

УНИВЕРЗИТЕТ У КРАГУЈЕВЦУ
ФАКУЛТЕТ МЕДИЦИНСКИХ НАУКА



Љиљана З. Бјеловић

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

Ментор: Проф. Др Татјана Кањевац

ДОКТОРСКА ДИСЕРТАЦИЈА

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

РЕЗИМЕ

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

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

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

и 2% CHX са 17% EDTA. Раствори су помешани у односу 1:1 и присуство *РСА* је испитивано танкослојном хроматографијом, нуклеарно магнетно резонантном спектроскопијом и инфрацрвеном спектроскопијом. **Резултати;** СЕМ анализом је показано формирање преципитата на површини дентина и у дентинским тубулима у свим терапијским групама, док у контролној групи преципитат није уочен. Највећа количина преципитата је забележена у CHX групи. Анализом података је показано да је количина преципитата у овој групи била значајно већа у односу на МТАД групу у коронарној ($p < 0,05$) односно QMiX групу у средњој трећини ($p < 0,05$). У апексној трећини, преципитат формиран у CHX групи био је значајно већи од оног у МТАД и QMiX групи ($p < 0,05$). Процент затворених дентинских тубула у CHX је био сличан као у EDTA+CHX групи, али се значајно разликовао од осталих група ($p < 0,05$). Пенетрација боје је била мања у свим трећинама у CHX групи у односу на контролу као и у односу на QMiX и МТАД групу ($p < 0,05$). ЕДС анализа преципитата у CHX групи је показала статистички значајно више хлора у поређењу са преципитатом формираним у другим групама ($p < 0,05$). Мешање 5,25% NaOCl и 2% CHX је било праћено стварањем браон преципитата; 5,25% NaOCl и QMiX наранџасто-браон, а мешање 2% CHX и 17% стварањем белог преципитата. Комбиновање 5,25% NaOCl са 17% EDTA је довело само до стварања мехурића. Резултати ове студије нису показали стварање *РСА* ни за једну од испитаних комбинација раствора. **Закључак;** Преципитат богат хлором се ствара много више на површини дентинског зида канала корена после иригације 5,25% NaOCl и финалне иригације 2% CHX него после иригације са NaOCl и EDTA + CHX, QMiX или МТАД, смањујући број отворених дентинских тубула и пермеабилност дентина у свим трећинама канала корена. Мешање NaOCl и CHX или QMiX и CHX са EDTA је резултирало стварањем талоба без *РСА*

Кључне речи: преципитат, дентински тубули, пермеабилност, *РСА*, СЕМ

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

SUMMARY

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

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

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

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

1. УВОД.....	7
1. ДЕНТИН.....	9
1.1. Састав.....	9
1.2. Структура.....	10
1.3. Дентински тубули.....	11
1.3.1. Течност дентинских тубула.....	12
1.3.2. Колонизација бактерија.....	13
2. ИРИГАНСИ.....	13
2.1. НАТРИЈУМ ХИПОХЛОРИТ.....	14
2.1.1. Хемијска структура и начин деловања.....	14
2.1.2. Антимикробни ефекат.....	14
2.1.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	15
2.1.4. Цитотоксичност.....	16
2.1.5. Способност продирања у дентинске тубуле.....	17
2.1.6. Деактивирање.....	17
2.2. ХЛОРХЕКСИДИН.....	18
2.2.1. Хемијска структура и начин деловања.....	18
2.2.2. Антимикробни ефекат.....	19
2.2.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	20
2.2.4. Цитотоксичност.....	20
2.2.5. Супстантивност.....	21
2.2.6. Способност продирања у дентинске тубуле.....	22
2.2.7. Деактивирање.....	22
2.3. ЕТИЛЕНДИАМИНТЕТРАСИРЋЕТНА КИСЕЛИНА.....	22
2.3.1. Хемијска структура и начин деловања.....	23
2.3.2. Антимикробни ефекат.....	23
2.3.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	24
2.3.4. Цитотоксичност.....	25
2.3.5. Способност продирања у дентинске тубуле.....	25
2.3.6. Деактивирање.....	26
2.4. КОМБИНАЦИЈЕ ИРИГАНАСА.....	26
2.4.1. ДЕТЕРЦЕНТИ.....	26
2.4.2. МТАД.....	27
2.4.2.1. Антимикробни ефекат.....	27
2.4.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	28
2.4.2.3. Цитотоксичност.....	28
2.4.2.4. Способност продирања у дентинске тубуле.....	28
2.4.2.5. Деактивирање.....	29
2.4.3. QMiX.....	29
2.4.3.1. Антимикробни ефекат.....	29
2.4.3.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива.....	29
2.4.3.3. Цитотоксичност.....	30
2.4.3.4. Способност продирања у дентинске тубуле.....	30
2.4.3.5. Деактивирање.....	31
3. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ИРИГАНАСА.....	31
3.1. NAOCl и CHX.....	31
3.1.1. Преципитат и детекција парахлоранилина (<i>para-chloroaniline</i>) (PCA).....	32
3.1.2. Хемијска структура PCA.....	33
3.1.3. Токсичност PCA и преципитата.....	34
3.1.4. Превенција.....	34

3.2. NaOCl и EDTA	35
3.2.1. Хемичка реакција.....	35
3.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива	35
3.2.3. Превенција.....	36
3.3. CHX и EDTA	36
3.3.1. Хемичка реакција.....	36
3.4. NaOCl и MTAD	37
3.5. NaOCl и QMIX	37
2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА.....	38
3. РАДНА ХИПОТЕЗА	39
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ	40
4.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ	40
4.2. ОДАБИР И ПРИПРЕМА УЗОРКА	40
4.2.1. Одабир узорка.....	40
4.2.2. Инструментација канала корена	42
4.3. СЕМ АНАЛИЗА УЗОРАКА.....	43
4.3.1. Припрема узорка.....	44
4.3.2. Одређивање количине преципитата на површини дентина канала корена	45
4.3.3. Одређивање броја потпуно затворених дентинских тубула канала корена.....	46
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ПЕРМЕАБИЛНОСТИ ДЕНТИНА	46
4.5. ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ПРЕЦИПИТАТА НА ПОВРШИНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА	47
4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ РСА У ПРЕЦИПИТАТУ	47
4.6.1. Хемикалије и растварачи.....	48
4.6.2. Комбиновање и мешање ириганаса	48
4.6.3. Одређивање РСА.....	48
4.6.3.1. TLC анализа.....	49
4.6.3.2. 1H-NMR анализа	49
4.6.3.3. IR анализа	49
4.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА	49
4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАКА.....	50
5. РЕЗУЛТАТИ.....	51
5.1. КОЛИЧИНА ПРЕЦИПИТАТА ФОРМИРАНОГ НА ПОВРШИНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА – СЕМ АНАЛИЗА .	51
5.2. ПРИСУСТВО ПРЕЦИПИТАТА УНУТАР ДЕНТИНСКИХ ТУБУЛА – СЕМ АНАЛИЗА	53
5.3. БРОЈ ЗАТВОРЕНИХ ДЕНТИНСКИХ ТУБУЛА КАНАЛА КОРЕНА – СЕМ АНАЛИЗА	53
5.4. УТИЦАЈ ПРЕЦИПИТАТА НА ПЕРМЕАБИЛНОСТ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА	54
5.5. ХЕМИЈСКИ САСТАВ ПРЕЦИПИТАТА ФОРМИРАНОГ НА ПОВРШИНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА– ЕДС АНАЛИЗА	56
5.6. ПРИСУСТВО РСА У САСТАВУ ПРЕЦИПИТАТА.....	60
5.6.1. Резултати TLC анализе	60
5.6.2. Резултати 1H NMR анализе.....	62
5.6.3. Резултати IR анализе	62
6. ДИСКУСИЈА.....	71
7. ЗАКЉУЧЦИ	83
8. ЛИТЕРАТУРА.....	85

1. УВОД

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

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

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

Познато је да раствори који се користе за иригацију у току ендодонтске терапије долазе у контакт један са другим унутар коренског канала (7, 17-20). Као последица њихових интеракција може доћи до стварања преципитата који имају клинички значај јер се тешко уклањају, а могу бити и потиснути у периапексне структуре (21). У највећем

броју *in vitro* истраживања показано је да мешањем NaOCl и CHX се ствара наранџасто-браон преципитат који може да узрокује промену боје зуба, оклузију дентинских тубула и смањење пермеабилности дентина (17, 20, 22, 23). Такође, према неким налазима преципитат садржи токсичну (24) и канцерогену супстанцу (25) познату као парахлоранилин (PCA). Уколико се CHX комбинује са EDTA долази до интеракције и стварања нетоксичног млечно белог преципитата (18) који смањује ефикасност EDTA раствора. Малобројна су истраживања о стварању преципитата између NaOCl и комбинованих раствора MTAD или QMiX. До данас постоји само једна студија (19) у којој је показано да комбинација резидуалног NaOCl и MTAD доводи до стварања жутог преципитата. Присуство преципитата у већим количинама на површини дентина може значајно да утиче на адхезију силера за коренски дентин, посебно силера на бази смола (26). Подаци о количини и хемијском саставу преципитата који се ствара у овим интеракцијама на дентинском зиду канала корена још увек недостају. Интеракција NaOCl са QMiX до сада је испитивана у неколико студија које су дале опречне резултате (20, 27). Док је у појединим истраживањима показано да се преципитат ствара на површини дентина (20), друга нису доказала присуство преципитата на површини дентина ни у дентинским тубулама након испирања канала NaOCl и QMiX (27). Његова количина у интеракцији између NaOCl и QMiX још увек није одређивана. Такође, пенетрација преципитата у дентинске тубуле после иригације NaOCl и финалне иригације CHX, EDTA + CHX, MTAD или QMiX још увек није разјашњена. Методе које се користе за анализу присуства PCA у преципитату су различите али показују и парадоксално различите исходе (20, 22, 27, 28).

Узимајући у обзир чињеницу да нежељене интеракције између различитих ириганаса и преципитат могу компромитовати ендодонтску терапију (15, 17-20), као и последице које овај токсични супстрат (PCA) има на опште здравље (7) и периапикално ткиво (21), наше истраживање је од битног клиничког значаја. Да би се установио клинички прихватљив начин уклањања преципитата у условима када се он ипак ствара, протокол иригације подлеже новом концепту у циљу превенције антагонистичких реакција и осим ефикасне, омогућавања безбедне иригације каналног система зуба.

1. ДЕНТИН

1.1. Састав

Дентин је васкуларно, минерализовано, витално ткиво ендодонцијума и чини највећи део зубне масе. Као високопермеабилно ткиво, чини минерализовану компоненту пулпо-дентинског комплекса са око 70% (по тежини) неорганичног материјала, углавном у облику калцијум хидроксипатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (29). Минерали и елементи који улазе у састав дентина, у нижим концентрацијама него у саставу глеђи, чине азот (2,42% - 3,64%), карбонати (2,99% - 3,25%) и цинк око 300 ppm (30, 31). Концентрација флуорида у саставу дентина је између 100-500 ppm и зависи од нивоа флуоризације подручја у којима одређени појединац живи или је узимао препарате флуора и да ли је дентин који се анализира предходно био кариозан (30, 31). Такође, дентин чини и 20% органског материјала, који укључује различите колагене и неколагене протеине, липиде, протеогликане и факторе раста (29). Колаген типа I чини 90% дентинског матрикса, док се колагени влакана тип III, V и VI налазе у траговима (32). Неколагени протеини, који чине око 10% матрикса, спадају у неколико категорија: фосфопротеини, остеокалцин, матрикс *GLA*-протеин, протеогликани, различити кисели гликопротеини и серумски протеини (31). Од фосфорпротеина у састав матрикса улазе фосфопротеин (*HP, MP, LP*) и дентин матрикс протеин 1 (*AG1*), док од гликопротеина налазимо дентин сијалопротеин, остеоонектин и остеоопонтин (33-35). Неколагени протеини могу бити важни за процесе током дентиногенезе (32, 36). У матриксу корисни су за стварање минералних материја (32), а када се имобилизују на чврстој подлози, индукују формирање апатита у физиолошким условима (36). Такође, они могу деловати као регулатори величине и брзине за кристализацију и промовисати дифузију калцијумових јона у ткиву дентина. Однос неорганичне и органске компоненте у дентину није константан, нпр. нижи садржај колагена и више минерала присутни су у близини дентинских тубула.

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

1.2. Структура

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

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

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

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

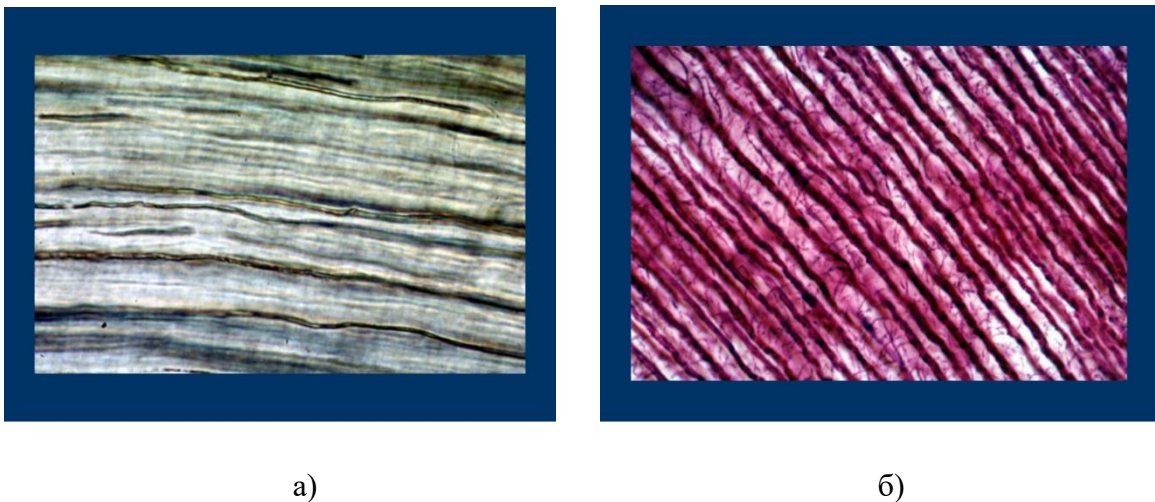
посматрају неколагени протеини, матрикс терцијарног дентина има смањену концентрацију фосфорина у поређењу са примарним дентином (49). Фосфорин спада у групу фосфопротеина и налази се само у минерализованом матриксу, док у предентину није пронађен (50). Фосфопротеини имају високи афинитет за везивање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

1.3. Дентински тубули

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

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

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



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

1.3.1. Течност дентинских тубула

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

Топлота, услед ширења флуида проузрокује кретање дентинског ликвора од споља према пулпи, а ниска температура, услед смањења његовог волумена проузроковаће кретање флуида од пулпе према споља. Међутим, сва топлота, претерано сушење експонираног дентина изазваће кретање дентинског ликвора према споља што изазива аспирацију једара одонтобласта у дентинске каналиће, деформацију, па и кидање нервних завршетака што је праћено болом (38).

1.3.2. Колонизација бактерија

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

2. ИРИГАНСИ

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

"Идеално" средство за иригацију требало би да је стабилно, ефикасно, дуготрајног антимикуробног и фунгицидног дејства, способно да пенетрира у сва подручја канала корена без негативног ефекта на зубе, периапикално ткиво или опште здравље, а

јефтино и лако доступно (9). Међутим, до данас није синтетисан ни један ириганс који поседује све ове карактеристике и зато је неопходно комбиновање истих како би им се побољшала ефикасност у свакодневној клиничкој пракси. У ендодонтској терапији данас, најчешће се кориште ириганси NaOCl, EDTA и CHX, комбиновани са новијим производима као што су QMiX и MTAD (9, 73, 76).

2.1. НАТРИЈУМ ХИПОХЛОРИТ

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

2.1.1. Хемијска структура и начин деловања

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



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

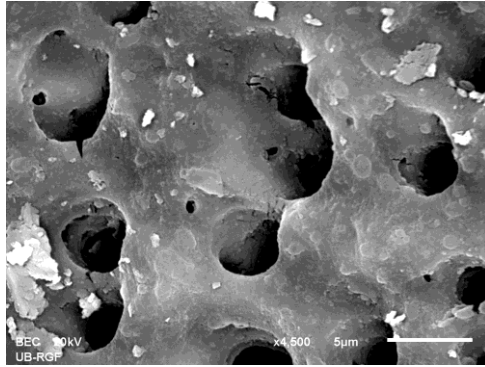
2.1.2. Антимикробни ефекат

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

(85-87), али са повећањем концентрације значајно се повећава токсични ефекат раствора (88). NaOCl је у стању да поремети и раствори биофилм када се користи као 1%, 5,25% или 6% раствор (81, 82). У лабораторијским условима NaOCl брзо и ефикасно елиминише бактерије, и када се примени у нижим концентрацијама (89-91), док је у клиничким условима његов ефекат ограничен због присуства органских материја, без обзира на примењену концентрацију (73). У појединим *in vitro* студијама показано је да NaOCl има изражен ефекат на *Candida albicans*, али време контакта ириганса са каналом корена током испирања мора бити продужено (91-93). Такође, у клиничким студијама показано је да 2,5% NaOCl умерено ефикасан против бактерија, али мање ефикасан против ендотоксина у инфицираном каналу корена (94, 95).

2.1.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

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



Слика 2. Репрезентативна СЕМ микрографија ерозије дентина

2.1.4. Цитотоксичност

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

Нежељена својства NaOCl су изражена токсичност на орална ткива, гингивалне фибробласте и оралне епителне ћелије (111, 112). Главни недостатак NaOCl је да делује

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

2.1.5. Способност продирања у дентинске тубуле

Могућност ириганса да продре у дентинске тубуле је важна јер могу бити инфицирани више дана или недеља (66, 67, 71). До данас је ограничен број студија које су испитивале пенетрацију NaOCl (120, 121). Дубина на којој се елиминишу бактерије може да варира од 200 μm до 500 μm , у зависности од тога да ли се користи 1% или 6% NaOCl (122-129).

2.1.6. Деактивирање

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

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

2.2.2. Антимикробни ефекат

Антимикробна активност СНХ је интензивно тестирана. У бројним истраживањима је компариран антимикробни ефекат СНХ са физиолошким раствором и NaOCl. У појединим студијама показано је да NaOCl ефикасније делује од СНХ (123, 125), док у другим студијама ефекат СНХ је био супериорнији (126, 148). Међутим, постоје студије у којима је уочен сличан антимикробни потенцијал оба ириганса (149-152). У *in vivo* студијама констатовано је да укључивање СНХ у протокол иригације као финалног ириганса било ефикасније од физиолошког раствора (153, 154). С обзиром да и NaOCl и СНХ имају и предности и мана, многи аутори су препоручили да се ова два ириганса комбинују у циљу побољшања антимикробне активности у каналу корена (155). Такође, у истраживањима је показано да способност елиминисања бактерија са NaOCl је смањена на једну четвртину, а са СНХ једну половину, и процена бактеријских оптерећења са применом молекуларних техника су показале сличне налазе (156). Међутим, ови налази нису репродуковани у студији са нижом концентрацијом СНХ (157). Када су испитивани ефекти на биофилм у експерименталним *in vitro* студијама, уочено је да СНХ ефикасно уклања ендодонтски биофилм бактерија (158). У поређењу са другим иригансима, као што је NaOCl, ефекат СНХ је био знатно нижи, што је показало да СНХ не може бити ефикасан као појединачан ириганс (128, 159). Међутим, постоје студије у којима је запажено да способност СНХ да инактивира липополисахариде није се разликовала од NaOCl (94, 95). Испитивањем ефикасности ових ириганаса на гљивице, 2% СНХ је показао исту ефективност као 1,3% NaOCl (92). У скоријем истраживању о ефикасности NaOCl и СНХ у клиничким условима нису нађени докази који би препоручили једног од њих као средство избора у ендодонтској терапији, у лечењу зуба са инфицираним коренским каналима једнокорених зуба (160).

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

2.2.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

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

2.2.4. Цитотоксичност

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

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

2.2.5. Супстантивност

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

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

2.2.6. Способност продирања у дентинске тубуле

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

2.2.7. Деактивирање

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

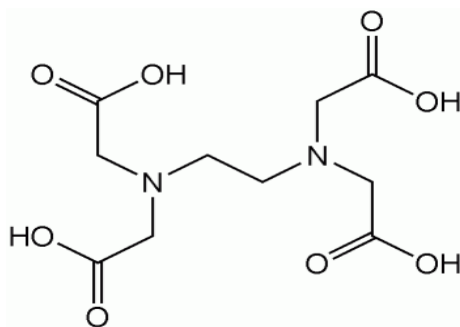
2.3. ЕТИЛЕНДИАМИНТЕТРАСИРЋЕТНА КИСЕЛИНА

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

EDTA концентрације од 10-17% и pH 7-8 делује као хелатор и користи се за уклањање неорганског дела дентинског зида и размазног слоја (9, 81).

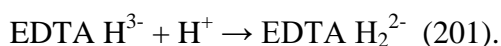
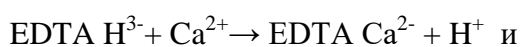
2.3.1. Хемијска структура и начин деловања

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



Слика 4. Хемијска структура EDTA

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



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

2.3.2. Антимикробни ефекат

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

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

2.3.3. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

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

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

2.3.4. Цитотоксичност

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

2.3.5. Способност продирања у дентинске тубуле

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

2.3.6. Деактивирање

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

2.4. КОМБИНАЦИЈЕ ИРИГАНАСА

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

2.4.1. ДЕТЕРЏЕНТИ

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

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

2.4.2. МТАД

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

2.4.2.1. Антимикробни ефекат

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

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

2.4.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

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

2.4.2.3. Цитотоксичност

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

2.4.2.4. Способност продирања у дентинске тубуле

Детерцент у саставу MTAD смањује површински напон и олакшава пенетрацију раствора. Низак површински напон MTAD ($34,5 \text{ mJ/m}^2$) може да осигура потпунији контакт ириганса са дентином канала корена и тиме повећа способност дубљег продирања ириганса у дентинске каналиће, чиме осигурава ефикасније уклањање размазног слоја, дезинфекцију канала, бољу и лакшу дифузију дејствених компонената интраканалних лекова (253).

2.4.2.5. Деактивирање

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

2.4.3. QMiX

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

2.4.3.1. Антимикубни ефекат

QMiX испољава изражен антимикубни ефекат сличан 6% NaOCl, а супериорнији од 2% CHX, МТАД или NaOCl примењеног у нижим концентрацијама у експерименталним условима (151, 225). QMiX је ефикасан у елиминисању *E. Faecalis* као 1% NaOCl, али показано је да брже уклања биофилм и елиминише бактерије од 2% CHX и једнако добро као 2% NaOCl (151). Са друге стране, постоје студије у којима су ови налази оспорени (233, 234), у којима су испитивани не само број елиминисаних бактерија, већ и број живих бактерија, као и количина биофилма након примене QMiX (233, 234). *Pai* и сар. (243) доказали су да QMiX је ефикасан у елиминисању бактерија, али неефикасан у уклањању биофилма, што смањује његов свеобухватни антимикубни ефекат. Такође, *Ordinola-Zapata* и сар. (233) показали су да QMiX је мање ефикасан у уклањању биофилма од 6% NaOCl, али има већи ефекат од 2% CHX.

2.4.3.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

У студијама које су проучавале ефекат уклањања размазног слоја са QMiX раствором запажено је сличан или супериорнији од 17% EDTA (151, 228, 231), при чему његова предност у односу на EDTA је мањи ерозивни ефекат на дентин (230). Уклањање размазног слоја са QMiX и EDTA може бити у вези са резултатима који су указали на

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

2.4.3.3. Цитотоксичност

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

2.4.3.4. Способност продирања у дентинске тубуле

Истраживања о пенетрацији QMiX у дентинске тубуле се односи на испитивање његове антимикробне ефикасности у току иригације, у различитим временским интервалима при чему се мерио број мртвих бактерија у тубулима (123, 125, 126). Показало се да QMiX је испољио своје антимикробно дејство до исте дубине као 6% NaOCl, при чему су оба ириганса елиминисала бактерије целом дужином дентинских тубула у року од три минута. Поред тога, уочено је да бактерије биофилма старог један дан су биле уништене у тубулима пропорционално између QMiX и 6% NaOCl, али QMiX је био ефикаснији него 2% CHX и NaOCl у нижим концентрацијама (126). Међутим, када је испитиван биофилм стар три недеље, QMiX је био мање ефикасан од 6% NaOCl, али ипак ефикаснији од других ириганаса (123). У другој студији наводи се да способност бактерицидног деловања QMiX унутар дентинских каналића, када је присутан биофилм, након излагања 6% NaOCl у трајању десет минута ефикаснија од

комбинације 6% NaOCl, 17% EDTA и 2% CHX (123, 126). Тај ефекат је уочен на дубини до 300 μm (125).

2.4.3.5. Деактивирање

Када је антимикуробни ефекат QMiX испитиван и подвргнут интеракцији са дентином уочено је да његова ефикасност одложена. Међутим, дентин не елиминише ефекат у потпуности. Иако се антимикуробни ефекат непосредно блокира, са временом се врати антимикуробно дејство QMiX (259).

3. ИНТЕРАКЦИЈЕ ИЗМЕЂУ ИРИГАНАСА

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

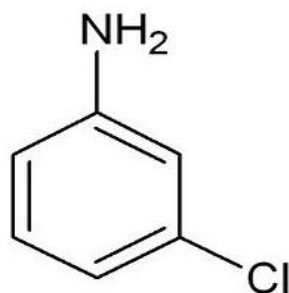
3.1. NaOCl и CHX

Установљена је интеракција између два најчешће коришћена ириганса у ендодонтској терапији, NaOCl и CHX, која се огледа у стварању наранцасто-браон преципитата. У једном од првих истраживања запажа се могућност реакције између NaOCl и CHX, при чему уочено је да формација хлорхексидин-хлорида повећала ефикасност иригације (155). Са друге стране, постоје студије у којима су ови резултати оспорени. Концензус је да ова мешавина доводи до формирања преципитата који је потенцијално токсичан (17, 23, 132, 139, 165, 260-264). Стога, тренутна реакција постоји и огледа се у промени боје раствора када се 2% CHX помеша чак и са врло ниским концентрацијама NaOCl (0,023%). Повећање концентрације NaOCl на само 0,19% доводи и до формирања видљивог преципитата чија се количина повећава са концентрацијом NaOCl (17). Уочена је промена боје раствора од светло до тамно браон, при чему је најтамнију пребојеност показао раствор са највећом концентрацијом NaOCl. Присуство преципитата у замућеном раствору је запажено тек након центрифугирања. Чак и да концентрација CHX буде десет пута мања од 0,2% CHX настаје тренутна реакција са 0,5% NaOCl (262, 263). У овој студији показано је да интеракција између NaOCl и

СНХ, као и стварање преципитата, не зависе само од концентрације NaOCl, већ и од концентрације СНХ.

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

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



Слика 5. Молекулска структура парахлоранилина

Ово може укључити било који од три изомера анилина (Cl (C₆H₄) H₂N), односно 2-хлороанилин, 3-хлороанилин и 4-хлороанилин, што чини парахлоранилин или *PCA*. Такође, ови налази су потврђени коришћењем технике диазотизације, којом се детектује присуство ароматичних амина. Закључено је да хлороанилин и ароматични амин су заиста били присутни (165). У наредној студији, коришћењем гасне

хроматографије са масеном спектрометријом резултати су показали да 2-хлороанилина и 3-хлороанилин нису били присутни, само *PCA* је детектован у талогу (269). Контрадикторни резултати добијени су када се талог анализирао нуклеарно-магнетно-резонантном спектроскопијом и није уочена мерљива количина *PCA* (260). Једна друга студија, коришћењем Бајлштајнов теста растворљивости је показала присуство хлора и анилина и поново потврдила пароположај хлора, применом *NMR* спектроскопске анализе (264). Такође, једна група аутора је закључила да коришћењем једнодимензионе и дводимензионе *NMR* спектроскопије су идентификована два субституисана једињења бензена, као што су пара-хлорофенилуреа (*PCU*) и пара-хлорофенилгванидил-1,6-дигванидил-хексан (261). Како је *PCA* нестабилан, то може бити разлог немогућности његове детекције. У окружењу које омогућава да узорак испарава, *PCA* се не може открити. За разлику од ових налаза, користећи секундарну масену спектроскопску анализу (*TOF-SIMS*), уочено је да када се узорак преципитата охлади и спречи испаравање, велики пораст *PCA* је откривен, с обзиром да детекција *PCA* је смањена на собној температури (139). Примарна електроспреј јонизацијска масена спектрометрија (*ESI-MS*) је још једном потврдила присуство *PCA* (126). Такође, гасна хроматографија/масена спектрометрија (*GC/MS*) је потврдила присуство *PCA*, користећи три дела доказа. На хроматографско време задржавања запажени су јони молекула испаравани изотопом за елемент хлора и ударног спектра електрона са тачном фрагментацијом и омјером узорка (270). Међутим, електроспреј јонизација са квадропол масеном спектрометријом (*ESIQ-TOF-MS*) није детектовала сигнал који одговара *PCA* (132).

3.1.2. Хемијска структура *PCA*

Количина створеног *PCA* је директно пропорционална концентрацији NaOCl који интерагује са CHX (17). Сирћетна киселина може растворити преципитат али промена боје и даље постоји, што се може објаснити чињеницом мање поларности производа и могућношћу стварања преципитата у воденом раствору (262). Сматра се да преципитат и *PCA* настају ацидо-базном реакцијом. CHX има киселу реакцију ($\text{pH } 5,5\text{-}6,0$) и способност да донира протоне, а NaOCl је база која може прихватити протоне, са *PCA* који остаје део тог преципитата (17, 271). Иницијална структура CHX је показала да стварање преципитата се постиже хлорисањем гванидног азота (132). Алтернативно у киселом раствору, растварач нападом на угљеник са дефицитарним електронима у

СНХ, доводи до тетраедарског интермедијата са излазним групама које су *РСА* или амонијак. *РСА* лакше напусти групу, зато што амонијак је више у основи у односу на ароматичне аminer из *РСА*. Те реакције имају облик пара-хлорфенилбигванид-амидиноуреа или пара-хлорфенилгванид-амидино-парахлорфенил-уреа. У основном окружењу тетраедарског интермедијата је лакше протонovati доводећи до искључиво *РСА*. Незасићени угљеник у *РСА* може бити нападнут да формира тетраедарски интермедијер, који је способан да деградира на *РСА* и карбаминске киселине (271).

3.1.3. Токсичност *РСА* и преципитата

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

3.1.4. Превенција

Да би се спречио настанак преципитата и евентуално пребојавање зуба, не треба дозволити да NaOCl и СНХ дођу у непосредан контакт. Међутим, то није увек могуће. Неколико студија су истраживеле методе превенције формирања преципитата (132, 134, 264, 270, 275). Показало се да заостали NaOCl после испирања канала треба уклонити дестилованом водом и канал корена посушити папирним поенима пре иригације са СНХ. Метода примене папирног поена за уклањање резидуалног NaOCl из канала, може да смањи али не елиминише број оклудираних тубула преципитатом у каналу корена (275). Други метод за превенцију настанка преципитата је употреба интермедијарног испирања између два ириганса (22, 264, 270). Предложено је да се лимунска киселина користи пре финалног испирања са СНХ, при чему је доказано да су дентински тубули остали отворени без формирања преципитата (22). Међутим, *РСА* је још увек била присутна (270). У циљу превенције стварања преципитата предложена је дестилована вода, као још један ириганс који може да спречи или смањи формирање талоба (132). Резултати истраживања су показали да ако се користе физиолошки раствор или дестилована вода пре СНХ, дебљина преципитата се смањује у поређењу са дентином када није коришћено интермедијерно наводњавање. У појединим

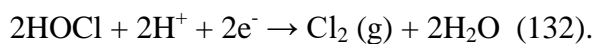
лабораторијским студијама доказано је да алкохол и сирћетна киселина могу да спрече стварање преципитата (262, 276). До скора је и физиолошки раствор био предлаган као погодан међу-ириганс који успешно „раздваја“ растворе за испирање канала корена зуба (264). Међутим, између СНХ и физиолошког раствора може постојати интеракција која се огледа у стварању нерастворљивог беличастог преципитата (132).

3.2. NaOCl и EDTA

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

3.2.1. Хемијска реакција

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



3.2.2. Ефекат на мека и чврста зубна ткива

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

3.2.3. Превенција

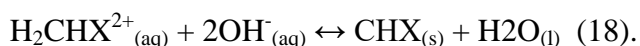
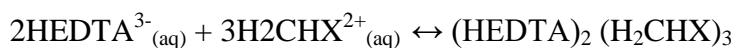
Интермедијарно испирање канала корена дестилованом водом се препоручује да се спречи или смањи реакција између NaOCl и EDTA (132). Други начин да се избегне реакција је обилно испирање са NaOCl после употребе EDTA, да би се уклонили остаци хелатора (133, 134).

3.3. CHX и EDTA

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

3.3.1. Хемијска реакција

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



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

3.4. NaOCl и MTAD

NaOCl је показао да реагује са MTAD у присуству светлости, узрокујући браон дисколорацију дентина (14). Наиме, до данас постоји само једна *in vitro* студија у којој се запажа формирање жутог преципитата, непознатог хемијског састава, дуж зидова канала корена када је MTAD коришћен за финално испирање након NaOCl (19). Такође, аутори су приметили црвено-љубичасто бојење дентина након излагања светлости, а после иницијалног испирања канала корена са 1,3 % NaOCl праћеног са финалним испирањем MTAD (243). Познато је да постоји реакција између NaOCl и лимунске киселине, која је довела до формирања белог преципитата, што је указало на сложену интеракцију између NaOCl и MTAD која захтева даља истраживања за проверу сигурности и корисности ове комбинације ириганаса (19).

3.5. NaOCl и QMiX

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

2. ЦИЉЕВИ ИСТРАЖИВАЊА

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

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

3. РАДНА ХИПОТЕЗА

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

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

4.1. ДИЗАЈН СТУДИЈЕ

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

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

4.2. ОДАБИР И ПРИПРЕМА УЗОРКА

4.2.1. Одабир узорка

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

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

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



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



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



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

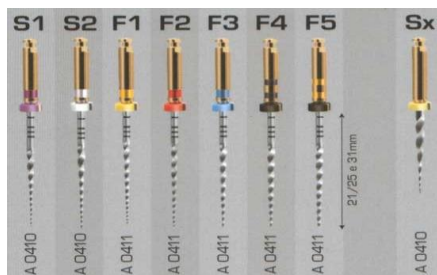


Слика 6.4. QMiX (*Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA*)

4.2.2. Инструментација канала корена

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

Канали су препарисани крунично-апексном тзв. “*crown-down*” техником, коришћењем машинских никл-титанијумских *Protaper Universal* инструмената (*Dentsply, Maillefer, Switzerland*) (слика 6.5) мењаних после сваког петог корена. Величина апексне препарације у свим групама је износила 40/0.06 (инструмент F4). Покретање инструмената вршено је помоћу електричног мотора *X-Smart* (*Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*) и редукционог микроколењака (16:1) (слика 6.6), са уједначеном брзином ротације од 300 обртаја у минути и контролом обртног момента од 1,4 Ncm.



Слика 6.5. Машински никл-титанијумски *Protaper Universal* инструменти (*Dentsply, Maillefer, Switzerland*)



Слика 6.6. Електрични мотор *X-Smart* (*Dentsply, Maillefer, Ballaigues, Switzerland*)

После сваког инструмента канал је испран са 1ml 5,25% раствора NaOCl, осим у MTAD групи где је коришћен 1,3% NaOCl, према препоруци произвођача. За испирање канала корена примењена је игла величине 27G (*Endo-Eze, Ultradent, South Jordan, UT, USA*) која је постављена 1 mm краће од радне дужине и у току инцирања ириганса померана апексно-крунично. Након завршене инструментације сви канали су испрани са 5 ml 17% EDTA у трајању од пет минута у циљу уклањања размазног слоја, а затим и

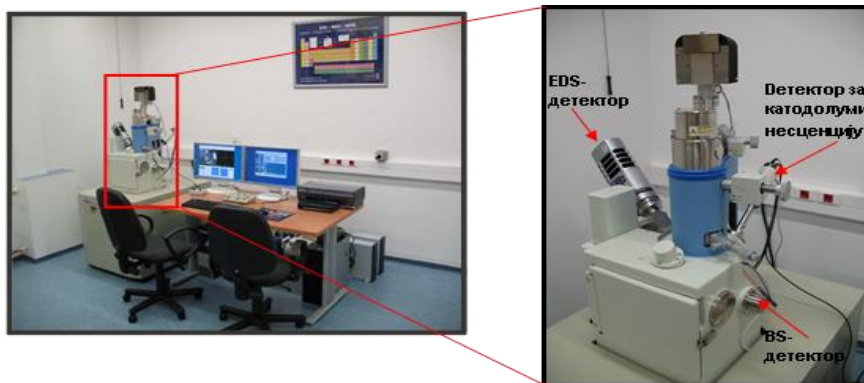
дестилованом водом, да се уклоне остаци раствора EDTA. Након тога коренови су испирани на следећи начин:

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

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

4.3. СЕМ АНАЛИЗА УЗОРАКА

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



Слика 6.7. Лабораторија за СЕМ-ЕДС (лево); *JEOL JSM-6610LV* микроскоп са приказаним детекторима (десно)

4.3.1. Припрема узорка

Осамнаест узорака из сваке групе је одбарано за испитивање утицаја различитих финалних ириганса на површину дентина. Дијамантским диском је направљен танки, уздужни рез са букалне и лингвалне површине корена водећи рачуна да не дође до перфорације канала. На површини корена усечени су и плитки хоризонтални жлебови на растојању од 2, 7 и 12 mm од врха корена, како би се за сваки узорак прецизније дефинисала тачка посматрања по трећинама канала. На тај начин је искључена и пристрасност посматрача при одабиру регије за посматрање. Уздужно цепање зуба је урађено помоћу малог длета, постављеног у формиран уздужни урез, и чекића. Половина корена која се правилније одломилa и на којој нису била присутна оштећења је коришћена за даљу анализу. Одабрана половина узорка је очишћена од прашине, влакана, папира, замашћених делова и отисака прстију и затим дехидрирана раствором етанола у трајању од неколико минута у ултразвучној кади, постепено повећавајући концентрацију раствора (25%, 50%, 75% и 100%) (слика 6.8). Узорци су затим напаривани златом дебљине 20 nm $19,32 \times 10^{-3} \text{ kg/m}^3$ (SCD050 Sputter Coater; LEICA, TO, Japan) с циљем повећања електропроводљивости односно постизања квалитетније структуре слике (слика 6.9). Узорак је постављен на алуминијумске носаче помоћу лепљиве траке и анализирани СЕМ-ом (SEM, JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan) (слика 4.10 и 4.11).



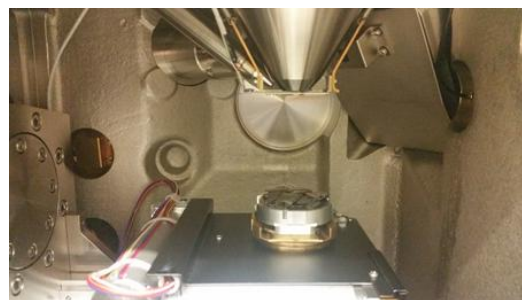
Слика 6.8 Ултразвучна када за припрему узорка



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



Слика 6.10. Алуминијумски носач узорака



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

Површина дентина у круничној, средњој и апикалној трећини корена је анализирана при увећању од 500x, 2.000x и 4.500x у фази висине од 10mm и напону 15kV (за убрзање електрона).

За утврђивање присуства преципитата у дентинским тубулима додатно је анализирано десет коренова, по два из сваке групе. Коренови су уграђени у смолу и након тога попречно пресечени на 3, 6 и 9 mm од врха користећи дијамантски диск и мањи број обртаја. Узорци су дехидрирани коришћењем растућих концентрација етанола (25%, 50%, 75% и 100%), постављени на алуминијумски држач (слика 6.12), напаривањем превучени златом и на крају анализирани СЕМ-ом (*JEOL-JSM-6610LV, Tokyo, Japan*) при увећању од 3 700x до 6 500x.



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

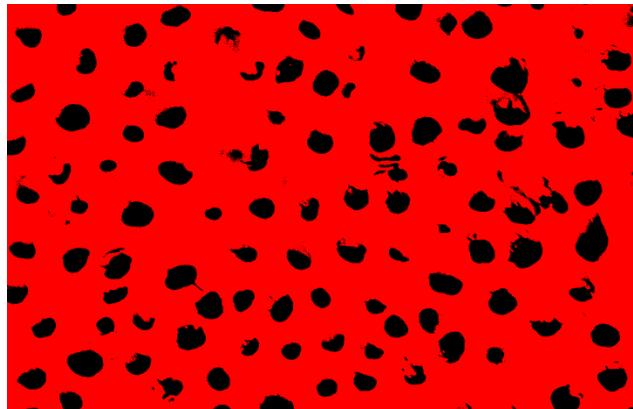
4.3.2. Одређивање количине преципитата на површини дентина канала корена

Три микрофотографије направљене су при увећању од 2000x у коронарној, средњој и апексној трећини корена, укупно девет слика по узорку, односно укупно 162 слике по групи. Микрографије су сачуване у *TIFF* формату. Репрезентативна подручја сваке

трећине канала корена су анализирана помоћу рачунарског програма *Adobe Photoshop CS5, Adobe Systems*. Сlike су стандардизоване на величину $47\mu\text{m} \times 63\mu\text{m}$ и одређен је број пиксела целокупне слике. Затим је помоћу магнетног показивача означена површина слике са насталим преципитатом и одређен је број пиксела. Дељењем ових двеју вредности израчунат је проценат преципитата за сваку слику.

4.3.3. Одређивање броја потпуно затворених дентинских тубула канала корена

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



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

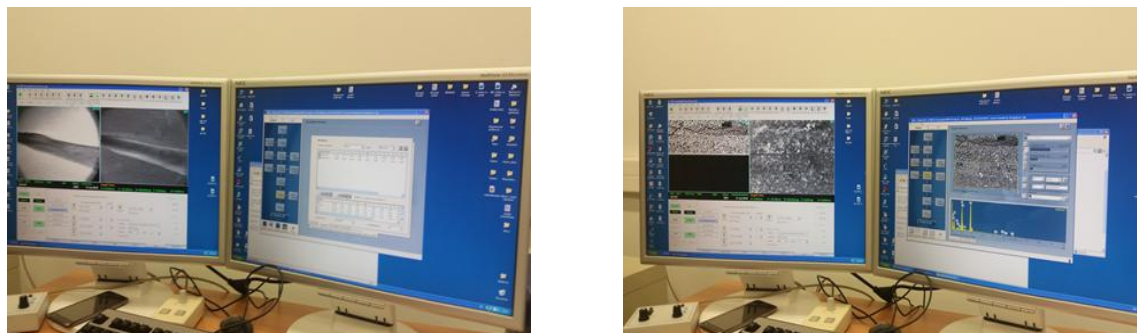
4.4. ИСПИТИВАЊЕ ПЕРМЕАБИЛНОСТИ ДЕНТИНА

Преосталих педесет узорака је коришћено за испитивање утицаја преципитата на пермеабилност дентина канала корена. Коренови су обложени полимеризујућом епоксидном смолом (*Brascola Ltda; São Bernardo do Campo, SP, Brazil*) остављајући слободан отвор канала, а затим потопљани у 0,2% раствор Родамина Б (*Rhodamine B*). Након 24 часа, коренови су континуирано испрани под млазом текуће воде током 24 наредни часа. Након тог периода смола је уклоњена оштрим ножем, а коренови су

положени у полиестарску смолу. Сваки корен исечен је на хоризонталне дискове дебљине од 1 mm помоћу машине за сечење, уз примену малог броја обртаја и хлађење воденим млазом (*Extec Labcut 1010, Enfield, CT*). Сви пресеци су исполирани са силицијум карбидним брусним папирима како би се добила равна површина. Из сваке трећине корена изабран је насумично по један хоризонтални диск, најчешће из средњег дела трећине који је скениран (*Epson Perfection 1240U skener, Epson Corp., Tokyo, Japan*) с резолуцијом од 400dpi и анализиран помоћу софтвера *ImageLab 4.1 (Bio Red, Tokyo, Japan)* у циљу одређивања породора боје. Продор боје у дентинске каналиће изражен је као проценат површине у коју је пенетрирала боја у односу на укупну површину трећине корена.

4.5. ХЕМИЈСКА АНАЛИЗА ПРЕЦИПИТАТА НА ПОВРШИНИ ДЕНТИНА КАНАЛА КОРЕНА

Преципитат на површини дентина канала корена испитиван СЕМ-ом је даље подвргнут ЕДС анализи у циљу одређивања хемијског састава преципитата. Количина елемената Са, Р, С, О, Mg, Cl, Na и N у преципитату сваког узорка је мерена у две тачке дуж канала корена, у коронарној и апексној трећини (слика 6.14). У контролној групи ЕДС анализом је одређен хемијски састав дентина канала корена. Количина елемената у саставу преципитата односно дентина (контролна група) је изражена у процентима.



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

4.6. ОДРЕЂИВАЊЕ РСА У ПРЕЦИПИТАТУ

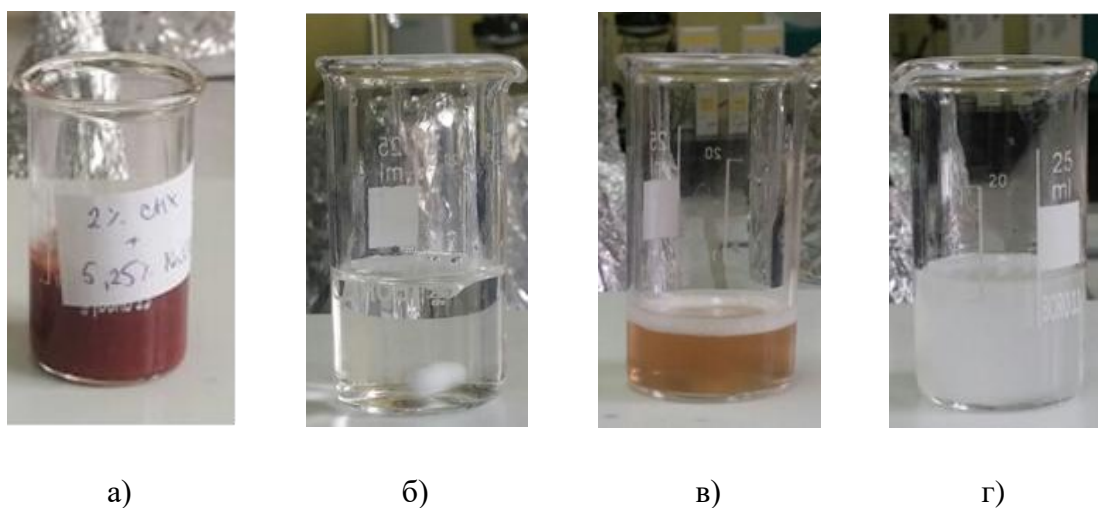
Одређивање присуства РСА у преципитату је обављена на Институту за хемију Природно математичког факултета, Универзитета у Крагујевцу, Србија.

4.6.1. Хемикалије и растварачи

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

4.6.2. Комбиновање и мешање ириганаса

Пет милилитара 5,25% NaOCl је помешано са 5 ml 2% CHX, 17% EDTA или QMiX, а 2% CHX раствор са 17% EDTA. Сви ириганси су замешани у омеру 1:1 (в/в), а добијене смеше су квалитативно анализирани на промену боје, стварање преципитата и/или формирање мехурића. Визуелни аспект мешања ириганаса је приказан на слици 6.15.



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

4.6.3. Одређивање *РСА*

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

4.6.3.1. TLC анализа

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

4.6.3.2. ¹H-NMR анализа

Преципитат и 20 mg *PCA* су растворени у 0,7 ml *DMSO-d₆* и пренети у 5 mm *NMR* епрувету. ¹H-NMR спектри су бележени на 25°C у спектрометру (*Varian Gemini 2000 NMR Spectrometer Systems*) на 200 MHz. Хемијска померања су изражена у ppm (δ) и скаларне спојнице су изражене у Hz.

4.6.3.3. IR анализа

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

4.7. СНАГА СТУДИЈЕ И ВЕЛИЧИНА УЗОРКА

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

4.8. СТАТИСТИЧКА ОБРАДА ПОДАТАКА

Статистичка обрада података је урађена у статистичком програму SPSS 20.0 (*IBM Corp., Armonk, NY, USA*). Резултати су приказани у облику средњих вриједности и стандардних девијација. За поређење разлика у количини талога, броју затворених дентинских тубула и хемијском саставу преципитата (Колмогоров-Смирнов тест $p < 0,05$) између група и унутар група је коришћен Крускал-Волисов тест, са *Dunn post hoc* анализом и Ман-Витнијев тест. Разлике у пенетрацији боје (Колмогоров-Смирнов тест $p > 0,05$) између група су одређене применом једносмерне анализе варијансе (АНОВА), са *post hoc* анализом коришћењем Tukey's теста. Ниво статистичке значајности дефинисан је као 5% (праг значајности $p < 0,05$).

5. РЕЗУЛТАТИ

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

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

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

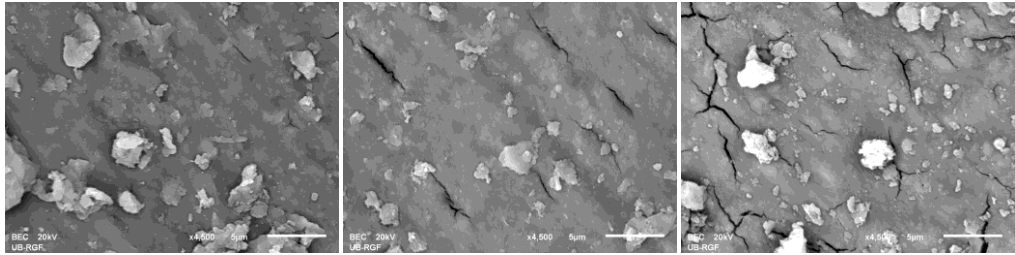
Трећина Канала	СНХ група	ЕДТА+СНХ група	QMiX група	MTAD група
Коронарна	13,13 \pm 13,47 ^{Aa}	7,30 \pm 4,92 ^{Ab}	4,34 \pm 3,04 ^{Ab}	4,69 \pm 5,02 ^{Ba}
Средња	11,81 \pm 14,23 ^{Aa}	6,79 \pm 6,54 ^{Ab}	3,85 \pm 4,12 ^{Ba}	4,30 \pm 4,67 ^{ABa}
Апексна	10,07 \pm 5,96 ^{Aa}	6,70 \pm 4,49 ^{Ab}	3,57 \pm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

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

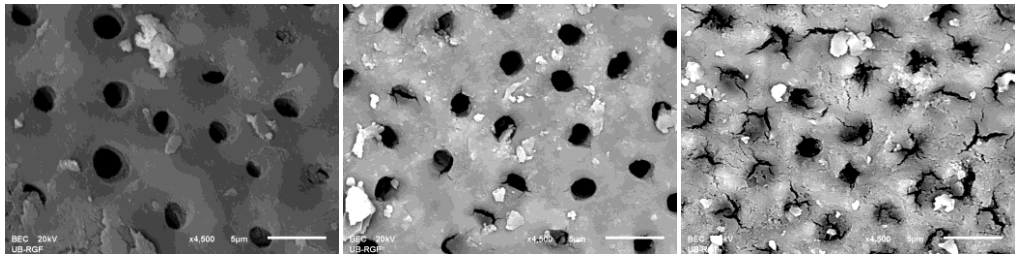
Највећа количина преципитата је забележена у СНХ групи. Анализом података је показано да је количина преципитата у овој групи била значајно већа у односу на MTAD групу ($p < 0,05$) у коронарој трећини и поређено са QMiX групом у средњој трећини ($p < 0,05$). У апексној трећини, преципитат формиран у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

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

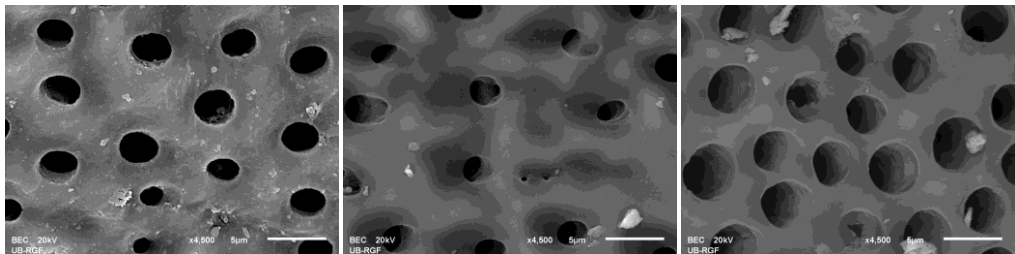
а) CHX група



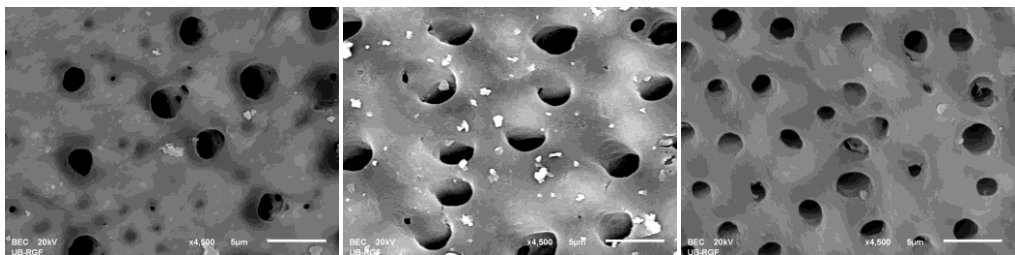
б) CHX + EDTA група



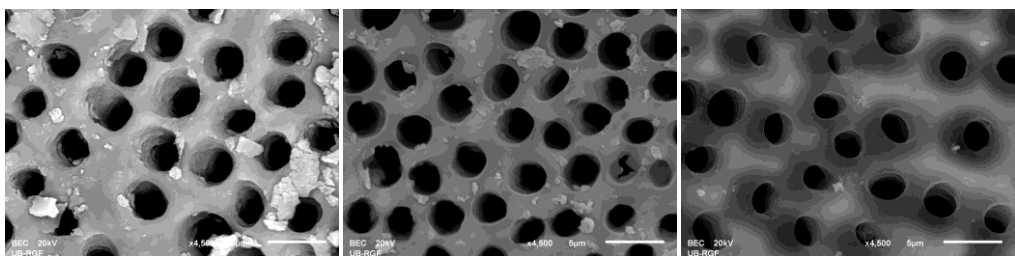
в) MTAD група



г) QMiX група



д) Дестилована вода



Апексна трећина

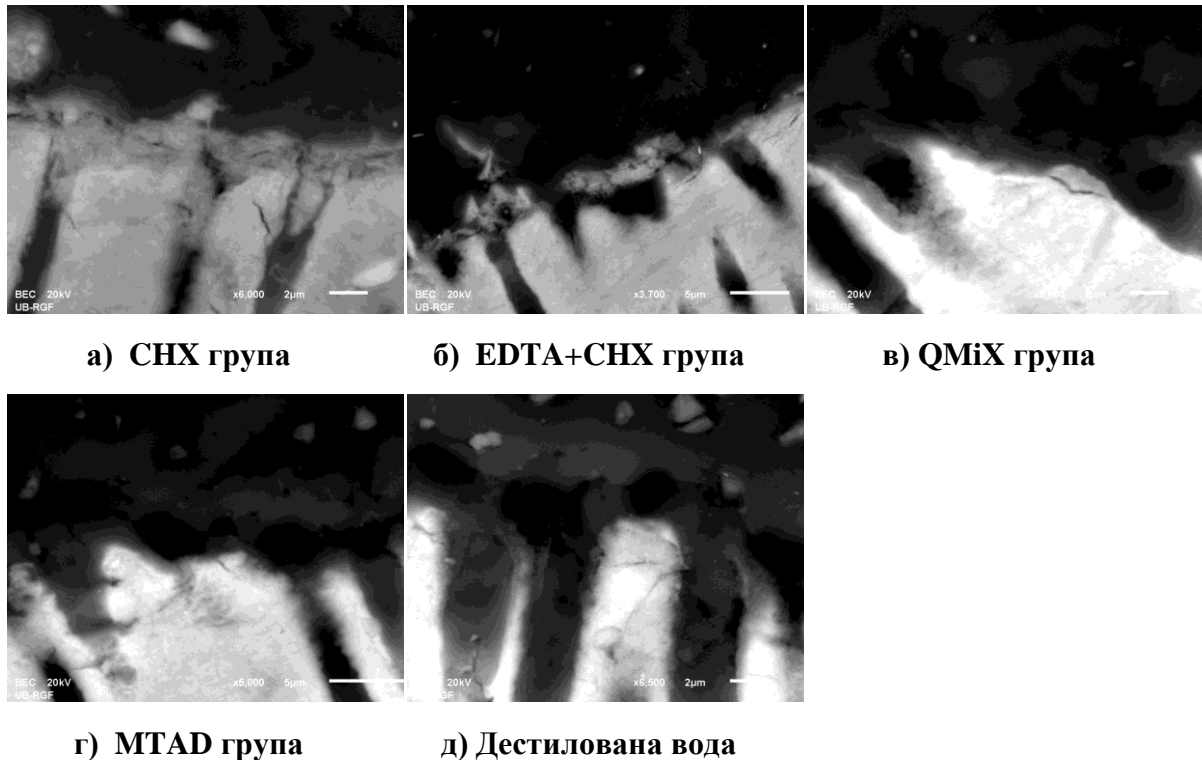
Средња трећина

Коронарна трећина

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

5.2. Присуство преципитата унутар дентинских тубула – СЕМ анализа

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



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

5.3. СЕМ анализа - Број затворених дентинских тубула канала корена

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

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

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

5.4. Утицај преципитата на пермеабилност дентина канала корена

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

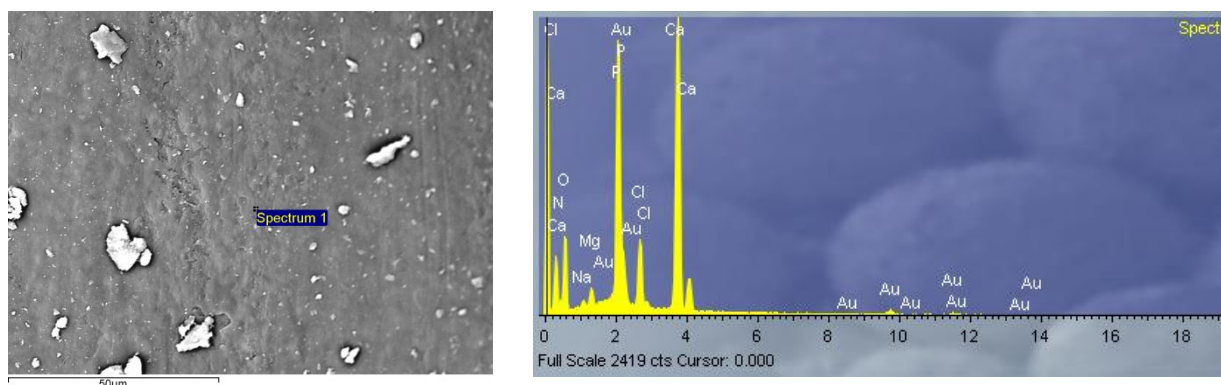
Анализом састава преципитата у апексној и коронарној трећини канала корена није показала значајну разлику у вредностима хемијских елемената у групама СНХ, EDTA + СНХ и QMiX ($p > 0,05$), осим за вредност Cl у СНХ групи ($p < 0,05$). Значајне разлике у количини Ca, P, Mg, Cl и Na у преципитату између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

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

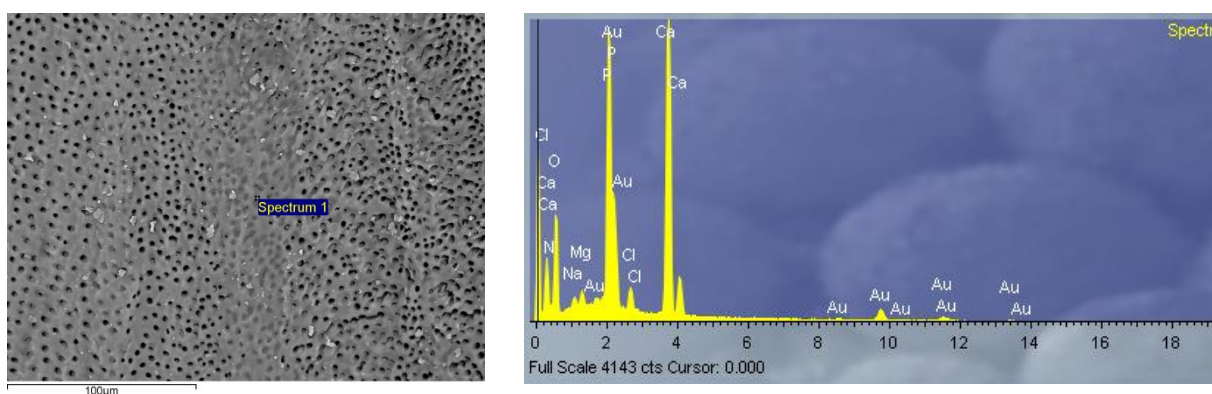
	Трећина Корена	Дестилована вода	СНХ група	ЕДТА+СНХ група	QMiX група	MTAD група
Са	Апексна	23,43 \pm 3,80 ^{Aa}	16,71 \pm 5,97 ^{Ba}	19,62 \pm 2,32 ^{ABa}	17,86 \pm 4,21 ^{Ba}	10,20 \pm 4,54 ^{Ca}
	Коронарна	23,20 \pm 3,27 ^{Aa}	15,45 \pm 3,52 ^{Bca}	17,48 \pm 4,30 ^{Bca}	18,92 \pm 3,79 ^{Ba}	13,36 \pm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

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

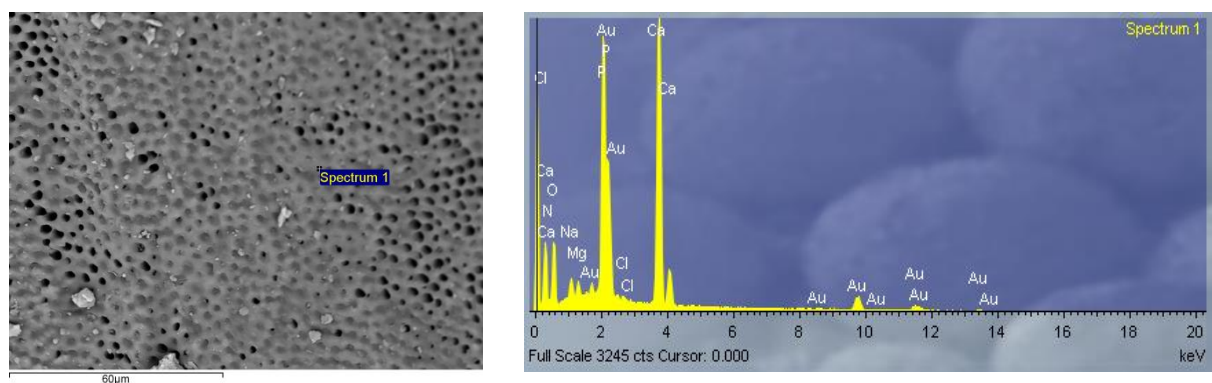
ЕДС слике површине преципитата у CHX, EDTA + CHX, MTAD и QMiX групи и површине дентина у контролној групи су приказане на слици 7.3.



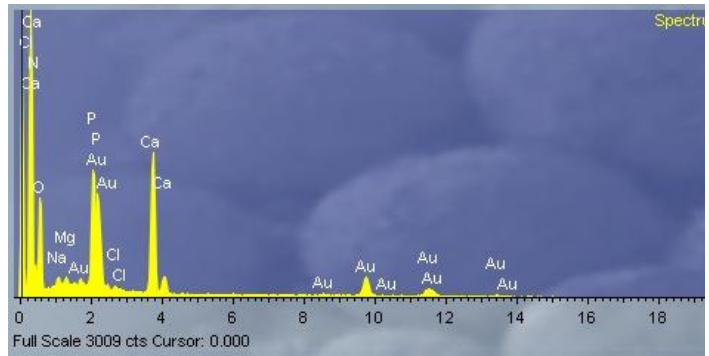
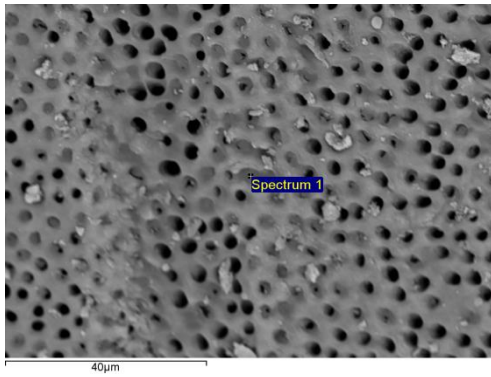
а) CHX група



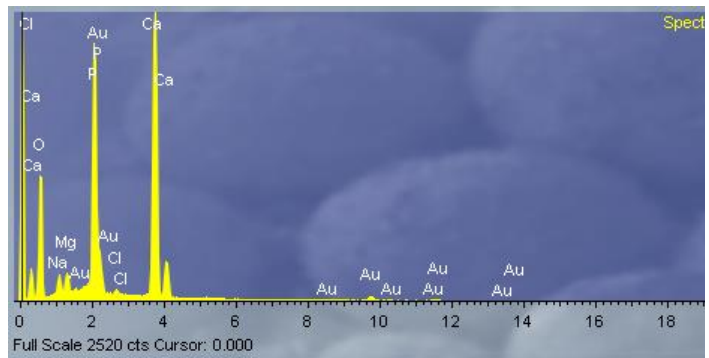
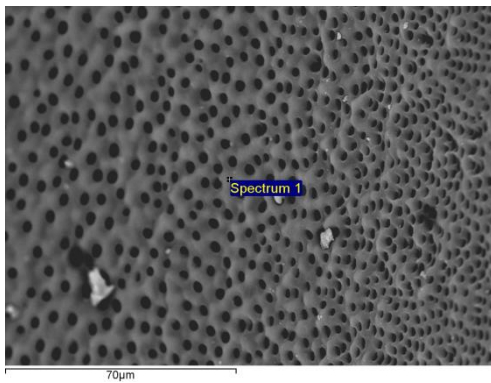
б) CHX+EDTA група



в) QMiX група



г) МТАД група



д) Дестилована вода

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

5.6. Присуство РСА у саставу преципитата

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

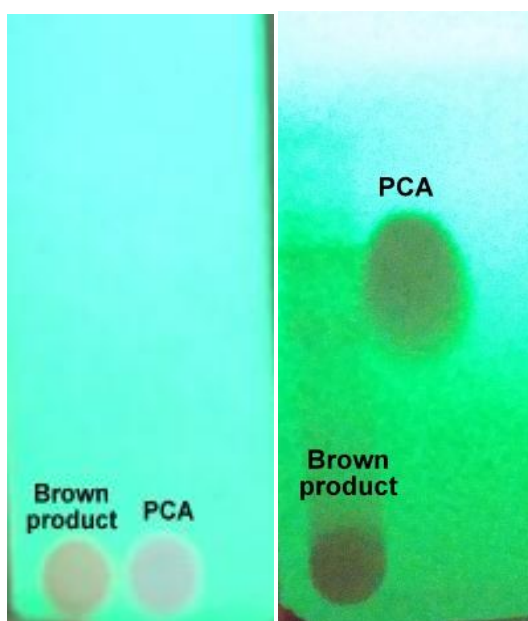
Табела 5. Визуелне карактеристике комбинованих ириганаса

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

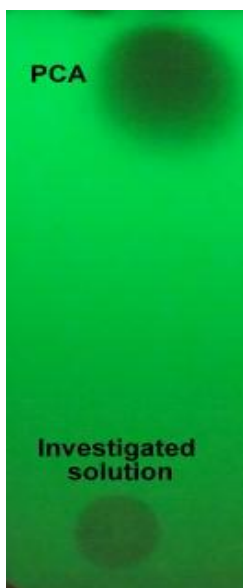
*Раствори су мешани у односу 1:1 (v/v) на собној температури.

5.6.1. Резултати TLC анализе

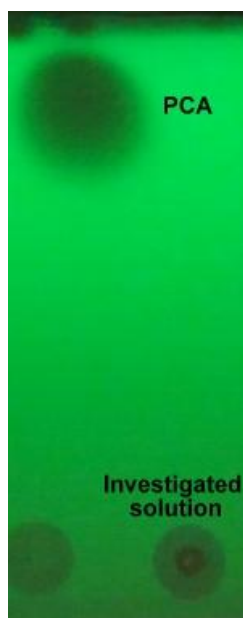
TLC анализом после мешања раствора 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и QMiX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA, и 2% CHX и 17% EDTA није показано присуство PCA (слике 7.4-7.7).



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



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



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



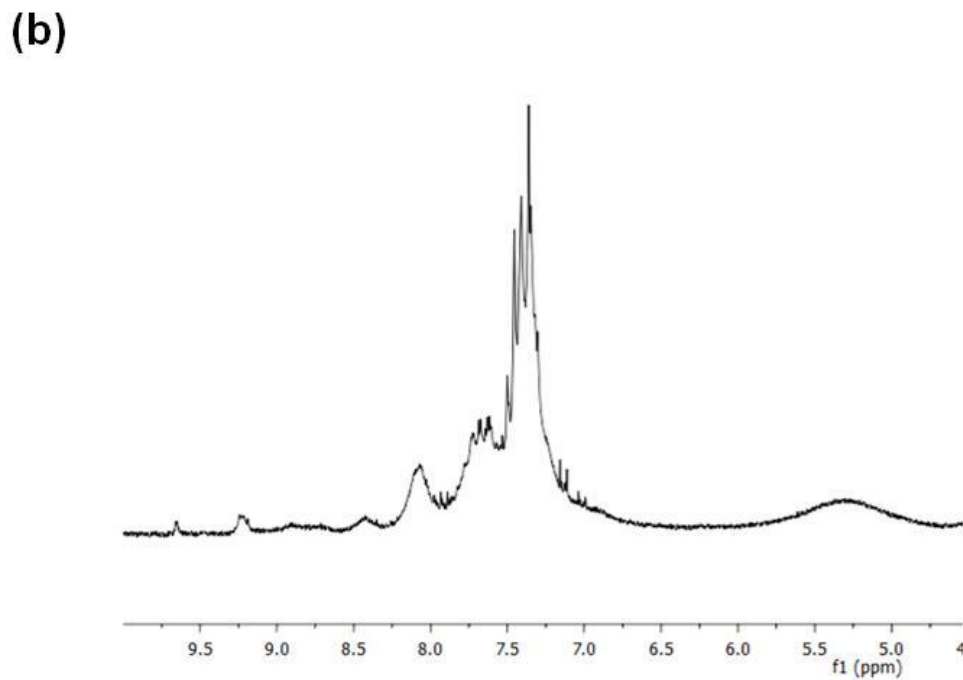
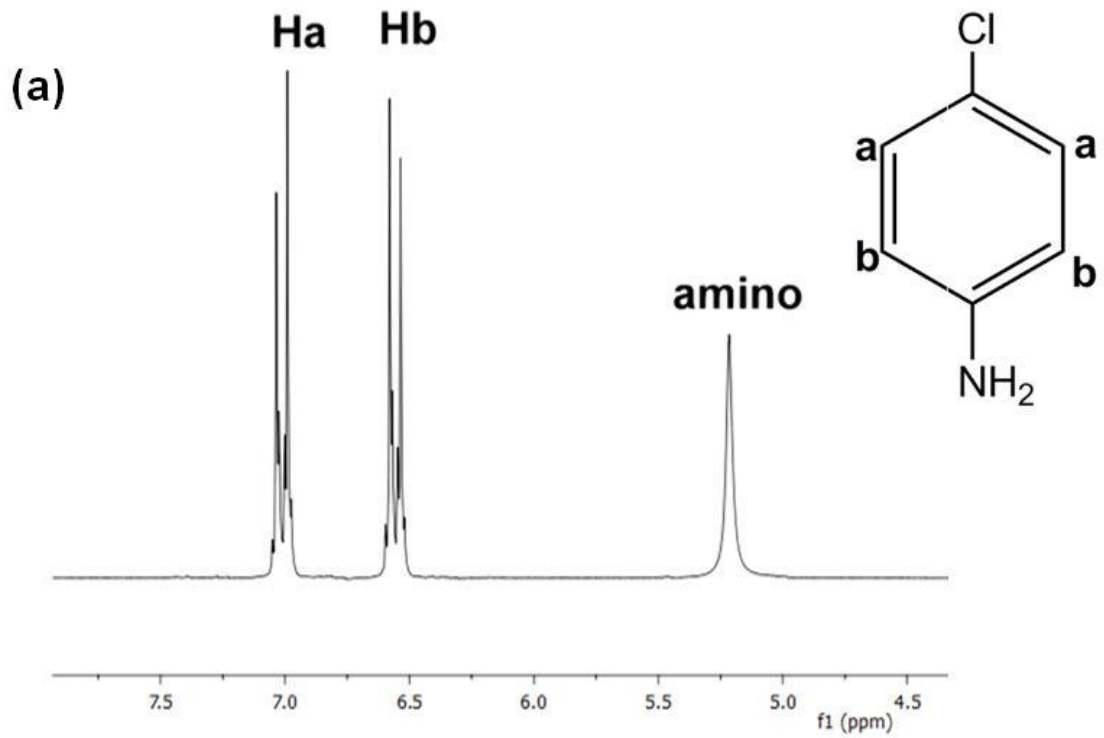
Слика 7.7. *TLC* анализа присуства *PCA* у производу насталом мешањем 2% *CHX* и 17% *EDTA*; *TLC* плоча након развијања у растварачу

5.6.2. Резултати ^1H NMR анализе

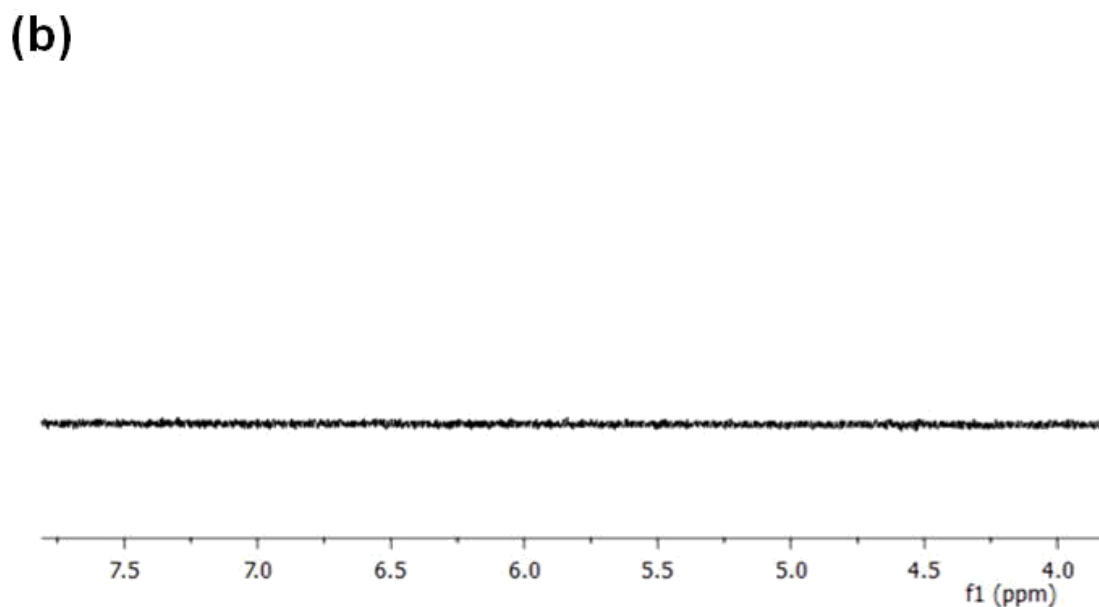
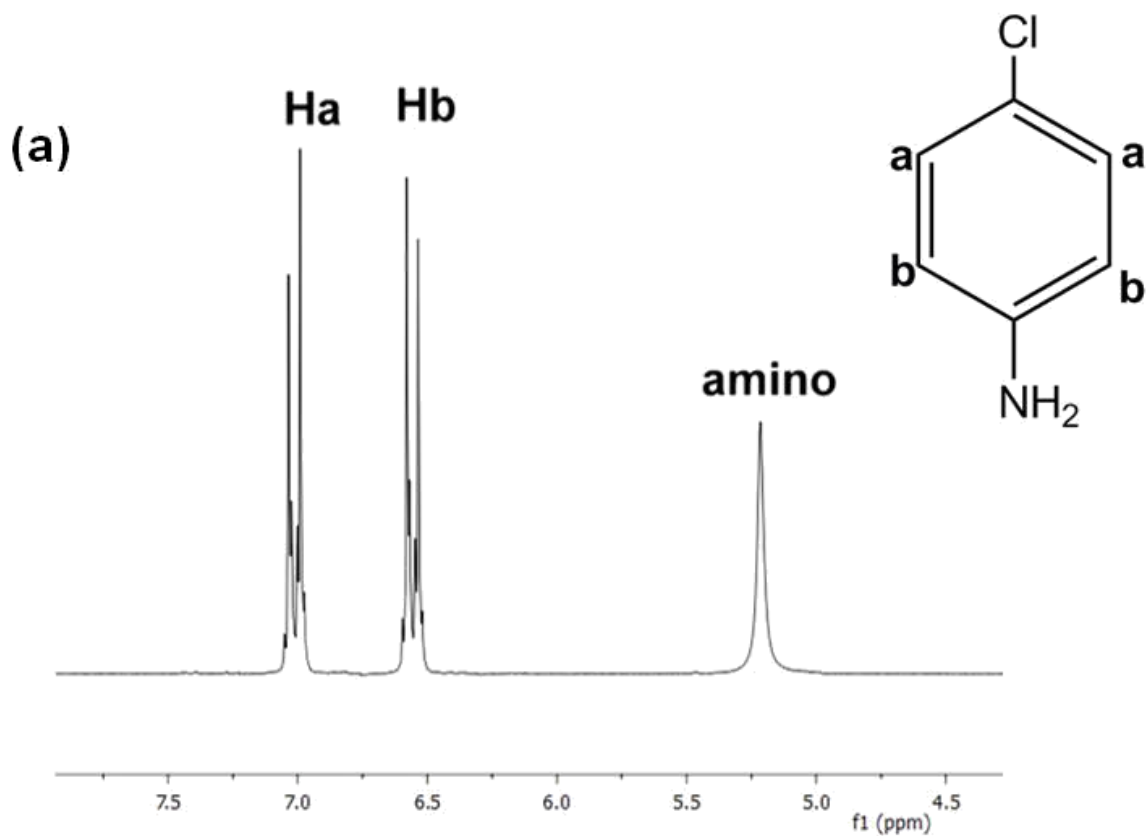
^1H NMR спектар *PCA* и преципитата насталих мешањем 5,25% NaOCl и 2% *CHX*, 5,25% NaOCl и *QMIX*, 5,25% NaOCl 17% *EDTA*, 2% *CHX* и 17% *EDTA*, су приказани на сликама 5.8-5.11. ^1H NMR спектар *PCA* карактерише постојање сигнала на 7,01 и 6,56 ppm са константом коњузије $J = 8.8$ Hz који се приписују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

5.6.3. Резултати IR анализе

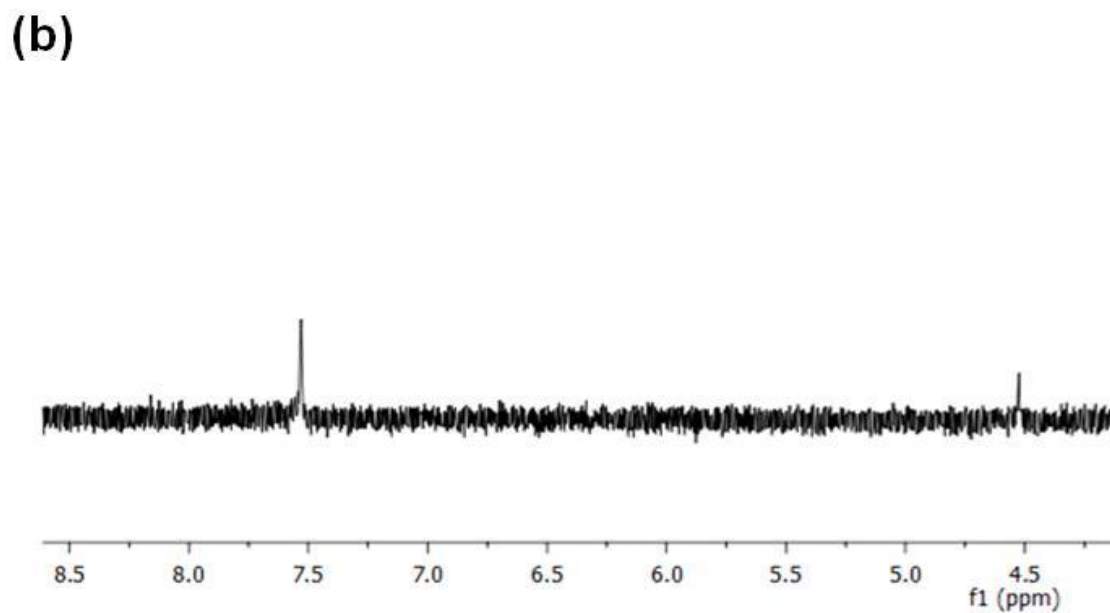
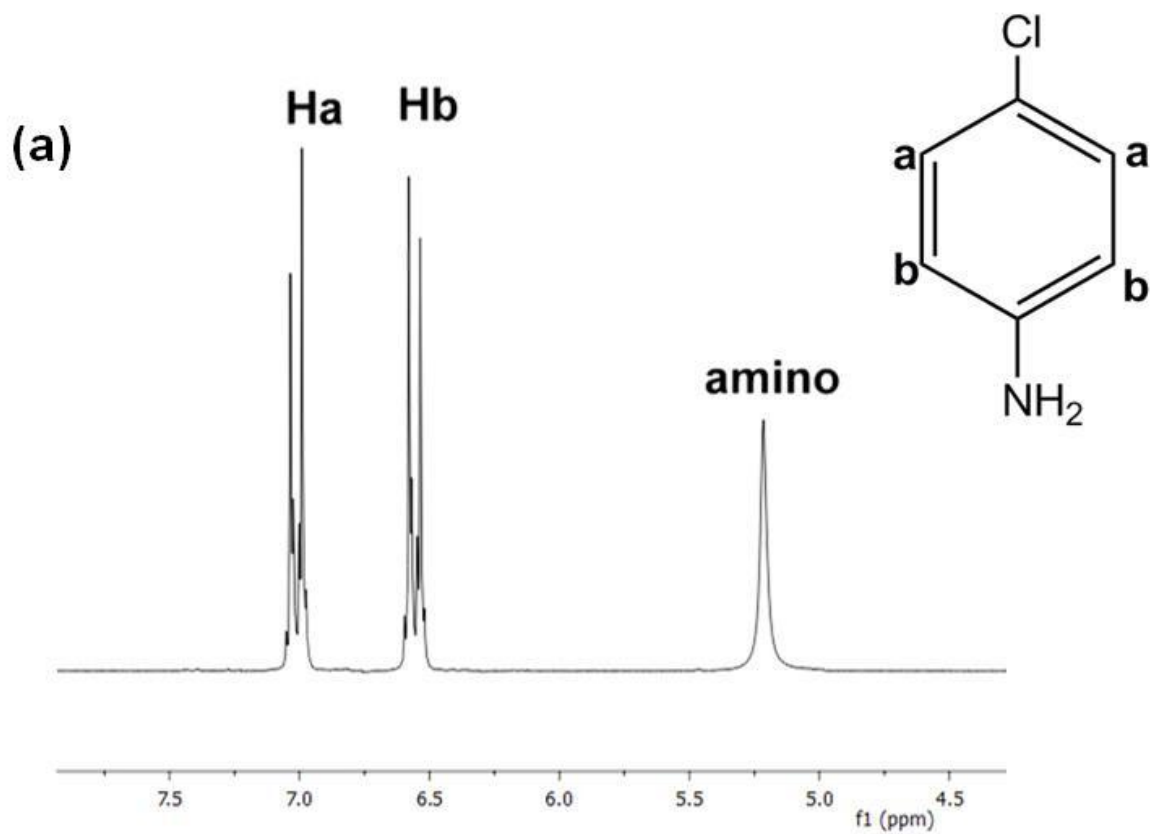
Као последица присуства остатка амина, *IR* спектар *PCA* карактеришу два сигнала на 3472 cm^{-1} и 3382 cm^{-1} , због асиметричне и симетричне вибрације истезања. Ни један од ових сигнала није откривен у производима насталим мешањем 5,25% NaOCl и 2% *CHX*, 5,25% NaOCl и *QMIX*, 5,25% NaOCl и 17% *EDTA*,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



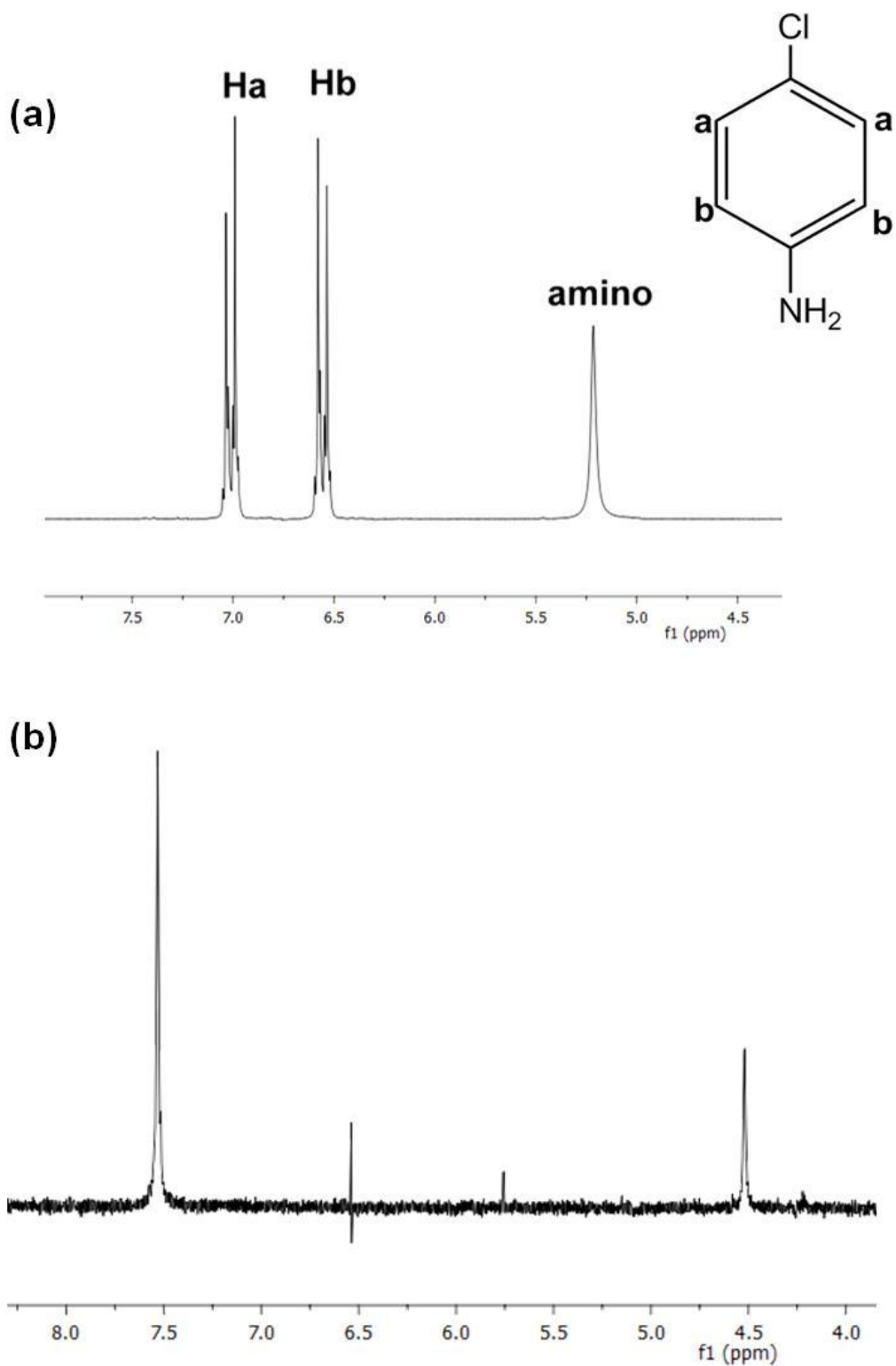
Слика 5.8. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (a) и браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и 2% CHX (б) у DMCO-d_6 на собној температури



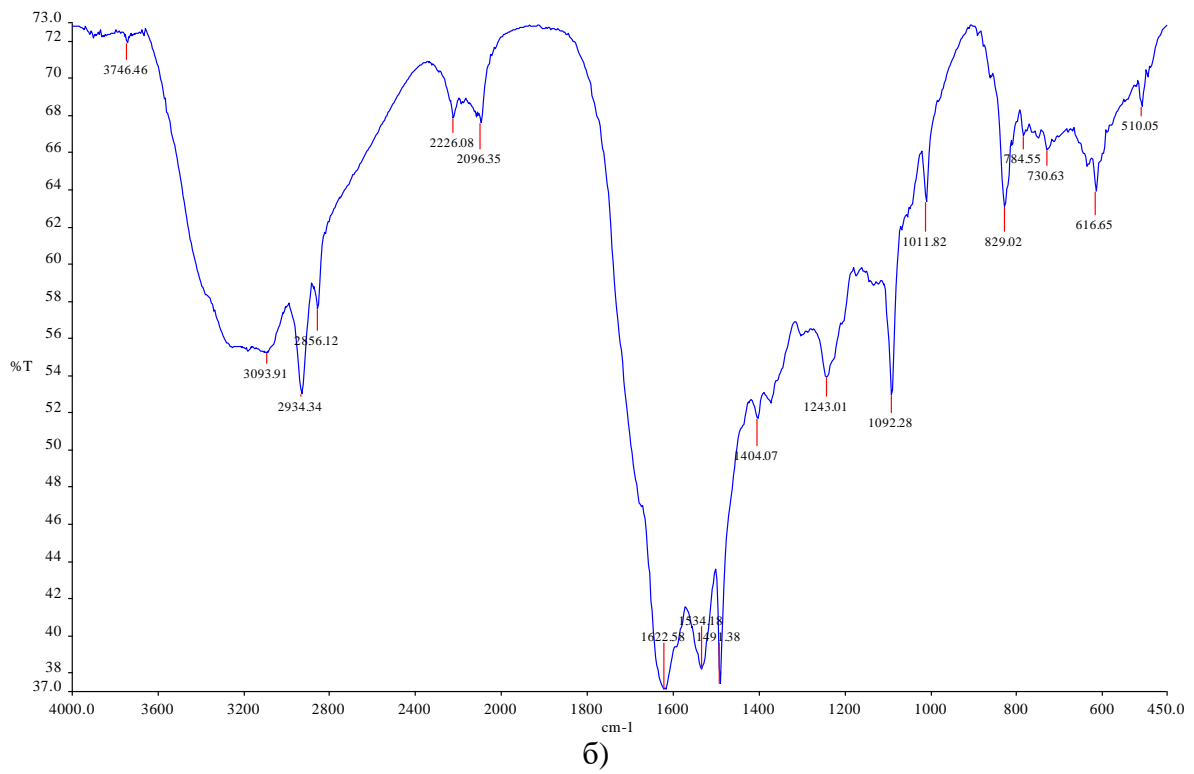
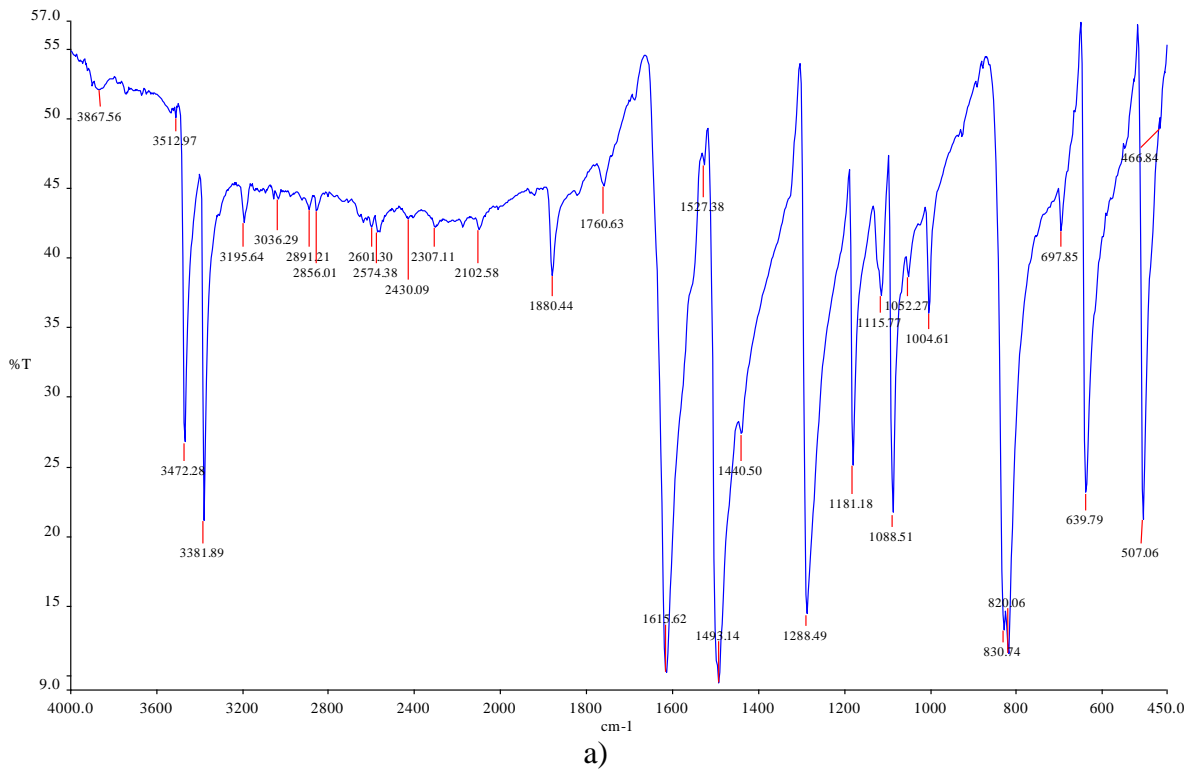
Слика 7.9. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (а) и наранџасто-браон чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и QMiX (б) у DMSO-d_6 на собној температури



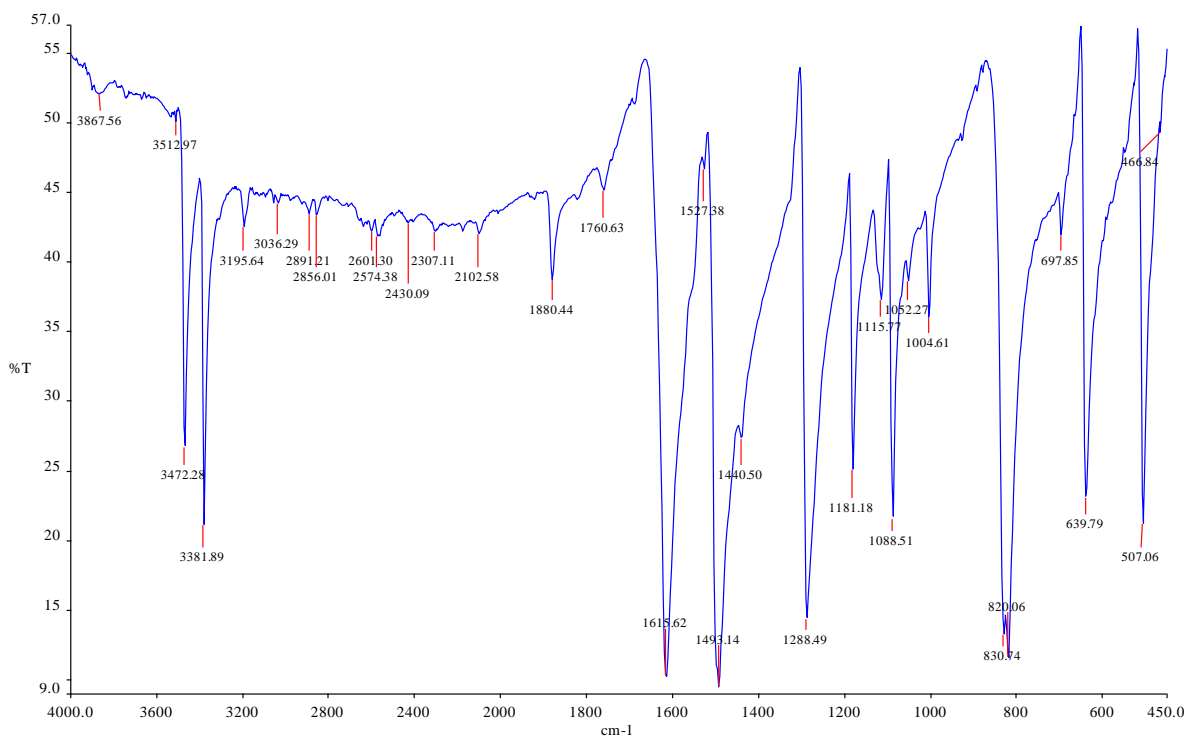
Слика 7.10. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (а) и белу чврсту супстанцу настале мешањем 5,25% NaOCl и 17% EDTA (б) у $\text{DMSO-}d_6$ на собној температури



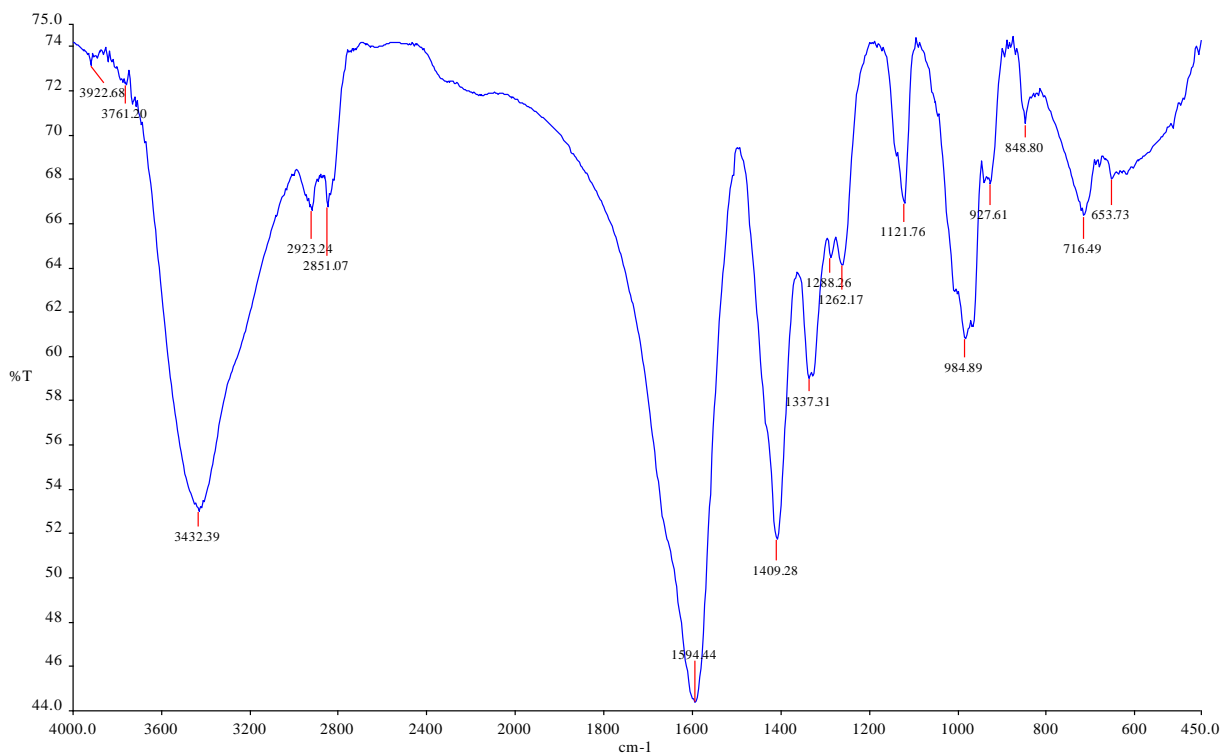
Слика 7.11. Делови ^1H NMR спектра (ароматични регион) за PCA (а) и белу чврсту супстанцу настале мешањем 2% CHX и 17% EDTA (б) у $\text{DMSO}-d_6$ на собној температури



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

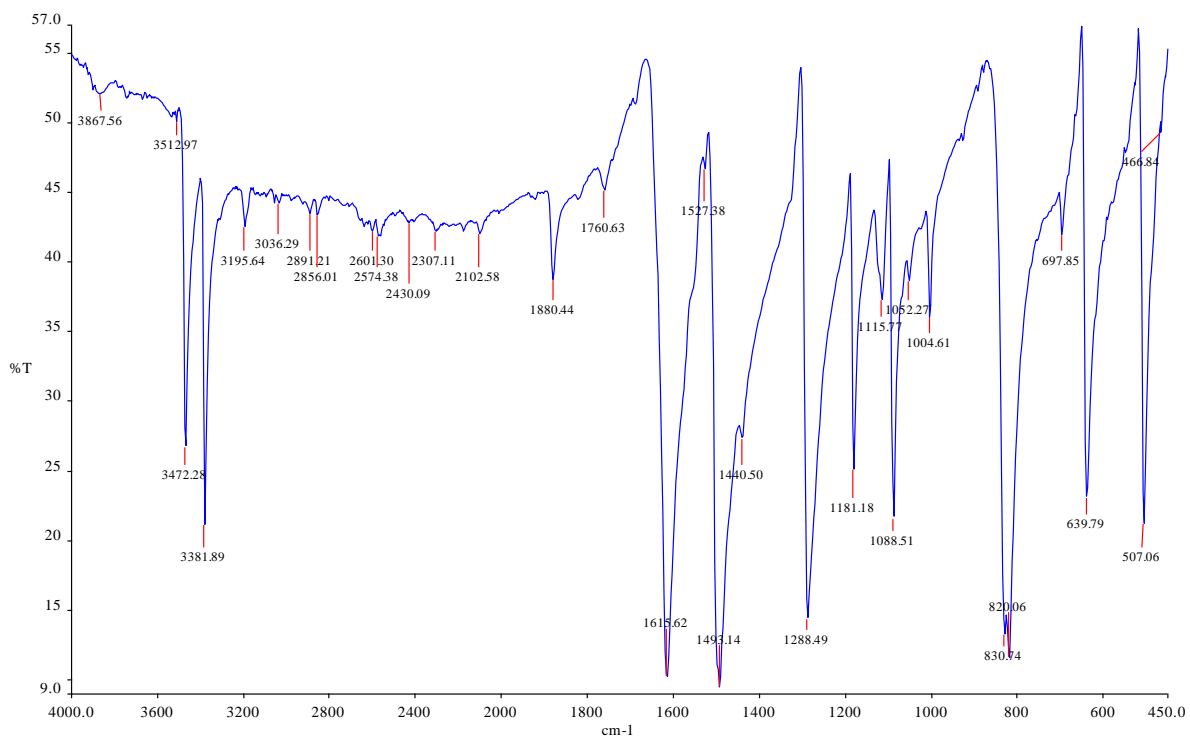


a)

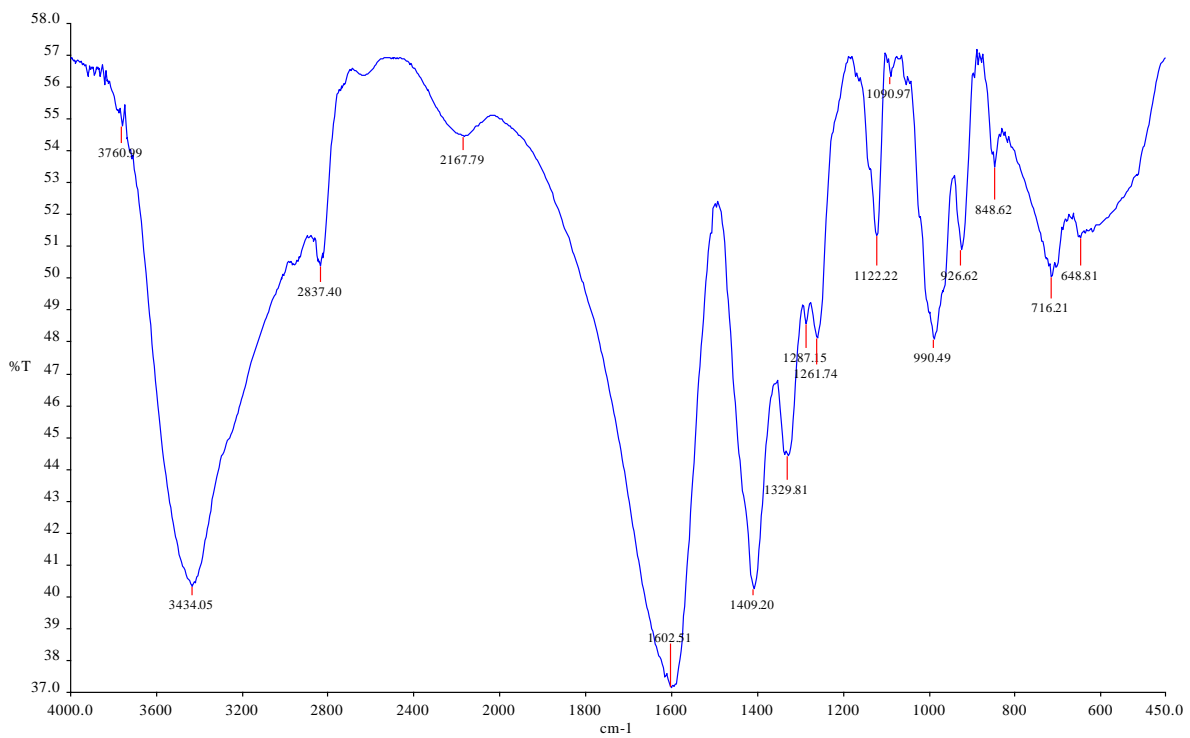


б)

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

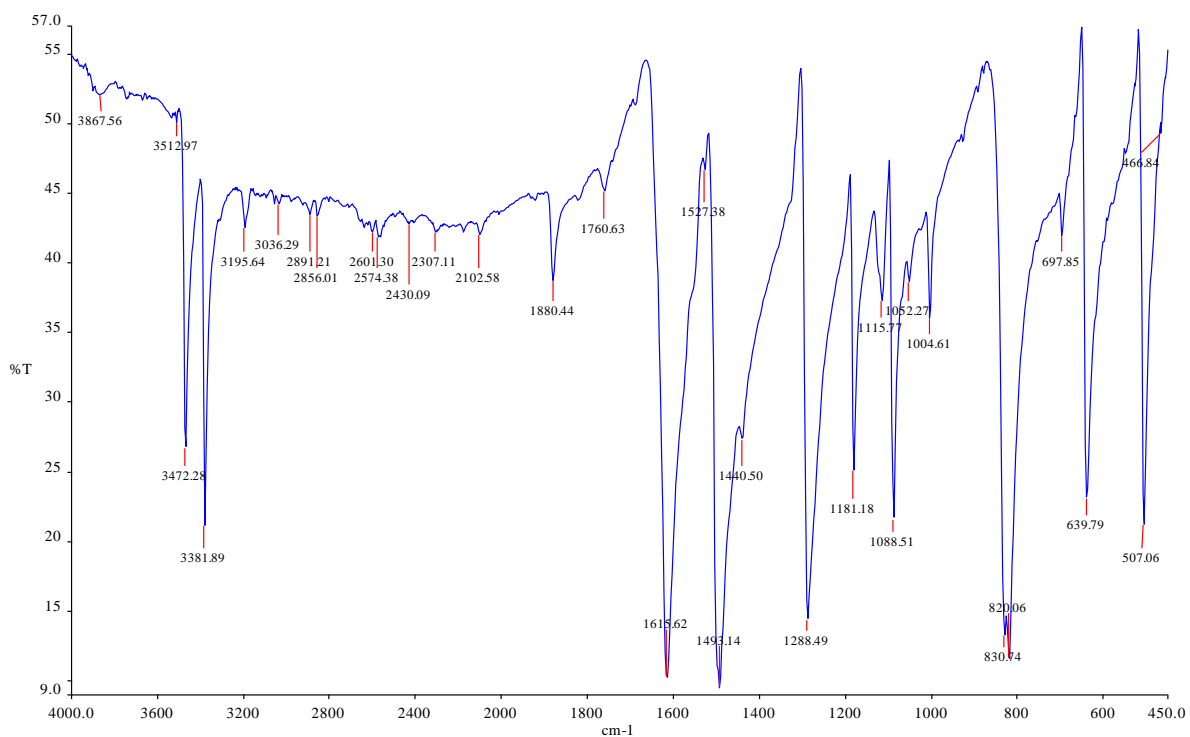


a)

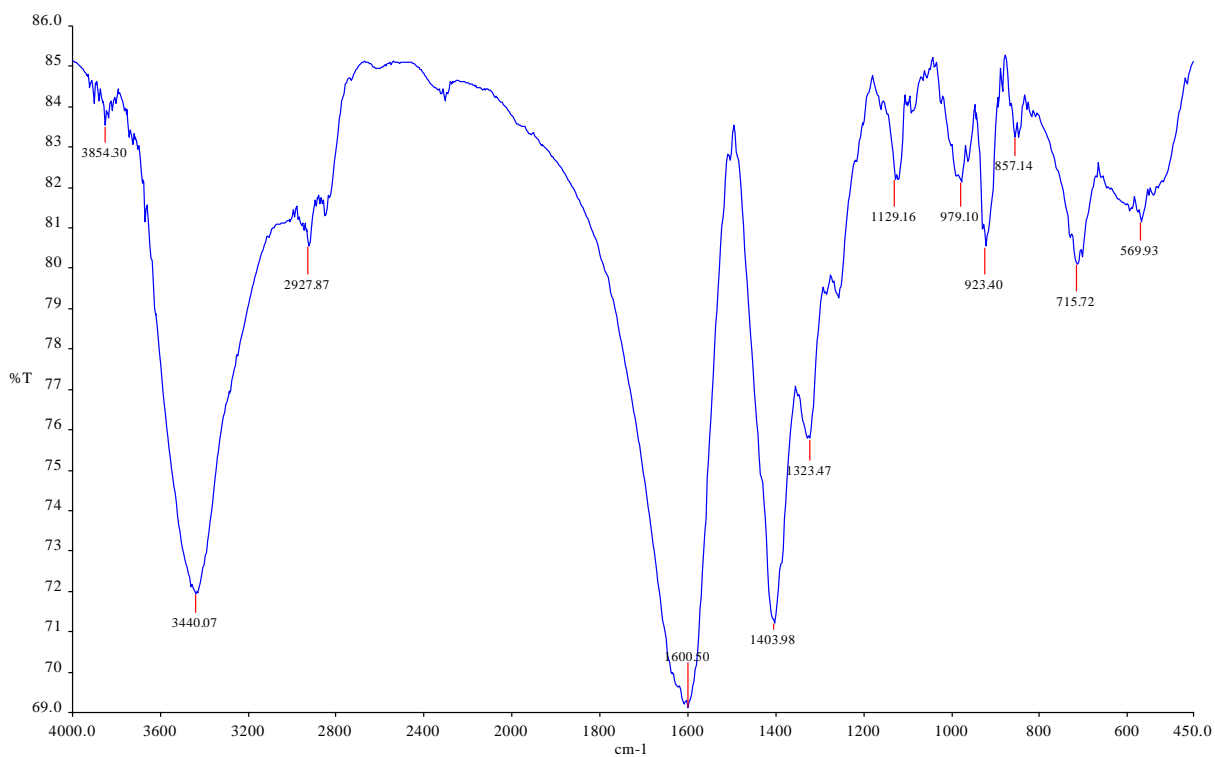


б)

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



а)



б)

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

6. ДИСКУСИЈА

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

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

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

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

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

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

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

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

У овој студији количина створеног преципитата после испирања 5,25% NaOCl и финалног испирања 2% CHX је била за око 2-3 пута већа од количине преципитата створеног у другим испитиваним групама. Ипак, значајна разлика у колични преципитата између CHX и других група је зебележена само у коронарној и средњој трећини у ондосу на MTAD групу и у апексној трећини у односу на QMiX и MTAD групу, што је вероватно последица високих стандардних девијација у свакој од испитиваних група. Такође, резултати нашег истраживања су показали да количина преципитата у EDTA + CHX и QMiX групи се нису значајно разликовале, али је преципитат у EDTA + CHX групи био скоро двоструко већи. Ови налази се могу објаснити мањом количином CHX у QMiX раствору, јер интеракција између NaOCl и CHX и стварање преципитата не зависи само од концентрације NaOCl (17) већ и од концентрације CHX (263). Из истог разлога се може претпоставити да испирање канала

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

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

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

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

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

У складу са резултатима других истраживања (22, 281, 293) значајна разлика у продору боје између трећина је забележена у свим групама, укључујући и контролну групу, са највећом пенетрацијом боје у коронарној а најмањом у апексној трећини

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

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

Преципитат уочен на површини дентина у овом истраживању је даље подвргнут ЕДС анализи у циљу потврде преципитата и одређивања његовог хемијског састава. У СНХ групи ЕДС анализа преципитата је показала постојање значајно више Cl у поређењу са преципитатом формираним у другим групама и вредностима Cl у дентину канала корена (контролна група). Слично овим налазима *Prado* и сар. (279) су такође показали висок ниво Cl и присуство N и C у хемијском размазном слоју (преципитату) насталом после комбиновања NaOCl и СНХ. Узимајућу у обзир да ови елементи улазе у састав СНХ (C₂₂H₃₀Cl₂N₁₀) аутори су претопоставили да је преципитат резултат деградације СНХ оксидативним деловањем NaOCl (261). У прилог томе говоре и налази о одсуству N и ниском нивоу Cl у размазном слоју који је резултат инструментације као и на чистој површини дентина (261). И у овом истраживању у контролним узорцима који су испирани NaOCl и дестилованом водом није детектован N док је Cl био присутан у малим количинама. Занимљиво је истаћи да се хемијски састав преципитата створеног у EDTA + СНХ групи није разликовао од оног насталог у QMiX групи, што не изненађује узимајући у обзир да QMiX у свом саставу садржи EDTA и СНХ. Међутим, преципитат у овим групама се по свом хемијском саставу није значајно разликовао ни од оног нађеног у СНХ групи, осим за вредност Cl. Могло би се претпоставити да се сличне реакције одвијају после иригације канала 5,25% NaOCl и финалне иригације 2% СНХ, 17% EDTA + 2% СНХ и QMiX, односно да преципитат настао у тим интеракцијама је вероватно последица интеракције NaOCl и СНХ пре него интеракције EDTA и СНХ, како је и раније сугерисано од стране истраживача (261). Ипак, узимајући у обзир да је ово прво истраживање у којем је анализиран хемијски састав преципитата после иригације канала 5,25% NaOCl и финалне иригације 17% EDTA + 2% СНХ и QMiX није могуће спровести додатна поређења и анализе.

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

P, Mg, Cl и Na између апексне и коронарне трећине. Тачан узрок ових разлика још увек није јасан, али указује да хемијске реакције које се дешавају између NaOCl и MTAD се значајно разликују од оних који укључују NaOCl и CHX.

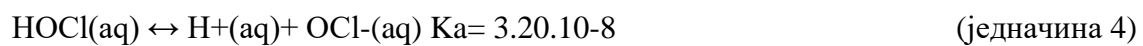
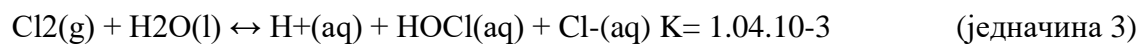
У воденом раствору CHX може постепено да хидролизује и формира PCA. Стога мешање CHX и NaOCl може да узрокује хидролизу CHX на мање фрагменте. Према неким претпоставкама прво долази до кидања везе између угљеника и азота због мале дисоцијационе енергије везе између ова два атома. Услед ове дисоцијације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

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



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





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

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



7. ЗАКЉУЧЦИ

1. Иригација канала корена 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX, 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD праћена је стварањем преципитата на површини дентина канала корена и у дентинским тубулима. Преципитат није нађен после испирања канала корена 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група). Највећа количина преципитата створена је у коронарној, а најмања у апексној трећини канала корена у свакој од испитиваних комбинација ириганаса, без разлика по коренским трећинама.
2. После иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX количина створеног преципитата у коронарној трећини канала корена је била значајно већа у поређењу са оним створеним после иригације 1,3% NaOCl и MTAD; у средњој трећини је била значајно већа у односу на преципитат створен после иригације 5,25% NaOCl и QMiX, док је у апексној трећини количина преципитата после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX била значајно већа у поређењу са оним насталим после иригације 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD.
3. Број затворених дентинских тубула на површини канала корена после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX је у свим коренским трећинама био значајно већи у поређењу са бројем затворених дентинских тубула после испирања 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група), 5,25% NaOCl и QMiX и 5,25% NaOCl и MTAD. Број затворених дентинских тубула у коронарној трећини је био значајно већи од оног после испирања 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD и у средњој трећини значајно већи од оног после испирања 5,25% NaOCl и QMiX.
4. У испитиваним комбинацијама ириганаса највећи број затворених дентинских тубула је нађен у апексној, а најмањи у коронарној трећини, са значајном разликом између коронарне и апексне трећине после иригације 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX и 1,3% NaOCl и MTAD, као и између коронарне и других трећина после иригације 5,25% NaOCl и QMiX.
5. Значајно већа пенетрација боје у дентинске тубуле у коронарној трећини је уочена после иригације 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група),

5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD у односу на иригацију 5,25% NaOCl и 2% CHX. У средњој трећини у свим испитиваним комбинацијама ириганаса је забележена значајно већа пенетрација боје него после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, док је у апексној трећини већа пенетрација боје уочена после иригације 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група) у односу на све остале комбинације ириганаса, као и после иригације 5,25% NaOCl и QMiX и 1,3% NaOCl и MTAD у поређењу са иригацијом 5,25% NaOCl и 2% CHX.

6. Највећа пенетрација боје је забележена у коронарној, а најмања у апексној трећини канала корена у свакој од испитиваних комбинација ириганаса, укључујући и испирање 5,25% NaOCl и дестилованом водом (контролна група), са значајном разликом између коренских трећина.
7. ЕДС анализа је показала да преципитат настао после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX садржи значајно више Cl у поређењу са преципитатом формираним у другим групама и вриједностима Cl у дентину канала корена (контролна група). Преципитат који је формиран после иригације канала 1,3% NaOCl и MTAD се у односу на онај после финалне иригације QMiX разликовао у количини Ca, P, S, Cl и Na, док се у односу на преципитат настао после финалне иригације 2% CHX и 17% EDTA + 2% CHX разликовао и по количини Mg и O.
8. Састав хемијских елемената у створеном преципитату после иригације 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA + 2% CHX и 5,25% NaOCl и QMiX у апексној и коронарној трећини канала се није разликовао осим за вредност Cl после испирања 5,25% NaOCl и 2% CHX. Значајне разлике у количини Ca, P, Mg, Cl и Na у преципитату су уочене после иригације 1,3% NaOCl и MTAD између апексне и коронарне трећине.
9. Након мешања 5,25% NaOCl и 2% CHX, 5,25% NaOCl и QMiX, 5,25% NaOCl и 17% EDTA као и 2% CHX и 17% EDTA формиран су таложни нуспродукти који према TLC, ¹H NMR и IR анализи не садрже PCA.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Fernández R1, Cadavid D, Zapata SM, Alvarez LG, Restrepo FA. Impact of three radiographic methods in the outcome of nonsurgical endodontic treatment: a five-year follow-up. *J Endod*. 2013;39(9):1097-1103.
2. Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;112(6):825-842.
3. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997;30(5):297-306.
4. Dalton BC, Ørstavik D, Phillips C, Pettiette M, Trope M. Bacterial reduction with nickel-titanium rotary instrumentation. *J Endod* 1998;24(11):763-767.
5. Heling II, Chandler NP. Antimicrobial effect of irrigant combinations within dentinal tubules. *Int Endod J*. 1998;31(1):8-14.
6. Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J* 2014; 216(6):299-303.
7. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JA. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. *J Endod* 2012; 38(4):426-431.
8. Nogo-Zivanovic D, Bjelovic Lj, Ivanovic V, Kanjevac T, Tanackovic I. Consideration of therapeutic possibilities of irrigants in endodontic therapy. *Ser J Exp Clin Res* 2018; in press [DOI:10.1515/SJECR-2016-0095].
9. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32(5):389-398.
10. Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002; 28(1):17-19.
11. Mohammadi Z, Abbott PV. Antimicrobial substantivity of root canal irrigants and medicaments: a review. *Aust Endod J* 2009; 35(3):131-139.
12. Rôças IN, Siqueira JF Jr. Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study. *J Endod* 2011;37(2):143-150.
13. Souza MA, Montagner A, Lana DL, Vidal CM, Farina AP, Cecchin D. Comparative evaluation of the retaining of QMix and chlorhexidine formulations on human dentin: a chemical analysis. *Clinical Oral Investigations* 2016; doi:10.1007/s00784-016-1837-9.
14. Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Katterring JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod* 2003;29(6):400-403.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

