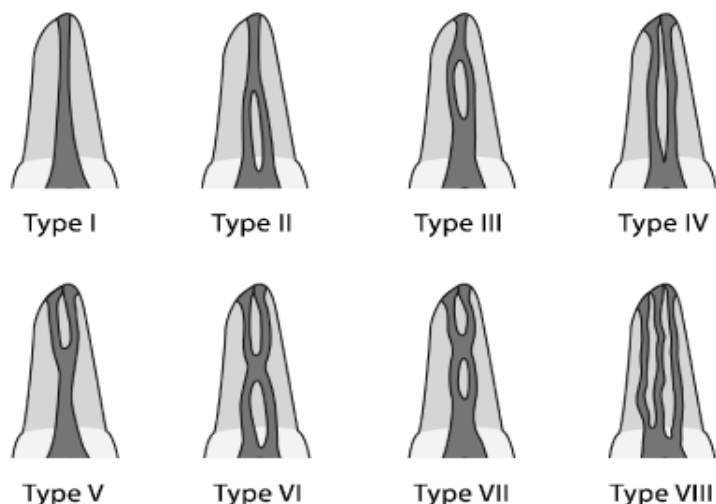
- 1) pulpnu komoru (koronarni dio)
- 2) korijenske kanale (radikularni dio)

Pulpna komora sastoji se od krova pulpe, pulpnih rogova (ispod kvržica zubi) i dna pulpne komore. Korijenski kanali nastavljaju se od dna pulpne komore prema vrhu korijena i parodontnom ligamentu. Započinju kao lijevkasti ulazi i završavaju apikalnim otvorom. Sustav korijenskih kanala je izrazito složen (slika 2). Čine ga glavni kanal te niz lateralnih i akcesornih kanalića koji međusobno povezuju korijenske kanale, ali i pulpu zuba s parodontnim ligamentom.



Slika 1. Anatomija endodontskog prostora zuba [Preuzeto iz (11)].

Prema Vertucciju razlikujemo 8 tipova korijenskih kanala (11).



Slika 2. Oblici korijenskih kanala prema Vertucciju [ Preuzeto iz (11)].

Aksesorni kanali su bilo koji ogranak koji povezuje pulpu s vanjskom površinom korijena. Mogu se protezati od pulpne komorice prema furkaciji, od koronarne trećine kanala prema furkaciji ili može postojati kombinacija oba oblika. Lateralni kanali su tipovi aksesornih kanala položeni horizontalno u odnosu na glavni kanal i obično se nalaze u koronarnoj ili srednjoj trećini korijena (12). Nastali su od zarobljenih parodontalnih krvnih žila iz Hertwigove epitelne ovojnice za vrijeme apozicije tvrdog zubnog tkiva (13). Anatomija vrha korijena zuba je poseban entitet. Njegov izgled određuju broj i položaj apikalnih krvnih žila

za vrijeme apeksogeneze (14). U mladih zubi vrh je širok i otvoren dok je u zubi kod starije populacije, kao posljedica apozicije cementa, uzak i često zatvoren. Odlaganjem tvrdih zubnih tkiva dolazi i do udaljavanja apikalnog otvora od anatomskog vrha zuba (15).

Najčešće govorimo o jednom apikalnom otvoru, međutim, u stvarnosti postoji niz malih apikalnih otvora što je posebno izraženo u višekorijenih zubi. Tu pojavu zovemo apikalna delta (16).

Vrh korijena zuba obilježavaju:

- apikalna konstrikcija (foramen apicis dentis internum, foramen physiologicum) na mjestu prelaska dentina u cement
- anatomski otvor (foramen apicis dentis externum, foramen anatomicum), najširi dio otvora
- prostor između njih (oblik tunela)

Prosječno je udaljenost između unutarnjeg i vanjskog otvora 1 mm od anatomskog otvora (17). Poseban problem u anatomiji endodontskog prostora predstavljaju istmusi. Oni su uska, vrpčasta komunikacija između dva korijenska kanala koji sadrže pulpno tkivo. Najčešće se nalaze kod meziobukalnih kanala prvih maksilarnih molara, mezijalnih kanala prvih mandibularnih molara, mandibularnih inciziva te mandibularnih premolara.

## 1.2. MIKROBIOLOGIJA ENDODONTSKOG PROSTORA

Provedena su brojna istraživanja mikrobiološkog sastava inficiranih korijenskih kanala. Studije su provedene na zubima s vitalnom pulpom, avitalnim zubima i zubima s upalno promijenjenim periapikalnim područjem. Različitim tehnikama uzorkovanja, kultivacije i identifikacije mikroorganizama, najčešće dosad izolirane bakterije bile su: streptokoki kao predstavnici gram- pozitivnih bakterija te *Neisseria species*, *Bacteroides species*., *Fusobacterium species*. kao predstavnici gram-negativnih bakterija ( Tablica 1). Također valja uzeti u obzir da dobiveni podaci mogu biti kompromitirani zbog pogrešaka pri uzimanju uzoraka, neadekvatnih medija za transport i uzgajanje bakterija te onečišćenja uzoraka slinom. Problem je također bilo preživljavanje anaerobnih mikroorganizama zbog nedostatka adekvatnih medija i opreme. Upotrebom metoda genetske detekcije mikroorganizama kao što je PCR, omogućena je i detekcija anaerobnih bakterija kao što su spirohete, osobito *Treponema denticola*, koja se sve češće uočava u uzorcima iz korijenskih kanala. Najnovijom tehnikom PCR- Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) pokazalo se da nakon

endodontske terapije korijenskog kanala dolazi do značajne promjene u zajednici mikroorganizama. Ta tehnika dokazuje da su endodontskim zahvatom određene vrste mikroorganizama bude u potpunosti uklonjen, dok su ostale vrste značajno brojem reducirane što sve može dovesti do predominacije preostalih mikroorganizama u korijenskom kanalu (18).

Pojedini mikroorganizmi koje se unutar razmaza mogu uočiti ne moraju rasti u laboratorijskim uvjetima, ili neće narasti u tolikom broju koji je brojiv pod mikroskopom.

Broj kolonija mikroorganizama u inficiranim korijenskim kanalima varira od  $10^2 - 10^8$  formiranih kolonija (CFU) (19).

Mikroorganizmi su najbrojniji u koronarnom dijelu korijenskih kanala i broj im se smanjuje prema apeksu, osobito ukoliko je pulpna komora zatvorena. Bakterijska penetracija u dentinske tubuluse prisutna je većinom kod korijenskih kanala s nekrotičnom pulpom (4).

Sustav korijenskih kanala je selektivno stanište koje omogućava rast određenih bakterijskih vrsta više od drugih. Tkivna tekućina, nusprodukti nekrotične pulpe, manjak kisika odlučuju koja će bakterijska vrsta prevladati.

Kanali zubi s prisutnom fistulom povezani su s najmanje 17 različitih vrsta mikroorganizama. Čak je i veličina lezije u periapikalnom području povezana s brojem i raznolikošću mikroorganizama u korijenskom kanalu. U malim lezijama (< 5 mm) izolirano je oko 12 vrsta mikroorganizama, u lezijama promjera 5 – 10 mm 16 vrsta, a u lezijama > 10 mm 20-ak vrsta. U velikim lezijama broj se penje na oko 40 vrsta izoliranih mikroorganizama.

Prema kliničkim i radiološkim kriterijima naočigled dobro endodontski liječeni zubi i dalje u svom endodontskom sustavu imaju 1 – 5 vrsta mikroorganizama, a u neadekvatno liječenih korijenskih kanala može perzistirati čak 10 – 30 vrsta mikroorganizama.

Tablica 1. Najčešće izolirane bakterije iz inficiranih korijenskih kanala. Preuzeto iz: Lamont RJ. Oral microbiology and Immunology. ASM Press: Washington DC; 2006.

Rod ili grupa	Učestalost izolacije (%)
<i>Bacteroides</i>	70
<i>Prevotella</i>	60
<i>Lactobacillus</i>	51
<i>Oralni streptococci</i>	41
<i>Clostridium</i>	36
<i>Fusobacterium</i>	33
<i>Propionibacterium</i>	29
<i>Peptostreptococcus</i>	25
<i>Corynebacterium</i>	25
<i>Bifidobacterium</i>	21
<i>Eubacteria</i>	20
<i>Capnocytophaga</i>	17
<i>Actinomyces</i>	16
<i>Leuconostac</i>	13
<i>Porphyromonas</i>	10
<i>Candida</i>	10
<i>Veillonella</i>	9
<i>Gamella</i>	8
<i>Staphylococcus</i>	7
<i>Aerococcus</i>	5
<i>Saccharomyces</i>	3
<i>Enterococcus</i>	3

### 1.2.1. Mikroflora inficirane i neliječene nekrotične pulpe

Mikroflora korijenskih kanala s netaknutom krunom, ali s nekrotičnom pulpom i periapikalnom bolešću obiluje (> 90%) obligatnim anaerobima iz rodova *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Eubacterium* i *Peptostreptococci*. Nasuprot tome sastav mikroorganizama izoliranih iz korijenskih kanala zubi koji su u kontaktu s oralnim okolišem (čak i u apikalnoj trećini) imaju znatno manje anaerobnih mikroorganizama (< 70%) (20).

### 1.2.2. Mikroflora endodontskog prostora u prethodno endodontski liječenim zubima

U prethodno endodontski liječenim zubima prevladavaju otporni mikroorganizmi, većinom gram-pozitivni koki, štapići i filamenti iz rodova *Actinomyces*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*. Osim gore navedenih mikroorganizama, značajnu ulogu u sekundarnim bakterijskim infekcijama imaju i gljive iz vrste *C. albicans*, koja je i načešće izolirana gljiva iz prethodno endodontski liječenim korijenskih kanala (21, 22).

### 1.2.3. *Staphylococcus epidermidis*

*S. epidermidis* je i dosad bila identificirana kao bakterija koja sudjeluje u mikroflori endodontskog prostora, ali je njezina važnost kao endodontskog patogena bila zanemarivana zbog moguće kontaminacije uzoraka u kontaktu s kožom (23). *S. epidermidis* dio je mikroflora ljudske kože i živi kao komenzalni organizam u benignom odnosu s domaćinom. Kao oportunistička bakterija sposobna je naseliti i inficirati brojne medicinske uređaje kao što su kateteri, umjetni zglobovi, vaskularni graftovi.

*S. epidermidis* je gram-pozitivan, koagulaza negativan kok. Ima sposobnost proizvodnje glikokaliksa koji djeluje kao ljepilo kojim adherira na stanice i strane tvari (plastika) što ga čini otpornim na fagocitozu i neke antibiotike. Veličine je 0,5 – 1,5 µm u promjeru. Iako je fakultativni anaerob, najbolje raste u aerobnim uvjetima. Biofilm koji proizvede *S. epidermidis* sastoji se od niza stanica uklopljenih u ekstracelularnu ljepljivu tvar otprilike 160 µm debljine čime je taj biofilm otporan na djelovanje antibiotika i antiseptika (24).

#### 1.2.4. *Enterococcus faecalis*

Iako nebitan kod primarnih endodontskih infekcija, pokazao se dominantnim mikroorganizmom u sekundarnim endodontskim infekcijama. Tome pridonosi i činjenica što može persistirati u korijenskom kanalu kao monoinfekcija bez sinergističke potpore drugih mikroorganizama. Isto tako je otporan na većinu intrakanalnih uložaka kao što su kalcijev-hidroksid [Ca(OH)<sub>2</sub>]. Enterokoki su dio normalne flore usne šupljine i gastrointestinalnog trakta. *E. faecalis* je odgovoran za 80% svih infekcija uzrokovanih enterokokima (25,26). To su najčešće urinarne infekcije, bakterijemije, intraabdominalne infekcije i endokarditis.

*E. faecalis* su sferičnog ili ovoidnog oblika, javljaju se u paru ili kratkim lancima. U tekućem mediju formiraju kremaste bijele kolonije. To su gram- pozitivne, katalaza negativne bakterije koje mogu izdržati 30 minuta na 60 °C i pH 9,6 (27). Većinom su fakultativni anaerobi. Fermentiraju ugljikohidrate do mliječne kiseline. S nedostatkom hrane veličina *E. faecalis* se smanjuje sve do minimalne vrijednosti. Stanice poprimaju neobičan oblik i organiziraju se u parove, ne lance (nije stadij spora). Također u nedostatku hrane, osobito glukoze, razvijaju otpornost prema toplini, vodikovom peroksidu (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), Natrijevom hipokloritu (NaOCl-u)(28). Imaju sposobnost stvaranja biofilma, proizvode superoksida čime oštećuju tkivo i djeluju kemotaktično na neutrofile te imaju sposobnost preživljavanja u visokom pH bez interakcije sa drugim mikroorganizmima (29). Imaju specifičnu sposobnost adhezije za hidroksilapatit cakline te invazije dentinskih tubulusa 250 – 400 μm dubine (30,31). Osim toga imaju sklonost vezanja za kolagen u dentinskim tubulusima te time mogu činiti gnijezdo infekcije čak i nakon brtvljenja korijenskih kanala (32,33). Specifičnost *E. faecalis* je i posjedovanje protonske pumpe kojom se vodikovi ioni upumpavaju i zakiseljuju citoplazmu te smanjuju alkalične uvjete. Istraživanja su pokazala da je za eradikaciju *E. faecalis* potreban pH 10,5 – 11 (34). Često je prisutan u supurativnim infekcijama kao što su kronične periapikalne upale.

### 1.2.5. *Porphyromonas endodontalis*

Nekada karakteriziran kao crno pigmentirana bakterija iz roda *Bacteroides*, smatra se da ima veliki patogeni potencijal. Originalno je izoliran iz korijenskih kanala zuba, ali je pronađen i u drugim dijelovima usne šupljine što sugerira njegov oportunistički karakter. Vrlo često se nalazi kod akutnih supurativnih infekcija vrha korijena (35).

### 1.2.6. *Prevotella intermedia*

Gram je negativni, crno pigmentirani parodontalni patogen. Striktni je oralni anaerob, ali kratkoročno prisustvo kisika neće je eliminirati. Živi u parodontnim džepovima i koegzistira s drugim mikroorganizmima. *Prevotella intermedia* najčešće je izolirana iz periapikalnih lezija. Građena je od unutarnje i vanjske membrane i sloja peptidoglikana. Za rast i razvoj treba vitamin K i hemin kojima obiluje gingivalna tekućina, ali su i proizvod drugih bakterija u korijenskom kanalu. Voli lagano bazični pH i temperaturu 34 – 36 °C. Izlučuje salivarne IgA proteaze, živi u sinergizmu s *Peptostreptococcus micros* (36).

### 1.2.7. *Fusobacterium nucleatum*

Gram je negativna bakterija poznata kao animalni i humani patogen. Nema sposobnost stvaranja spora. Njezina iznimna sposobnost da adherira na biofilm zajedno s ostalim gram-pozitivnim i gram-negativnim bakterijama osobito na mekim tkivima (mukoznim membranama) čini je visoko invazivnim patogenom. Vretenastog je ili štapićastog oblika, paralelnih stijenki i zadebljanih vrhova te može varirati u obliku, veličini i pokretljivosti. Fermentira ugljikohidrate i određene aminokiseline te na taj način kao glavne metaboličke proizvode stvaraju octenu i maslačnu kiselinu.

*F. nucleatum* izrazito je učinkovit patogen karakterističan za oralne infekcije jer ima sposobnost adheriranja na već postojeće mikroorganizme u biofilmu čineći na taj način svojevrstu spojnicu između pionirskih mikroorganizama (nezreli plak) i onih koji se naseljavaju kasnije (zreli plak). Nalazimo ga u biofilmu na zubu, u parodontnim džepovima i unutar korijenskog kanala zuba (37).



### 1.2.8. *Actinomyces spp.*

Aktinomicete su gram-pozitivni, fakultativni ili obligatni anaerobi koji ne formiraju endospore. Pojedinačno su štapićastog oblika, dok u skupini tvore nakupine poput gljiva – hife. Normalno su prisutni u području gingivalnog sulkusa, a ukoliko se za to stvore uvjeti mogu biti uzročnici upalnih procesa i apscesa u usnoj šupljini. Najgori oblik infekcije uzrokovne *A. israelii* jest aktinomikoza koju karakteriziraju multipli apscesi i fistule.

Čest su nalaz kod sekundarnih endodontskih infekcija osobito kod onih koji ne reagiraju na standardnu endodontsku terapiju kao i kod periapikalnih cista. Klinički su vidljiva žuta zrnca u sklopu supurativnog sadržaja bilo iz apscesa ili ciste. U tome se ističe vrsta *A. radicidentis*. Osim nje najčešće u sastavu biofilma korijenskog kanala sa sekundarnim endodontskim infekcijama nalaze se *A. naeshudii* i *A. israelii* (38).

### 1.2.9. *Propionibacterium spp.*

Ove bakterije su gram-pozitivni anaerobni štapići, sporo rastu i ne stvaraju spore. Fermentiraju ugljikohidrate do propionske kiseline. Normalni su stanovnici kože i obično nepatogeni. Mogu biti oportunistički patogeni i uzrokovati akne, moždane apscese, infekcije centralnog živčanog sustava (CŽS).

Izolirana je iz dubokih dentinskih slojeva unutar inficiranih korijenskih kanala. U čak 52% sekundarnih endodontskih infekcija izolirana je vrsta *P. propionicum* kao i *P. acnes*. Ima sposobnost penetracije u dentinske tubuluse i stvaranje kompleksa s dentinskim zidom. Mogu preživjeti u uvjetima s jako malo kisika kao i u unutrašnjosti makrofaga. Proizvode upalne medijatore (proteaze, lipaze, neuraminidaze, fosfataze) (39).

### 1.2.10. *Candida albicans*

Rod *Candida spp.* dio je normalne flore usne šupljine, gastrointestinalnog trakta, anusa, rodnice i vagine kod zdrave osobe (40). Većina su oportunistički patogeni i infekcije uzrokovane njima najčešće su posljedica poremećaja ravnoteže normalne mikrobiološke flore. Uzrokovane antibioticima širokog spektra, imunosupresivima ili gubitkom zaštitne barijere, gljivične infekcije se smatraju "bolesti bolesnih" (41). *C. albicans* je najdominantnija gljiva u usnoj šupljini (42). Incidencija *C. albicans* u usnoj šupljini prema istraživanjima iznosi 30 – 45% u zdravih ljudi (43). Primarni oralni habitat za *C. albicans* je dorzum jezika, dok su ostala mjesta kolonizirana sekundarno. To su supragingivno (44), dentin (45,46), korijen zuba (47), subgingivno (48), paradontni džepovi (50).

Gljive su kemoorganotrofni eukariotički mikroorganizmi koje možemo naći u dvije osnovne forme: plijesni i kvasci. Plijesni su višestanične filamentozne gljive sastavljene od razgranatih cilindričnih cjevčica – hifa. Hife tvore mreže – micelije. Kvasci su jednostanične gljive sferičnih ili ovalnih oblika (51).

*C. albicans* kao najistraženija vrsta gljive u promjenjivim uvjetima okoliša ima sposobnost prelaska u klamidospore koje omogućavaju prilagodbu na različita mjesta i situacije.

Stanična stijenka *C. albicans* sastoji se od ugljikohidrata, lipida i proteina i ima glavnu ulogu u biologiji i patologiji ove gljive (52). Mehanizam patološkog djelovanja *C. albicans* sastoji se od: 1) prilagodbe na različite uvjete okoliša, 2) adhezije na različite površine, 3) proizvodnje hidrolitičkih enzima, 4) morfoloških promjena, 5) stvaranja biofilma, 6) izbjegavanja i imunomodulacije obrane domaćina.

*C. albicans* je sposobna vezati se za kolagen tipa I i IV (53) te za *Fusobacterium nucleatum*. Isto tako posjeduje hidrolitičke enzime koji mogu degradirati humani dentinski kolagen (53). *C. albicans* stvara biofilm koji je 100 i više puta otporniji na djelovanje antimikotika od npr. planktoničnih stanica (54,55). Njena sposobnost da koegzistira sa drugim mikroorganizmima može značajno povećati njeno preživljavanje unutar korijenskog kanala (56).

Gljive su dosad zapažene u primarnim endodontskim infekcijama u malom postotku (56), ali zato su češći nalaz u korijenskim kanalima zubi koji su prethodno bili endodontski tretirani i to u prevalenciji od 6-18 % (57). Upravo je *C. albicans* bila najčešće izolirana gljiva u tim slučajevima. Ova dimorfična gljiva dobro raste u uvjetima bogatima kisikom, slabije u uvjetima sa malo kisika i niskim redoks potencijalom (58). Njena sposobnost da preživi u takvim uvjetima kao i sposobnost stvaranja biofilma na organskim i anorganskim

materijalima ključni su za preživljavanje u unutar okoliša kao što je očišćen i napunjen korijenski kanal (59). Poznato je i da hidrofobnost površine stanice *C.albicans* raste u anaerobnim uvjetima što može promijeniti stvaranje biofilma (60). Budući da je promjer gljiva 1 – 6  $\mu\text{m}$ , a hifa 1,9 – 2,6  $\mu\text{m}$ , imaju sposobnost ulaska u dentinske tubuluse i to do dubine od 60  $\mu\text{m}$  (61,62).

#### 1.2.6. *Pseudomonas aeruginosa*

*P. aeruginosa* vodeći je bolnički patogen. Bolničke infekcije uzrokovane ovim mikroorganizmima teško je tretirati zbog same rezistencije bakterije prema antimikrobnim lijekovima i sposobnosti prilagođavanja novim terapijama (63).

U jedinicama intenzivne njege *P. aeruginosa* rangirana je među pet mikroorganizama koji uzrokuju plućne, krvne i bolesti urinarnog trakta, infekcije mekih tkiva i kirurških rana (64). Ovisno o uvjetima okoliša i imunološkom statusu domaćina, *P. aeruginosa* može biti kolonizator u stanju mirovanja, uzrokovati krvne diskrazije ili biti visoko virulentan patogen u akutnim infekcijama (65). Glavne odrednice virulencije *P. aeruginose* su:

- sekrecija velikog broja toksina u izvanstanični okoliš, osobito tip III koji djeluje direktno na stanice domaćina
- posjedovanje međustaničnog sustava signala koji omogućava prikupljanje bakterija iz okoline na željeno mjesto, tzv. " quorum sensing" (QS) (66) – sposobnost formiranja biofilma visoko otpornog na djelovanje antibiotika
- flagela; bič pomoću kojeg se *P. aeruginosa* kreće i koji omogućava bolje prianjanje na površine stanica domaćina kao i disperziju biofilma (67).

#### 1.2.7. Biofilm

Apikalni parodontitis kao i karijes, marginalni parodontitis, i većina humanih, endogenih infekcija nije uzrokovan samo jednim patogenom već s više v različitim patogenima najčešće organiziranih u mješovite zajednice biofilma (68,69). U ekološkoj hijerarhiji individualni mikroorganizmi formiraju mikrokolonije koje zatim stupaju u međusobnu interakciju i stvaraju zajednice. U zajednici mikroorganizama svaka od pojedinih populacija međusobno

koegzistira i pridonosi održavanjem ekosustava što se događa i u inficiranom korijenskom kanalu zuba.

Analiziranjem mikroorganizama uključenih u endodontske infekcije došlo se do nekoliko zaključaka:

- 1) različiti tipovi endodontskih infekcija (uključujući perzistentne i sekundarne infekcije) uzrokovane su mješovitim bakterijskim zajednicama (70)
- 2) moguć je pronalazak novih sojeva bakterija (71)
- 3) postoje razlike među mikroorganizmima koji uzrokuju isti tip endodontskih infekcija što upućuje na heterogenu etiologiju apikalnog parodontitisa (70)
- 4) u osoba s različitim geografskih područja te su razlike još više izražene (72)
- 5) često se sastav biofilma u apikalnom i koronarnom dijelu kao i u istome dijelu korijenskog kanala različitih pacijenata znatno razlikuju (73).

Biofilm možemo definirati kao sesilnu, višestaničnu zajednicu mikroorganizama vezanih za površinu i zapletenih u ekstracelularnom polisaharidnom matriksu (EPS), koji je proizvod tih istih mikroorganizama (74).

U medicinskoj mikrobiologiji sposobnost formiranje biofilma se smatra faktorom virulencije. Biofilmovi nisu pasivne nakupine bakterijskih stanica vezanih za površinu već su strukturalno i dinamički organizirani kompleksi bioloških sustava. Bakterijske stanice unutar biofilma tvore mikrokolonije (oko 15 % volumena) zapletene u neravnomjerno rasprostranjen matriks EPS-a (85 % volumena), međusobno odvojene vodenim kanalima (75,76). Biofilm na površini zuba mogu tvoriti 300 i više slojeva stanica (77).

Struktura biofilma se znatno razlikuje po fizikalnim, kemijskim i biološkim čimbenicima ovisno o okolišu (78). Oblik mikrokolonija reguliraju poprečne sile vezane uz strujanje zraka ili vode iznad biofilma. Najčešće je to oblik tornja ili gljive ukoliko su poprečne sile slabije ili imaju izduženi oblik ukoliko su poprečne sile jače (79).

Bakterije u biofilmu strateški su pozicionirane tako da bi se postigle optimalne metaboličke interakcije i arhitektonski izgled biofilma. Svojstva koja pokazuje biofilm većinom su uzrokovana interakcijama između populacija što rezultira novim fiziološkim funkcijama.

Život unutar biofilma bakterijama omogućava:

- širi habitat za rast
- veći izvor hrane i povećanu metaboličku raznolikost
- zaštitu od natjecateljskih mikroorganizama, obrambenih snaga domaćina, antimikrobnih sredstava i stresa iz okoline

- olakšanu izmjenu genetskog materijala koji pojačava virulenciju i otpornost prema antibioticima

- pojačanu patogenost.

Odnos domaćin/ bakterijska zajednica ovisi o vrsti mikroorganizma koji čine tu zajednicu, a virulencija ovisi o tome je li kultura, čista, ili miješana.

Različiti mikroorganizmi i proizvodi njihova metabolizma prisutni u biofilmu korijenskoga kanala dovode do razvoja apikalnog parodontitisa sa sličnim i/ili istim simptomima bolesti. U mješovitom biofilmu mogući su razni odnosi među mikroorganizmima; od neznatnog utjecaja, ili reducirane patogenosti do sinergističkog djelovanja. Endodontski apsces primjer je kako bakterije niske virulencije u prisustvu drugih mikroorganizama mogu dovesti do razvoja bolesti (patogeni sinergizam) (80).

Infekcije uzrokovane biofilmom razlikuju se od infekcija uzrokovanih patogenima koji se pojavljuju u planktonskom stanju. Akutne infekcije najčešće su povezane s velikim brojem bakterijskih stanica u planktonskom stanju te sposobnošću da invadiraju tkivo zbog smanjenog otpora domaćina (81). Pokazalo se da se geni nekih patogena odgovorni za faktore virulencije češće izražavaju u planktonskom obliku nego u obliku biofilma (82). Geni odgovorni za toksičnost i stvaranje enzima isključuju se kada bakterija uđe u sastav biofilma, a mogu se ponovno uključiti i pojačati ponovnim prelaskom u planktonsko stanje (74). Bakterije u planktonskom stanju osjetljivije su na antimikrobna sredstva kao i na fagocitozu (83).

Kronične infekcije najčešće se povezuju s niskom virulencijom bakterijske zajednice koja s druge strane predstavlja trajni izvor agresije na tkivo. Kod kroničnog apikalnog parodontitisa bakterije iz nekrotičnog kanala formiraju biofilm na dentinskim zidovima apikalnog dijela korijenskoga kanala, a apikalni parodontni ligament reagira stalnom upalnom reakcijom s posljedičnim oštećenjem okolnog tkiva. Taj biofilm je i potencijalni izvor akutnih egzacerbacija otpuštanjem određenog broja bakterija u planktonskom obliku. Oštećenja koja nastaju na tkivu općenito su proporcionalna s gustoćom i vrstama mikroorganizama koji tvore biofilm.

### 1.2.8. Zreli/nezreli biofilm

Rani plak sastoji se većinom od Gram pozitivnih mikroorganizama, a ukoliko se plak ne uklanja, prolazi proces maturacije i stvara se kompleksnija flora s dominantnim Gram-negativnim bakterijama (84).

Različiti autori koji su se bavili biofilmom ne slažu se oko definicije nezrelog i zrelog biofilma. Što je biofilm stariji teže ga je ukloniti i djelovati na njega. Četiri dana star biofilm prema prosječnoj debljini 34 $\mu$ m smatra se nezrelim dok je šest dana star biofilm klasificiran kao zreli budući da je debljina iznosila 52  $\mu$ m (85). Za razliku od njih u svom su istraživanju imunofluorescentnim konfokalnim mikroskopom pokazali su da je biofilm star 4 – 5 dana nezreli, dok je 21 dan star biofilm zreli (86). Sličan rezultat da je mladi, nezreli biofilm starosti 2 – 6 dana, dok je, zreli biofilm star 15 dana dobili su Gunther i sur. (87).

## 1.3. ENDODONTSKO LIJEČENJE

Endodontsko liječenje možemo provoditi na zubima s vitalnom ili avitalnom pulpom, s intaktnim ili upalno promijenjenim periapikalnim tkivom.

Sastoji se od mehaničkog uklanjanja pulpnog tkiva pomoću različitih endodontskih instrumenata i od upotrebe različitih kemijskih sredstava kako bi se postiglo dodatno čišćenje i dezinfekcija endodontskog prostora.

### 1.3.1. Klinički protokoli – preporuke

Preporuke za rutinski antimikrobni tretman inficiranih korijenskih kanala potkrijepljene su znanstvenim dokazima i kliničkom praksom.

- 1) Zub mora biti bez plaka i kamenca na površini
- 2) Pristup endodontskom prostoru (trepanacijski otvor) može započeti prije postavljanja gumene plahtice, ali mora biti dovršen tek nakon postavljanja iste. Svo kariozno tkivo i neodgovarajući ispuni se moraju ukloniti

- 3) Nakon postavljanja gumene plahtice počistiti radno polje s 2,5%-tnim NaOCl-om ili 2%-tnim CHX-om
- 4) Inspirati pulpnu komoricu s 2,5%-tnim NaOCl-om
- 5) Provoditi silazeću (crown-down) tehniku bilo strojnim ili ručnim instrumentima. Između svakog instrumenta slijedi irigacija s minimalno 2 ml NaOCl-a. Korijenski kanal mora biti proširen 1 mm kraće od apikalnog otvora. Preinstrumentiranje nije poželjno.
- 6) Ukloniti zaostatni sloj 17%-tnim EDTA-om ili limunskom kiselinom, te isprati NaOCl-om
- 7) Može uslijediti ispiranje NaOCl-om, ultrazvučno aktiviran slobodno oscilirajućim instrumentom

Kod indikacija za višeposjetno liječenje:

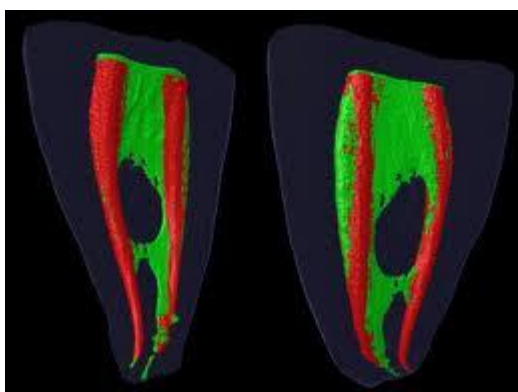
- 8) Postaviti međuposjetni antimikrobni uložak na bazi kalcijevog hidroksida [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] i privremeno zatvoriti zub
- 9) Nakon 7 dana odstraniti uložak, isprati kanal s NaOCl-om i napuniti korijenski kanal (88).

### 1.3.2. Mehanička obrada endodontskog prostora

Uloga mehaničke obrade korijenskih kanala je i stvaranje pristupa k radikularnom dijelu korijenskog kanala endodontskim instrumentima, ali i sredstvima za dezinfekciju kao i postizanje adekvatnog oblika za punjenje istog.

Prilikom mehaničkog uklanjanja pulpe (ekstirpacije), ovisno o stanju pulpnog tkiva, zaostaju rastrgani odontoblastički nastavci osobito u apikalnom dijelu zuba, nekrotično tkivo, mikroorganizmi i njihovi nusprodukti. Vitalna pulpa se češće uklanja iz korijenskog kanala u fragmentima, dok u slučajevima koagulacijske nekroze češće uklonimo pulpu u jednom komadu. Osim toga prilikom svake mehaničke aktivnosti na dentinskom tkivu nastaje zaostatni sloj: 1 – 2  $\mu\text{m}$  tanki, amorfni, iregularni i granularni sloj koji penetrira 40  $\mu\text{m}$  u

dentinske tubuluse. Kompleksna je struktura anorganskih i organskih čestica, koaguliranih proteina, pulpnog tkiva, slina, krvnih stanica i mikroorganizama (89). Zbog kompleksne anatomske građe endodontskog prostora mehanička obrada korijenskog kanala nije dostatna. Prema različitim istraživanjima 35 – 53% površine korijenskog kanala nakon mehaničke obrade ostaje neinstrumentirano (90, 91) (slika 3) ili prilikom instrumentacije pulpno tkivo biva zbijeno i pritisnuto uz dentinske zidove. Prema Paque i sur. (91) samo 20,1- 40,4% ukupnog volumena ovalnih korijenskih kanala je u kontaktu sa endodontskim instrumentima tokom kemomehaničke obrade korijenskog kanala. Dakle dezinfekcija netaknutih područja moguća je jedino pomoću sredstava za irigaciju korijenskih kanala (92).



Slika 3. Crvena boja predstavlja očišćeni endodontski prostor nakon mehaničke obrade, dok zelena boja predstavlja neobrađeni dio endodontskog prostora ( Preuzeto sa: [http://rootcanalanatomy.blogspot.com/2012\\_05\\_01\\_archive.html](http://rootcanalanatomy.blogspot.com/2012_05_01_archive.html))

### 1.3.3. Kemijska obrada endodontskog prostora

Prema istraživanju Ingle i sur. (14) 80% inicijalno inficiranih korijenskih kanala pokazivalo je pozitivne kulture mikroorganizama odmah nakon instrumentacije i irigacije sterilnom vodom, a taj je broj porastao do 95% 48 sati kasnije. Stoga irigansi s antimikrobnim svojstvima moraju se koristiti pri endodontskoj terapiji kako bi se eliminirao maksimalni broj mikroorganizama.



Irigansi ispiru debris iz korijenskih kanala, otapaju organsko i anorgansko tkivo i djeluju na zaostatni sloj. Isto tako vlaže korijenski kanal i omogućavaju lakši rad endodontskim instrumentima. Irigansi su sposobni doprijeti u većinu mjesta unutar korijenskih kanala koji su inače nedostupni endodontskim instrumentima. Različita kemijska sredstva koriste se kao irigansi za korijenske kanale. Najčešće su korišteni: natrijev hipoklorit u koncentracijama 0,5 – 5,25%, etilendiaminotetraoctena kiselina (17%) i klorheksidin (2%).

Idealano sredstvo za ispiranje korijenskih kanala trebalo bi ispunjavati određene uvjete: otapati organski i anorganski sadržaj, imati antimikrobna svojstva, vlažiti korijenski kanal, imati malu površinsku napetost i nadalje biti netoksičan prema tkivu usne šupljine (93).

Slijedeći podlogu apikalnog parodontitisa, dakle infektivne bolesti, najbitnije svojstvo sredstva za ispiranje korijenskih kanala je antimikrobno djelovanje.

Nažalost niti jedno dostupno sredstvo ne ispunjava sve navedene uvjete što dovodi do potrebe za traženjem novih sredstava poboljšanih svojstava.

### 1.3.2.1 Najčešće korištena sredstva za kemijsku obradu endodontskog prostora

#### Natrijev hipoklorit (NaOCl)

NaOCl je istovremeno i oksidirajuće i hidrolizirajuće sredstvo s baktericidnim i proteolitičkim djelovanjem. U upotrebi je kao sredstvo za ispiranje rana od 1915. god., dok se od 1920. koristi u endodonciji. Relativno je jeftin, dostupan, ima nisku viskoznost i dug vijek trajanja, naravno, u odgovarajućoj ambalaži.

NaOCl najčešće je korišteno sredstvo za irigaciju korijenskih kanala. Posjeduje širok spektar antimikrobnog djelovanja, vrlo brzo i učinkovito uništava vegetativne i spora-formirajuće bakterije, gljive, protozoe, viruse (94). Njegov antimikrobni učinak proizlazi iz sposobnosti da oksidira i hidrolizira stanične proteine i do neke mjere dovodi do gubitka unutar stanične tekućine osmotskim djelovanjem (95). U kontaktu s tkivnim proteinima u kratkom vremenu se stvaraju nitrati, formaldehid i acetaldehid, što dovodi do kidanja peptidnih veza i do otapanja proteina. Dakle natrijev hipoklorit je snažan antimikrobni agens koji posjeduje sposobnost otapanja nekrotičnog tkiva kao i organskih komponenti zaostatnog sloja.

NaOCl razgrađuje organske i masne tvari i transformira ih do soli masnih kiselina i glicerola u reakciji saponifikacije. Neutralizira aminokiseline do vode i soli u reakciji neutralizacije. Pri tome nastaje hipoklorna kiselina koja u kontaktu s organskim tkivom stvara kloramine koji

interferiraj sa staničnim metabolizmom, osobito mikroorganizama (96). NaOCl ima alkalični pH od 11 i više što dodatno pridonosi njegovom antimikrobnom djelovanju.

Koristi se u koncentracijama od 0,5 – 5,25%. Učinkovitost djelovanja vezana je uz koncentraciju slobodnog kloridnog iona pa se smanjenje koncentracije može kompenzirati povećanim volumenom. U malim koncentracijama otapa nekrotično tkivo dok u velikim koncentracijama otapa i vitalno tkivo što je općenito nepoželjan efekt. Ispitivanja su pokazala da povišena koncentracija otopine NaOCl-a ne povećava značajno i njegovo djelovanje unutar korijenskog kanala. Jedino stalna uporaba i velike količine mogu djelovati na najbolji mogući način tj. mogu nadomjestiti njegovu koncentraciju i održati njegovu antibakterijsku učinkovitost. NaOCl je dominantniji u svom djelovanju nad sterilnom vodom jedino ukoliko je veličina apikalne preparacije veća od #30. Kod nedovoljno proširenih kanala i nedovoljno obrađenog apikalnog dijela, djelovanje im je jednako (97).

Prema dosadašnjim istraživanjima NaOCl je pokazao svoje antimikrobno djelovanje na aerobne i anaerobne mikroorganizme karakteristične za endodontski prostor zuba. To su prvenstveno *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella intermedia*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Peptostreptococcus micros*, *Streptococcus sanguis*, *Lactobacillus acidophilus* (98,99).

Negativne strane NaOCl-a su korozivno djelovanje na metale, visoka alkaličnost, hipertoničnost i intezivan, neugodan miris. Osim toga visoko je toksičan za oralna tkiva u većim koncentracijama ukoliko dođu u kontakt s njim te može izazivati alergijske reakcije (99,100,101,102,103,104). U kombinacijama sa kelatorima kao što su EDTA i limunska kiselina smanjuje se količina slobodnih klorina pa samim time i antimikrobno djelovanje NaOCl-a. Isto tako u kombinaciji sa CHX dolazi do stvaranja precipitata parakloroanilina koji dovodi do obojenja tvrdih zubnih struktura i do otpuštanja štetnih kemijskih spojeva u periapikalno područje (105).

### Klorheksidin (CHX)

Klorheksidin otkriven je kasnih 1940-ih u istraživačkim laboratorijima u Macclesfieldu, Engleska. Originalne soli bile su klorheksidin acetat i hidroklorid koje su bile slabo topljive u vodi pa su zamijenjene klorheksidin glukonatom. Po kemijskom sastavu je sintetski kationski

bisbigvanid. Ima svojstvo antibakterijske substantivnosti na dentin; pozitivno nabijene molekule CHX se adsorbiraju na dentin i sprječavaju kolonizaciju mikroorganizama tek tijekom određenog vremena nakon medikacije. U svhu postizanja tog učinka potrebna je produžena interakcija radi zasićenja dentina CHX molekulama. Inkorporacija CHX u dentin je, čini se, prilično dugotrajna i učinkovito reducira broj bakterija čak i tri mjeseca nakon punjenja korijenskih kanala i vrlo malo iritira tkivo. Antimikrobna svojstva ovise o pH: optimum 5,5 – 7. U prisutnosti organske materije reducira se ili čak potpuno nestaje; u prisutnosti dentinskog matriksa znatno se inhibira njegova aktivnost. Čuva se na sobnoj temperaturi u zatvorenoj posudi. Pojavljuje se na tržištu u tri oblika: diglukonat, acetat i soli hidroklorida.

CHX je snažni antiseptik koji se koristi za kontrolu zubnog plaka, sprečavanje i kontrolu paradontnih bolesti, za irigaciju korijenskih kanala i kao intrakanalni uložak. Vodena otopina u koncentraciji od 0,1 – 0,2% se koristi u tu svrhu, dok se za irigaciju endodontskog prostora koristi 2%-tna vodena otopina ili gel.

Preporuča se upotreba CHX-a za irigaciju korijenskih kanala kod zubi s otvorenim apeksom i kod alergija na NaOCl. Dobro priliježe na pelikulu na caklini.

Djeluje bakteriostatski i baktericidno ovisno o dozi. Veže se za površinu mikroorganizama, uništava integritet stanične membrane, penetrira u stanicu i precipitira na citoplazmu što dovodi do smrti stanice. U višim koncentracijama izaziva precipitaciju intracelularnih komponenti prvenstveno adenosin trifosfata (ATP) i nukleinskih kiselina. Kao posljedica citoplazma postaje smrznuta što rezultira smanjenjem curenja.

Smatra se da je CHX manje kaustičan od NaOCl-a, što i ne mora biti istina. Naime, 2%-tni CHX djeluje iritirajuće na kožu (106). Unatoč korisnoj upotrebi CHX-a kao završnog sredstva za irigaciju korijenskih kanala nije preporučljivo koristiti ga i kao jedino sredstvo. Naime, CHX nema organolitički učinak; ne može otapati nekrotične tkivne ostatke. To se pokušalo izmijeniti proizvodnjom CHX u obliku gela kako bi se povećao njegov mehanički učinak. Zatim je nedostatak CHX njegova osjetljivost na postojanje organskog sadržaja u korijenskom kanalu. Naime iako dentin smanjuje baktericidnost CHX na pojedine bakterije, izgleda kako serumski proteini, naročito albumin, kojeg ima u upalnom eksudatu, može daleko više oslabiti protubakterijski učinak CHX nego dentin (107). Isto tako slabije djeluje na Gram negativne nego na Gram pozitivne bakterije (108).

Za razliku od NaOCl-a ima manju citotoksičnost, ali bolju prijemčljivost na dentin i stoga njegov antimikrobni učinak može trajati danima ili tjednima (109).

#### **1.4. POLIHEKSAMETILEN BIGVANID ( PHMB)**

Poliheksametilen bigvanid sintetiziran je 1950-ih u laboratorijima ICI Ltd, UK u sklopu programa protiv malarije. Spada u skupinu biguanida (heterogena mješavina biguanidnih polimera), ima široki antimikrobni spektar i koristi se za dezinfekciju. Ranih 1990-ih uveden je u medicinu kao lokalni antiseptik od strane kirurga Willeneggera (110,111). Od tada se koristi u terapiji opekotina, kroničnih rana, bakterijskih vaginoza (112), kao zamjena za antibiotike u lokalnim upalama (113).

Mehanizam djelovanja mu je sljedeći: kationski polimer PHMB vezan za negativno nabijenu fosfolipidnu membranu bakterije interferira sa stabilnošću istih. Fosfatidilglicerol i ostale negativno nabijene vrste fosfolipida primarni su ciljevi za PHMB na omotaču mikroorganizama. Pozitivno nabijene biguanidne grupe pomoću elektrostatske privlačnosti stupaju u kontakt s negativno nabijenim fosfatnim grupama fosfolipida. Novoformirani kompleks PHMB-fosfolipid inducira povećanu membransku permeabilnost i fluidnost (114,115,116). Ostala visoko sklona mjesta za vezanje PHMB-a su lipopolisaharidi u vanjskoj membrani G-negativnih bakterija, teihoične kiseline na staničnom zidu G-pozitivnih bakterija, peptidoglikanske komponente stanične stijenke i proteini citoplazmatske membrane.

Nasuprot tome, djelovanje na ljudske i životinjske stanice je vrlo ograničeno zbog čega PHMB ima veliku sigurnosnu granicu. PHMB ima sposobnost vezivanja za kisele polisaharide, što je ovisno o dozi. Pri nižim koncentracijama PHMB se veže elektrostatskim vezama, dok pri većim koncentracijama vodikove veze postaju dominantnije. Upravo ovaj mehanizam omogućava vezanje PHMB-a za matriks biofilma. Pod pretpostavkom da je stupanj vezanja/oslobađanja konstantan, koncentracija slobodnih PHMB-a raste i na taj način matriks postaje toksičniji za mikroorganizme biofilma.

PHMB je biocid širokog spektra na gram-pozitivne i gram-negativne bakterije, gljive, protozoe, virus HIV-a. Američka agencija za zaštitu okoliša klasificirala je PHMB kao siguran za opću uporabu, bez mutagenog, genotoksičnog ili neurotoksičnog učinka. Zbog učinkovitosti, širokog spektra djelovanja i izvrsne tolerancije, poliheksanide se smatra antiseptikom prvog izbora, ali je kontraindicirana njeno primjena pri tretmanu hrskavica ili

centralnog živčanog sustava (CŽS). PHMB se koristi za dezinfekciju bazena, kao konzervans u kozmetici i za kožne predmete, za dezinfekciju kontaktnih leća, za čuvanje celuloznih vlaknastih materijala i tekstila te različitih tehničkih otopina, te u otopinama za ispiranje usne šupljine.

## 1.5. CITOTOKSIČNOST

**Biokompatibilnost** se tradicionalno opisuje kao sposobnost materijala ili tvari da djeluje sa odgovarajućim odgovorom domaćina kada se primjenjuje kako je i namijenjeno. Termin odgovarajući podrazumijeva da biokompatibilni materijal nije nužno inertan već reakcija na ispitivani materijal treba biti prihvatljivi rizik u usporedbi sa klinički prihvatljivim materijalom. Termin odgovor domaćina podrazumijeva, između ostalog, sistemsku akutnu, subkroničnu i kroničnu toksičnost, senzibilizaciju/ alergijsku reakciju, lokalnu iritaciju i mutagenost/ karcinogenost.

**Citotoksičnost** se definira kao sposobnost nekog materijala da utječe na staničnu vijabilnost (117). Dakle testovi citotoksičnosti su primarno testovi biokompatibilnosti koji određuju lizu stanice, inhibiciju staničnog rasta i ostale učinke na stanicu koje uzrokuju ispitivane tvari. Citotoksičnost opisuje samo jedan aspekt biokompatibilnosti. Tretiranje stanica s citotoksičnim tvarima može rezultirati različitim promjenama na stanicama. Materijali koji se primjenjuju u usnoj šupljini ne smiju sadržavati toksične i difuzibilne tvari koje mogu ući u krvotok te tako uzrokovati sistemsku ili lokalnu toksičnost, ne smiju djelovati teratogeno ili kancerogeno. Današnji materijali se testiraju prema odredbama i standardima koje propisuje American National Standard Institute (ANSI) i International Standards Organization (ISO, Geneve, Switzerland, 1992.-1997.). Sukladno EN 1441 (Europski komitet za standardizaciju 1996.) biokompatibilni materijali ne smiju biti štetni za organizam domaćina. Karakteristika materijala da uđe u interakciju s biološkim tkivom i pritom stvori stabilnu vezu ključna je za biokompatibilnost. Jedan od aspekata biokompatibilnosti dentalnih materijala jest nedopuštanje bakterijske invazije.

Stanice mogu proći kroz nekrozu ili apoptozu na kraju svog života .

**Nekroza** (grč. *Necrosis* – mrtva, smrt) oblik je stanične ozljede koja rezultira preranom smrću stanice. Uzrokovana je različitim faktorima (infekcije, toksini, trauma). Stanice koje prolaze

nekrozu ubrzano otiču, gube membranski integritet, gase metabolizam i otpuštaju svoj sadržaj u okolinu čime započinje upalni odgovor u okolnom tkivu.

Te stanice nemaju dovoljno vremena za aktivaciju mehanizama apoptoze i ne pokazuju apoptotične markere (118). Razlikujemo pet morfoloških oblika nekroze: koagulacijska, likvefakcijska, kazeozna, masna i fibrinoidna nekroza.

Dva su osnovna načina na koja se razvija nekroza. Kod prvog dolazi do bubrenja stanice (oncosis), zatim slijedi uvrtnanje stanične membrane i skupljanje jezgre (pyknosis). Završni korak je otapanje jezgre u citoplazmi (kariorrhexis). Drugi put slijedi nakon apoptoze i uvrtnanja stanične membrane kada dolazi do raspadanja jezgre na fragmente (karyolysis) (Slika 4.).

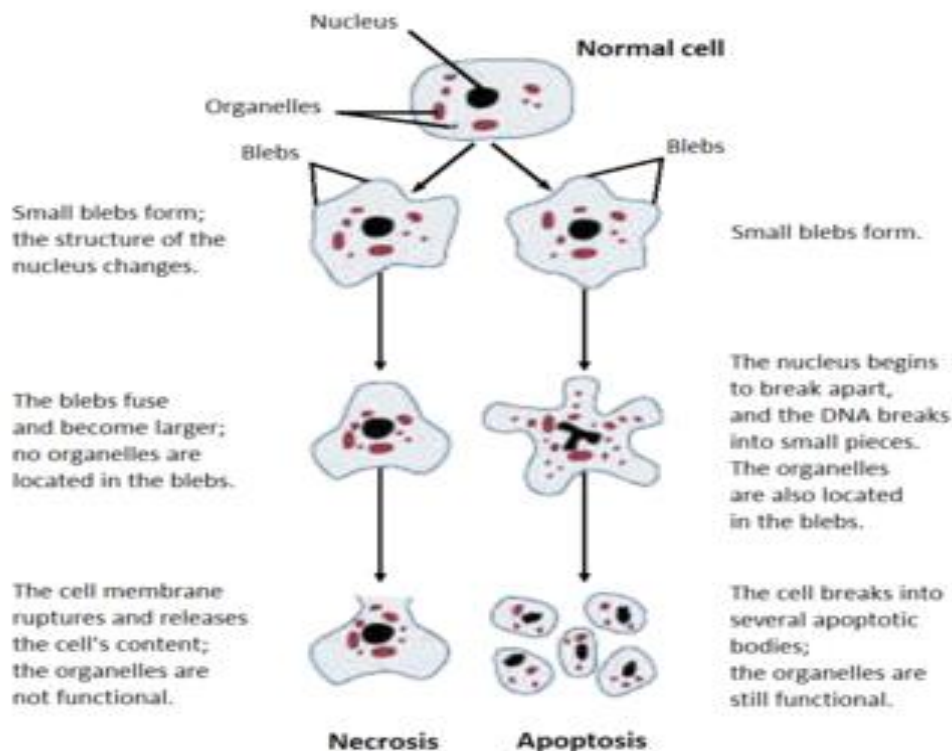
**Apoptozu** (grč. *Apoptosis* – otpadati) karakteriziraju dobro definirani stanični i molekularni događaji koji uključuju promjene u refraktornom indeksu stanice, skupljanje citoplazme, kondenzaciju jezgre i rascjep deoksiribonukleinske kiseline (DNK) na fragmente regularne veličine. Stanice u kulturi koje prolaze apoptozu eventualno sekundarno prolaze nekrozu. Isključit će metabolizam, izgubiti integritet membrane i doživjeti lizu (119,120).

Tri pojave karakteriziraju stanice koje podliježu apoptozi:

1. zgusnuće kromatina i stvaranje mjehurića u membranama
2. fragmentacija DNK u komadiće veličine nukleosoma
3. potreba za sintezom novih RNK i proteina

Ova je zadnja karakteristika dovela do dodatnog opisa tog procesa kao što je "programirana smrt stanice" ili stanično samoubojstvo, budući da je pri umiranju stanice uključen njezin aktivni metabolizam.

Inicijatora apoptoze ima mnogo i različiti su: fiziološki i nefiziološki. Oni aktiviraju intracelularni apoptotski proces. Na kraju, morfološke promjene u staničnoj membrani signaliziraju prepoznavanje i aktivaciju fagocita te eliminaciju takve apoptotske stanice bez upalnog procesa.



Slika 4. Prikaz glavnih faza apoptoze i nekroze. Glavna razlika je što se kod apoptoze stanica raspada na apoptotična tijela, dok kod nekroze puca stanična membrana i sadržaj citoplazme izlazi u okolno tkivo. Preuzeto sa: <http://en.wikipedia.org/wiki/Necrosis>.

Procjenjivanje integriteta stanične membrane je najuobičajeniji način mjerenja i procjenjivanja stanične sposobnosti za život i citotoksičnog učinka. Sastojci koji imaju citotoksični učinak često kompromitiraju integritet stanične membrane. Vitalne boje kao što su tripan plava ili propidium-jodid obično su isključene iz unutrašnjosti zdravih stanica. S druge strane ukoliko je stanična membrana kompromitirana boje slobodno ulaze kroz membranu i bojaju unutarstanične komponente.

Drugi način određivanja vitalnosti stanice je pomoću staničnih proteaza – laktat dehidrogenaza. Proteaze su aktivne kod živih stanica. Ovaj test određuje integritet stanične membrane.

Citotoksičnost se također može utvrđivati pomoću 3-(4,5 Dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H – tetrazolium bromid (MTT). Ovaj test mjeri redukcijski potencijal stanice uz pomoć kolorimetrijske reakcije. Žive stanice reduciraju MTT reagens do obojanih formazanskih

proizvoda i određuje se intezitet absorbcije. To je test koji mjeri metaboličku funkciju stanice mjerenjem aktivnosti mitohondrija.

Pokazalo se da su promjene u metaboličkoj aktivnosti bolji indikatori rane ozljede stanice, dok su učinci na integritet membrane pokazatelji ozbiljnijih oštećenja koja vode do smrti stanice.



## **2.0. SVRHA I CILJ RADA**

Svrha ovog istraživanja je bila:

1. ispitati učinak 0,2%-tnog poliheksametilen bigvanida (PHMB) na monokulture mikroorganizama *E. faecalis*, *C. albicans* i *P. aeruginosa* nakon inkubacije od 48 sati (nezreli biofilm u korijenskom kanalu).
2. ispitati učinak 0,2%-tnog PHMB-a na miješanu kulturu mikroorganizama *E. faecalis*, *S. epidermidis* i *C. albicans* nakon inkubacije od četiri tjedna (zreli biofilm).
3. ispitati moguću citotoksičnost PHMB-a u odabranim koncentracijama (0,1 i 0,2%) na fibroblastima kineskog hrčka V-79 pomoću (MTT) testa.

Nulte hipoteze su:

1. da PHMB u koncentraciji od 0,2% ima slabije antimikrobno djelovanje u odnosu na dosadašnji "zlatni standard" 2,5%-tni NaOCl, kako na monokulture mikroorganizama kod nezrelog biofilma tako i na miješane kulture kod zrelog biofilma uspoređivanjem broja stvorenih kolonija po mililitru (CFU/ml) prije i poslije tretiranja s odabranim otopinama.
2. da 0,2% PHMB ima slabije antimikrobno djelovanje od srodnog antimikrobnog sredstva 0,2 % CHX-a na miješanu kulturu mikroorganizama kod zrelog biofilma korištenjem iste metode (CFU/mL).
3. da je PHMB u koncentracijama od 0,2% i 0,1% jače citotoksičan od 2,5%-tnog i 1,25%-tnog NaOCl-a i to ispitivanjem na fibroblastima kineskog hrčka, V-79 stanicama korištenjem MTT testa.

### **3.0. MATERIJALI I METODE**

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Priprema uzoraka za ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na nezreli biofilm

Istraživanje je provedeno na Zavodu za endodonciju i restaurativnu dentalnu medicinu Stomatološkog fakulteta u Zagrebu i Zavodu za kliničku mikrobiologiju Klinike za infektivne bolesti tijekom veljače 2011. godine.

Prikupljeno je 48 jednokorijenskih zubi koji su ekstrahirani zbog ortodontskih ili parodontoloških razloga. Zubi nisu bili prethodno endodontski tretirani te su nakon ekstrakcije bili pohranjeni u 1%-tnoj otopini kloramina. Zubi su očišćeni od kamenca i tkivnih ostataka pomoću kireta i diskova za poliranje (3M ESPE, USA). Dvadesetčetiri sata prije pripreme, zubi su držani u 0,5%-tnoj otopini NaOCl-a zbog dezinfekcije.

Krone i apikalni dijelovi zubi uklonjeni su pomoću dijamantnih svrdala pod vodenim hlađenjem kako bi se dobili istovjetni uzorci duljine 10 mm. Zatim su korijenski kanali svakog pojedinačnog uzorka prošireni pomoću Hedstroem iglica do veličine 40 uz konstantno ispiranje 2,5%-tnim NaOCl-om te uz završno ispiranje 17%-tnom etilendiaminotetraoctenom kiselinom (EDTA) kroz 5 minuta kako bi se uklonio zaostatni sloj. Cement je s korijena zubi uklonjen pomoću cilindričnog dijamantnog svrdla uz mali broj okretaja (< 100 okr/min) te su potom korijeni zubi prekriveni s prozirnim lakom za nokte (Max Factor, The Proctor and Gamble Company, Cincinnati, Ohio, USA) koji se sušio pola sata na sobnoj temperaturi. Uzorci su nasumice podijeljeni u tri skupine (16 zubi u svakoj skupini).

#### 3.1.2. Priprema uzoraka za ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na zreli biofilm

Priprema uzoraka je izvedena prema gore opisanom protokolu. Uzorci su nasumice podijeljeni u tri skupine, jedna skupina po 30 zubi ( $n = 30$ ) i dvije skupine po 10 zubi ( $n = 10$ ).

### 3.1.3. Priprema uzoraka za ispitivanje citotoksičnosti PHMB-a

Fibroblasti kineskog hrčka, V-79 stanice uzete su iz banke staničnih kultura (GIBCO BRL, Invitrogen, Grand Island, USA). Stanice su uzgajane kao jednoslojna kultura u Dulbekovoj modifikaciji Eagleovog medija (DMEM; Sigma, St. Louis, MO) uz dodatak 10%-tnog fetalnog seruma teleta (FBS) na 37 °C u vlažnoj atmosferi s 5% CO<sub>2</sub>.

Stanice su podijeljene u tri skupine: I) stanice tretirane NaOCl-om, II) stanice tretirane PHMB-om, III) kontrolne netretirane stanice.

## 3.2. METODE

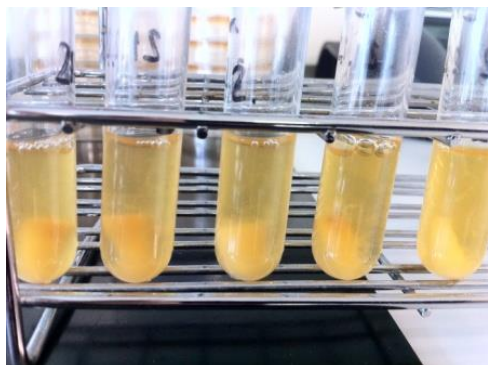
### 3.2.1. Ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na nezreli biofilm

Prekonočne bujonske kulture *E. faecalis* (ATCC 51299), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) i *C. albicans* (klinički izolirana) pripremljene su u triptikaza soj bujonu (Tryptic Soy Broth, Difco). Bujonska kultura sadržavala je 5 – 9 x 10<sup>8</sup> bakterija po mililitru (CFU/mL) što je utvrđeno serijskim razrjeđenjima svakog pojedinačnog bujona.

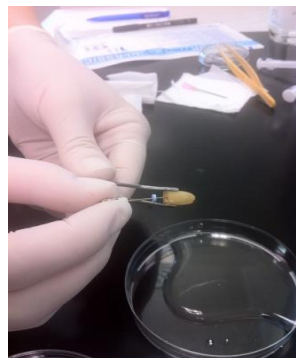
Uzorci su zatim uronjeni u epruvete s po 2 ml bujona na način da je svaki pojedinačni uzorak uronjen u svoju epruvetu (Slika 5). Uzorci su zatim držani na 37 °C kroz 48 sati. Nakon inkubacije uzorci su izvađeni iz bujona, isprani sterilnom fiziološkom otopinom, korijenski kanali posušeni sterilnim papirnatim štapićima i zatim je iz svakog pojedinačnog uzorka uz pomoć Hedstroem pilica veličine 50 uzet uzorak dentinske piljevine iz korijenskog kanala koji je predstavljao uzorak A. Jedanaest uzoraka iz svake skupine tretirano je 0,2%-tnim PHMB-om i to na način da je svake 2 minute kanal ispran s 2 ml otopine, dakle ukupno 10 ml kroz 10 minuta čime se reproducirao klinički postupak. Ista stvar napravljena je s ostalih 5 uzoraka koji su tretirani s 2,5%-tnim NaOCl-om. Zatim su svi uzorci isprani s po 2 ml neutralizatora Tween 80 (Croda Health Care, Yorkshire, England, UK), posušeni sterilnim papirnatim štapićima nakon toga ponovno su uzimani uzorci dentinske piljevine pomoću Hedstroem pilica veličine 50, označeni kao uzorak B (Slika 6).

I uzorci A i B su pomoću pilica preneseni u epruvete sa sterilnom fiziološkom otopinom od koje su napravljena deseterostruka razrjeđenja. Nakon 30 sekundi mješanja na Vortex aparatu

iz svake epruvete 0,1 mL uzorka inokuliran je na po tri ploče krvnog agara (Columbia Blood Agar, Oxoid, UK). Ploče su inkubirane 48 sati na 37 °C. Broj bakterija u mililitru uzorka određen je prema srednjoj vrijednosti broja kolonija poraslih iz pojedinih razrjeđenja.



Slika 5. Uzorci zubi u epruvetama



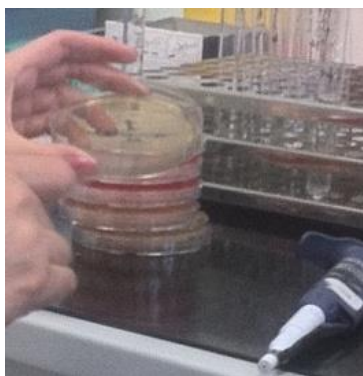
Slika 6. Uzimanje uzoraka dentinske piljevine pomoću Hedstroem iglice

### 3.2.2. Ispitivanje antimikrobnog učinka PHMB-a na zreli biofilm

U mikrobiološkom laboratoriju napravljena je miješana 24-satna bujonska kultura koja je sadržavala *E. faecalis* (ATCC 29212), *S. epidermidis* (WHO 36) i *C. albicans* (ATCC 90028). Postupak je bio jednak kao i u predhodnom istraživanju uz razliku što su se uzorci u takvom bujonu držali četiri tjedna uz povremeno dohranjivanje. Nakon 4 tjedna na istovjetan način uzeti su uzorci dentinske piljevine prije (uzorak A) i nakon (uzorak B) tretiranja uzoraka 0,2%-tnim PHMB-om, 2,5%-tnim NaOCl-om i 0,2%-tnim CHX-om.

S obzirom da se radilo o miješanoj kulturi bakterija razrjeđenja uzoraka A i B nasađivana su na selektivne ploče (Slika 7): Gelose D – CoccoSel (CCS) agar (bioMerieux, France) za *E. faecalis*, Mannitol Salt (MS) agar (Oxoid, UK) za *S. epidermidis* i Sabouraud Chloramphenicol (SAB) agar (Bio-Rad, France) za *C. albicans*.

Trideset uzoraka tretirano je 0,2%-tnim PHMB-om na isti način kao i kod nezrelog biofilma, 10 uzoraka je tretirano 2,5%-tnim NaOCl-om i 10 0,2%-tnim CHX-om. Inkubacija nasađenih ploča i broj bakterija u mililitru uzorka određivani su na isti način kao i kod nezrelog boifilma (Slika 8).



Slika 7. Nasađivanje razrijeđenja uzoraka na selektivne podloge



Slika 8. Kolonije *E. faecalis* na Gelose D – Cocosel agaru

### 3.2.3. Ispitivanje citotoksičnosti

Istraživanje je provedeno na Zavodu za molekularnu biologiju, Laboratorij za genotoksične agense Instituta Ruđer Bošković u Zagrebu. Ispitivani su PHMB u koncentraciji od 0,2% i 0,1%, zatim NaOCl u koncentraciji od 2,5% i 1,25%. Kontrolne stanice tretirane su sterilnom fiziološkom otopinom.

Za određivanje citotoksičnosti koristio se MTT kolorimetrijski test. Svaki eksperiment ponovljen je tri puta. Budući da su se oba sredstva, PHMB i NaOCl, pokazali citotoksičnima u obje koncentracije pristupilo se utvrđivanju koji tip stanične smrti je nastupio uslijed tretiranja stanica s navedena dva sredstva. Kako bi se utvrdilo je li nastupila nekroza, utvrđivao se gubitak integriteta stanične membrane mjerenjem ulaska tripan plave boje. Stanice ( $3,7 \times 10^4$ ) su nasađene na ploče s 24 bunarića. Sljedeći dan stanice su tretirane 0,2%-tnim PHMB-om ili 2,5%-tnim NaOCl-om. Zatim su isprane sterilnom fiziološkom otopinom i prebačene u svježi medij kroz 0,5, 1,5 i 3 sata. Zatim su stanice tretirane 0,2%-tnom tripan plavom bojom i analizirane pod mikroskopom. Stanice koje su izgubile integritet stanične membrane, dakle nekrotične stanice, bile su vidljivo obojane plavom bojom.

Kako bi se odredila indukcija apoptoze  $5 \times 10^5$  fibroblasta kineskog hrčka V-79 nasađene su na Petrijeve posudice, promjera 10 centimetara. Sljedeći dan stanice su isprane 2,5%-tnim i 1,25%-tnim NaOCl-om, zatim sterilnom fiziološkom otopinom i uzgajane u mediju kroz sljedeća 24 sata. Kao pozitivna kontrola služile su stanice koje su tretirane s 20 mikromola ( $\mu\text{M}$ ) cisplatine kroz 24 sata. Za cisplatinu je poznato da inducira apoptozu stanica. Je li došlo

do apoptoze, procjenjivalo se na temelju morfoloških promjena na stanicama tretiranim NaOCl-om. Stanice su obojane akridin-narančastom bojom (AO) te etidium bromidom (EtBr). Vezane i planktonske stanice su prikupljene, centrifugirane i resuspendirane u malom volumenu medija. Zatim su pomiješane 10  $\mu$ l suspenzije i po 4  $\mu$ l akridin-narančaste boje i etidium bromida. AO se umeće u DNK i daje zelenu fluorescentnu boju (ekscitira na 502 nm, a emitira svjetlo na 526 nm). Također se veže za RNK u citoplazmi i boja citoplazmu u crvenonarančastu boju. EtBr prolazi samo kroz oštećene stanične membrane, umeće se u DNK i daje crvenu fluorescentnu boju (ekscitira na 510 nm, emitira svjetlo na 595 nm) i slabo se veže za RNK dajući citoplazmi fluorescentno narančastu boju. Fluorescencija u stanicama je promatrana pomoću epifluorescentnog mikroskopa (Axiovert 35, Option) kroz BP 450-490, FT 510, LP 520 filter. Slike su napravljene pomoću fotoaparata Pixera Pro150ES (San Jose, CA).

### 3.3. STATISTIČKA ANALIZA

U prvom dijelu istraživanja (nezreli biofilm) podaci su analizirani pomoću SPSS, verzija 16 (IBM, New Orchard Road, NY, USA). Normalnost distribucije podataka testirana je Shapiro-Wilk testom, a za usporedbu podataka između grupa korišten je Kruskal-Wallisov test sa  $p = 0,05$ .

Kod istraživanja antimikrobnog učinka na zreli biofilm u korijenskom kanalu za statističku obradu podataka korišteni su programski paketi STATISTICA 7.0 i MedCalc. Deskriptivna statistika je korištena za određivanje osnovnih statističkih parametara (srednje vrijednosti, standardne pogreške, standardne devijacije, relativne standardne devijacije, medijani te minimalne i maksimalne vrijednosti). T-testom je utvrđeno postojanje/nepostojanje statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti broja mikroorganizama prije i nakon obrade pojedinom otopinom.

Analizom varijance i Newman-Keuls testom utvrđeno je postojanje/nepostojanje statistički značajne razlike između srednjih vrijednosti efikasnosti antiseptičkog djelovanja za pojedine parove testiranih grupa



#### **4.0. REZULTATI**

#### 4.1. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA PHMB-A NA NEZRELI BIOFILM U KORIJENSKOM KANALU

Između grupe "A" (netretirani uzorci) i grupe "B" (uzorci tretirani 0,2%-tnim PHMB-om) postojala je statistički značajna razlika. U grupi uzoraka inficiranih s *E. faecalis* nakon tretiranja 0,2%-tnim PHMB-om došlo je do smanjenja broja mikroorganizama u 3 uzorka, dok je u 8 uzoraka došlo do potpunog uklanjanja mikroorganizama, kao što je vidljivo u Tablici 2. Statistički značajna razlika između grupa "A" i "B" je jasno vidljiva ( $\chi^2 = 14,450$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,0001$ ).

Tablica 2. Broj *E. faecalis* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om

N	<i>Enterococcus faecalis</i>	
	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$1,3 \times 10^4$	$4,5 \times 10^2$
2	$1,5 \times 10^4$	Sterilno
3	$3,1 \times 10^3$	Sterilno
4	$1,6 \times 10^4$	Sterilno
5	$2,4 \times 10^3$	Sterilno
6	$2,5 \times 10^3$	Sterilno
7	$2,2 \times 10^4$	Sterilno
8	$1,5 \times 10^2$	Sterilno
9	$1,1 \times 10^2$	Sterilno
10	$4,9 \times 10^4$	$1,5 \times 10^1$
11	$2,2 \times 10^3$	$1,3 \times 10^3$

N- uzorak

U grupi uzoraka inficiranoj s *P. aeruginosa* nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om došlo je do potpunog uklanjanja mikroorganizama, kao što je vidljivo u Tablici 3. Statistički

značajna razlika u broju *P. aeruginosa* prije i poslije tretmana je jasno vidljiva ( $\chi^2 = 18,021$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,0001$ ).

Tablica 3. Broj *P. aeruginosa* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om

N	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$2,2 \times 10^4$	Sterilno
2	$1,1 \times 10^2$	Sterilno
3	$3,1 \times 10^3$	Sterilno
4	$2,4 \times 10^4$	Sterilno
5	$1,3 \times 10^3$	Sterilno
6	$3,1 \times 10^2$	Sterilno
7	$4,8 \times 10^3$	Sterilno
8	$2,5 \times 10^3$	Sterilno
9	$1,6 \times 10^2$	Sterilno
10	$2,3 \times 10^3$	Sterilno
11	$2,5 \times 10^4$	Sterilno

N- uzorak

U grupi uzoraka inficiranih s *C. albicans* kod 7 uzoraka došlo je do potpune redukcije rasta gljiva, dok je kod preostala 4 uzorka došlo do smanjenja broja gljiva nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om, što je prikazano u Tablici 4. Izražena je statistički značajna razlika između grupe "A" i "B" ( $\chi^2 = 16,147$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,0001$ ).

Tablica 4. Broj *C. albicans* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om

N	<i>Candida albicans</i>	
	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$1 \times 10^3$	$7,5 \times 10^1$
2	$4 \times 10^3$	$1 \times 10^1$
3	$1,5 \times 10^3$	Sterilno
4	$1 \times 10^2$	$2 \times 10^1$
5	$7 \times 10^2$	Sterilno
6	$2 \times 10^3$	Sterilno
7	$3 \times 10^3$	Sterilno
8	$3 \times 10^2$	$1 \times 10^1$
9	$2 \times 10^2$	Sterilno
10	$1 \times 10^3$	Sterilno
11	$2,2 \times 10^3$	$1 \times 10^1$

N- uzorak

Uzorci tretirani 2,5%-tnim NaOCl-om pokazali su slične rezultate. Također je postojala statistički značajna razlika između grupe "A" i "B".

Uzorci inficirani s *E. faecalis* nakon ispiranja 2,5%-tnim NaOCl-om pokazala su smanjenje broja mikroorganizama u 2 uzorka i potpunu redukciju mikroorganizama u 3 uzorka ( $\chi^2 = 6,988$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,008$ ) (Tablica 5).

Tablica 5. Broj *E. faecalis* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 2,5%-tnim NaOCl-om

<i>Enterococcus faecalis</i>		
N	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$3,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^3$
2	$1,6 \times 10^4$	sterilno
3	$1,3 \times 10^3$	sterilno
4	$1,0 \times 10^4$	$2,5 \times 10^2$
5	$4,0 \times 10^4$	sterilno

N- uzorak

Uzorci inficirani s *P. aeruginosa* bili su u 4 od 5 slučajeva bez mikroorganizama nakon tretmana 2,5%-tnim NaOCl-om ( $\chi^2 = 7,258$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,007$ ) (Tablica 6).

Tablica 6. Broj *P. aeruginosa* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 2,5%-tnim NaOCl-om

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
N	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$1,8 \times 10^2$	sterilno
2	$3,1 \times 10^3$	sterilno
3	$2,2 \times 10^3$	sterilno
4	$2,5 \times 10^3$	$1,2 \times 10^2$
5	$1,9 \times 10^4$	sterilno

N- uzorak

U uzorcima s monokulturom *C. albicans* došlo je do smanjenja broja gljiva nakon tretmana 2,5%-tnim NaOCl-om ( $\chi^2 = 5,312$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,021$ ) (Tablica 7).

Tablica 7. Broj *C. albicans* (CFU/mL) prije i nakon tretmana 2.5%-tnim NaOCl-om

<i>Candida albicans</i>		
N	Prije tretmana	Nakon tretmana
1	$4 \times 10^3$	$3 \times 10^2$
2	$1,8 \times 10^2$	$1,2 \times 10^1$
3	$3,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^1$
4	$1,5 \times 10^3$	$1 \times 10^2$
5	$3 \times 10^2$	$2 \times 10^1$

N- uzorak

U usporedbi djelotvornosti 0,2%-tnog PHMB-a i 2,5%-tnog NaOCl-a na *E. faecalis* i *P. aeruginosa* nije postojala statistički značajna razlika ( $\chi^2 = 0,232$ ,  $df = 1$ ,  $P = 0,630$ ,  $\chi^2 = 2,2$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,138$ ).

Kod *C. albicans*, 0,2%-tni PHMB se pokazao djelotvornijim sredstvom za smanjenje broja gljiva od 2,5%-tnog NaOCl-a ( $\chi^2 = 6,6$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0,01$ ).

#### 4.2. ISPITIVANJE ANTIMIKROBNOG UČINKA NA ZRELI BIOFILM U KORIJENSKOM KANALU

Osnovni statistički parametri za broj mikroorganizama prije i nakon tretmana s tri različita antiseptika je prikazan u Tablici 8 i na Slikama 9 i 10, a rezultati t-testa u Tablici 9.

Tablica 8. Osnovni statistički parametri za broj mikroorganizama prije i nakon tretmana s tri različita antiseptika.

Antiseptik	Stat. parametar	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
		Prije tretiranja	Poslije tretiranja	Prije tretiranja	Poslije tretiranja	Prije tretiranja	Poslije tretiranja
CHX	X	2013,6	50,9	45470,0	1204,0	110,0	0,0
	SD	1184,1	149,1	31512,4	1695,5	205,9	0,0
	RSD	0,6	2,9	0,7	1,4	1,9	0,0
	SP	357,0	45,0	9965,1	536,2	65,1	0,0
	M	2100,0	0,0	50000,0	170,0	22,5	0,0
	Min.	550,0	0,0	3200,0	0,0	0,0	0,0
	Maks.	3900,0	500,0	86000,0	4200,0	500,0	0,0
NaOCl	X	8820,0	1,1	20283,0	0,0	3,5	0,0
	SD	19257,5	3,3	22578,7	0,0	7,5	0,0
	RSD	2,2	3,0	1,1	0,0	2,1	0,0
	SP	6419,2	1,1	7140,0	0,0	2,4	0,0
	M	1700,0	0,0	8550,0	0,0	0,0	0,0
	Min.	980,0	0,0	230,0	0,0	0,0	0,0
	Maks.	60000,0	10,0	60000,0	0,0	20,0	0,0
PHMB	X	1610,5	0,3	21755,0	0,0	54,7	0,0
	SD	1736,8	1,8	19542,1	0,0	105,6	0,0
	RSD	1,1	5,5	0,9	0,0	1,9	0,0
	SP	317,1	0,3	3567,9	0,0	19,3	0,0
	M	1100,0	0,0	16000,0	0,0	0,0	0,0
	Min.	25,0	0,0	400,0	0,0	0,0	0,0
	Maks.	8100,0	10,0	80000,0	0,0	510,0	0,0

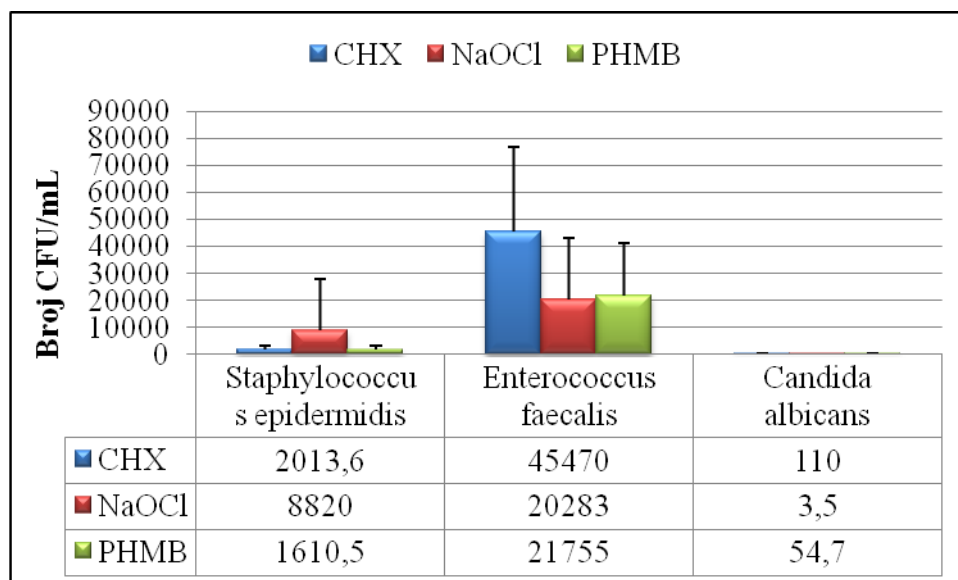
X – srednja vrijednost; SD – standardna devijacija; RDS – relativna standardna devijacija; SP – standardna pogreška; M – medijan, NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Tablica 9. Rezultati t-testa između broja mikroorganizama prije i nakon tretmana s tri različita dezinficijensa

Tretman	Mikroorganizam	Stat. parametar		
		T	df	p
PHMB	<i>Candida albicans</i>	2,84	58	0,006248*
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5,08	58	0,000004*
	<i>Enterococcus faecalis</i>	6,10	58	0,000000*
NaOCl	<i>Candida albicans</i>	1,49	18	0,155840
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	5,08	18	0,000004*
	<i>Enterococcus faecalis</i>	2,84	18	0,010845*
CHX	<i>Candida albicans</i>	1,69	18	0,108385
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4,84	18	0,000132*
	<i>Enterococcus faecalis</i>	4,44	18	0,000319*

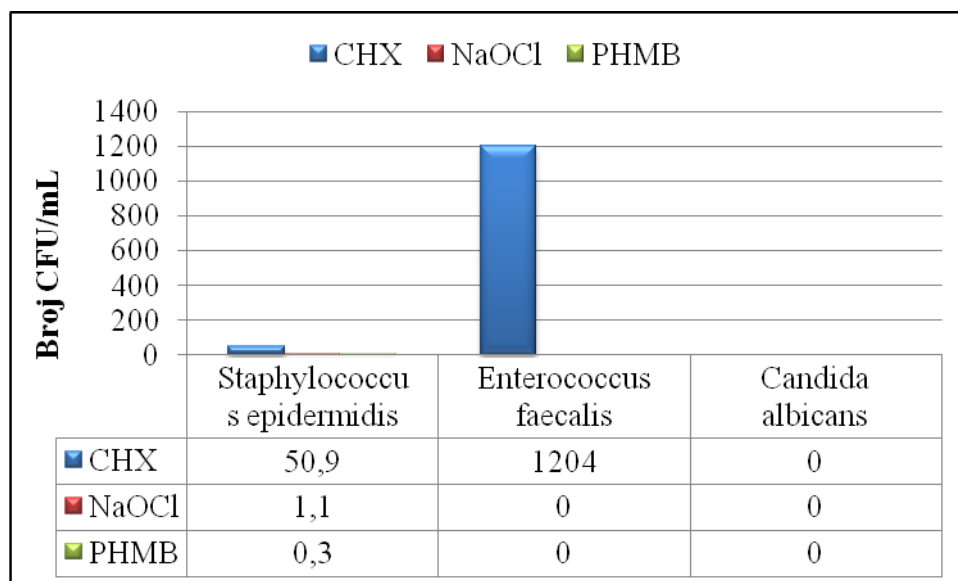
\* – statistički značajna razlika  $p < 0,005$

NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid



Slika 9. Srednje vrijednosti i standardne devijacije broja CFU/mL prije tretmana antisepticima, NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid





Slika 10. Srednje vrijednosti broja CFU/mL nakon tretmana antisepticima, NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Broj mikroorganizama prije obrade antiseptikom značajno varira između testiranih uzoraka u slučaju sva tri mikroorganizma što je vidljivo iz visokih vrijednosti standardnih devijacija i relativnih standardnih devijacija s tim da su najopterećeniji uzorci bili oni onečišćeni (inficirani) bakterijom *Enterococcus faecalis*. Nakon obrade otopinama uočeno je jasno smanjenje broja mikroorganizama (više od 50 puta) u slučaju sva tri mikroorganizma i sve tri otopine.

Rezultati t-testa su pokazali da su ove razlike i statistički značajne u slučaju tretmana PHMB-om za sva tri mikroorganizma. U slučaju NaOCl-a i CHX-a utvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između tretiranih i netretiranih uzoraka u slučaju obje bakterije, dok za gljivu *C. albicans* ta razlika nije bila statistički značajna uslijed malog broja pozitivnih inicijalnih uzoraka i velike disperzije rezultata.

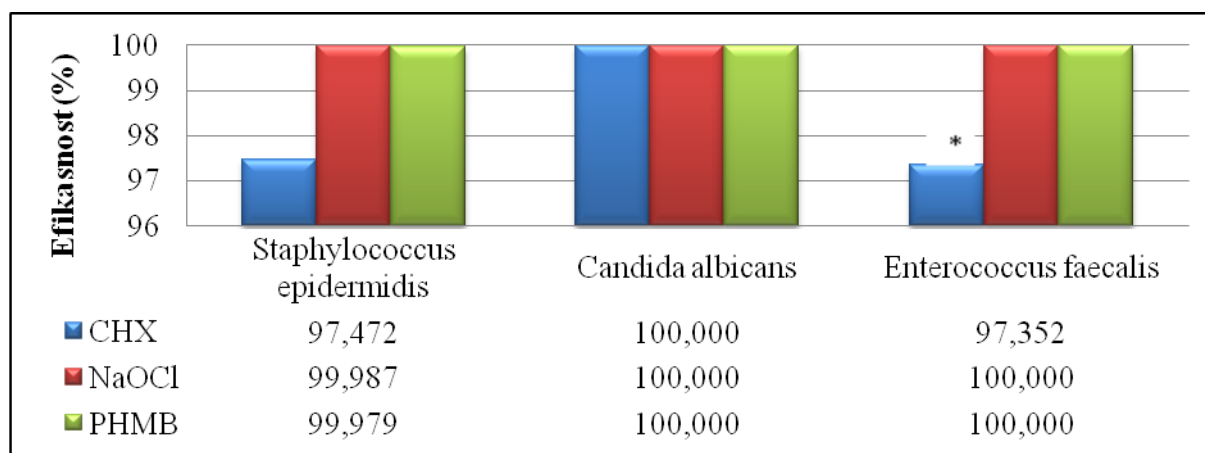
S obzirom na to da su se podaci za broj kolonija mikroorganizama prije tretmana značajno razlikovali, za usporedbu antimikrobnog djelovanja tri antiseptika upotrijebljena je efikasnost uklanjanja mikroorganizama umjesto broja kolonija nakon tretmana antisepticima. Iz Tablice 10 i Slike 11 je vidljivo da u slučaju bakterije *Staphylococcus epidermidis*, između tri testirana antiseptika, CHX je pokazao najslabiju efikasnost (97,47%) u uklanjanju ove bakterije, dok su ostala dva antiseptika imala gotovo identičnu efikasnost (99,98% u slučaju

NaOCl-a te 99,97% u slučaju PHMB-a). Slične vrijednosti i sličan odnos je utvrđen i u slučaju bakterije *Enterococcus faecalis*, uz nižu standardnu devijaciju u slučaju efikasnosti CHX-a. U slučaju gljive *C. albicans* efikasnost uklanjanja je iznosila 100% u slučaju sva tri antiseptika. Međutim, ulazne vrijednosti su bile znatno niže u odnosu na testirane bakterije.

Tablica 10. Srednje vrijednosti i standardne devijacije efikasnosti antimikrobnog djelovanja u postocima za tri različita antiseptika i tri mikroorganizma

Antiseptik	Mikroorganizam		
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
CHX	97,472±7,124	100±0	97,352±3,514*
NaOCl	99,987±0,196	100±0	100±0
PHMB	99,979±0,058	100±0	100±0

\* – statistički značajna razlika  $p < 0,005$ , NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid



Slika 11. Srednje vrijednosti učinkovitosti antimikrobnog djelovanja u postocima za tri različita antiseptika i tri mikroorganizma, NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX – klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Analizom varijance (Tablice 11 – 13) potvrđena je statistički značajna razlika ( $p < 0,05$ ) između tri antiseptika za bakteriju *Enterococcus faecalis*, ali ne i za *S.epidermidis*. Za *C. albicans* nije bilo moguće izračunati značajnost razlike. Newman-Keuls testom (Tablica 14)

potvrđeno je da je ta razlika statistički značajna između CHX-a i NaOCl-a ( $p = 0,000242$ ) te CHX-a i PHMB-a ( $p = 0,000490$ ).

Tablica 11. Rezultati analize varijance za učinkovitost djelovanja za *Staphylococcus epidermidis* između različitih antiseptika

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		
Izvor varijacije	Suma kvadrata	Br. stupnjeva slobode	Srednji kvadrat
Između grupa	47,78	2	23,89
Unutar grupa	457,18	47	9,73
Ukupna varijacija	504,97	49	
F	2,456		
P	0,0967		

NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Tablica 12. Rezultati analize varijance za učinkovitost djelovanja za *Enterococcus faecalis* između različitih antiseptika

	<i>Enterococcus faecalis</i>		
Izvor varijacije	Suma kvadrata	Br. stupnjeva slobode	Srednji kvadrat
Između grupa	51,04	2	25,52
Unutar grupa	111,11	47	2,36
Ukupna varijacija	162,16	49	
F	10,795		
P	0,000139*		

\* – statistički značajno  $p < 0,005$

NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Tablica 13. Rezultati analize varijance za učinkovitost djelovanja za gljivu *Candida albicans* između različitih antiseptika

	<i>Candida albicans</i>		
Izvor varijacije	Suma kvadrata	Br. stupnjeva slobode	Srednji kvadrat
Između grupa	0,00	2	0,00
Unutar grupa	0,00	19	0,00
Ukupna varijacija	0,00	21	
F	Ne može se izračunati		
P	Ne može se izračunati		

NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX- klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Tablica 14. Rezultati Newman-Keuls testa za učinkovitost djelovanja između tri primijenjena antiseptika

	<i>Staphylococcus epidermidis</i>			<i>Enterococcus faecalis</i>			<i>Candida albicans</i>		
	CHX	NaOCl	PHMB	CHX	NaOCl	PHMB	CHX	NaOCl	PHMB
CHX		NZ	NZ		0,00024 2*	0,00049 0*		NZ	NZ
NaOCl	NZ			0,00024 2*		NZ	NZ		NZ
PHMB	NZ	NZ	NZ	0,00049 0*	NZ		NZ	NZ	

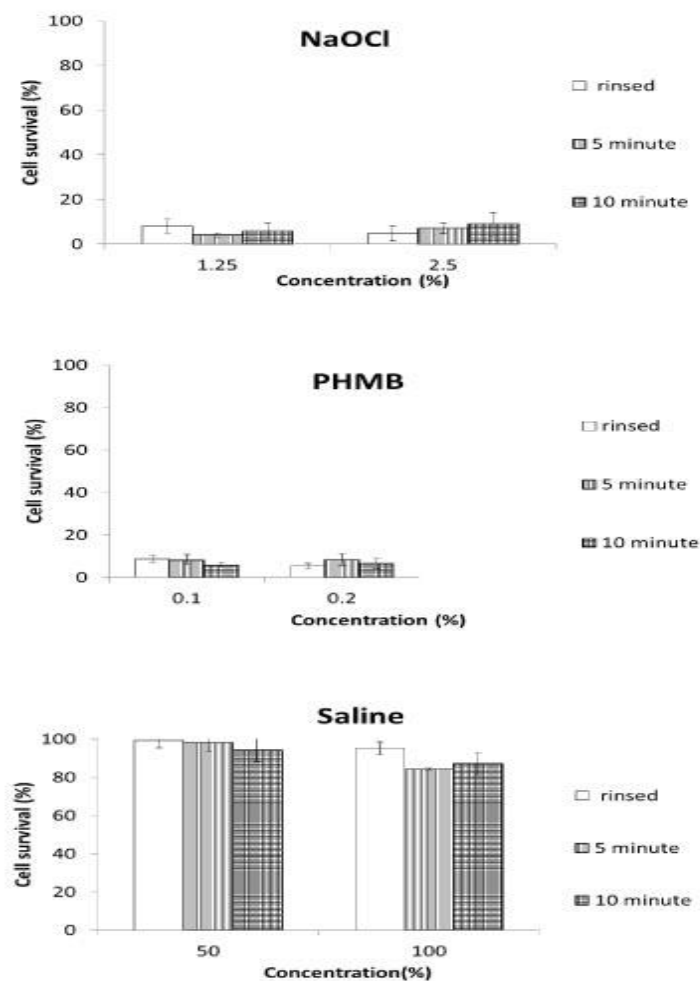
NZ – nije stat. značajno; \* – statistički značajno  $p < 0,005$

NaOCl - natrijev hipoklorit, CHX - klorheksidin, PHMB - poliheksametilen bigvanid

Iz dobivenih rezultata je moguće zaključiti da PHMB pokazuje bolji antiseptički učinak u odnosu na CHX u slučaju obje bakterije, a njegovi rezultati su usporedivi s onim dobivenim tretiranjem NaOCl-om.

### **4.3. ISPITIVANJE CITOTOKSIČNOSTI**

Dobiveni rezultati pokazuju da su većina stanica nakon inkubacije 0,1 i 0,2%-tnim PHMB-om ili 1,25 i 2,5%-tnim NaOCl-om u trajanju od 5 ili 10 minuta bile uništene, što prikazuje Slika 12.

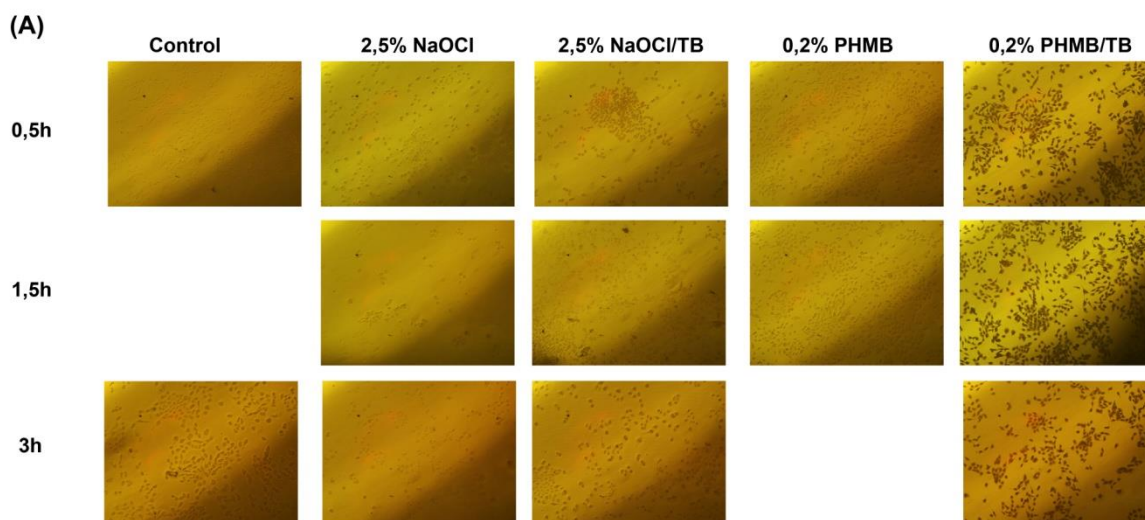


Slika

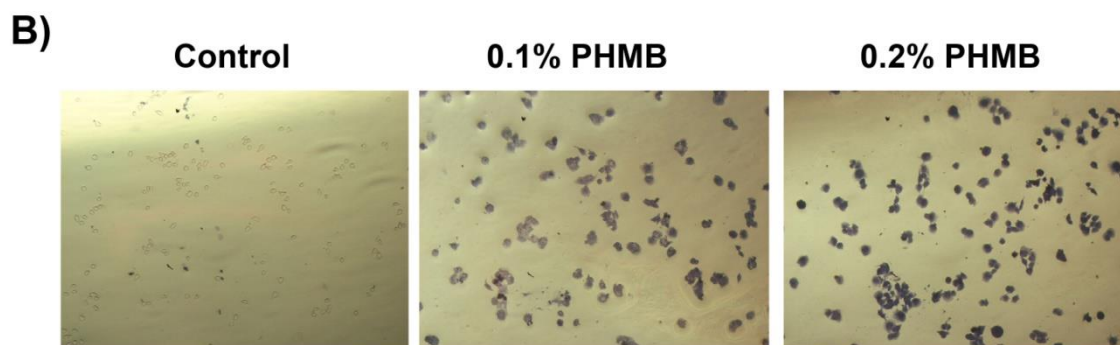
Slika 12. Postotak preživjelih stanica V-79 nakon tretmana 0,1%-tnim i 0,2%-tnim PHMB-om, 1,25%-tnim i 2,5%-tnim NaOCl-om te 50%-tnom i 100%-tnom fiziološkom otopinom

Isti rezultati su dobiveni i nakon kratkotrajnog ispiranja stanica jednakim koncentracijama navedenih otopina. Istovremeno, stanice koje su tretirane 50%-tnom ili 100%-tnom fiziološkom otopinom ostale su vitalne.

Tip stanične smrti uzrokovan djelovanjem PHMB-a i NaOCl-a se razlikovao. Pola sata nakon ispiranja stanica 0,2%-tnim PHMB-om, sve stanice su umrle u nekrozi (Slika 13 A). Isto se dogodilo nakon ispiranja stanica dvostruko nižom koncentracijom PHMB-a (Slika 13 B).



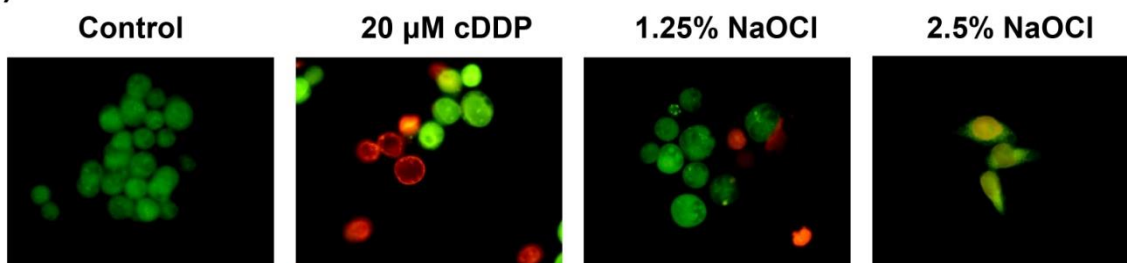
Slika 13 A. Stanice nakon ispiranja 0,2%-tnim PHMB-om



Slika 13 B. Stanice nakon ispiranja 0,1%-tnim i 0,2%-tnim PHMB-om

Nakon puno duže inkubacije (3 sata), stanice tretirane NaOCl-om bile su vitslne. Nakon 24 - satnog kontakta stanica s 1,25%-tnim i 2,5%-tnim NaOCl-om, započela je apoptoza (Slika 13 C). Nakon 48 sati kontakta stanica s NaOCl-om, sve stanice su umrle u apoptozi.

**C)**



Slika 13 C. Stanice tretirane cisplatinom, 1,25%-tnim i 2,5%-tnim NaOCl-om.





Cilj endodontskog tretmana je uspostaviti ili održati zdravo stanje periapikalnog tkiva. Taj cilj moguće je postići redukcijom ili eliminacijom mikroorganizama iz endodontskog prostora, osobito sustava korijenskih kanala zuba. Kemomehanička obrada korijenskog kanala podrazumijeva korištenje različitih instrumenata, tehnika rada te kemijskih tvari koji imaju zajednički cilj, a to je stvoriti idealne uvjete za punjenje korijenskih kanala zuba.

Anatomska građa endodontskog prostora je izrazito kompleksna s velikim brojem lateralnih i akcesornih kanalića, istmusa, apikalnih delti. Bez obzira koju tehniku instrumentacije i sredstva za irigaciju koristili analiza dentinske piljevine pokazala je da unutar korijenskih kanala i dalje perzistiraju mikroorganizmi (121). Haapaslo i Orstavik (31) su u svom istraživanju također pokazali kako unatoč uporabi različitih sredstava za irigaciju korijenskih kanala neke bakterije i dalje ostaju sposobne migrirati u dentin i tamo preživljavati. To bi mogao biti jedan od glavnih uzroka neuspjeha endodontskog tretmana (122). Prema Love i sur. (123) jedan od glavnih razloga preživljavanja mikroorganizama unatoč kemomehaničkoj obradi korijenskog kanala jest serum koji štiti mikroorganizme na način da razrijeđuje sredstva za irigaciju korijenskog kanala.

Ispitivanje učinkovitosti različitih sredstava za ispiranje korijenskih kanala i intrakanalnih medikamenata sa širokim antimikrobnim spektrom i niskom citotoksičnošću je i nadalje u fokusu znanstvenih istraživanja.

Antimikrobno djelovanje, sposobnost otapanja ostataka pulpnog tkiva, vlaženje prilikom instrumentacije korijenskih kanala, dostupnost, niska cijena i neškodljivost za biološka tkiva osnovni su uvjeti koje treba ispuniti sredstvo za irigaciju korijenskih kanala (124).

Danas se kao sredstvo za irigaciju korijenskih kanala koristi natrijev hipoklorit (NaOCl) u koncentracijama 0,5 – 5,25% (125). Ima široki antimikrobni spektar, otapa organski sadržaj, dostupan je na tržištu i ekonomski prihvatljiv. Međutim, istovremeno ima iritirajuće djelovanje na periapikalno tkivo (126), u kontaktu s ostalim oralnim tkivima ima adstrigentno djelovanje, jak, nadražujući miris, korozivno djelovanje na endodontske instrumente (127) te može uzrokovati alergijske reakcije (128).

Iako je NaOCl u različitim koncentracijama najkorištenije sredstvo za irigaciju korijenskih kanala i druge otopine su u uporabi, poput klorheksidina, providon jodida i MTD-a, bilo samostalno ili u kombinaciji sa NaOCl-om. Njih se koristi kako bi se pojačalo antimikrobno djelovanje i substantivnost prema rezistentnim bakterijama, a pri tome smanjio kaustični učinak. Također, neke od njih, poput raznih kelatora, se koriste za uklanjanje zaostatnog sloja

na koji NaOCl ne djeluje (129). Ustaljeno je mišljenje da NaOCl kao sredstvo koje ima sposobnost izbjeljivanja nije sposoban obojati zubne strukture. Prema istraživanjima Gutiereza i Guzmana (130) NaOCl u kontaktu sa eritrocitima stvara smeđi precipitat koji ima veliku sklonost kristaliziranja u dentinu.

Dokazano je da NaOCl u kombinaciji sa drugim sredstvima koja se koriste u korijenskim kanalima može stvarati spojeve koji dovode do obojenja tvrdih zubnih tkiva. To su prvenstveno CHX i mješavina tetraciklina (tetracycline isomer), kiseline (citric acid) i deterdženta (detergent Tween 80)(MTAD). NaOCl u kombinaciji sa CHX stvara tamno smeđi talog parakloroanilina (PCA) koji boji dentin, taloži se na ulaze u dentinske kanale i na dentinske zidove i djeluje kao rezidualni film koji onemogućava difuziju intrakanalnih medikamenata i adheziju punila za korijenske kanale (131). PCA je osim toga karcinogen kao i produkti njegove razgradnje (132). U kombinaciji sa MTAD također se stvara smeđi precipitat koji boji zube (133).

Poliheksametilen bigvanid (PHMB) je brzodjelujuće, antimikrobno sredstvo širokog spektra djelovanja, učinkovito i u niskim koncentracijama na gram-pozitivne i gram- negativne bakterije (134, 135), gljive (136, 137), protozoe (138, 139) kao i na viruse. Stabilan je kroz široki raspon pH (1-11), slabo se pjeni, nema formaldehida ni mirisa i prozirna je tekućina.

PHMB djeluje na vanjsku i citoplazmatsku membranu stanice. Adherira na njih, razara ih i dovodi do otpuštanja kalijevih iona te ostalih komponenata citoplazme što rezultira smrću stanice (140).

Koristi se za dezinfekcije radnih površina, materijala i instrumenata (141), u otopinama za ispiranje usne šupljine (142, 143), otopinama za održavanje kontaktnih leća (144). U medicini se koristi za tretiranje opekotina i rana (145).

PHMB se nalazi u različitim komercijalnim pripravcima kao aktivna komponenta [Bigvasan IB10® (Arch Chemicals. Inc., UK), Lavasept® (Braun Melsungen AG, Deutschland)].

Preostali mikroorganizmi unutar korijenskih kanala, njihov razmještaj i dubina prodiranja u dentinske tubuluse ispitivani su različitim metodama. Akpata i Blechman (146) i Perez i sur. (147) u tu svrhu su se koristili histološkim preparatima dok su Weiger i sur. (148). Tandjung i sur. (149) su proučavali zaostale mikroorganizme procjenom njihove vitalnosti. U ovom radu je odlučeno za metodu kultiviranja uzoraka iz dentinskih kanala te određivanje broja

preživjelih bakterija (CFU) nakon tretmana sa različitim sredstvima za irigaciju kao i Haapasalo i Orstavik (31), Buck i sur. (150), Komorowski i sur. (151) te Siqueira i sur. (152).

Tehnika kultivacije je referentna metoda za određivanje sastava bakterijskog plaka. Omogućuje identifikaciju glavnih komponenti i njihovu osjetljivost na antibiotike *in vitro*. Prednosti metode kultivacije su: homogena distribucija mikrobnih stanica na hranjivoj podlozi, mikroorganizmi brzo rastu i sintetiziraju produkt, najveći je stupanj iskorištenja supstrata i produktivnosti.

Međutim metode kultivacije imaju i neka ograničenja od kojih je najznačajnije da se mogu brojati jedino živi mikroorganizmi. Neke stanice *E.faecalis*-a mogu ući u stacionarnu fazu što ih čini nemogućima za uočavanje ovom metodom. Stoga rezultate dobivene metodom kultivacije treba uzeti sa rezervom (153). Postoji vjerojatnost da je broj mikroorganizama prvenstveno *E.faecalis*-a u uzorku "A" bio još i veći od dobivenog broja što ovom metodom nije moglo biti vidljivo. Samim time postoji i mogućnost da je i djelovanje ispitivanih antimikrobnih sredstava bilo još i bolje od dokazanog. Za razliku od metode kultivacije molekularne metode mogu ponuditi bolju sliku endodontskih mikroorganizama prije i nakon tretmana antimikrobnim sredstvima uključujući i one koji se ne mogu uzgajati u laboratorijima sa trenutno dostupnim tehnikama (18).

Prema Souza i sur. (154) količina CFU u koronarnoj trećini korijena zuba je veća nego u srednjoj i apikalnoj trećini zbog većeg broja dentinskih tubulusa kao i njihovih promjera što može predstavljati još jedan dodatni čimbenik koji je mogao utjecati na rezultate ovog istraživanja.

S obzirom da je rađeno *ex vivo* istraživanje, pripremljeni su uzorci prema metodi Haapasala i Ørstavika iz 1987. godine, uz određene modifikacije. Navedeni autori koristili su goveđe sjekutiće od kojih su izrađivali dentinske diskove za *ex vivo* istraživanje. U ovom istraživanju korišteni su humani ekstrahirani zubi kojima su odstranjene krune i apikalni dijelovi, uklonjeni cementni omotači, obrađen endodontski prostor i sterilizirani. Na taj način dobiveni su dentinski blokovi humanog podrijetla koji su realno predstavljali medij (korijenski kanal) koji i inače naseljavaju mikroorganizmi kako bi se mogla reproducirati infekcija dentinskih tubulusa i proučiti djelovanje odabranih otopina na njih.

U ovom istraživanju se htjelo proučiti djelovanje 0,2-postotne koncentracije PHMB- a na mikroorganizme nezrelog 48- satnog biofilma koji se sastoji od mikroorganizama

karakterističnih za endodontski prostor – *E. faecalis*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*. U tu svrhu napravljeni su bujoni s monokulturama navedenih mikroorganizama kojima su inficirani korijenski kanali. Inkubacija je trajala 48 sati, vrijeme koje je prema Portenieru i sur. (155) i Foleyu i sur. (156) potrebno kako bi se unutar korijenskog kanala formirao nezreli biofilm. Obzirom da je bilo riječ o kratkom vremenu inkubacije prema Saueru i sur. (157) veliki broj stanica navedenih mikroorganizama još je uvijek bio u obliku slobodnih, planktonskih stanica.

U skladu sa istraživanjima navedenim u brojnim radovima u dostupnoj literaturi pa tako i istraživanju Stuarda i sur. (30) odlučeno je da se koriste ovi mikroorganizmi jer je njihova virulencija, otpornost prema antimikrobnim sredstvima kao i visoka prevalencija u slučajevima neuspjelih endodontskih zahvata izrazito velika.

Prema Molanderu i sur. (158) te Lui i sur. (159) *E. faecalis* kao predstavnik je gram-pozitivnih bakterija najčešće je izolirani mikroorganizam kod zubi s neuspješnim endodontskim tretmanom. Ima sposobnost invazije dentinskih tubulusa, istmusa i ostalih ramifikacija u endodontskom prostoru zuba (160). Također, prema istraživanju Bystroma i sur. (161), posjeduje sposobnost preživljavanja u surovim uvjetima i okolišu kao što su otopine zasićene solima i pri visokoj vrijednosti pH. Do sličnih saznanja su došli Portenier i sur. (155) u svojim istraživanjima. Obzirom na prethodno navedene rezultate prihvaćen je kao mikroorganizam koji služi kao model za istraživanje perzistentnih endodontskih infekcija.

*P. aeruginosa* predstavnik je gram- negativnih bakterija i najotporniji je među uobičajenim gram- negativnim patogenima. Uzrokuje otporne endodontske infekcije (162). U dosadašnjim istraživanjima  $\text{Ca(OH)}_2$  sam i u kombinaciji s jodid kalij jodinom (IKI) nije bio sposoban uništiti ovu bakteriju (163, 164), dok su u istraživanjima Ashrafa i sur. (165) 0,5%-tni NaOCl i 2%-tni CHX uspjeli eliminirati određeni broj ovih mikroorganizama.

*C. albicans* najčešće je izolirana gljiva u korijenskom kanalu zuba i ima značajnu ulogu u patogenezi neuspjeha endodontskih zahvata. Uz to je i jedan od najotpornijih mikroorganizama na fizikalno-kemijske postupke obrade korijenskih kanala i teško ju je iskorijeniti. Pleomorfni je mikroorganizam čiji varijabilni oblici rasta mogu rezultirati različitim oblicima kao što su blastospore ili klamidospore (166). Preobrazba *C. albicans* iz komenzalnog u patogeni oblik ovisi o minimalnim promjenama u okolišu što rezultira ispoljavanjem različitih patogenih karakteristika kao što su adhezija, formiranje hifa, sekrecija, proteinaza i promjena fenotipa. Prema istraživanjima Bodrumlu i sur. (167) tetraciklini i NaOCl nisu imali uspjeha u eliminaciji ovih gljiva iz endodontskog prostora.

Iz dobivenih rezultata ove studije dalo se zaključiti da je 0,2%-tni PHMB učinkovit u antimikrobnom djelovanju na navedene mikroorganizme. U slučaju *E. faecalis* djelovanje je bilo slično djelovanju 2,5%-tnog NaOCl-a. Na *P. aeruginosa* i *C. albicans* djelovao je značajno bolje od NaOCl-a.

Obzirom da su planktonske stanice osjetljivije na djelovanje antimikrobnih sredstava, u drugom dijelu istraživanja ispitivao se učinak 0,2%-tnog PHMB-a i 2,5%-tnog NaOCl-a na zreli biofilm kojeg je činila miješana kultura *E. faecalis*, *S. epidermidis* i *C. albicans*. U takvoj kulturi uzorci su držani 4 tjedna kako bi se omogućilo stvaranje zrelog biofilma u korijenskim kanalima zubi. Istraživanje de Lucena i sur. (74) pokazalo je da je to dovoljno vremena kako bi mikroorganizmi mogli prodrijeti unutar dentinskih tubulusa do dubine od 300 µm.

*S. epidermidis* je gram-pozitivni kok koji je do nedavno bio zanemarivan kao mogući patogen u korijenskom kanalu zuba budući da se smatralo da je njegovo prisustvo u uzorcima iz korijenskih kanala posljedica kontaminacije s kože. Posljednja istraživanja Niazia i sur. (23) potvrdila su prisutnost *S. epidermidis* u endodontskim infekcijama i povezala s refraktornim endodontskim infekcijama s abscesima u kliničkoj slici. To je bio razlog uvrštavanja *S. epidermidis* u miješanu kulturu u kojoj su se držali uzorci.

PHMB po svom kemijskom sastavu spada u skupinu bigvanida. U istu skupinu spada i klorheksidin (CHX), antiseptik koji je dugo vremena u uporabi kao oralni antiseptik osobito kod parodontološki kompromitiranih pacijenata. CHX u koncentraciji od 0,12% i 0,2% uspješno djeluje i na suzbijanje i odstranjenje zubnog biofilma (168, 169). Osim toga 0,2%-tni CHX koristi se i u irigaciji korijenskih kanala budući da je pokazao djelovanje na mikroorganizme na koje NaOCl djeluje slabije (*Streptococcus spp.*) (170). Može se koristiti ga kao sredstvo za ispiranje korijenskih kanala u situacijama kada je utvrđena alergija na NaOCl (171).

Obzirom da PHMB spada u istu kemijsku skupinu, a mogao bi imati neke prednosti pred CHX, u ovom istraživanju je uspoređen antibakterijski učinak 0,2%-tnog PHMB-a s onim 0,2%-tnog CHX-a na navedene mikroorganizme.

U uzorcima "A", nakon 4 tjedna inkubacije u bujonu kod svih 30 uzoraka nalazilo se  $10^3$  ili  $10^4$  *E. faecalis*. Nakon irigacije PHMB-om, u uzorku "B" došlo je do potpunog izostanka rasta mikroorganizama na CCS agaru, odnosno korijenski kanali su nakon tretmana bili sterilni, dakle PHMB se pokazao odličnim u djelovanju na *E. faecalis*. Pri tumačenju rezultata

treba uzeti u obzir činjenicu da je upravo taj mikroorganizam sposoban preživjeti djelovanje brojnih antimikrobnih tvari zbog svoje veličine, sposobnosti vezanja za kolagena vlakna i sposobnosti dubokog prodiranja u dentinske tubuluse. U istraživanjima Evansa i sur. (171), Haapasala i sur. (4) te Porteniera i sur. (173) *E. faecalis* je pokazao otpornost na antimikrobno djelovanje  $\text{Ca(OH)}_2$  i CHX. Radovi Kayaoglu i sur. (32) te Chivatxaranukul i sur. (31) su pokazali da je *E. faecalis* otporan na djelovanje antimikrobnih sredstava zbog sposobnosti vezanja za dentin i to za kolagena vlakna i hidroksilapatit (HA). Uz potrebna dodatna klinička istraživanja, rezultati ovog rada ukazuju na mogućnost korištenja PHMB-a kao sredstva za ispiranje korijenskih kanala obzirom na njegovu sposobnost uklanjanja *E. faecalis* iz endodontskog prostora.

Nakon ispiranja uzoraka 2,5%-tnim NaOCl-om također je došlo do potpunog uklanjanja *E. faecalis* iz korijenskih kanala što je u suprotnosti sa radovima Porteniera i sur. (173) te Liu i sur. (153) u kojima se pokazalo da je *E. faecalis* u svom stadiju bez dotoka nutrijenata otporan na djelovanje  $\text{Ca(OH)}_2$ , CHX-a i NaOCl-a. I Liu i sur. također navode sposobnost *E. faecalis* da stvara voluminozni biofilm unutar korijenskog kanala koji je otporan na djelovanje NaOCl-a.

U ovom istraživanju u oba slučaja, nezrelog i zrelog biofilma, *E. faecalis* je bio izrazito osjetljiv na djelovanje i NaOCl-a i PHMB-a unatoč njegovoj sposobnosti vezivanja za kolagen i HA te dovoljnom vremenskom period od četiri tjedna za kolonizaciju dentinskih tubulusa. Štoviše, došlo je do potpunog uklanjanja *E. faecalis*-a, tj. kanali su bili sterilni.

Za razliku od uzoraka ispiranih NaOCl-om i PHMB-om uzorci ispirani 0,2%-tnim CHX-om pokazali su drugačije rezultate. U većem broju uzoraka nakon ispiranja došlo je do djelomične redukcije *E. faecalis* i samo je dio uzoraka bio sterilan. Ovi su rezultati u suprotnosti s rezultatima istraživanja Oncag i sur. (174) i Vianna i sur. (98) u kojima se CHX pokazao superiornijim u odnosu na NaOCl u eliminaciji *E. faecalis*.

Nakon 4 tjedna inkubacije sa *S. epidermidis* u uzorcima "A" u prosjeku je bilo  $10^3$  mikroorganizama. Nakon tretmana 0,2%-tnim PHMB-om i 2,5%-tnim NaOCl-om, uzorci "B" bili su sterilni uz učinkovitost od 99,98% odnosno 99,99%. CHX u koncentraciji od 0,2% pokazao se slabijim u djelovanju na ovaj mikroorganizam

Rezultati ovog istraživanja su u skladu sa rezultatima Burgersa i sur. (175) i Pappena i sur. (176) koji su u svojim istraživanjima dokazali učinkovitost NaOCl-a na *S. epidermidis*.

Pappen i sur. navode da je NaOCl bio učinkovit ukoliko nije bio prisutan goveđi serum. U prisutnosti seruma antimikrobni učinak NaOCl-a je opadao. Ti rezultati djelomično objašnjavaju zašto je djelovanje NaOCl-a bolje u *ex vivo* nego u *in vivo* istraživanjima.

Za razliku od gore navedenih autora Leonardo i sur. (177) te Sagripanti i sur. (178) u svojim istraživanjima dobili su podatke prema kojima NaOCl nije pokazao antimikrobni učinak na *S.epidermidis*.

U ovom istraživanju CHX u koncentraciji od 0,2% pokazao se najlošijim izborom za eliminaciju *S. epidermidis*-a. Prema Burgersu i sur. (175), Hendersonu i sur. (179) te Brindleu i sur. (180) CHX nije pokazao antibakterijski učinak na ovu bakteriju. To se u potpunosti slaže s rezultatima ovog istraživanja. Međutim, Leonarda i sur. (175) su pokazali da je 2% CHX bio učinkovitiji u svom antimikrobnom djelovanju na *S.epidermidis* od drugih antiseptika uključujući i NaOCl. To se može objasniti 10 puta većom koncentracijom CHX u odnosu na ovo istraživanje.

*C. albicans* se u ovom dijelu istraživanja ponašala suprotno očekivanjima. Nakon 4 tjedna inkubacije od ukupno 50 uzoraka kultiviralo se većinom  $10^1$  mikroorganizama i to u samo 22 uzorka unutar korijenskih kanala

Suprotno ovim rezultatima Nakamura i sur. (181) nakon 28 dana inkubacije uspjeli su zadržati vijabilnost *C. albicans* što ovom istraživanju nakon 4 tjedna nije bio slučaj. To bi se moglo objasniti istraživanjima Sen i sur. (182) i Biswas i sur. (183) koji su pokazali da medij na kojem se *C. albicans* uzgaja kao i supstrat koji se dodaje mogu utjecati na rast te gljive. U skladu s tim je i zaključak Ning i sur. (184) koji tvrde da je *C. albicans* u bilo kojoj svojoj formi teško ukloniti iz dentinskih tubulusa i da je zbog toga teško uočiti metodom kultivacije ako se ne provodi ispravna tehnika uzimanja uzoraka iz korijenskih kanala. Tome mogu doprinijeti i kompetitivna svojstva ostalih mikroorganizama u polimikrobnom biofilmu. S time se slažu i istraživanja Sen i sur. (182) i Siqueire i sur. (185) prema kojima se *C. albicans* uspješno adherira za stijenke korijenskih kanala zubi te pokazuje razne morfološke oblike. Richardsa i sur. (186) te Chaieba i sur. (187) su usvojim istraživanjima dokazali da *C. albicans* može preživjeti u uvjetima nedostatak kisika i nutrijenata. Upravo takvi uvjeti vladaju u instrumentiranim i napunjenim korijenskim kanalima.

Rezultati ovog istraživanja kod zrelog biofilma su pokazali učinkovitost 0,2%-tnog PHMB-a na sva tri mikroorganizma.



U prvom dijelu našeg istraživanja uspjelo se u uzorcima "A" dobiti kolonije *C. albicans*. U tom vremenu pokazala se osjetljivom na 0,2%- tni PHMB.

2,5%-tni NaOCl se pokazao učinkovitim ali ne u tolikoj mjeri kao PHMB (nije bilo sterilnih kanala u uzorcima "B").

Tsang i sur. (188) objavili su da je *C.albicans* na gruboj neravnoj podlozi kao što je i dentin manje osjetljiva na djelovanje antifungalnih lijekova. Richardsa i sur. (186) te Chaieba i sur. (187) zaključuju da je unutar okoliša siromašnog sa hranjivim tvarima ponašanje i reakcija *C.albicans* na antimikrobne tvari potpuno drugačije nego inače.

Neka od mogućih objašnjenja su nedostatak nutrijenata potrebnih za preživljavanje *C. albicans* budući da se nalazila u bujonu s ostala dva mikroorganizma, natjecanje između bakterija i gljiva za mjesto adhezije, lučenje bakterijskih tvari (organske kiseline, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) koje inhibiraju rast gljiva *C. albicans* (174).

U ovom istraživanju korištena su sva ti antimikrobna sredstva odvojeno. Pri tome je PHMB u koncentraciji od 0,2% pokazao sposobnost uklanjanja odabranih mikroorganizama karakterističnih za endodontski prostor zuba. 2,5% NaOCl pokazao je također dobra antimikrobna svojstva do je 0,2%-tni CHX je pokazao slabiji antimikrobni učinak na sve odabrane mikroorganizme.

U dostupnoj literaturi često se predlaže uporaba dvaju različitih antimikrobnih sredstava koji u kombinaciji pokazuju bolji učinak nego svaki zasebno. Tako Nakamura i sur. (181) navode da je 1%-tni NaOCl učinkovitiji u kombinaciji s limunskom kiselinom koja djeluje kao kelator. Torabinejad i sur. (189) te Hülsmann i sur. (190) smatraju da se uklanjanjem zaostatnog sloja povećava permeabilnost dentina za antimikrobna sredstva i time im omogućujuće dublji prodor u dentin i djelovanje na veći broj bakterija i gljiva. Obzirom da CHX posjeduje dobra svojstva substantivnosti i rezidualnog antimikrobnog djelovanja Zamany i sur. (191) predlažu korištenje CHX u kombinaciji sa nekim drugim sredstvom za irigaciju korijenskih kanala. Da bi svojstvo rezidualnog antimikrobnog djelovanja došlo do izražaja potrebno je da CHX bude posljednje sredstva prije sušenja i punjenja korijenskih kanala (192). Međutim CHX boja zubna tkiva dok je PHMB bezbojan. Također se navode i alergijske reakcije na CHX dok takvih podataka za PHMB nema. Obzirom na navedeno buduća istraživanja bi trebalo usmjeriti na kombiniranu uporabu PHMB-a i NaOCl-a.

Da bi neko sredstvo bilo preporučljivo za uporabu u endodonciji, pored njegovog antimikrobnog djelovanja, potrebno je ispitati i njegov učinak na tkiva domaćina. U *in vitro* uvjetima jedan od najčešće korištenih testova je ispitivanje citotoksičnosti na različitim kulturama stanica. Ispitivanja na staničnim kulturama su puno pogodnija od ispitivanja na životinjama iz razloga što su uvjeti u kojima se kulture stanica razvijaju i razmnožavaju dobro kontrolirani te daju informacije o molekularnim mehanizmima unutar stanice. Obzirom na dokazano antimikrobno 0,2%-tnog PHMB-a na mikroorganizme unutar zrelog četverotjednog biofilma u ovom istraživanju, sljedeći korak je bio ispitivanje citotoksičnosti PHMB-a u usporedbi s NaOCl-om.

Citotoksičnost PHMB-a je ispitivana na staničnim kulturama fibroblasta kineskog hrčka V-79. Iako se za ispitivanja citotoksičnosti endodontskih materijala mogu koristiti stanice humanog (193-198) i životinjskog podrijetla (134,199,200), V-79 stanice odabrane su prvenstveno zbog svoje genomske stabilnosti i dostupnosti.

Za određivanje citotoksičnosti koristio se spektrofotometrijski test MTT test, brzi, precizni test s visokom reproducibilnosti (201).

Otopine su testirane u koncentracijama koje su bile djelotvorne u prvom dijelu istraživanja, dakle 0,2%-tni PHMB i 2,5%-tni NaOCl, te upola manje koncentracije, 0,1%-tni PHMB i 1,25%-tni NaOCl.

Odabrano kontaktno vrijeme odgovaralo je kliničkim uvjetima. Stanice su bile kratkotrajno isprane, dakle nekoliko sekundi ili je kontakt trajao 5 i 10 minuta.

Rezultati su pokazali da obje otopine u obje koncentracije djeluju citotoksično i nakon samog ispiranja stanica. Dulje vrijeme kontakta očekivano je dalo iste rezultate.

Navarro-Escobar i sur. (202) dobili su rezultate suprotne rezultatima ovog istraživanja. Kontakt mišjih fibroblasta s 2,5%-tnim NaOCl-om nije rezultirao staničnom smrću. Za PHMB u literaturi postoje oprečni rezultati. PHMB u 20%-tnoj koncentraciji nije imao citotoksičan učinak na stanične kulture primarnih humanih keratinocita i fibroblasta (203). Nasuprot tome u istraživanju Kalteisa i sur. (204) 0,2%-tni PHMB pokazao se toksičnim za stanice kineskog hrčka. Razlike u rezultatima ovih istraživanja mogle bi se objasniti različitim podrijetlom stanica, no veća je vjerojatnost da se radi o različitim eksperimentalnim uvjetima i korištenim metodama.

Nakon što je utvrđeno da su sve stanice mrtve, ispitan je tip stanične smrti koji je nastupio nakon kontakta stanica s PHMB-om i NaOCl-om. Rezultati su pokazali da je PHMB uzrokovao vrlo brzu nekrozu, dok je NaOCl doveo do apoptoze stanica i to nakon 24 sata.

Niže koncentracije NaOCl-a izazivaju zaustavljanje rasta stanica ili apoptozu, dok više koncentracije rezultiraju nekrozom stanica (205) što ukazuje da je njegova toksičnost ovisna o koncentraciji. U ovom istraživanju dobiveni su suprotni rezultati, odnosno NaOCl u obje koncentracije, bez obzira na vrijeme kontakta, uzrokovao je apoptozu.

Nekroza uslijed djelovanja PHMB-a na ispitivane stanice može se objasniti mehanizmom djelovanja ove otopine na membrane stanica. Naime, oštećenjem dolazi do istjecanja citoplazmatskog sadržaja i smrti stanice u nekrozi (206).

## **6.0. ZAKLJUČAK**

Rezultati ovog istraživanja ukazuju na sljedeće zaključke:

1. Poliheksametilen bigvanid (PHMB) u koncentraciji od 0,2% pokazao je jednako antimikrobno djelovanje na 48-satne monokulture *E. faecalis* i *P. aeruginosa* kao i 2,5%-tni natrijev hipoklorit (NaOCl).
2. PHMB u koncentraciji od 0,2% pokazao je statistički značajno bolje antimikrobno djelovanje na 48-satnu monokulturu *C. albicans* od 2,5%-tnog NaOCl-a.
3. PHMB u koncentraciji od 0,2% pokazao je jednako antimikrobno djelovanje na *E. faecalis* i *S. epidermidis* u četverotjednoj mješovitoj kulturi stanica kao i 2,5%-tni NaOCl.
4. Klorheksidin u koncentraciji od 0,2% pokazao je statistički značajno slabije djelovanje na *E. faecalis* i osobito na *S. epidermidis* od 0,2%-tnog PHMB-a i 2,5%-tnog NaOCl-a.
5. Gljiva *C. albicans* nije uspjela preživjeti u četverotjednoj mješovitoj kulturi mikroorganizama i nije bilo moguće odrediti učinak antimikrobnih otopina naovog uzročnika u zrelom plaku.
6. Oba ispitivana sredstva, PHMB i NaOCl, pokazala su citotoksičan učinak na fibroblaste kineskog hrčka V-79; PHMB je izazvao smrt stanica u nekrozi, a NaOCl je izazvao smrt stanica u apoptozi.

## **7.0. LITERATURA**

1. Eriksen HM. Endodontology- epidemiological considerations. *Dent Traumatol.* 1991;7(5) :189-95.
2. Miller W.D. An introduction to the study of the bacterio-pathology of the dental pulp. *Dent Cosmos.* 1894;36:505-8.
3. Kakekahi S, Stanley HR, Fitzgerald JR. The effects of surgical exposures of dental pulps of germ- free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.
4. . Siqueira JF Jr, Rocas IN. Treatment of Endodontic Infections:The Infection. In: Siqueira JF Jr. *Treatment of Endodontic Infections.* Berlin:Quintessence Publishing; 2011.
5. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod.* 2008;34(11):1291-301.
6. Haapasalo M, Unni E, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Topics.* 2005;10:77-102.
7. Gutarts R, Nusstein J, Reader A, Beck M. In vivo debridement efficacy of ultrasonic irrigation following hand rotary instrumentation in human mandibular molars. *J Endod.* 2005;31(3):166-70.
8. Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M.The in vivo evaluation of hand/ rotary/ ultrasound instrumentation in necrotic, human, mandibular molar. *J Endod.* 2007;33(7):782-7.
9. Torabinejad M Khadein AA, Babagoli J et al. A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29(3):170-5.
10. Dai L, Khechen K, Khan S et al. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod.* 2011;37(1):80-4.
11. Vertucci FJ. Root canal morphology and its relationship to endodontic procedures. *Endod Topics.* 2005;10:3-29.
12. American Association of Endodontists. *Glossary of Endodontic Terms*, 7<sup>th</sup> ed. American Association of Endodontists, Chicago, IL, 2003:9
13. Cutright DE, Bhaskar SN. Pulpal Vasculature as demonstrated by a new method. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1969;27(5):678–83.
14. Ingle JJ, Bakland LK. *Endodontics*, 5<sup>th</sup> ed. Hamilton, London: BC Decker Inc; 2002.
15. Green D. Morphology of the pulp cavity of permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1955;8(7):743-59.

16. Green D. Stereomicroscopic study of 700 root apices of maxillary and mandibular posterior teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1960;13:728-33.
17. Smulson MH, Hagen JC, Ellenz SJ. Pulpo-periapical pathology and immunologic considerations. In: *Endodontic Therapy*, 5<sup>th</sup> ed. St Louis: Mosby-Yearbook Inc.; 1996.
18. Paiva SSM, Siqueira JF Jr, Roças IN, Carmo FL, Leite DCA, Ferreira DC et al. Clinical antimicrobial efficacy of NiTi rotary instrumentation with NaOCl irrigation, final rinse with chlorhexidine and interappointment medication: a molecular study. *Int Endod J.* 2013;46(3):225-33.
19. Byström A, Haponen RP, Sjögren U, Sundquist G. Healing of periapical lesions of pulpless teeth after endodontic treatment with controlled asepsis. *Endod Dent Traumatol.* 1987;3(2):58-63.
20. Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp.* 8<sup>th</sup> ed. St.Louis: Mosby; 2002.
21. Dunlap CL, Barker BF. Giant cell hyalin angiopathy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1977;44(4):587-91.
22. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbiologic annalysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1998;85(1):86-93.
23. Niazi SA, Clarke D, Do T, Gilbert SC, Mannocci F, Beighton D. *Propionibacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis* isolated from refractory endodontic lesions are opportunistic pathogens. *J Clin Microb.* 2010;48(11):3859-69.
24. Nilsson M, Frykberg L, Flock JI, Pei L, Lindberg M, Guss B. A fibrinogen- binding protein of *Staphylococcus epidermidis*. *Infect Immun.* 1998;66(6):2666-73.
25. Clewell DB. Bacterial sex pheromone- induced plasmid transfer. *Cell.* 1993;73(1):9-12.
26. Wirth R. The sex- pheromone system of *Enterococcus faecalis*. More than just plasmid- collection mechanism. *Eur J Biochem.* 1994;222(2):235-46.
27. Dunny GM. Genetics functions and cell-cell interactions in the pheromone-inducible plasmid transfer system of *Enterococcus faecalis*. *Mol Microbiol.* 1990;4(5):689-96.
28. Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997;30(2):91-5.
29. George S, Kishen A, Song KP. The role of enviromental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod.* 2005;31(12):867-72.



30. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. J Endod. 2006;32(2):93-8.
31. Haapasalo M, Ørstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. J Dent Res. 1987;66(8):1375-9.
32. Chivatxaranukul P, Dashper SG, Messer HH. Dentinal tubule invasion and adherence by *Enterococcus faecalis*. Int Endod J. 2008;41(10):873-82.
33. Kayaoglu G, Erten H, Orstavik D. Possible role of the adhesin ace and collagen adherence in conveying resistance to disinfectants on *Enterococcus faecalis*. Oral Microb Immun. 2008;23(6):449-54.
34. McHugh CP, Zhang P, Michalek S, Eleazer PD. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. J Endod. 2004;30(4):218-9.
35. van Winkelhoff AJ, van Steenberghe TJ, de Graaff J. Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis: its role in endodontal infections. J Endod. 1992;18(9):431-4.
36. Hafström C, Dahlén G. Pathogenicity of Prevotella intermedia and Prevotella nigrescens isolates in a wound chamber model in rabbits. Oral Microbiol Immunol. 1997;12(3):148-54.
37. Castellarin M, Warren RL, Freeman JD, Dreolini L, Krzywinski M, Strauss J et al. Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012;22(2):299-306.
38. Brailsford SR, Tregaskis RB, Leftwich HS, Bighton D. The predominant Actinomyces spp. isolated from infected dentin of active root caries lesions. J Dent Res. 1999;78(9):1525-34.
39. Chávez de Paz LE, Molander A, Dahlén G. Gram-positive rods prevailing in teeth with apical periodontitis undergoing root canal treatment. Int Endod J. 2004;37(9):579-87.
40. Soll DR. Candida commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. Acta Trop. 2002;81(2):101-10.
41. Marsh P, Martin MV. Oral microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Oxford ( England): Wright;1999.
42. Odds FC. Candida and candidosis- a review and bibliography. 2<sup>nd</sup> ed. London. Bailliere Tindall- W.B. Saunders.
43. Arendorf TM, Walker DM. The prevalence of and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man. Arch Oral Biol. 1980;25(1):1-10.
44. Dupont B, Graybill JR, Armstrong D, Laroche R, Touze JE, Wheat LJ. Fungal infections in AIDS patients. J Med Vet Mycol. 1992;30( Suppl 1):19-28.

45. Jacob BS, Flaitz CM, Nichols CM, Hicks MJ. Role of dentinal carious lesions in the pathogenesis of oral candidiasis in HIV infection. *J Am Dent Assoc.* 1998;129(2):187-94.
46. Hodson JJ, Craig GT. The incidence of *Candida albicans* in the plaque of teeth of children. *Dent Pract Dent Rec.* 1972;22(8):296-301.
47. Lynch E, Beighton D. A comparison of primary root caries lesions classified according to colour. *Caries Res.* 1994;28(4):233-9.
48. Slots J, Rams TE, Listgarten MA. Yeasts, enteric rods and pseudomonas in the subgingival flora of severe adult periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1988;3(2):47-52.
49. Reynaud AH, Nygaard- Ostby B, Boygard GK, Eribe ER, Olsen I, Gjermo P. Yeasts in periodontal pockets. *J Clin Periodontol.* 2001;28(9):860-4.
50. Chaffin WL, Lopez- Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998; 62(1):130-80.
51. Richar LM, Nobile CJ, Bruno VM, Mitchell AP. *Candida albicans* Biofilm-Defective Mutants. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(8): 1493–1502.
52. Khan Z, Ahmad S, Chandy R, Joseph L. A simple xylose-based agar medium for the differentiation of *Candida dubliniensis* and *Candida albicans*. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2012 ;72(3):285-7.
53. Hagihara Y, Kaminishi H, Cho T, Tanaka M, Kaita H. Degradation of human dentine collagen by an enzyme produced by yeast *Candida albicans*. *Arch Oral Biol.* 1988;33(8):617-9.
54. Kumamoto CA. *Candida* biofilms. *Curr Opin Microbiol.* 2002;5(6):608-11.
55. Turk T, Ates M, Sen BH. The effect of treatment of radicular dentin on colonization patterns of *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(3):457-62.
56. Ferrari PHP, Cai S, Bombana AC. Effects of endodontic procedures on Enterococci, enteric bacteria and yeasts in primary endodontic infections. *Int Endod J.* 2005;38(6):372-8.
57. Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(4):522-30.
58. Ning J, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H et al. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. *Int Endod J.* 2013;46(1):62-70.

59. Rosa EA, Rached RN, Ignacio SA et al. Phenotypic evaluation of the effect of anaerobiosis on some virulence attributes of *Candida albicans*. J Med Microbiology. 2008;57(Pt 10):1277- 81.
60. Waltimo TM, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro yeast infection of human dentin. J Endod. 2000;26(4):207-9.
61. Ljungh A, Wadstrom T. Growth conditions influence expression of cell surface hydrophobic of staphylococci and other wound infection pathogens. Microb Immunol. 1995;39(10):753-7.
62. Sen BH, Safavi KE, Spangerg LS. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1997;84(1):68-73.
63. Siqueira JF Jr, Sen BH. Funghi in endodontic infections. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2004;97(5):632-41.
64. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa*- a phenomenon of bacterial resistance. J Med Microbiol. 2009;58(Pt 9):1133-48.
65. Trautmann M, Lepper PM, Haller M. Ecology of *Pseudomonas aeruginosa* in the intensive care unit and the evolving role of water outlets as a reservoir of the organisms. Am J Infect Control. 2005;33(5 Suppl 1):41-9.
66. Sadikot RT, Blackwell TS, Christman JW, Prince AS. Pathogen- host interactions in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. Am J Resp Crit Care Med. 2005;171(11):1209-33.
67. Juhas M, Eberl L, Tummler B. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. Environ Microbiol. 2005;7(4):459-71.
68. Munson MA, Pitt- Ford T, Chong B, Weightman A, Wade WG. Molecular and cultural analysis of the microflora associated with endodontic infections. J Dent Res. 2002;81(11):761-66.
69. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. Oral Microbiol Immunol. 2006;21(2):112-22.
70. Machado de Oliviera JC, Siqueira JF Jr, Rocas IN et al. Bacterial community profiles of endodontic abscesses from Brazilian and USA subjects as compared by denaturing gradient gel electrophoresis analysis. Oral Microbiol Immunol. 2007;22(1):14-8.

71. Machado de Oliveira JC, Gama TG, Siqueira JF Jr et al. On the use of denaturing gradient gel electrophoresis analysis approach for bacterial identification in endodontic infections. *Clin Oral Investig.* 2007;11(2):127-32.
72. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Debelian G, et al. Profiling of root canal bacterial communities associated with chronic apical periodontitis from Brazilian and Norwegian subjects. *J Endod.* 2008;34(12):1457-61.
73. Alves FR, Siqueira JF Jr, Carmo FL, et al. Bacterial community profiling of cryogenically ground samples from the apical and coronal root segments of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2009;35(4):486-92.
74. Costerton JW. *The biofilm primer.* Berlin, Heidelberg: Springer- Verlag, 2007.
75. Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15(2):167-93.
76. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.* 2002;56:187-209.
77. Socransky SS, Haffajee AD. Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2002;28:12-55.
78. Purevdorj B, Costerton JW, Stoodley P. Influence of hydrodynamics and cell signaling on the structure and behavior of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 2002;68(9):4457-64.
79. Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin- Scott HM. Influence of hydrodynamics and nutrients on biofilm structure. *J Appl Microbiol.* 1999;85(Suppl 1):19-28.
80. Brook I. Encapsulated anaerobic bacteria in synergistic infections. *Microbiol Rev.* 1986;50(4):452-57.
81. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J.* 2007;18(4):267-80.
82. Fukurawa S, Kuchma SL, O'Toole GA. Keeping their options open: acute versus persistent infections. *J Bacteriol.* 2006;188(4):1211-17.
83. Hall- Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004;2(2):95-108.
84. Chan Y, Chan CH. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria from odontogenic infections in Taiwan. *J Microbiol Immunol Infect.* 2003;36(2):105-10.
85. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial etiology. *Periodontol.* 2005;38:135-87.

86. Thurlow LR, Hanke ML, Fritz T, Angle A, Aldrich A, Williams SH, et al.. *Staphylococcus aureus* biofilm prevent macrophage phagocytosis and attenuate inflammation in vivo. *J Immunol.* 2011;186(11):6585-96.
87. Gunther F, Wabnitz GH, Stroh P, Prior B, Obst U, Samstag Y, et al. Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: Phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol Immunol.* 2009;46(8-9):1805-13.
88. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Treatment of Endodontic Infections: Controlling Endodontic Infection- an overview. In: Siqueira JF Jr. *Treatment of Endodontic Infections.* Berlin: Quintessence Publishing; 2011.
89. Gulabivala K, Patel B, Evans G, Yuan- Ling N. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Topics.* 2005;10:103-22.
90. Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed with high resolution computed tomography. *J Endod.* 2001;27(1):1-6.
91. Paque F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval- shaped root canals in mandibular molars using nickel- titanium rotary instruments: a micro- computed tomography study. *J Endod.* 2010;36(4):703-7.
92. Peters OA, Schonberger K, Laib A. Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro- computed tomography. *Int Endod J.* 2003;(4):221-230.
93. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am.* 2010;54(2):291-312.
94. Siqueira JF Jr, Magalhaes KM, Rocas IN. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/ camphorated paramonodhlorofenol paste as a intracanal dressing. *J Endod.* 2007;33(6):667-72.
95. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of NaOCl on vital tissue. *J Endod.* 1985;11(12):525-8.
96. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spano JCE, Marchesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.
97. Shuping GB, Orstavik D, Sigurdsson A, Trope M. Reduction of intracanal bacteria using nickel-titanium rotary instrumentation and various medications. *J Endod.* 2000;26(12):751-5.

98. Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97(1):79-84.
99. Carson KR, Goodell GG, McClanahan SB. Comparison of the microbial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens. *J Endod.* 2005;31(6):471-73.
100. Spångberg L, Engström B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg.* 1973;36(6):856-71.
101. Pashley EL, Birdsong NL, Bowman K, Pashley DH. Cytotoxic effects of sodium hypochlorite on vital tissue. *J Endod.* 1985;11(12):525-8.
102. Tanomaru Filho M, Leonardo MR, Silva LAB, Anibal EF, Faccioli LH. Inflammatory response to different endodontic irrigating solutions. *Int Endod J.* 2002;35(9):735-9.
103. Neal RG, Craig RG, Powers JM. Effect of sterilization and irrigants on the cutting abilities of stainless steel files. *J Endod.* 1983;9(3):93-6.
104. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod.* 1992;18(12):605-12.
105. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod.* 1989;15(5):224-6.
106. De Lucena JM, Decker EM, Walter C, Boeira LS, Löst C, Weiger R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod J.* 2013;46(1):53-61.
107. M. Zehnder, "Root canal irrigants." *J Endod.* 2006; 32(5):389–98.
108. Jaju S, Jaju PP. Newer root canal irrigants in horizon: a review. *Int J Dent.* 2011;2011: 851359.
109. Gomes BP, Ferraz CC, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2001;34(6):424-8.
110. Willenegger H. Lokale antiseptika in der chirurgie-eine Wiedergeburt? *Unfallchirurg.* 1994;20(2):94-110.
111. Willenegger H. Klinische erfahrungen mit einem neuen antiinfektivum. *Hyg Med.* 1994;19:227-33.

112. Gerli S, Rossetti D, DiRenzo GC. A new approach for the treatment of bacterial vaginosis: use of polyhexamethylene biguanide. A prospective, randomised study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2003;7(5):127-30.
113. Kramer A, Daeschlein G, Kammerlander G, Andriessen A, Aspöck C, Bergemann R, et al. Konsensusempfehlung zur Auswahl von Wirkstoffen für die Wundantiseptik. *Hyg Med.* 2004;5:147-57.
114. Ikeda T, Tazuke S, Watanabe M. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. Fluorescence depolarisation studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanides in the main chain. *Biochim Biophys Acta.* 1983; 735(3):380-6.
115. Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH. Interaction of polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1984; 769(1):57-66.
116. Ikeda T, Tazuke S, Bamford CH. Interaction of membrane active biguanides with negatively charged species. A model of their interaction with target sites in microbial membranes. *J Chem Res.* 1985;6:180-1.
117. Promega Corporation 2006. *Protocols and Applications Guide. Cell Viability* 81. Promega Corporation 2007. *Protocols and Applications Guide. Apoptosis.*
118. Peters OA. Research that matters- biocompatibility and cytotoxicity screening. *Int Endod J.* 2013;46(3):195-97.
119. Riss TL, Moravec RA. Use of multiple assay endpoints to investigate the effects of incubation time, dose of toxin and plating density in cell-based cytotoxicity assays. *Assay Drug Dev Technol.* 2004;2(1):51-62.
120. Wu MK, Dummer PMH, Wesselink PR. Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J.* 2006;39(5):343-56.
121. Camara AC, de Albuquerque MM, Aguiar CM, de Barros Corela AC. In vitro antimicrobial activity of 0.5%, 1% and 2.5% sodium hypochlorite in root canals instrumented with ProTaper Universal system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):55-61.
122. Goldman M, Goldman LB, Kronman JH, Lin PS. The efficacy of several irrigating solutions for endodontics: a scanning electron microscopy study. *Oral Surg.* 1981;52(2):197-204.
123. Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34(5):399-405.

124. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Dent Clin North America*. 2010;54(2):291-312.
125. Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *J Endod*. 1991;17(11):573-4.
126. Dartar Oztan M, Akman AA, Zaimoglu L, Bilgiç S. Corrosion rates of stainless-steel files in different irrigating solutions. *Int Endod J*. 2002; 35(8): 655-59.
127. Kaufman AY, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod*. 1989; 15(5): 224-26.
128. Elsztein C, de Menezes JAS, de Morais MA Jr. Polyhexamethyl biguanide can eliminate contaminant yeasts from fuel- ethanol fermentation process. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2008;35(9):967-73.
129. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod*. 2006; 32(5):389-98.
130. Gutierrez JH, Guzman M. Tooth discoloration in endodontic procedures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968;26(5):706-11.
131. Akisue E, Tomita VS, Gavini G, Poli de Figueiredo JA. Effect of the combination of sodium hypochlorite and chlorhexidine on dentinal permeability and scanning electron microscopy precipitate observation. *J Endod*. 2010;36(5):847-50.
132. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconat. *J Endod*. 2007;33(8):966-9.
133. Torabinejad M, Cho Y, Khademi AA, Bakland LK, Shabahang S. The effect of various concentrations of sodium hypochlorite on the ability of MTAD to remove the smear layer. *J Endod*. 2003;29(4):233-9.
134. Messick CR, Pendland SL, Moshirfar M, Fiscella RG, Losnedahl KJ, Schriever CA, Schreckenberger PC. In- vitro activity of polyhexamethylen biguanide (PHMB) against fungal isolates associated with infective keratitis. *J Antimicrob Chemother*. 1999;44(2):297-8.
135. Liu N, Khong D, Chung SK, Hwang DG. In vitro susceptibility of ocular bacteria and fungal pathogens to polyhexamethylene biguanide. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37:4058.
136. Larkin DFP, Kilvington S, Dart JKG. Treatment of *Acanthamoeba keratitis* with polyhexamethylene biguanide. *J Ophthalmol*. 1992;99(2):185-91.
137. Donoso R, Mura JJ, Lopez M. *Acanthamoeba keratitis* treated with propamidine and polyhexamethylene biguanide ( PHMB). *Rev Med Chil*. 2002;130(4):396-401.



138. Narasimhan S, Madhavan HN, Therese LK. Development and application of an in vitro susceptibility test for *Acanthamoeba species* isolated from keratitis to polyhexamethylene biguanide and chlorohexidine. *Cornea*. 2002;21(2):203-5.
139. Schnuch A, Geier J, Uter W. The biocide polyhexamethylene biguanide remains a noncommon contact allergen. *Contact Dermatitis*. 2007;56(4):235-59.
140. Gilliver S. PHMB: a well-tolerated antiseptic with no reported toxic effects. *J Wound Care*. 2009; *Activa Health care Suppl*:9-14.
141. Rosin M, Welk A, Kochert T, Majic Toot A, Kramer A, Pitten FA. The effect of a PHMB mouthrinse compared to an essential oil rinse and CHX rinse on bacterial count and 4 day plaque regrowth. *J Clin Periodol*. 2002;29(5):392-9.
142. Welk A, Splieth CH, Schmidt-Martens G, Schwahn CH, Kocher T, Kramer A, Rosin M. The effect of a PHMB mouthrinse and CHX rinse on bacterial counts and 4-day plaque re-growth. *J Clin Periodol*. 2005;35(2):499-505.
143. Yanai R, Ueda K, Nishida T, Toyohara M, Mori O. Effects of ionic and surfactant agents on the antimicrobial activity of polyhexamethylene biguanide. *Eye Contact Lens*. 2011;37(2): 85-9.
144. Elzinga G, Van Doorn J, Wiersema AM, Kucus RJ, Andriessen A, Ablass JG, Spits H, Post A, VanGent M. Clinical evaluation of a PHMB-impregnated biocellulose dressing on pediatric lacerations. *J Wound Care*. 2011;20(6):280-4.
145. Sibbald RG, Coutts P, Woo KY. Reduction of the bacterial burden and pain in chronic wounds using new PHMB antimicrobial foam dressing- clinical trial results. *Adv Skin Wound Care*. 2011;24(2):78-84.
146. Akpata ES, Blechman H. Bacterial invasion of pulpal dentinal wall in vitro. *J Dent Research*. 1982;61(2):435-8.
147. Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains into root dentine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1993;76(1):97-103.
148. Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Löst C. Vitality status of microorganisms in infected human root dentin. *Int Endod J*. 2002;35(2):166-71.
149. Tandjung L, Waltimo T, Hauser I, Heide P, Decker EM, Weiger R. Octenidine in root canal and dentine disinfection ex vivo. *Int Endod J*. 2007;40(11):845-51.
150. Bucker R, Eleazer PD, Staat RH. In vitro disinfection of dentinal tubules by various endodontic irrigants. *J Endod*. 1999;25(12):786-8.

151. Komorovski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine- treated bovine root dentine. *J Endod.* 2000;26(6):315-7.
152. Siqueira JF Jr, Machado AG, Silveira RM, Lopes HP, de Uzeda M. Evaluation of the effectiveness of sodium hypochlorite used with three irrigation methods in the elimination of *Enterococcus faecalis* from the root canal, in vitro. *Int Endod J.* 1997;30(4):279-82.
153. Liu H, Wei X, Ling J, Wang W, Huang X. Biofilm formation capability of *Enterococcus faecalis* cells in starvation phase and its susceptibility to sodium hypochlorite. *J Endod.* 2010;36(4):60-5.
154. Souza EB, Cai S, Simionato MR, Lage- Marquez JL. High- power diode laser in the disinfection in depth of the root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(1):68-72.
155. Portenier I, Waltimo TMT, Haapasalo M. *E.faecalis*- the root canal survivor and „star“ in post treatment disease. *Endod Top.* 2003;6:135-59.
156. Foley I, Gilbert P. In vitro studies of the activity of glycopeptide combination against *E.faecalis* biofilm. *J Antimicrob Chemother.* 1997;40(5):667-72.
157. Sauer K, Camper AK, Ehrlich GH, Costerton JW, Davies DG. *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol.* 2002;184(4):1140-54.
158. Molander A, Lunquist P, Papapanou PN, Dahlen G, Reit C. A protocol for polymerase chain reaction detection of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from the root canal. *Int Endod J.* 2002;35(1):1-6.
159. Lui JN, Lim V, Song KP, Chen NN. In vitro antimicrobial effect of chlorhexidine-impregnated guttapercha points on *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J.* 2004;37(2):105-13.
160. Love RM. *Enterococcus faecalis*- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001;34(5):399-405.
161. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol.* 1985;1(5):170-5.
162. Ranta K, Haapasalo M, Ranta H. Monoinfection of root canal with *Pseudomonas aeruginosa*. *Dent Traum.* 1988;4(6):269-72.
163. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In vitro determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endod.* 1998;24(1):15-17.

164. Pallotta RC, Ribeiro MS, de Lima Machado ME. Determination of the minimum inhibitory concentration of four medicaments used as intracanal medication. *Aust Endod J.* 2007; 33(3):107-11.
165. Ashraf H, Samiee M, Eslami G, Reza M, Hosseini G. Presence of *Candida albicans* in root canal system of teeth requiring endodontic retreatment with and without periapical lesions. *Int End J.* 2007;2(1):24-8.
166. Hannula J, Saarela M, Alaluusa S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and United States. *Oral Microbiol Immunol.* 1997;12(6):358-65.
167. Bodrumlu E, Alaçam T, Semiz M. The antimicrobial and antifungal efficacy of tetracycline- integrated gutta- percha. *Indian J Dent.* 2008;19(2):112-5.
168. Slots J, Rams TE, Schonfeld SE. In vitro activity of chlorhexidine against enteric rods, pseudomonas and acinetobacter from human periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 1991;6(1):62-4.
169. Lorenz K, Bruhn G, Heumann C, Netuschil L, Brex M, Hoffmann T. Effect of two chlorhexidine mouthrinses on the development of dental plaque, gingivitis, and discoloration. A randomized, investigator- blind, placebo- controlled, 3-week experimental gingivitis study. *J Clin Periodontol.* 2006;33(8):561-7.
170. Roças IN, Siquiera JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod.* 2011;37(2):143-50.
171. Kaufman AJ, Keila S. Hypersensitivity to sodium hypochlorite. *J Endod.* 1989; 15(5):224-6.
172. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanism involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002;35(3):221-8.
173. Portenier I, Waltimo T, Orstavik D, Haapasalo M. Killing of *Enterococcus faecalis* by MTAD and chlorhexidine digluconate with or without cetrimide in the presence or absence of dentine powder or BSA. *J Endod.* 2006;32(2):138-41.
174. Onçağ O, Hoşgör M, Hilmioğlu S, Zekioğlu O, Eronat C, Burhanoğlu D. Comparison of antibacterials and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J.* 2003; 36(6):423-32.
175. Burgers R, Wittey C, Hahnel S, Gosan M. The effect of various topical peri-implantitis antiseptics on *Staphylococcus epidermidis*, *Candida albicans* and *Streptococcus sanguinis*. *Arch Oral Biol.* 2012;57(7):940-7.

176. Pappen FG, Qian W, Aleksejuniene S, Leonardo Rde T, Leonardo MR, Haapasalo M. Inhibition of sodium hypochlorite antimicrobial activity in the presence of bovine serum albumin. *J Endod.* 2010;36(2):268-71.
177. Leonardo MR, da Silva LA, Filho MT, Bonifacio KC, Ito IY. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of castor oil- based irrigant. *J Endod.* 2001;27(12):717-9.
178. Sagripanti JL, Eklund CA, Trost PA, Jinneman KC, Abeyta C Jr, Kaysner CA et al. Comparative sensivity of 13 species of pathogenic bacteria to seven chemical germicides. *Am J Infect Control.* 1997;25(4):335-9.
179. Henderson E, Schneider S, Petersen FC, Hangen HJ, Wohlfahrt JC, Ekstrand K et al. Chemical debridement of contaminated titanium surfaces: An in vitro study. *Acta Odontol Scand.* 2012;71(3-4):957-64.
180. Brindle ER, Miller DA, Stewart PS. Hydrodynamic deformation and removal of *Staphylococcus epidermidis* biofilm treated with urea, chlorhexidine, iron chloride or DispersinB. *Biotechnol Bioenerg.* 2011;108(12):2968-77.
181. Nakamura VC, Cai S, Caudeiro GTM, Ferari PH, Caldeira CL, Gavini G. *Ex vivo* evaluation of the effects of several root canal preparation techniques and irrigation regimens on a mixed microbial infection. *Int Endod J.* 2013;46(3):217-24
182. Sen BH, Safavi KE, Spangberg LSW. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1997;84(1):68-73
183. Biswas S, Van Dijck P, Datta A. Enviromental sensing and signal transduction pathways regulating morphopathogenic determinants of *Candida albicans*. *Microbiol Mol Biol Rewiev.* 2007;71(2):348-76.
184. Ning Y, Hu X, Ling J, Du Y, Liu J, Liu H et al. *Candida albicans* survival and biofilm formation under starvation conditions. *Int Endod J.* 2013;46(1):62-70.
185. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod.* 2002;28(11):770-73.
186. Richards R, Davies JK, Figdor D. Starvation survival and recovery in serum of *Candida albicans* compared with *Enterococcus faecalis*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(1):125-30.
187. Chaieb K, Kouidhi B, Zmantar T, Mahdouani K, Bakhrouf A. Starvation survival of *Candida albicans* in various water microcosms. *J Basic Microb.* 2011;51(4):357-63.
188. Tsang CS, Ng H, McMillan AC. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Investig.* 2007;11(4):31-8.

189. Torabinejad M, Handysides R, Khademi AA, Bakland LK. Clinical implications of the smear layer in endodontics: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(6):658-66.
190. Hulsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810-30.
191. Zamany A, Safavi K, Spangberg LS. The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;96(5):578-81.
192. Zhender M, Schmidlin P, Sener P, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod.* 2005;31(11):817-20.
193. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446-50.
194. Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod.* 2005;31(8):613-15.
195. Heling I, Rotstein I, Dinur T, Szwec- Levine Y, Steinberg D. Bactericidal and cytotoxic effects of sodium hypochlorite and sodium dichloroisocyanurate solutions *in vitro*. *J Endod.* 2001;27(4):278-80.
196. Hidalgo E, Bartolome R, Dominguez C. Cytotoxicity mechanism of sodium hypochlorite in cultured human dermal fibroblasts and its bactericidal effectiveness. *Chem Biol Interact.* 2002;139(3):265-82.
197. Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F, et al. Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics *in vitro*. *J Surg Res.* 2010;164(2):344-350.
198. Miletic I, Devcic N, Anic I, Borcic J, Karlovic Z, Osmak M. The cytotoxicity of RoekoSeal and AH Plus compared during different setting periods. *J Endod.* 2005;31(4):307-09.
199. Navarro-Escobar E, Gonzalez- Rodriguez MP, Ferer- Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 2010;15(1):90-4.
200. Miletic I, Jukic S, Anic I, Zeljezic D, Garaj-Vrhovac V, Osmak M. Examination of cytotoxicity and mutagenicity of AH26 and AH Plus sealers. *Int Endod J.* 2003;36(5):330-35.

201. Mickisch G, Fajta S, Keilhauer G, Schlike E, Tschada P, Alken P. Chemosensitivity testing of primary human renal cell carcinoma by a tetrazolium based microculture assay (MTT). *Urol Res.* 1990;18(2):131-36.
202. Navarro-Escobar E, Gonzalez- Rodriguez MP, Ferer- Luque CM. Cytotoxic effects of two acid solutions and 2.5% sodium hypochlorite used in endodontic therapy. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 2010;15(1):90-4.
203. Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F, et al. Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics *in vitro*. *J Surg Res.* 2010;164(2):344-30.
204. Kalteis T, Luring C, Schaumburger J, Perlick L, Bathis H, Grifka J. Tissue toxicity of antiseptics. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2003;141(2):233-38.
205. Vissers MC, Pullar JM, Hampton MB. Hypochlorous acid causes caspase activation and apoptosis or growth arrest in human endothelial cells. *Biochem J.* 1999;344:443-49.
206. Broxton P, Woodcock PM, Heatley F, Gilbert P. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol.* 1984;57(1):115-24.

## **8.0. ŽIVOTOPIS AUTORA S POPISOM OBJAVLJENIH RADOVA**

Ivana Medvedec Mikić rođena je 1981.god. u Splitu. Nakon završene Prve jezične gimnazije u Splitu 2000. god. upisuje Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu. Diplomirala je 2006. godine. Na 5. godini studija dobila je nagradu Stomatološkog fakulteta i tvrtke 3M ESPE za najboljeg studenta .

2009. god. zaposlila se na Studiju Dentalne medicine Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Splitu u zvanju asistent/ specijalizant. Iste godine započinje specijalistički staž iz Endodoncije i restaurativne stomatologije i paralelno upisuje i poslijediplomski doktorski studij "Dentalna medicina" na Stomatološkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Specijalistički ispit položila je u listopadu 2012.god.

Sudjeluje u nastavi iz kolegija Karijesologija, Restaurativna dentalna medicina, Endodoncija, Propedeutika u dentalnoj meicini te Dentalna medicina starije dobi.

Udana je i majka jednog djeteta.

### **Popis objavljenih radova:**

1. Medvedec Mikić I, Filipović Zore I, Fuchs Crčić V, Matijević J, Plančak D, Katunarić M, Buković D. Prevalence of third molars and pathological changes related to them in Dental Medicine. *Coll.Antropol.* 2013;37(3):877-84.

2.Tadin A, Marović D, Galić N, Milevoj A, Medvedec Mikić I, Želježić D. Genotoxic biomonitoring of flowable and non-flowable composite resins in peripheral blood leukocytes. *Acta Odontol Scand.* 2013;71(3-4):923-29.

### Ostali radovi u drugim časopisima

1.Medvedec Mikic I, Ladika Davidovic B, Matijevic J, Prpić-Mehičić G, Tadin A, Jukić Krmek S. A pilot- study of effects of Ecolostrum on salivary IgA. *Acta Stomatol Croat.* 2012;46(2):111-6.



2. Medvedec Mikić I, Tambić Andrašević A, Prpić- Mehičić G, Matijević J, Tadin A, Simeon P. The Effect of Polyhexamethylen Biguanide on Microorganisms in Root Canal. *Acta Stomatol Croat.* 2013;47(2):99-110.