

# Antimikrobni učinak i citotoksičnost materijala za punjenje korijenskog kanala

---

**Brekalo Pršo, Ivana**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2002**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Rijeka, Faculty of Medicine / Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:188:208187>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-02-02**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the University of Rijeka Library - SVKRI Repository](#)



**SVEUČILIŠTE U RIJECI  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Ivana Brekalo**

**ANTIMIKROBNI UČINAK I CITOTOKSIČNOST MATERIJALA ZA  
PUNJENJE KORIJENSKOG KANALA**

**Doktorska disertacija**

**Rijeka, 2002.**



## I AUTOR

---

Ime i prezime : Ivana Brekalo

Datum i mjesto rođenja.: 5. siječnja 1970. Rijeka

Završeni fakultet : Medicinski fakultet Rijeka-Stomatološki studij,1993.

Postdiplomski studij: Medicinski fakultet Rijeka, 1998.

Sadašnje zaposlenje: asistent Medicinskog fakuleta u Rijeci

---

## II PODACI O DISERTACIJI I MENTORIMA

---

Naslov rada: Antimikrobni učinak i citotoksičnost materijala za punjenje korjenskog kanala

Broj str. 88, sl. 17, tab. 9, bibliografskih podataka: 139

Ustanova ili mjesto gdje je disertacija izrađena: – Medicinski fakultet u Rijeci

Znanstveno područje: BIOMEDICINA I ZDRAVSTVO

Znanstveno polje: Stomatologija

Znanstvena grana:

Mentori: doc.dr.sc. Maja Abram

Fakultet na kojem je obranjena: Medicinski fakultet Rijeka

---

## III OCJENA I OBRANA

---

Datum prijave teme: 27. rujna 1999.

Datum predaje rad: 3. rujna 2002.

Datum sjednice Vijeća na kojoj je rad prihvaćen: 19. studenoga 2002.

Sastav Povjerenstva koje je rad ocijenilo

doc.dr.sc. Sonja Pezelj-Ribarić, prof.dr.sc. Ivica Anić, prof.dr.sc. Miljenko Dorić,

nasl.doc.dr.sc. Tomislav Tamarut

Datum obrane : 3. prosinca 2002.

Sastav Povjerenstva pred kojim je rad obranjen: doc.dr.sc. Sonja Pezelj-

Ribarić,prof.dr.sc. Ivica Anić, prof.dr.sc. Miljenko Dorić, nasl.doc.dr.sc. Tomislav

Tamarut i doc.dr.sc. Maja Abram

---

Mentor rada: Doc. dr. sc. Maja Abram

Doktorska disertacija obranjena je dana \_\_\_\_\_ na Medicinskom fakultetu

Sveučilišta u Rijeci, pred povjerenstvom u sastavu:

- 1.
- 2.
- 3.
- 4.

Rad ima 88 listova.

UDK klasifikacija:

Rad je izrađen na Zavodu za mikrobiologiju i parazitologiju i Katedri za oralnu patologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci u sklopu projekta 0062058 «Biološki učinci stomatoloških materijala» pod vodstvom doc. dr. sc. Sonje Pezelj-Ribarić.

Iskreno se zahvaljujem svom mentoru doc. dr. sc. Maji Abram koja me potaknula na ostvarenje ovog rada i pri tome mi pomagala brojnim i dragocjenim stručnim savjetima.

Veliko hvala upućujem pročelniku Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju Medicinskog fakulteta u Rijeci prof. dr. sc. Miljenku Doriću koji mi je omogućio rad na svom Zavodu i pružio nesebičnu pomoć.

Hvala i svim ostalim djelatnicima Zavoda za mikrobiologiju i parazitologiju na razumijevanju, a osobito Ivani Tokmadžić, dr. med. na požrtvornosti i pomoći glede tehničkog ostvarenja rada.

Zahvaljujem se doc. dr. sc. Tomislavu Tamarutu na susretljivosti i korisnim savjetima, kao i svojim kolegama s Dentalne patologije.

Posebno hvala mojoj kolegici doc. dr. sc. Sonji Pezelj-Ribarić koja je, kao i uvijek do sada, bila moja stručna i moralna podrška u svakom trenutku.

Najveću zahvalnost dugujem svojoj obitelji koja me podržava u svim mojim dobrim nastojanjima.

## SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** Ocijeniti biokompatibilnost tri po sastavu različita standardna stomatološka materijala za trajno punjenje korijenskih kanala na funkcije mišjih makrofaga, citotoksični učinak te antimikrobnu aktivnost.

**Materijal i metode:** Rabljena su tri materijala za punjenje korijenskih kanala: Apexit, AH Plus i Ketac Endo. Za ocjenu njihovog učinka na makrofagnu aktivnost rabljeni su makrofazi BALB/c miševa. Miševima je u trbušnu šupljinu injiciran RPMI medij. Miševi su bili žrtvovani u vremenskim razdobljima od 2, 7 i 14 dana. Peritonealni makrofazi su sakupljeni za procjenu njihove aktivnosti testovima adherencije, fagocitoze, kandidacidnim i Nitro blue tetrazolium testom (NBT). Citotoksičnost navedenih materijala ispitana je na *in vitro* modelu kulture mišjih fibroblasta (L 929). Materijali su inkubirani zajedno s L 929 stanicama u pločicama s 12 zdenaca u razdobljima od 1, 6, 20 i 24 sata, te se pod svjetlosnim mikroskopom promatrala promjena u broju i morfologiji stanica. Antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskih kanala ispitivan je uporabom testa izravnog dodira (DCT), testa difuzije u agaru (ADT) i testa preživljavanja u bujonu (BST). Bakterijska suspenzija spravljena je od sojeva: *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Rast mikroorganizama ocijenjivan je u razdobljima od 1, 6, 20 i 24 sata ocjenom broja jedinica koje tvore kolonije po ml (CFU/ml). Za ADT, mjerene su zone bakterijske inhibicije oko materijala. Zdenci s bakterijskom suspenzijom služili su kao pozitivna kontrola, a zdenci s materijalom (bez bakterijske suspenzije) kao negativna kontrola.



**Rezultati:** Sve tri vrste materijala za punjenje korijenskih kanala imale su utjecaj na aktivnost makrofaga *in vitro*. Ketac Endo je, u odnosu na kontrolu, u prvih 48 sati djelovao poticajno na sve ispitivane funkcije makrofaga ( $p \leq 0,05$ ) ali je nakon 7 i 14 dana taj učinak jenjavao. Testiranjem post-hoc testom (LSD) u ukupnom vremenskom razdoblju razlike između testiranih materijala nisu znakovite. Adherencija materijala Ketac Endo između 2. i 14. dana znakovito pada za razliku od kontrole i preostala dva materijala ( $p \leq 0,05$ ). Ostali materijali su u opisanom ocijenjivanom razdoblju suzbijali sposobnost adherencije i fagocitoze makrofaga, a poticajno su djelovali na sposobnost makrofaga za uništavanje *Candida albicans*. Usporedbom svih ispitivanih testova u Pearson-ovoj korelaciji izračunata je statistički znakovito pozitivna povezanost između indeksa fagocitoze i NBT indeksa ( $p \leq 0,05$ ). U dodiru sa stanicama fibroblasta, svježe zamiješani Ketac Endo i AH Plus su pokazali visoku razinu citotoksičnosti. Najmanju toksičnost pokazao je Apexit ( $p \leq 0,05$ ). Rezultati DCT-a su pokazali da AH Plus i Ketac Endo iskazuju značajno bolji antimikrobni učinak od Apexita kroz 24 sata ( $p \leq 0,05$ ). AH Plus je nakon 20 sati u potpunosti spriječio rast svih ispitivanih mikroorganizama. Uporabom ADT testa, Ketac Endo je pokazao veću zonu inhibicije bakterijskog rasta od AH Plus i Apexita. Primjenom testa BST, svježe zamiješani Apexit iskazao je snažni antibakterijski učinak, osobito prema Gram-negativnim vrstama, dok stvrdnuti Apexit nije imao nikakav inhibitorni učinak na *Candida albicans*.

**Zaključak:** Materijali za trajno punjenje korijenskih kanala utječu na funkcije makrofaga *in vitro* u različitim ispitivanim vremenskim periodima. Ketac Endo poticajno djeluje na etape u fagocitoznom procesu makrofaga (adherencija, fagocitoza,

kandidicidna i metabolička aktivnost) do sedmog dana. Nakon toga, ove funkcije makrofaga su u opadanju ( $p \leq 0,05$ ). AH Plus djeluje inhibitorno na proces adherencije i fagocitoze nakon 14-og dana, ali potiče mikrobicidnu aktivnost makrofaga prema 14-om danu ( $p \leq 0,05$ ). Apexit smanjuje sposobnost adherencije i fagocitoze makrofaga tijekom inkubacije. Kandidicidna aktivnost također je u opadanju ( $p \leq 0,05$ ). Najsnažniji antimikrobni učinak u testu izravnog dodira (DCT) i testu difuzije u agaru (DCT) ispoljavaju Ketac Endo i AH Plus, a Apexit najslabiji. Utjecajem na živu stanicu i funkcije makrofaga, ovi materijali u kliničkim uvjetim mogu stoga utjecati na funkcije u procesu cijeljenja periapeksnog tkiva.

**Ključne riječi:** materijali za punjenje korijenskog kanala, biokompatibilnost, antimikrobni učinak

## SUMMARY

**Objectives:** To investigate the biocompatibility of three different root canal sealers by studying their influence on macrophage functions and cytotoxic effect in cell culture model. We also evaluated the antimicrobial properties of these materials by using: agar diffusion test, direct contact test and broth survival test.

**Material and Methods:** Root canal filling materials tested were Apexit, AH Plus and Ketac Endo. To evaluate their effect on macrophage function, we used BALB/c mice as a source of inflammatory macrophages. Mice were injected intraperitoneally with RPMI medium and sacrificed 2, 7 and 14 days later. Peritoneal macrophages were collected and its function was evaluated by calculating the adherence, fagocytic, candidacidal and Nitro blue tetrazolium (NBT)-dye assay. An *in vitro* cell culture model of mouse skin fibroblasts (L929) was used to measure the cytotoxicity of these materials. Sealers were incubated with L 929 in a 12-well plate for 1, 6, 20 and 24 hours and the cell morphology and cell number were determined by a light microscope. Antimicrobial activity of the sealers was determined using direct contact test (DCT), agar diffusion test (ADT) and broth survival test (BST). Suspensions of *P. putida*, *S. marcescens*, *S. aureus* and *C. albicans* were prepared and the growth of microorganisms was observed after 1, 6, 20 and 24 hours and expressed as colony forming units per ml (CFU/ml). For ADT, zones of inhibition of bacterial growth were measured.

**Results:** All three types of sealers influenced macrophage activity *in vitro*. Ketac Endo enhanced all macrophage functions at the first 48 hours ( $p \leq 0,05$ ), when compared to the control, but this effect had changed after 7 and 14 days, causing inhibition of these

functions. Using post-hoc test (LSD) at all times tested, there were no statistically significant differences between tested materials. The adherence index of Ketac Endo decreased significantly ( $p \leq 0,05$ ) when compared to the control and other two materials. Other materials tested suppressed substrate adherence capacity and phagocytosis, while increased the capacity of macrophage ingestion of *Candida albicans* in a time-dependent manner. Analysing all the macrophage assays, using Pearson-correlation test, it was found the statistically significant positive correlation between phagocytic assay and NBT index ( $p \leq 0,05$ ). In the contact with fibroblast cell line, freshly mixed Ketac Endo and AH Plus showed high level of cytotoxicity. The least cytotoxic sealer was Apexit ( $p \leq 0,05$ ). The results of the DCT showed that AH Plus and Ketac Endo had a significantly better antimicrobial effect than Apexit at 24 hours ( $p \leq 0,05$ ). AH Plus completely inhibited the growth of all strains tested after 20 hours. When assessed with the ADT, Ketac Endo was capable of producing a larger inhibition zone than AH Plus and Apexit. By employing BST, freshly mixed Apexit caused consistent inhibitory effect on bacterial growth, especially on Gram-negative rods, while aged Apexit showed no inhibitory effect on *Candida albicans*.

**Conclusion:** Root canal filling materials influence macrophage behaviour and cell viability *in vitro* in different time intervals. Ketac Endo has stimulative effect in every stage of macrophage phagocytic process (adherence, phagocytosis, candidacidal and metabolic activity) during 7 days of incubation. After 7 days, this effect on macrophage function is reduced. AH Plus inhibits substrate adherence and phagocytic



capacity, but stimulates the microbicidal activity of macrophages at 14 days ( $p \leq 0,05$ ). Apexit shows inhibitory effect on adherence capacity and phagocytosis during time interval, as well as on its candidacidal capacity ( $p \leq 0,05$ ). Using the ADT and DCT, Ketac Endo and AH Plus have the greatest antimicrobial activity and Apexit the lowest. These effects on live cells and macrophage function may have important clinical implications by modulating immune and inflammatory reactions in periapical tissue.

**Key words:** root canal sealers, biocompatibility, antimicrobial effect

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b>	1
<b>1.1. Endodontska terapija</b>	1
<b>1.2. Materijali za punjenje korijenskog kanala</b>	3
1.2.1. Cementi za punjenje korijenskog kanala	4
1.2.1.1. <i>Cementi na bazi cink-okid eugenola</i>	4
1.2.1.2. <i>Sintetski cementi</i>	5
1.2.1.3. <i>Biološki cementi</i>	6
1.2.1.4. <i>Ostali cementi</i>	8
1.2.2. Značenje antimikrobnog učinka materijala za punjenje korijenskog kanala	9
<b>1.3. Mikrobiologija usne šupljine</b>	11
1.3.1. Čimbenici virulencije mikroorganizama	12
1.3.2. Čimbenici obrane organizma na prisutnost mikroorganizama i njihovih produkata	14
1.3.3. Značaj mikroorganizama u upali pulpe i periapiksa	16
1.3.3.1. <i>Putevi ulaska mikroorganizama u pulpu</i>	19
<b>1.4. Djelovanje materijala na obrambeni sustav domaćina</b>	21
<b>1.5. Uloga makrofaga u imunološkoj slici upale</b>	22
1.5.1. Fenotipska obilježja makrofaga	23
1.5.2. Uloga makrofaga u urođenoj obrambenoj reakciji tkiva	26
1.5.2.1. <i>Kemotaksija</i>	26
1.5.2.2. <i>Adherencija</i>	27
1.5.2.3. <i>Fagocitoza i uništavanje mikroorganizama</i>	28
1.5.3. Reakcija makrofaga na izravni dodir s materijalima za punjenje korijenskog kanala	29

<b>2. CILJ ISTRAŽIVANJA</b>	31
<b>3. MATERIJAL I METODE</b>	32
<b>3.1. Materijali za punjenje korijenskog kanala</b>	32
<b>3.2. Eksperimentalne životinje</b>	32
<b>3.3. Ispitivanje aktivnosti makrofaga</b>	33
3.3.1. Prikupljanje peritonealnih makrofaga	33
3.3.2. Test adherencije makrofaga na plastičnu površinu	33
3.3.3. Test fagocitoze	34
3.3.4. Mikrobicidna aktivnost makrofaga (Killing test)	34
3.3.5. Ispitivanje metaboličke aktivnosti makrofaga (NBT test)	35
<b>3.4. Ispitivanje citotoksičnosti u kulturi stanica</b>	36
3.4.1. Postupak određivanja citotoksičnosti	36
<b>3.5. Ispitivanje antimikrobnog učinka materijala za punjenje korijenskog kanala</b>	37
3.5.1. Test difuzije u agaru (ADT)	37
3.5.2. Test izravnog dodira (DCT)	38
3.5.3. Test preživljavanja u bujonu (BST)	39
<b>3.6. Statistička obrada</b>	40
<b>4. REZULTATI</b>	41
<b>4.1. Aktivnost makrofaga</b>	41
4.1.1. Adherencija	41
4.1.2. Fagocitoza	43
4.1.3. Mikrobicidna sposobnost makrofaga	45
4.1.4. Metabolička aktivnost makrofaga	46
4.1.5. Utjecaj materijala na makrofagne funkcije	48

<b>4.2. Citotoksičnost materijala za punjenje korijenskog kanala</b>	<b>52</b>
4.2.1. Određivanje broja stanica	52
4.2.2. Morfološke promjene stanica	53
<b>4.3. Antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskog kanala</b>	<b>56</b>
4.3.1. Test difuzije u agaru (ADT)	56
4.3.2. Test preživljavanja u bujonu (BST)	57
4.3.3. Test izravnog dodira (DCT)	58
<b>5. RASPRAVA</b>	<b>65</b>
<b>6. ZAKLJUČAK</b>	<b>75</b>
<b>7. LITERATURA</b>	<b>76</b>

## 1. UVOD

### 1.1. Endodontska terapija

Endodontska terapija je usmjerena k uklanjanju inficiranog materijala iz korijenskog kanala i periapeksnog tkiva i sprječavanju reinfekcije istog. Budući da se radi o patogenim uzročnicima upale, za njihovo uklanjanje vrijede sva medicinska pravila "kirurškog čišćenja rane" što obuhvaća: temeljito odstranjenje mikroorganizama i njihovih produkata, detritusa, hranidbenog supstrata te sprječavanje ili prevencija bakterijskog razmnožavanja (1). To se postiže biomehaničkim čišćenjem korijenskog kanala koje, ovisno o slučaju, može obuhvaćati instrumentaciju kanala, uporabu lijekova ili otopina za ispiranje, elektrolizu ili kirurški zahvat, te njegovim potpunim, trodimenzionalnim punjenjem. Iako se ovim zahvatima nedvojbeno smanjuje broj živih mikroorganizama u korijenskom kanalu, složena anatomija kanalnog sustava, osobito apeksne delte, onemogućuje njegovo potpuno čišćenje (2). Naime, čišćenjem, širenjem i ispiranjem endodontskog prostora dezinfekcijskim otopinama ne postiže se potpuna sterilnost prostora korijenskog kanala (3).

U skladu s ranijim spoznajama Schilder-a (4), Weine-a (1), Bence-a (5), svaka endodontska terapija se može podijeliti u tri osnovne etape. Prva je dijagnostička u kojoj se određuje vrsta oboljenja i plan terapije. U drugoj se uklanja inficirani sadržaj uz oblikovanje korijenskog kanala i time se priprema za posljednju etapu hermetičnog punjenja navedenog prostora odabranim materijalom (1). Svi navedeni postupci liječenja korijenskog kanala moraju se provoditi u strogo aseptičkim uvjetima.

Posljednja etapa endodontske terapije je punjenje obrađenog endodontskog prostora, anatomski složenog sustava korijenskog kanala, hermetičnim nenadražujućim materijalom. Osnovni cilj svakog endodontskog liječenja je potpuno ispunjenje navedenog prostora sa



savršenim brtvljenjem, naročito apeksnog dijela korijena na cementno-dentinskoj granici (6). Takvim hermetičnim i trodimenzionalnim ispunjenjem kanalnog prostora stvaraju se uvjeti za ostvarenje osnovnih zahtjeva endodontske terapije: sprječavanje ulaska periapexnog sadržaja u kanalni prostor i njegovo zadržavanje, što uzrokuje reinfekciju korijenskog kanala i periapiksa. Time se sprječava preživljavanje i razmnožavanje zaostalih bakterija i stvaranje bioloških uvjeta pogodnih za proces cijeljenja periapexnog tkiva (7). Iako se biomehaničkim čišćenjem nastoji u potpunosti ukloniti infekcija i ostaci pulpnog tkiva, često je postupak neuspješan, stoga je i neuspješno ostvarenje cilja: sterilnost kanalnog prostora. Zbog toga mikroorganizmi često zaostaju izolirani u sustavu korijenskog kanala, a najčešće unutar dentinskih kanalića. Tako smješteni, oni su nedostupni tkivnim fagocitima, a nekrotični ostaci pulpe u korijenskom kanalu služe im za preživljavanje (8). Ukoliko se, međutim, cijeli endodontski sustav hermetično i trodimenzionalno ispuni, zaostali mikroorganizmi ostati će "zarobljeni" u dentinskim kanalićima između korijenskog cementa s jedne i kanalnog punjenja s druge strane, bez mogućnosti preživljavanja.

Brojni autori smatraju ovu posljednju etapu endodontske terapije najkritičnijom i uzrokom većine terapijskih neuspjeha (9,10,11). Međutim, razlozi zbog kojih dolazi do nadražaja tkiva oko korijena, a time i do neuspjeha u liječenju korijenskog kanala su višestruki: izvedbene pogreške (netočno određivanje dužine korijenskog kanala, "zipping", perforacije i sl.), nedovoljno oblikovanje i "debridman", vertikalni lom korijena, uznapredovalo parodontno oštećenje, loša nadogradnja zuba (12). Stoga su za potpuni uspjeh endodontske terapije jednako važne sve nabrojene etape u liječenju pulpnog i parodontnog tkiva.

## 1.2. Materijali za punjenje korijenskog kanala

Na tržištu postoji veliki broj materijala za punjenje korijenskog kanala koji se razlikuju po svom sastavu i čija su se svojstva i način primjene mjenjali tijekom godina. Brojni materijali su tijekom vremena izbačeni iz kliničke uporabe jer su se pokazali kao neprikladni, nadražujući ili biološki neprihvatljivi. Idealni materijal za punjenje korijenskog kanala trebao bi, prema Grossman-ovoj preporuci (13), imati sljedeća svojstva:

- jednostavno unošenje u korijenski kanal
- dobro zatvaranje korijenskog kanala lateralno i apikalno
- nepromjenjivost volumena nakon unošenja u kanal
- nepropustnost za vlagu
- baktericidno ili bakteriostatsko djelovanje
- rentgen kontrastnost
- nemogućnost promjene boje zubnog tkiva
- nenadražajno djelovanje na periapeksno tkivo
- mogućnost sterilizacije
- jednostavnost uklanjanja iz korijenskog kanala.

Još uvijek na tržištu ne postoji materijal koji bi zadovoljavao sve navedene zahtjeve. Danas su u kliničkoj uporabi oni materijali koji zadovoljavaju najviše kriterija. Prvenstveno se moraju izabrati materijali i tehnike s najmanjim rizikom za pacijenta. Najčešće se za punjenje korijenskog kanala rabi gutaperka, kao polukruti materijal, u kombinaciji s odgovarajućim cementom.

### 1.2.1. Cementi za punjenje korijenskog kanala

Cementi za punjenje korijenskog kanala se uvijek rabe u kombinaciji s osnovnim punilom (npr. gutaperka, srebrni štapić i sl.), neovisno o tehnici punjenja korijenskog kanala (14). Zbog toga su fizička svojstva cementa vrlo važna, a njegovo unošenje u korijenski kanal se smatra kritičnom fazom punjenja (12).

Cementi za punjenje korijenskog kanala služe kao sredstva koja popunjavaju prazne prostore između gutaperka štapića i stijenke korijenskog kanala; kao sveza između glavnog i pomoćnog gutaperka štapića; kao punilo koje može ispuniti sve prostore u koje ne može dospjeti gutaperka štapić i kao podmazivač koji smanjuje trenje i olakšava unošenje krutog ili polukrutog sredstva za punjenje u korijenskom kanalu (1,6). Iz tog razloga cimente treba unositi u minimalnim količinama i u kemijski inertnom obliku jer predstavlja slabi dio punjenja. Glede kemijskog sastava, cementi se dijele na: sintetske, biološke, cimente na bazi cink-oksida i ostale cimente (12).

#### 1.2.1.1. Cementi na bazi cink-oxid eugenola

Osnovna prednost cementa na bazi cink-oxid eugenola (ZOE) je njihova duga povijest uspješne primjene u stomatologiji, osobito za punjenje korijenskog kanala mliječnih zubi. Tijekom tako duge kliničke primjene pozitivna svojstva tih cemenata nadišla su njihove negativne aspekte (neadhezivnost, topivost i sl.).

Najčešće rabljeni cement iz ove skupine je cement Grossmanove formule (tekućina: eugenol; prašak: cink-oxid, bizmut-karbonat, barij-sulfat, natrij-borat) jer pokazuje vrlo mali stupanj nadraživanja tkiva i visoku razinu antimikrobnog učinka (6). Dobra svojstva ovog cementa su njegova plastičnost i relativno dugo vrijeme stvrdnjavanja, što se pripisuje natrij-boratu. Ima i



dobru sposobnost brtvljenja, uz vrlo male dimenzionalne promjene tijekom stvrdnjavanja. Međutim, u dodiru s vodom iz dentinskih kanalića, cink-eugenat se razgrađuje otpuštajući postupno eugenol, što Grossman navodi kao nadražujuće djelovanje, a ujedno čini materijal nestabilnim. Mogućnost resorpcije ovog cementa ima jedino prednost u slučaju protiskivanja materijala u periapeks tijekom kanalnog punjenja. Das (15) smatra da eugenol nije jedini odgovoran za nadražujuće djelovanje cementa, ukazujući na mogući toksični učinak cinkovih iona iz cink-oksida. Pokazalo se da je upalna reakcija periapeksnog tkiva i citotoksično djelovanje ZOE cementa najizraženije u vrijeme stvrdnjavanja materijala, te se smanjuje tijekom vremena, tj. dok se višak eugenola i čestica cink-oksida ne fagocitiraju od strane makrofaga (16).

#### *1.2.1.2. Sintetski cementi*

Ovi materijali u svojoj osnovi sadrže sintetske smole. Najpoznatiji i najčešće rabljeni tvornički pripravci su Diaket (ESPE, Seefeld, Germany) i AH 26 (Dentsply DeTrey, Milford, USA), kojeg danas sve više zamjenjuje noviji AH Plus (Dentsply DeTrey, Milford, USA).

Diaket je korijenski cement na bazi polivinilske smole u poliketonskom sredstvu. U uporabi je od početka 50-ih godina i pokazao se kao dobro punilo, otporno na apsorpciju vlage i netopivo u organskim otapalima i kloroformu (6). Ispitivanja propusnosti svrstala su Diaket u sredstva s jako dobrim svojstvom brtvljenja korijenskog kanala (17), ali je u dosadašnjim ispitivanjima biokompatibilnosti pokazao određeni stupanj citotoksičnosti na kulturi stanica (18). Zbog dobre podnošljivosti od strane koštanog tkiva danas se sve više rabi kao materijal za apikalno brtvljenje u periradikalnoj kirurgiji jer osigurava brzo cijeljenje i dobro odlaganje kosti i cementa na reseciranom završetku korijena (19).

AH 26 je u stomatološku praksu uveo Schroeder 1954. godine kao materijal na bazi epoksi smole, dobivene miješanjem praha (10% srebrnog praha, 61% bizmut trioksida, 5% titan dioksida i 25% heksametilen tetramina) i tekućine (100% bisfenol diglicidil eter). Brojni autori navode njegove dobre fizikalno-kemijske osobitosti, kao: dimenzionalna stabilnost, radioopacitet, volumna stabilnost, dobro prijanjanje na dentin, mala kontrakcija, antibakterijski učinak i sposobnost hermetičkog brtvljenja (6,20,21). Međutim, uočeno je da ovaj materijal neposredno nakon miješanja može izazvati lokalnu upalnu reakciju tkiva i citotoksično djelovanje, ali se ovi učinci smanjuju nakon potpunog stvrdnjavanja cementa (22). Početna toksičnost pripisuje se srebru i formaldehidu koji se u cement dodaju radi antiseptičkog učinka, a otpuštaju se tijekom procesa stvrdnjavanja materijala (23).

U posljednje vrijeme se na tržištu pojavio novi cement – AH Plus, kao zamjena za AH 26 i koji je, prema navodima proizvođača, boljih svojstava od AH 26. Temeljno je to isti materijal, ali je kemijska struktura epoksi amina kod AH Plus stabilnija pa više nema opasnosti od otpuštanja toksičnih tvari (formaldehid). Istodobno, vrlo dobro prijanja uz dentinske stijenke i zadržava dimenzionalnu stabilnost kroz duže vrijeme (24,25).

### *1.2.1.3. Biološki cementi*

Ovoj skupini pripadaju cementi na temelju kalcij-hidroksida (CH) koji su naziv biološki dobili tumačenjem da vitalno tkivo pruža biološki odgovor na njihovo prisustvo. Kalcij-hidroksid je prvi put u stomatologiju uveo Hermann (26) kao sredstvo za poticanje mineralizacije pri indirektnom i direktnom prekrivanju pulpe. Dugo vremena se vjerovalo da visoki pH kalcij-hidroksida utječe na enzimske pufere i potiče mineralizaciju. Danas je ta pretpostavka odbačena te se primjena CH u endodonciji bazira prvenstveno na njegovoj antibakterijskoj aktivnosti, ali i na drugim biološkim svojstvima, kao što su sposobnost tkivne

topivosti i sprječavanje resorpcije zuba (27) te poticanje zacjeljivanja tkiva (28). Zbog toga se kalcij-hidroksid dodaje raznim endodontskim punilima glede poboljšanja njihovih antibakterijskih svojstava (29). Tvornički pripravci ove grupe cemenata su: Sealapex (KERR, Romulus, MI, USA), Apexit (Vivadent, Schaan, Liechtenstein), CRCS (Hygenic, Akron, Ohio, USA) i drugi, koji se sastoje od dvije paste. Jedna sadrži kalcij-hidroksid ili oksid (akceptor protona), punilo (cink-oksidi), plasticizere i kontrastno sredstvo (barij sulfat), a druga pasta sadrži salicilatni ester (donator protona). Preparati CH u obliku paste se primjenjuju i kao intrakanalni ljekoviti uložak jer se od njih očekuje antimikrobni učinak. Naime, jedno od najvažnijih svojstava CH, bilo u obliku paste ili cementa, je njegovo snažno antibakterijsko djelovanje kroz duže vrijeme, zbog polaganog otpuštanja hidroksilnih iona u vodenom mediju (30,31,32). Zbog njegove visoke pH vrijednosti (11-12,5), veliki broj bakterijskih vrsta izoliranih iz inficiranog korijenskog kanala nestanu nakon neposrednog dodira s pastom ili cementom kroz određeno vrijeme (33). Ipak, ova tvrdnja o snažnom antibakterijskom učinku CH je prilično kontroverzna i zbog toga je temelj brojnih istraživanja u novije vrijeme. Dok pojedina ispitivanja pokazuju da je antibakterijska aktivnost CH neznatna i ograničena visokim pH ovih cemenata (34), neki autori navode da preparati na temelju CH pokazuju antimikrobnu aktivnost koja ovisi o otpuštanju hidroksilnih iona (35,36). Pobornici ove druge tvrdnje smatraju da se hidroksilni ioni otpuštaju u vodenom mediju, te kao slobodni radikali pokazuju jaku reaktivnost i brzo stupaju u reakciju s drugim biomolekulama u okolini (37). Letalni učinak hidroksilnih iona na bakterijsku stanicu iskazuje se u njihovoj sposobnosti blokiranja enzima citoplazmatske membrane bakterija što dovodi do poremećaja hranidbenog lanca (35). Međutim, vrijeme potrebno za potpunu antimikrobnu učinkovitost cementa u izravnom dodiru s bakterijom još uvijek je nepoznato.



Loše svojstvo ovih cemenata je relativno veliki stupanj resorpcije što rezultira nehomogenošću kanalnog ispuna već godinu dana nakon trajnog punjenja (38). Neki autori navode i toksično djelovanje pojedinih materijala iz ove skupine (39,40).

#### 1.2.1.4. Ostali cementi

U potrazi za što boljim materijalom za punjenje korijenskog kanala, pokušalo se s endodontskom primjenom nekih materijala koji se inače rabe u restorativnoj stomatologiji. Pokušaji punjenja korijenskog kanala s cink-fosfatnim, polikarboksilatnim ili kompozitnim cementima pokazali su se neuspješnima (41,42). Iznimka je uspješna endodontska primjena staklo-ionomernih cemenata, npr. Ketac Endo, koje su u endodonciju prvi puta uveli Wilson i Kent 1972. godine (43). Ovi cementi se temelje na reakciji stvrdnjavanja između čestica stakla i vodene otopine poliakrilne kiseline. Staklo-ionomerni cementi vežu se kemijski za dentin i caklinski hidroksil-apatit (44) i otpuštaju fluoridne ione. Ovi cementi su dokazano biološki inertni i nenadražajni za okolno vitalno tkivo, vrlo dobro prijanjaju uz stijenke korijenskog kanala i jednostavni su za kliničku uporabu (45). Glede navedenih svojstava, Pitt Ford (46) je predložio uporabu ovih cemenata, uz gutaperka štapiće, u svrhu punjenja korijenskog kanala budući da je do tada njihova primjena bila ograničena samo na konzervativnu stomatologiju.

Najnoviji materijali koji su uvedeni u endodontsku praksu, uvijek s istim ciljem da se postigne što veća hermetičnost kanalnog ispuna s prirodnim materijalom, su mineral-trioksid agregat (MTA) i hidroksil-apatitni cement. MTA se rabi kao materijal za retrogradno punjenje vrška korijena jer je pokazao najbolju mogućnost brtvljenja reseciranog kanalnog sustava u *in vitro* uvjetima (47). U usporedbi sa standardnim materijalima za brtvljenje korijenskog vrška, ima puno manji stupanj citotoksičnosti te se danas preporuča kao materijal izbora u tu svrhu

(48). Hidroksil-apatit se uspješno primjenjuje u stomatologiji za ispunjavanje koštanih oštećenja zbog dobre biokompatibilnosti, osobito prema parodontnom tkivu (49,50). Roane i Benenati navode uspješnu primjenu ovog cementa u liječenju oštećene furkacije višekorijenskih zuba (51). U svrhu trajnog ispuna korijenskog kanala, hidroksil-apatitni cement se rabi tek 15-ak godina i stoga su potrebna daljnja ispitivanja glede njegove šire primjene.

### 1.2.2. Značenje antimikrobnog učinka materijala za punjenje korijenskog kanala

Endodoncija je temeljno klinička disciplina usmjerena prema sprječavanju i kontroli infekcije korijenskog kanala. Stoga i završna etapa kanalnog liječenja ima važnu ulogu u nadzoru endodontskih infekcija. Čvrstim apikalnim, lateralnim i koronarnim brtvljenjem sprječava se prodor sline i periapeksne tekućine, ali se i onemogućava prehrana zaostalih mikroorganizama. Glede potpunog ostvarenja uspješne endodontske terapije vrlo je važna mikrobicidna aktivnost punila. Njihov antimikrobni učinak znatno pomaže uklanjanju zaostalih mikroorganizama koji nisu bili odstranjeni kemomehaničkom obradom i intrakanalnim lijekovima (52). Jednaku važnost antimikrobni učinak ima i na sprječavanje ponovne kanalne infekcije i poticanje procesa cijeljenja apeksnog i periapeksnog tkiva (53). Zbog toga pri izboru materijala koji se rabe kao lječkoviti kanalni ulošci i materijala za trajni ispun endodontskog prostora uvijek treba dati prednost onima s dokazanim antimikrobnim učinkom.

Procjenjivanje antimikrobnog učinka tih materijala provodi se različitim *in vitro* i *in vivo* testovima prema različitim vrstama pravih i fakultativno anaerobnih mikroorganizama, budući da su dosadašnja istraživanja pokazala njihovu prevagu u inficiranim korijenskim kanalima. Radi se o gram-pozitivnim i gram-negativnim kokcima i štapićima koji su osobito

prilagođeni preživljavanju u nekrotičnoj pulpi i dentinskim kanalićima gdje je opskrba krvlju i kisikom slaba ili nikakva. Premda na tkivnoj kulturi inficiranog korijenskog kanala prevladavaju pravi anaerobi (~90%), svojstvo inficiranog korijenskog kanala je polimikrobnost u kojoj prevladava međuovisnički odnos pravih s fakultativno anaerobnim i aerobnim mikroorganizmima (54). Zbog toga je vrlo važno testiranje osjetljivosti tih mikroorganizama na izravni dodir s pojedinim materijalima za punjenje korijenskog kanala prisutnih na tržištu. Važnost *in vitro* istraživanja u tu svrhu i njihovih rezultata je u pružanju informacija o antimikrobnom djelovanju materijala na određene mikroorganizme, ali i u preporuci za daljnja *in vivo* istraživanja. Smatra se, naime, da materijali koji ne iskazuju očekivani antimikrobni učinak prema najzastupljenijim mikroorganizmima inficiranog korijenskog kanala ne pružaju odgovarajuće uvjete potrebne za zacjeljivanje periapeksnog tkiva.



### 1.3. Mikrobiologija usne šupljine

U usnoj šupljini se nalazi veliki broj različitih mikroorganizama (više od 500 različitih vrsta) koji su usnu šupljinu, kao i ostale okolini-izložene površine tijela (i unutarnje i vanjske), naselili tijekom rođenja. Mikroorganizmi iz drugih izvora (zrak, voda, hrana) također imaju stalni nesmetani ulaz u usnu šupljinu (55). Usna šupljina je jedinstvena po svojim ekološkim svojstvima jer u njoj postoje različita mjesta za naseljavanje i rast mikroorganizama, kao usne, obrazi, nepce, jezik, gingiva i zubi. Svojstva ovih staništa mijenjaju se tijekom života i nikada nisu stabilna duže vrijeme jer na ovaj ekosustav mogu djelovati brojni vanjski čimbenici, npr. vađenje zuba, unošenje proteze, liječenja zuba (ispuni, primjena antibiotske terapije, kiretaža, poliranje i sl.). Njihova stabilnost uvelike ovisi i o protoku sline te vrsti i učestalosti unošenja hrane (55).

U fiziološkim uvjetima specifična mikroflora usne šupljine je u harmoničnom odnosu s domaćinom. Različite vrste mikroorganizama prilagođavaju se na svoj okoliš načinom prehrane i stvaranjem različitih odnosa s drugim mikroorganizmima. Taj odnos između mikroorganizama može biti simbioza, komenzalizam, antibioza i sinergizam. Odnos mikroorganizma i domaćina navodi se kao parazitarni, što znači da su mikroorganizmi sposobni živjeti i razmnožavati se u ili na domaćinu. Osnovni izvor prehrane mikroorganizama u usnoj šupljini je materijal u okolini zuba, izlučevine, odljuštene epitalne stanice i ponešto slinovnih dijelova. Kao vanjski izvor prehrane služi im hrana koja se unosi u organizam za njegovu prehranu. Ova dva izvora zadovoljavaju zahtjeve koji su neophodni za sintezu protoplazme i razmnožavanje oralnih mikroorganizama. Veliki broj različitih vrsta mikroorganizama našle su svoje idealno obitavalište u usnoj šupljini, ne samo zbog navedenih

izvora prehrane, nego i zbog toga što je usna šupljina idealan inkubator relativno stabilne temperature između 35 i 36° C, uz obilje vlage i kisika.

Već nekoliko sati nakon poroda u usnoj šupljini se može uočiti mikrobna flora koja se sastoji od laktobacila, streptokoka, stafilokoka, enterokoka, najserija i koliformnih bakterija. U ranom djetinjstvu u usnoj šupljini prevladavaju fakultativno anaerobne vrste, dok se s vremenom sve više naseljavaju pravi anaerobi. S pojavom mliječnih zubi uvjeti okoliša usne šupljine se mijenjaju na što se neke mikrobne vrste bolje prilagođavaju, što ponovno dovodi do promjene mikrobne flore. Promjene mikrobiota u odrasloj dobi najčešće su rezultat pojave bolesti, kao npr. karijes i parodontna oboljenja. S gubitkom trajnih zuba smanjuje se broj spiroheta, laktobacila i nekih vrsta streptokoka (56). Kvantitativni i kvalitativni odnosi oralnih mikroorganizama mijenjaju se s pojavom zuba, gubitkom zuba, uporabom zubnih proteza, promjenom prehrane, oralno-higijenskim navikama i stupnju zdravlja ili bolesti organizma.

### 1.3.1. Čimbenici virulencije mikroorganizama

Čimbenici virulencije mikroorganizama su razne tvari (egzotoksini, endotoksini, enzimi, krajnji metabolički produkti, poliamini, antigene tvari itd.) koje su proizvod samih mikroorganizama, a koje im daju sposobnost oštećenja tkiva. Mikroorganizmi koji su doveli do oštećenja tkiva su patogeni, a taj mehanizam patogenosti uključuje utjecaj i promjenu metabolizma stanica domaćina, proizvodnju litičkih čimbenika na stanice domaćina i proizvodnju toksina koji djeluju sistemski na domaćina (56). Stoga se može reći da stupanj virulencije nekog mikroorganizma određuje njegov mehanizam patogeneze, iako je moguće da su neki mikroorganizmi virulentni, ali ne i patogeni, što ovisi o tome u kojem sjedinjenju čimbenici virulencije reagiraju s domaćinom uzrokujući ili ne patološko stanje.



Izazivajući bolest, mikroorganizam mora imati sposobnost prodora u tkivo domaćina, razmnožavati se u ili na njemu, oduprijeti se obrambenim reakcijama organizma i oštetiti tkivo (6). Do oštećenja organa i nastanka bolesti dolazi ukoliko su mikroorganizmi sposobni prijanjati na površinu, najčešće uz pomoć fimbrija koje su važne i za uspostavljanje sinergističkih odnosa između bakterija (57). Adherancija je moguća jedino ako to dozvoljavaju fizičko-kemijska svojstva na obje površine – tkivnoj i površini mikroorganizma. Ovo svojstvo je najvažnije jer omogućava kolonizaciju, daljnji prodor mikroorganizma u dubinu tkiva i izazivanje bolesti.

Kao vrlo važan čimbenik virulencije mikroorganizma spominju se toksini koji, ovisno o svojoj prirodi, količini, brzini otpuštanja, mogu proizvesti razne patološke učinke. Endotoksini su uključeni u patogenezu infekcija izazvanih Gram-negativnim bakterijama neposredno razarajući staničnu membranu i aktivirajući alternativni put komplementa stanice domaćina (58). Bakterije proizvode i izlučuju egzotoksine tijekom života. Vrlo su razornog učinka već u malim količinama, a često djeluju udaljeno od mjesta sinteze.

Patogene bakterije sintetiziraju i enzime sposobne za razaranje stanica domaćina iako njihovo značenje u patogenezi raznih infekcija nije još dovoljno poznato. Osim posredstvom čimbenika virulencije koje sami sintetiziraju, mikroorganizmi mogu i posredno dovesti do oštećenja tkiva, npr. posredstvom procesa kemotaksije. Tako mikroorganizmi mogu u nekim slučajevima potaknuti migraciju polimorfonuklearnih leukocita (PMN) koji se raspadaju i oslobađaju lizosomne enzime oštećujući tkivo domaćina (6).

### 1.3.2. Čimbenici obrane organizma na prisutnost mikroorganizama i njihovih produkata

Reakcija domaćina na patogene mikroorganizme je raznolika i u konačnici može dovesti do zaštite i oporavka tkiva, ali isto tako može biti i štetna ukoliko izlučivanjem upalnih čimbenika od strane stanica-domaćina dođe do većeg oštećenja tkiva. Obrana može biti, kao i svuda u čovječjem organizmu tako i u usnoj šupljini, nespecifična i specifična (Tablica 1). Nespecifičnim mehanizmom obrane nastoji se spriječiti dublje prodiranje mikroorganizama i očuvati normalna flora usne šupljine. Pri tom je vrlo važno sačuvati cjelovitost sluznice koja predstavlja fizičku barijeru prodiranju mikroorganizama i makromolekulskih antigena u dubinu.

Uz očuvanje cjelovitosti mukoznih površina, vrlo je važno i očuvanje uravnotežene flore usne šupljine odnosom između mikroorganizma i domaćina i između samih mikroorganizama. Ukoliko mikroorganizmi normalne flore ne uspiju spriječiti adherenciju patogenih mikroorganizama može doći do prodora patogena u dublje dijelove tkiva gdje započinje nespecifični odgovor djelovanjem fagocita i oslobađanjem upalnih medijatora iz oštećenih stanica (59). U specifičnoj obrani organizma sudjeluju limfociti i specifična protutijela s ostalim topivim medijatorima. Ovom sustavu obrane svojstvena je visoka specifičnost i imunološka memorija koja mu omogućuje da se uspješno bori protiv patogenih mikroorganizama i promijenjenih tjelesnih stanica.

**Tablica 1.** Specifični i nespecifični obrambeni čimbenici usne šupljine (Adaptirano prema: Marsh P, Martin M. Oral microbiology, London, Chapman & Hall; 1992: 12)

Čimbenici obrane	Glavna funkcija
<b>Nespecifični</b>	
Protok sline	Fizičko odstranjenje mikroorganizama
Mucin/aglutinini	Fizičko odstranjenje mikroorganizama
Lizozim-proteaza-anionski sustav	Liza stanica
Laktoferin	Izlučivanje željeza
Apo-laktoferin	Uništavanje stanica
Sialoperoksidaza sustav	Stvaranje hipotiocianita (neutralni pH)
	Stvaranje hipocijanitne kiseline (niski pH)
Histidin-bogati peptidi	Antibakterijsko i antifungalno djelovanje
<b>Specifični</b>	
Unutar-epitelni limfociti	Zapreka prodora bakterija i/ili antigena u stanicu
Langerhansove stanice	Sprječavaju mikrobnu adheziju i metabolizam
IgG, IgA, IgM	Sprječavaju mikrobnu adheziju; Opsonini; aktivacija komplementa
Komplement	Aktivacija neutrofila
Neutrofili/makrofagi	Fagocitoza



### 1.3.3. Značaj mikroorganizama u upali pulpe i periapiksa

Većina pulpnih i periapiksnih oboljenja je rezultat neposrednog ili posrednog utjecaja oralnih mikroorganizama. Potvrdu da su bakterije uzročnici pulpne i periapiksne upale dali su još 1965. godine Kakehashi i sur. (60) koji su dokazali da se nakon neposrednog izlaganja pulpe usnoj šupljini razvila nekroza pulpe i periapiksna upala samo kod štakora s normalnom mikrobnom florom, ali ne i kod "germ-free" štakora.

Mikroorganizmi vrlo brzo i lako mogu prodrijeti u pulpno tkivo uslijed patoloških promjena koje su posljedica poremećaja cirkulacije i obrambenog mehanizma pulpe (upala i imunitet) jer time endodontski prostor postaje pogodan okoliš za njihov metabolizam. Tkivna tekućina i raspadnute stanice iz nekrotičnog pulpnog tkiva su pogodno hranilište za rast i razvoj bakterija, osobito anaerobnih.

Većina infekcija humanog korijenskog kanala je izazvana suradnjom različitih bakterija. Važna uloga u nastanku kliničkih znakova i simptoma pulpnih i periapiksnih oboljenja pripisuje se anaerobnim mikroorganizmima iz roda *Bacteroides* (61). Ishod tih oboljenja ovisi o vrsti i broju bakterija, njihovom međuočnosu i mogućnosti prehrane, vremenu u kojem ispoljavaju svoj utjecaj, kao i o općem i lokalnom obrambenom sustavu (62). Iako je više od 350 različitih vrsta bakterija izolirano iz usne šupljine, relativni mali broj je prisutan u inficiranom pulpnom ili periapiksnom tkivu, a oni najčešći prikazani su tablicom 2.

**Tablica 2.** Najčešće izolirane bakterije iz korjenskog kanala (Adaptirano prema: Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. St. Louis, Mosby-Year book, 1994: 366)

---

Organizmi
<b>Aerobni</b>
<i>Streptococcus salivarius</i>
$\alpha$ -Hemolitički streptokoki
$\gamma$ -Hemolitički streptokoki
<b>Anaerobni</b>
Gram pozitivni koki
<i>Peptococcus intermedius</i>
<i>Peptococcus constellatus</i>
<i>Peptococcus</i> species
<i>Peptostreptococcus micros</i>
Mikroaerofilni streptokoki
Gram-negativni koki
<i>Veillonella parvula</i>
Gram-pozitivni bacili
<i>Actinomyces</i> species
<i>Eubacterium</i> species
<i>Lactobacillus</i> species
Gram-negativni bacili
<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>Fusobacterium</i> species
<i>Bacteroides melaninogenicus</i> species
<i>Bacteroides melaninogenicus asaccharolyticus</i>

---

---

*Bacteroides melaninogenicus intermedius*

*Bacteroides melaninogenicus melaninogenicus*

*Bacteroides oralis*

*Bacteroides corrodens*

*Bacteroides ochraceus*

*Bacteroides bivius*

*Bacteroides species*

---

Prevladavaju anaerobne vrste iz roda *Bacteroides* koje zahtjevaju specifičan okoliš za svoj rast (63,64). Od Gram-pozitivnih fakultativno anaerobnih vrsta najbrojniji su streptokoki, od kojih su najzastupljeniji viridans streptokoki (oko 55%). Za njima, po učestalosti pojavljivanja u kulturama korijenskih kanala, slijede stafilokoki. Od ostalih Gram-pozitivnih mikroorganizama u inficiranom korijenskom kanalu u manjem postotku se javljaju *Streptococcus pneumoniae*, *Sarcina*, *Lactobacillus*, difteroidi, a od Gram-negativnih *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Escherichia coli*, *Veillonella*. Izolirane su još i *Candida*, *Actinomyces*, *Nocardia* (65).

Iako nije pouzdano dokazana sveza između pojedinih vrsta bakterija i kliničkih znakova ili simptoma pulpnog i periapeksnog oboljenja, ipak se iz prakse zna da su u njihovu patogenezu najčešće uključene tamno pigmentirane bakterije (*Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*), te *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Campylobacter* i *Peptostreptococcus* (66,67,68,69). Iz akutnih infekcija su najčešće izolirane *Porphyromonas gingivalis* i *endodontalis* koje su u svezi s nastankom boli, dok je *Prevotella* nađena i u simptomatskim i u asimptomatskim infekcijama (70).

Dok je flora korijenskog kanala detaljno proučena (66,71,72), podaci o mikrobnjoj flori u periapikalnim oštećenjima su ograničeni i kontroverzni jer je dokazivanje mikroorganizama u inficiranom periapikalnom tkivu povezano s brojnim praktičnim i tehničkim poteškoćama. Budući da u upaljenom periapikalnom tkivu dominiraju anaerobni mikroorganizmi (oko 75% ukupne mikrobne flore), za njihovo dokazivanje potrebne su složenije mikrobiološke tehnike, te pri tome uvijek postoji opasnost od zagađenja uzoraka prilikom pripremanja za analizu. Zbog toga se u ranijim istraživanjima (73) tvrdilo da je prisutnost anaerobnih bakterija vrlo mala. Daljnjim razvojem mikrobiologije uspješno se dokazala prevaga anaeroba. Danas se, osim bakterija, pokušavaju izolirati i identificirati virusi kao mogući uzročnici periapikalnih promjena (73).

#### *1.3.3.1. Putevi ulaska mikroorganizama u pulpu*

Rahlo vezivno tkivo pulpe je u normalnim uvjetima zaštićeno tvrdim dentinskim stijenkama na čijoj površini su neoštećena caklina i cement. Prirodna odsutnost, karijes ili jatrogeno odstranjenje cakline ili cementa izlaže dentinsko tkivo, a nekada neposredno i pulpno tkivo, mehaničkim, kemijskim i/ili mikrobnim oštećenjima. Glavni putevi kojima mikroorganizmi ulaze i inficiraju pulpu su otvoreni dentinski kanalići, neposredna izloženost pulpe, lateralni i apikalni otvor i anahoreza (12). Budući da je pulpa putem dentinskih kanalića, lateralnih i akcesornih kanala, furkacijskih kanala i apikalnog otvora usko povezana s parodontnim tkivom, infekcija iz kanala može lako zahvatiti parodontni ligament i okolno tkivo. Moguć je i prodor bakterija u obrnutom smjeru (prema pulpi) tijekom parodontnog oboljenja, ali je takva mogućnost manje vjerojatna (73,74).



#### a) Dentinski kanalići

Nedostatkom cakline i/ili cementa dentinski kanalići postaju izloženi bakterijama usne šupljine, a najčešći izvor bakterija koje prodiru u dentinske kanaliće je karijes ili mikropukotina uz ispun. U trenutku kada mikroorganizmi dostignu caklinsko-dentinsku granicu, daljnji prodor njihovih toksičnih produkata prema pulpi je olakšan prolaskom kroz otvorene dentinske kanaliće, što najčešće rezultira upalnim odgovorom pulpnog tkiva (75). S porastom broja bakterija i infiltracijom polimorfonukleara dolazi do upalnih promjena, što konačno dovodi do odumiranja pulpnog tkiva. Smatra se da je ovakav put infekcije svojstven samo nekim bakterijskim vrstama, pretežno onim fakultativno anaerobnim koje potječu iz normalne oralne flore.

#### b) Neposredna izloženost pulpe

Neposredna izloženost pulpe oralnoj flori kao posljedica traume, napuknuća ili karijesa tvrdih zubnih tkiva može također biti izvor infekcije pulpnog i periapeksnog tkiva. Tako inficirano tkivo može ostati upaljeno kroz duže vrijeme ili može brzo prijeći u nekrozu što ovisi o virulenciji bakterija, otpornosti domaćina, opskrbi krvlju i mogućnosti drenaže (73).

#### c) Lateralni kanali i apikalni otvor

Teoretski, lateralni kanalići i apikalni otvor koji su povezani s parodontnim džepom mogli bi predstavljati ulazna vrata mikroorganizmima u korijensko-kanalni sustav, iako o tome postoje dvojbeni mišljenja (12,76). Smatra se, naime, da pulpa može biti inficirana putem apikalnog otvora jedino kada je stanje pulpe već patološki promijenjeno. Pri tome se kao mogući uzročnici navode samo fakultativno anaerobni streptokoki (74).



#### d) Anahoreza

Anahoreza je proces kojim se mikroorganizmi tijekom bakterijemije krvlju prenose u upaljena ili nekrotična tkiva gdje izazivaju infekciju. Prvi put je učinak anahoreze na razvoj periapeksne lezije na modelu psa utvrdio Csernyei još 1939. godine (77). Kasnije su drugi autori potvrdili taj nalaz histopatološki (73,78), ali točan učinak anahoreze na razvoj pulpne ili periapeksne infekcije na humanim zubima još uvijek nije razjašnjen. Neosporno je jedino da je anahoreza najvjerojatniji mehanizam kojim traumatizirani zubi s neoštećenom krunom postaju inficirani (79).

### 1.4. Djelovanje materijala na obrambeni sustav domaćina

Biološka svojstva materijala koji se rabe u stomatologiji u središtu su interesa brojnih kliničkih i eksperimentalnih ispitivanja. Dobra tkivna podnošljivost je presudna pri uporabi materijala za punjenje korijenskih kanala jer dolaze u izravni dodir s apeksnim tkivom. Toksične tvari prisutne u tim materijalima mogu uzrokovati nadražaj ili čak potpuno uništavanje okolnog tkiva. Zbog toga je za svaki endodontski materijal koji je u kliničkoj uporabi važno znati ne samo posjeduje li zadovoljavajuće fizičko-kemijske osobine, već i je li biokompatibilan.

Metode procjene biološke kompatibilnosti endodontskih materijala se već tradicionalno dijele na *in vitro* i *in vivo* modele. Primjena standardiziranih *in vitro* modela pruža mogućnost izučavanja učinka dijelova materijala na stanične sustave promatrajući morfološke promjene na kulturama stanica (80). Uporabu staničnih kultura za ispitivanje biokompatibilnosti endodontskih punila prvi je uveo, 1964. godine, Rappaport i sur. (81). Danas se u tu svrhu najčešće rabe diploidne humane stanice koje su po tkivnim reakcijama najbližnje stanicama mukoze usne šupljine. Ispitivanja ovakve vrste, sa strogim uputama,

preporučena su od strane "American National Standards Institute the American Dental Association" i "Technical Report ISO-TR 7405 of the International Standards Organization" u svrhu smanjenja potrebe za *in vivo* metodama (82).

*In vivo* modeli ispitivanja stanične reakcije na endodontske materijale pružaju mogućnost praćenja kratkoročnih i dugoročnih učinaka materijala na živo tkivo s prednošću neposredne kontrole čimbenika i varijabli. Učinak sastavnih dijelova endodontskih materijala na živo tkivo se najbolje može izučavati praćenjem reakcije makrofaga koji su, kao sastavni dio retikulo-endotelnog sustava, glavni pokretači i nadzornici lokalnog imunološkog i upalnog odgovora (83). Ukoliko materijali za punjenje korijenskih kanala ne posjeduju svojstvo inertnosti prema okolnom vitalnom tkivu, mogu izazvati neželjenu tkivnu reakciju predvođenu makrofazima. Stoga, materijal koji je biokompatibilan ne bi smio ometati proces zacijeljivanja tkiva, ali bi svakako trebao poticati reorganizaciju oštećenih struktura i izolaciju stranog tijela (84).

### **1.5. Uloga makrofaga u imunološkoj slici upale**

Osnovnu ulogu u obrani organizma od prodora patogenih mikroorganizama i razvoja upale imaju urođeni i stečeni imunološki sustav. Još krajem 19. stoljeća, u vrijeme otkrića protutijela, veliki ruski imunolog Metchnikoff je ustvrdio da većinu mikroorganizama koji dođu u dodir sa živim tkivom progutaju i unište fagocitne stanice, koje je nazvao makrofazima (59). Otkrio je da su te stanice sposobne odmah stupiti u obrambenu reakciju, bez prethodne senzibilizacije, te da isto reagiraju u svim tkivima. Već tada je postalo jasno koliko je važna uloga tih stanica u obrani organizma od patogena, te da aktivnost makrofaga može biti jasan pokazatelj odnosa obrambenih snaga i vanjskog podražaja organizma. U toj borbi s mikroorganizmima i stranim česticama, makrofazi uključuju različite mehanizme od

kojih su neki dio urođene imunosti, a neki zahtijevaju prisutnost specifičnih protutijela koji su glavno "oružje" specifične, stečene imunosti. Zbog toga makrofazi zauzimaju jedinstveno mjesto u tkivnom odgovoru na vanjske podražaje sudjelujući aktivno u raznim fiziološkim i patološkim zbivanjima:

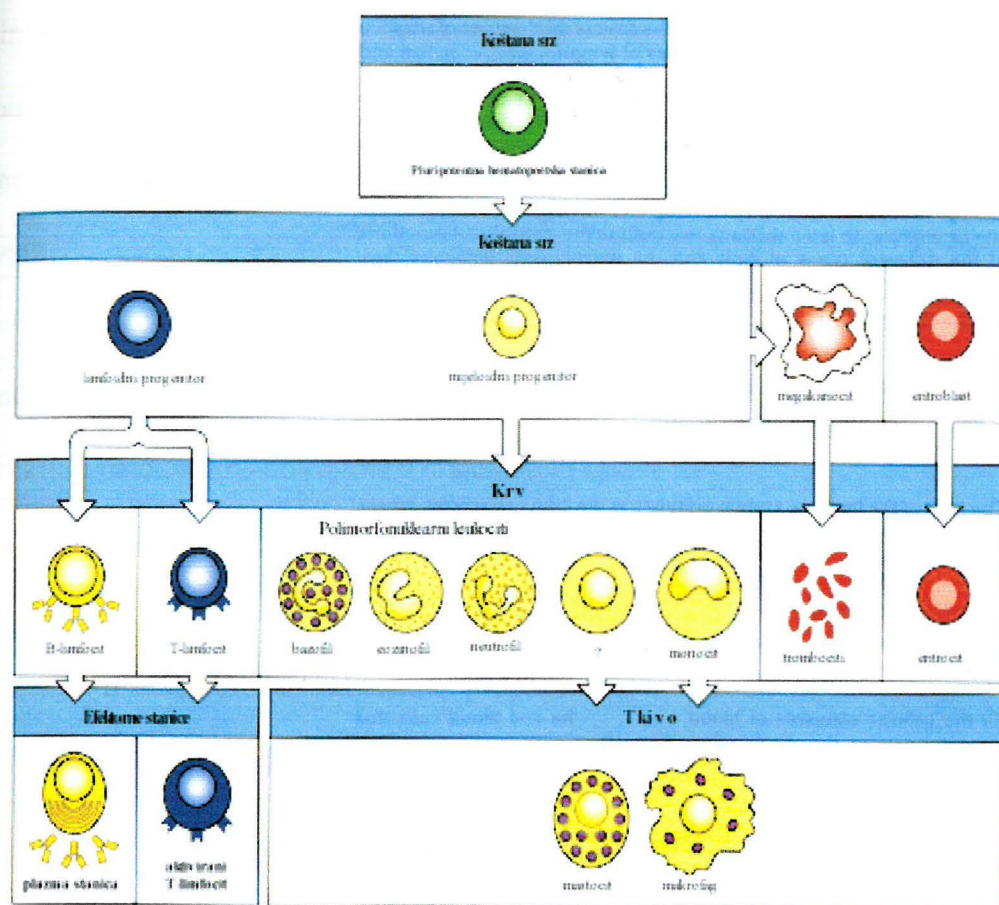
- a) mogu reagirati s brojnim izvanstaničnim molekulama-proteinima i polisaharidima - utječući tako na unutarstanične metaboličke promjene
- b) imaju sposobnost izlučivanja upalnih medijatora (citokina, derivata arahidonske kiseline i sl.) čiji intenzitet ovisi o metaboličkom stanju makrofaga
- c) uzajamno reagiraju s T i B limfocitima i tako sudjeluju u imunološkom odgovoru
- d) posjeduju limfokine, površinske receptore za regulatorne limfocitne proteine, koji aktiviraju makrofage i čine ih mikrobicidnim i tumoricidnim (85).

Iz toga je vidljivo da je mononuklearni fagocitni sustav uključen u infektivne procese utječući na imunološki odgovor u upali.

#### 1.5.1. Fenotipska obilježja makrofaga

Makrofazi svoj vijek započinju kao krvni monociti koji su nezrele stanice dok su u krvi, ali kada uđu u tkiva sazrijevaju, rastu i diferenciraju se u makrofage te počinju preuzimati ulogu pokretača imunološkog odgovora organizma. Sazrijevaju iz cirkulirajućih monocita posredstvom mijeloidnog progenitora kao prekursora (Slika 1).





Slika 1. Stanični elementi krvi koji potječu iz hematopoetske stanice koštane srži (Adaptirano prema: Janeway CA. Immunobiology. Current Biology Ltd, London, 1996: 1:4)

Zreli makrofazi su pokretne stanice koje lutaju različitim organima. Manji dio makrofaga je pričvršćen uz tkiva i oslobađaju se tek kad zatrebaju za obavljanje specifičnih zaštitnih funkcija. Naime, tijekom lokalne infekcije ili upale, kemotaksijski čimbenici i ostali upalni medijatori, kao citokini i eikozanoidi, potiču monocite na migraciju prema mjestu upale ili oštećenja gdje se diferenciraju u eksudacijske makrofage (86,87). Pokretni kao i pričvršćeni tkivni makrofagi, monociti, neke specijalizirane endotelne stanice u koštanoj srži,



limfnim čvorovima te retikularne i dendritične stanice pripadaju stanicama retikuloendotelnog ili monocitno-makrofagnog sustava (88,89). To je dinamični stanični sustav prisutan u svim tkivima sa snažnom ulogom nadzora tkivne homeostaze i lokalnog imunološkog i upalnog odgovora.

Makrofazi su se, kao dio tog složenog sustava, dokazali kao vrlo aktivne stanice koje brzo odgovaraju na hormonske i stanične signale te stoga imaju značajnu ulogu u brojnim fiziološkim i patološkim zbivanjima u organizmu (85).

Makrofazi pokazuju široku morfološku, fenotipsku i funkcionalnu raznolikost, ovisno o stadiju sazrijevanja, diferencijacije i aktivacije (90,91). Za nadzor aktivnosti makrofaga, kao što su rast, diferencijacija, aktivacija, prepoznavanje, endocitoza, migracija i sekrecija, odgovorni su receptori koji se nalaze na njihovoj površini. Uz Fc i komplementne receptore pomoću kojih fagocitiraju opsonizirane čestice, posjeduju i receptore za različite mikrobne čestice. Ti receptori uključuju makrofag-manoza receptor i receptore za peptide i lipolisaharide koji služe za prepoznavanje i vezanje specifičnih tvaari na površini bakterija (92). Time makrofazi prezentiraju patogenu česticu obrambenim snagama organizma čime se ubrajaju u skupinu antigen-prezentirajućih stanica (APC) u početnoj fazi poticanja stečene imunosti. APC su samo pomoćne stanice koje na svoju površinu vežu strane bjelančevine i time ostvaruju dvostruku ulogu: A) služe kao substrat kojeg prepoznaju T-pomoćničke stanice koje se nisu sposobne aktivirati u neposrednom dodiru sa stranom česticom; B) daju signal makrofazima za početak fagocitoze i izlučivanje kemijskih medijatora upale (59,85).

## 1.5.2. Uloga makrofaga u urođenoj obrambenoj reakciji tkiva

Polimorfonuklearni leukociti i makrofazi čine sustav urođenog imunološkog odgovora koji predstavlja prvu liniju obrane protiv brojnih bakterija, virusa i drugih štetnih mikroorganizama. Ove stanice su od presudnog značenja za početak imunološkog odgovora i poticanje razvoja stečenog imunološkog sustava. Međutim, svojim antibakterijskim djelovanjem ne mogu uništiti sve infektivne organizme budući da su mnoge bakterijske vrste otporne na njihovo djelovanje. Neke bakterije su čak u mogućnosti preživjeti unutar makrofaga ili im preživljavanje ovisi o njegovom unutarstaničnom sadržaju. Izvanstanični patogeni mogu zadržati svoju virulentnost izbjegavajući fagocitno prepoznavanje makrofaga. Budući da se stečeni imunološki odgovor pokreće tek nakon 4-5 dana od prodora patogena, urođeni imunološki sustav ima presudnu ulogu u nadzoru infekcije tijekom tog razdoblja (59).

Učinkovitost makrofaga u toj prvoj liniji obrane protiv mikrobne invazije ili stranih čestica ovisi o svakoj pojedinoj etapi tog složenog procesa koji obuhvaća: kemotaksiju, adherenciju, fagocitozu, unutarstanično uništavanje i probavljanje strane čestice.

### 1.5.2.1. Kemotaksija

Oštećenjem tkiva, patogeni nesmetano prolaze epitelnu površinu i ulaskom u tkivo započinju otpuštati "kemotaksijske čimbenike" (bakterijski produkti niske molekularne težine, čimbenici komplementa, antigen-protutijelo kompleksi, kalikrein, leukotrieni itd.) čiji koncentracijski gradijent privlači fagocite smještene u subepitelnom tkivu. Kemotaksijske tvari izazivaju fagocitni odgovor tek nakon vezanja za specifične receptore na staničnoj površini (93). Najbolje proučen receptor za kemotaksijske tvari je sintetski peptid nazvan FMLP koji je smješten na dvije različite strane makrofaga i kojeg regulira gvanin-vežući

protein. U trenutku zauzimanja receptora započinje stanični odgovor na podražaj, a kemotaksijska aktivnost se smanjuje. Kontrola završetka tog procesa je višestruka. Tako je, npr. kemotaksijski izazvana makrofagna aktivacija kontrolirana promjenom koncentracije cAMP.

Poremećaj u ovako složenoj kemotaksijskoj aktivnosti može dovesti do dramatičnih poremećaja u obrambenoj reakciji domaćina.

#### *1.5.2.2. Adherencija*

Adherencija ili prijanjanje za podlogu jedna je od temeljnih svojstava stanične membrane fagocita pa predstavlja najvažniji korak u složenom procesu fagocitoze (94).

Jednako kao što fagocitoza ovisi o staničnoj adheziji, tako i adhezija ovisi o tvarima izvanstaničnog matriksa, osobito fibronektinu i selektinu. Ove molekule djeluju kao sidrišni elementi pomoću kojih se izdanci makrofaga (mikroekstenzije) šire i tako ostvaruju izravni dodir s podlogom (95). Vrijeme neophodno za prihvaćanje fagocita za podlogu ovisi o vremenu potrebnom za prevladavanje hidrofilne i elektrostatske barijere između stanice i podloge i o spremnosti površinskih receptora stanice za vezanje s podlogom.

Sposobnost adherencije je različita, ovisno o prisustvu seruma u mediju, jer se smatra da su u serumu prisutni modulatori ili inhibitori adhezijskih molekula (96). Površinska svojstva makrofaga se također razlikuju, ovisno za kakvu vrstu podloge makrofag prijanja.

Nakon potpunog adheriranja stanice za podlogu, stanica se ispruži na površinu podloge što se naziva širenje fagocita. Adherencija i širenje su dva odvojena procesa jer se odvijaju posredstvom različitih receptora.



Budući da su makrofazi najzastupljenije imunokompetentne stanice u pulpnom i periapexnom tkivu, poremećaj adhezijske sposobnosti makrofaga može imati fiziološki i patofiziološki značaj *in vivo* na razini pulpe i periapexsa.

#### 1.5.2.3. Fagocitoza i uništavanje mikroorganizama

Fagocitoza štetnih čestica i stranog materijala od strane neutrofila i makrofaga započinje u trenutku dodira s "ciljem" i odvija se u nekoliko etapa: adheriranje čestice na površinu fagocita, stvaranje pseudopodija, gutanje, te na kraju uništavanje patogena, što tkivni makrofazi ostvaruju već nekoliko minuta nakon početka upale (89). Nužan preduvjet za uspješno fagocitno djelovanje makrofaga, što može zaustaviti širenje upale ili podražavajuće djelovanje stranog materijala u organizmu, je sposobnost kemotaksije i sposobnost prepoznavanja površine patogena uz pomoć površinskih receptora. Proces započinje kontrakcijom aktin-miozinskih mostića između adheriranih površina koja dovodi do stvaranja membranskog omotača i njegovog poniranja do točke stvaranja primarnog fagosoma (97).

Brojni patogeni razvijaju strategiju za izbjegavanje fagocitoze i uništavanja stvaranjem polisaharidnog omotača kojeg fagocitni receptori ne mogu prepoznati. S druge strane, bakterije koje posjeduju specifične tvari na površini (opsonine) prepoznatljive fagocitnim receptorima, u trenutku prijanjanja za površinu receptora daju signal makrofazima za početak fagocitoze i sekrecije kemijskih medijatora upale (citokini, eikozanoidi i sl.) odgovornih za nastanak glavnih znakova upale (98). Potencijalno patogene čestice su najčešće opsonizirane specifičnim IgG protutijelima koje fagociti prepoznaju preko Fc- $\gamma$  receptora. Proces fagocitoze neopsoniziranih čestica je također moguć, ali je vrlo složen i ovisi o fizičkim i kemijskim svojstvima površine strane čestice i makrofagnih receptora, a ostvaruje se svezom čestice i makrofaga lektin-vođenim mehanizmom (99).



U trenutku ulaska strane čestice u stanicu, stvoreni fagosom (fagocitna vakuola) se spaja s lizosomima te djelovanjem enzima dolazi do njenog probavljanja. Osim što ih probavljaju, neutrofil i makrofazi aktiviraju baktericidne oksidativne i neoksidativne mehanizme koji većinu bakterija ubijaju. Makrofazi aktivirani citokinima, kao npr. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  ili IL-1, imaju jači mikrobicidni učinak od neaktiviranih stanica (93). Nakon procesa fagocitoze i probavljanja čestica unutar stanice, makrofazi mogu izbaciti ostatke proizvoda i često preživjeti još puno mjeseci (89).

### 1.5.3. Reakcija makrofaga na izravni dodir s materijalima za punjenje korijenskih kanala

Jedno od najvažnijih svojstava materijala za punjenje korijenskih kanala je njihova biokompatibilnost budući da u području vrška korijena dolaze u neposredni dodir s vitalnim periapikalnim tkivom. Upravo zbog toga i neuspjesi nakon endodontske terapije izazvani prepunjenjem korijenskog kanala, tj. izlaskom materijala u periapikalni prostor, mogu biti posljedica njegovog štetnog djelovanja na cirkulaciju ili izazivanja neželjenog tkivnog odgovora predvođenog makrofazima (100).

Mehanizam tkivnog i koštanog odgovora na takav podražaj uključuje aktivaciju makrofaga koji imaju vodeću ulogu u procesu fagocitiranja i probavljanja stranog materijala. Makrofazi su pluripotentne stanice i njihov odgovor na strani materijal koji se nađe u tkivu može rezultirati lokalnim, ali isto tako i sistemskim učinkom. Burnost tkivne reakcije najviše ovisi o fizičko-mehaničkim svojstvima materijala (veličina i oblik čestica materijala i njihova površina) i njihovim biološkim svojstvima (toksičnost) (101). Toksičnost materijala naj snažnije potiče biološki odgovor tkiva utječući na pojedine razine makrofagne funkcije.

Najčešće su to pojedine razine fagocitnog procesa (102), sekretorna ili enzimska aktivnost makrofaga (83).

Dokazano je da različiti materijali koji se rabe u stomatologiji, pa tako i endodontski materijali, mogu u neposrednom dodiru s tkivom aktivirati makrofage na izlučivanje citokina i drugih topivih čestica (102,83). Glavni citokin kojeg izlučuju makrofazi, IL-1, smatra se važnim "čimbenikom osteoklastne aktivnosti", dok ostali čimbenici, kao TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  i IL-6, mogu aktivirati topive čestice koje su neposredno odgovorne za razvoj upalne reakcije. Prostaglandini, proteinaze i kolagenaze dovode do koštane razgradnje (103). Budući da su funkcije i međusobne reakcije citokina vrlo složene, kronična aktivacija makrofaga može imati utjecaja i na ostale obrambene funkcije, uključujući i imunološki sustav. Stoga je prva stepenica za ispitivanje biokompatibilnosti materijala usađenih u tkivo ili onih koji su s njim u neposrednom dodiru ispitati njihov učinak na osnovne funkcije makrofaga, koji započinju i vode upalni odgovor u tkivu, i njihov toksični učinak na živu stanicu kroz vremenske razmake.

## 2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Cilj ovog rada je ocijeniti biokompatibilnost tri kemijski različita standardna stomatološka materijala za trajno punjenje korijenskih kanala na funkcije mišjih makrofaga i citotoksični učinak na modelu stanične kulture, te njihov antimikrobni učinak testovima: difuzije u agaru, izravnog dodira i preživljavanju u bujonu.

Procjena navedenih svojstava endodontskih materijala primjenom različitih testova u *in vitro* i *in vivo* uvjetima pridonijela bi produbljivanju patofizioloških spoznaja o uzrocima upalnog odgovora okolnog tkiva na provedenu kliničku terapiju. Usvojene spoznaje bi pomogle uspješnijoj procjeni rizika pri njihovoj kliničkoj uporabi.

### **3. MATERIJAL I METODE**

#### **3.1. Materijali za punjenje korijenskog kanala**

Rabljena su tri materijala za punjenje korijenskih kanala koji su dostupni na tržištu. U ispitivanje je uključen po jedan predstavnik iz pojedine skupine cemenata za punjenje korijenskih kanala, podijeljenih prema kemijskom sastavu. Iz skupine sintetskih cemenata rabljen je AH Plus (Dentsply DeTrey, Konstanz, Germany); iz skupine biloških cemenata na bazi kalcij-hidroksida - Apexit (Vivadent, Schaan, Liechtenstein) i iz skupine staklo-ionomernih cemenata – Ketac Endo (ESPE, Seefeld, Germany).

Materijali su zamiješani prema uputama proizvođača, u aseptičkim uvjetima. Apexit i AH Plus su miješani ručno, a Ketac Endo strojno (Silamat Plus, Vivadent, Schaan, Liechtenstein).

#### **3.2. Eksperimentalne životinje**

U ispitivanju su rabljene ženke BALB/c miševa stare 2-3 mjeseca. Miševi su uzgojeni u uzgojnoj koloniji Središnjeg vivarija Medicinskog fakulteta u Rijeci, a tijekom eksperimentalne faze su čuvani u plastičnim kavezima u priručnom vivariju Zavoda za Mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci. Miševi su prehranjivani standardnom laboratorijskom hranom koju proizvodi Biotehnički fakultet Domžale, Slovenija.



### 3.3. Ispitivanje aktivnosti makrofaga

#### 3.3.1. Prikupljanje peritonealnih makrofaga

Svakoj eksperimentalnoj životinji je špricom od 5 ml u trbušnu šupljinu injicirano cca 500 mg materijala za punjenje korijenskih kanala. Nakon 48 sati, 7 i 14 dana od injiciranja materijala životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom. Prije uzimanja peritonealnog ispirka, a u svrhu što boljeg ispiranja makrofaga, u trbušnu šupljinu je ubrizgano 5 ml RPMI medija (Imunološki zavod, Zagreb). Nakon nježne 2-minutne masaže, špricom je izvučen peritonealni ispirak (cca 4-4,5 ml).

Početni broj makrofaga određivao se brojanjem u leukocitnoj mrežici Neubaerove komorice, nakon bojanja ispirka Türkovom otopinom. Izračunati broj makrofaga razrijeđen je u svrhu dobivanja prosječnog broja od oko  $5 \times 10^6$  makrofaga po ml ispirka.

#### 3.3.2. Test adherencije makrofaga na plastičnu površinu

Određivanje sposobnosti adherencije makrofaga na plastičnu površinu provelo se, uz neznatne preinake, prema tehnici koju su opisali De la Fuente i sur. (104). Nakon određivanja početnog broja makrofaga, oko 200  $\mu$ l suspenzije je stavljeno u plastičnu epruvetu koja se u vodoravnom položaju inkubirala kroz 2 sata na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub>. Istekom vremena inkubacije, epruvete su pažljivo izvađene. Pipetom je odmjereno 10  $\mu$ l suspenzije s ciljem određivanja broja neadheriranih makrofaga. Broj adheriranih makrofaga dobiven je oduzimanjem neadheriranih makrofaga od njihovog početnog broja. Rezultati su prikazani kao indeks adherencije (AI) koji je izračunavan prema slijedećoj formuli:

$$AI = 100 - \frac{\text{Neadherirani makrofazi/ml}}{\text{Početni broj makrofaga/ml}} \times 100$$

### 3.3.3. Test fagocitoze

Testom fagocitoze ispitana je sposobnost makrofaga na fagocitiranje *Candida albicans* koja je inaktivirana kuhanjem kroz 30 minuta. Početni broj makrofaga, kao i toplinski obrađene *C. albicans*, određen je na isti način koji je već opisan u poglavlju o prikupljanju peritonealnih makrofaga.

Koncentracija *C. albicans* iznosila je oko  $2,5 \times 10^7$ /ml. Jednaki volumen (200  $\mu$ l) pripremljene suspenzije makrofaga i *C. albicans* je nanesen u komorice sastavljene od 2 plastična prstena (2 mm visine i 16 mm u promjeru) prethodno zaljepljena na predmetno stakalce. Predmetnice su inkubirane u vlažnoj atmosferi uz 5% na 37°C kroz 30 minuta. Po završetku inkubacije, višak suspenzije je odliven, a prstenovi su isprani s RPMI medijem u svrhu uklanjanja nefagocitiranih blastokonidija. Nakon prekonoćnog sušenja, preparati su obojani metodom po Wright-u (Merck, Darmstadt, Germany) i mikroskopirani pod imerzijom glede određivanja broja makrofaga koji su fagocitirali mrtvu *C. albicans* (pozitivnih makrofaga).

Rezultati su izraženi indeksom fagocitoze (IF):

$$IF = \% \text{ makrofaga koji sadrže barem jednu } C. albicans \times \text{ prosječni broj } C. albicans \text{ po pozitivnom makrofagu}$$

### 3.3.4. Mikrobicidna aktivnost makrofaga (Killing test)

Killing testom se ocjenjivala kandidicidna sposobnost makrofaga prema živoj *C. albicans* uzgojenoj kroz 48 sati na Sabauroud dekstroza agaru (Difco Laboratories, Detroit,

MI, USA). Izmiješane suspenzije makrofaga ( $5 \times 10^6/\text{ml}$ ) i žive *C. albicans* ( $10^7/\text{ml}$ ) su inkubirane 1 sat na  $37^\circ\text{C}$  uz  $5\% \text{CO}_2$  i potom tretirane hladnom destiliranom vodom kroz 15 minuta na  $+4^\circ\text{C}$  u svrhu liziranja makrofaga. Oslobođene *C. albicans* su potom obojene s  $0,01\%$  metilenskim modrilom i promatrane pod svjetlosnim mikroskopom. Živa kandida ostaje neobojana, a mrtva poprimi intenzivno plavu boju. Brojano je najmanje 300 blastokonidija, a rezultat je izražen kao postotak ubijenih *C. albicans*.

### 3.3.5. Ispitivanje metaboličke aktivnosti makrofaga (NBT test)

Osnovni princip primjene Nitro blue tetrazolium (NBT) - dye testa je ispitivanje metaboličkih promjena makrofaga nakon fagocitiranja stranih čestica. Naime, nastale metaboličke promjene dovode do redukcije bezbojnog NBT u citoplazmi makrofaga u formazan koji daje crnu boju. Redukcija je posljedica dodira između fagocitirane čestice i NBT-a nakon oštećenja stanične membrane makrofaga.

U testu je rabljena svježa otopina NBT-a koja je čuvana na  $+4^\circ\text{C}$  najviše 48 sati. Nakon laganog miješanja jednake količine ispirka i boje ( $200 \mu\text{l}$ ) u plasičnoj epruveti, otvorena epruveta je inkubirana 15 minuta u  $\text{CO}_2$  inkubatoru na  $37^\circ\text{C}$ , a potom na sobnoj temperaturi isto vremensko razdoblje. U svrhu što boljeg očuvanja cjelovitosti stanice, za vrijeme inkubacije suspenzija se samo povremeno lagano promiješala, bez dodatnog centrifugiranja, mehaničkog odvajanja ili suvišnog pipetiranja. Po završetku inkubacije, pripremljeni su preparati koji su nakon sušenja obojeni metodom po Wright-u. Brojano je 100 fagocita u kojima se odredio broj pozitivnih stanica u kojima se jasno uočavao tamni talog formazana. Rezultat je prikazan u postotku NBT pozitivnih stanica na 100 fagocita.



### 3.4. Ispitivanje citotoksičnosti u kulturi stanica

*In vitro* ispitivanje citotoksičnosti materijala za punjenje korijenskih kanala provedeno je u kulturi mišjih L929 fibroblasta dobivenih iz potkožnog veziva miševa linije C3Hf. Stanice su uzgojene u 75 cm<sup>2</sup> – nim plastičnim posudama (flaskovima) za staničnu kulturu (Sterile Tissue Culture Flask) u inkubatoru na temperaturi od 37°C, uz 5% CO<sup>2</sup> i vlažnosti od 90%. Redovito su dohranjivane hranjivim medijem: 10% Dulbecco's Modified Eagle medij (DMEM – Gibco BRL-Life Technologies) kojem je dodan 10%-ni fetalni teleći serum (FCS – Fetal Bovine Serum, Gibco BRL) prethodno dekomplementiran u vodenoj kupelji na 56°C kroz 30 minuta, te antibiotici (100 IU/ml penicilin i 50 µl/ml streptomicin) i 200 mM L-glutamin (Gibco BRL).

Stanice su rasle u "falskovima" (cca 20 dana), dok nisu prekrile cijelu površinu posude. Tada su tripsinizacijom skupljene u sterilnu epruvetu, te centrifugirane (1200 okr/4 min.). Nakon centrifugiranja, stanice su resuspendirane u novom mediju i prebrojane u Neubaerovoj komorici pomoću tripanskog modrila, a početni broj je podešen na  $3 \times 10^5$  stanica po jednom mililitru.

Prema potrebi stanice su zamrzavane u mediju za smrzavanje na temperaturi -80°C. Prije ponovne uporabe, naglo su odmrzavane, ispirane u hranjivom mediju i iznova kultivirane.

#### 3.4.1. Postupak određivanja citotoksičnosti

Svježe zamiješani materijali (0,1 g) nanoseni su na sterilne teflonske diskove promjera 6 mm i ostavljeni kroz 2 sata pod UV svjetlom radi sterilizacije.



Diskovi s materijalom i prazni diskovi, koji su služili kao kontrola, su stavljeni u zdence pločica za staničnu kulturu od 12 rupica (Techno Plastic Products AG, Trasadingen, Switzerland) nakon čega je na njih nanesa suspenzija stanica u ukupnom volumenu od 3000  $\mu\text{l}$  i s početnim brojem stanica od  $3 \times 10^5/\text{ml}$ . Cijela pločica je stavljena u  $\text{CO}_2$  inkubator na  $37^\circ\text{C}$ . Nakon inkubacije od 1, 6, 20 i 24 sata, uklonjeni su teflonski diskovi i određivao se broj živih stanica pomoću tripanskog modrila u Neubaerovoj komorici. Osim promjene u broju, praćena je i promjena morfologije stanica tijekom eksperimenta.

Uzorci su obrađivani u triplikatu, a ispitivanje za svaki materijal i inkubacijsko razdoblje ponavljano tri puta.

### **3.5. Ispitivanje antimikrobnog učinka materijala za punjenje korijenskog kanala**

Ispitivan je antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskog kanala uporabom tri *in vitro* testa: testom difuzije u agaru (ADT - Agar diffusion test), testom izravnog dodira (DCT - Direct contact test) i testom preživljavanja u bujonu (BST - Broth survival test).

#### **3.5.1. Test difuzije u agaru (ADT)**

Testom difuzije u agaru određena je antimikrobna aktivnost ispitivanih materijala za punjenje korijenskih kanala prema bakteriji *Enterococcus faecalis* izoliranoj iz kliničkog materijala na Zavodu za mikrobiologiju Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Rijeci i identificiranoj pomoću API strep test kita (bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

Suspenzija enterokoka u koncentraciji od oko  $10^8$  jedinica koje tvore kolonije/ml (CFU – Colony forming units), nanesa je na površinu krvnog agara, razmazana sterilnim

staklenim štapićem i puštena kroz 20 minuta da se upije u podlogu. Svježe zamiješani materijali nanoseni su u smjeru kazaljke na satu, na udaljenosti od oko 5 cm. Podloge su inkubirane na 37°C kroz 24 sata. Mjeren je promjer zone inhibicije rasta oko svakog materijala i izražen u milimetrima.

Test je rađen u duplikatu i ponavljan tri puta.

### 3.5.2. Test izravnog dodira (DCT)

DCT je kvantitativna metoda kojom je određena antimikrobna aktivnost ispitivanih endodontskih materijala prema *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*. Svi mikroorganizmi su izolirani iz obriska usne šupljine i identificirani API – testovima (API-NE, API-E, API-Staf, API-Can; bioMerieux, Marcy-l'Etoile, France).

Suspenzije mikroorganizama pripremljene su u moždano-srčanom bujonu (BHI - brain heart infusion; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) i inkubirane u rotoru na 37°C kroz 24 sata. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana (3000 okr/min), supernatant odličen, a talog resuspendiran svježim 0,15 mol/l "phosphate-buffered saline" medijem (PBS; pH=6,9), te je u svim testovima rabljena koncentracija od oko  $10^8$  CFU/ml.

Svježe zamiješani materijali uneseni su u zdence mikrotitracijske pločice s 96 zdenaca ravnog dna. Neposredno nakon toga, na materijal je dodano 10 µl mikrobne suspenzije i ostavljeno 1 sat na 37°C u vlažnoj atmosferi. Hlapljenjem tekućeg medija osigurao se bliski dodir između materijala i mikroorganizama. U svaki je zdenac potom dodano 250 µl BHI bujona, te su inkubirani tijekom 1, 6, 20 i 24 sata. Po završetku svakog vremenskog perioda, napravljena su desetorostruka razrjeđenja, nasadena na krvni agar, te je

sljedeći dan određivan broj bakterijskih kolonija (CFU/ml). Prazni zdenci su služili kao pozitivna, a zdenci s materijalom (bez bakterijske suspenzije) kao negativna kontrola.

Test je rađen u duplikatu i ponavljan tri puta.

### 3.5.3. Test preživljavanja u bujonu (BST)

Modifikacijom BST-a, izvorno opisanog u radu Waltimo i sur. (105), određena je antimikrobna aktivnost zrelog, stvrdnutog Apexita prema *Pseudomonas putida*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus* i *Candida albicans*.

Mikrobne suspenzije pripremljene su kao što je prethodno opisano.

Svježe zamiješani Apexit je stavljen u epruvetu s 15 ml sterilnog PBS-a, začepljenu gumenim čepom, i ostavljen 5 dana u inkubatoru na 37°C uz 5% CO<sub>2</sub> i povećanu vlažnost. Kao pozitivna kontrola služio je sam PBS, a kao negativna kontrola preko noći istaložen supernatant zasićene otopine čistog kalcij-hidroksida (Merck, Darmstadt, Germany) u destiliranoj vodi. pH supernatanta iznosio je 12,4, pH Apexita 9,7, a pH čistog PBS-a 7,5.

Za izvođenje BST-a, odpipetirano je 5 ml iz svake epruvete i pomiješano s 50 µl mikrobne suspenzije. Nakon inkubacije od 1, 6, 20 i 24 sata na 37°C, rađena su deseterostruka razrjeđanja koja su nasadivana na krvni agar, brojane bakterijske kolonije (CFU), te rezultati izraženi u log CFU/ml.

Test je rađen u duplikatu i ponavljan tri puta.



### 3.6. Statistička obrada

#### Aktivnost makrofaga

Za svaku od ispitivanih makrofagnih funkcija, razlike između pojedinih materijala tijekom vremena uspoređene su testom dvosmjerne analize varijance. Jednim od post-hoc testova (LSD test) analizirana je razlika između kontrole i svakog od pojedinih materijala, kao i između pojedinih parova materijala u svakoj točki inkubacije.

Pearsonovim koeficijentom korelacije određena je sveza između različitih indeksa makrofagne aktivnosti. Statistička značajnost određivana je na razini  $p \leq 0,001$  i  $p \leq 0,05$ .

#### Ispitivanje citotoksičnosti

Friedmanovim testom analizirana je razlika u broju stanica za svaki ispitivani materijal kroz vrijeme. Mann-Whitneyevim U testom testirane su razlike između ispitivanog materijala i kontrolne grupe te između pojedinih parova materijala u svim točkama mjerenja. Statistička značajnost određivana je na razini  $p \leq 0,05$ .

#### Antimikrobni učinak

Kruskal-Wallisovim testom ocjenjivana je razlika u broju mikroorganizama s obzirom na vrijeme inkubacije.

Mann-Whitneyevim U testom analizirane su razlike između pojedinih vremena inkubacije, te između materijala i kontrole za svaki period inkubacije. Statistička značajnost određivana je na razini  $p \leq 0,05$ .

## 4. REZULTATI

### 4.1. Aktivnost makrofaga

Aktivnost makrofaga u neposrednom dodiru s materijalima za punjenje korijenskog kanala ispitivana je analizom četiri osnovne funkcije: adherencije, fagocitoze, metabolička aktivnost i mikrobicidne sposobnosti makrofaga.

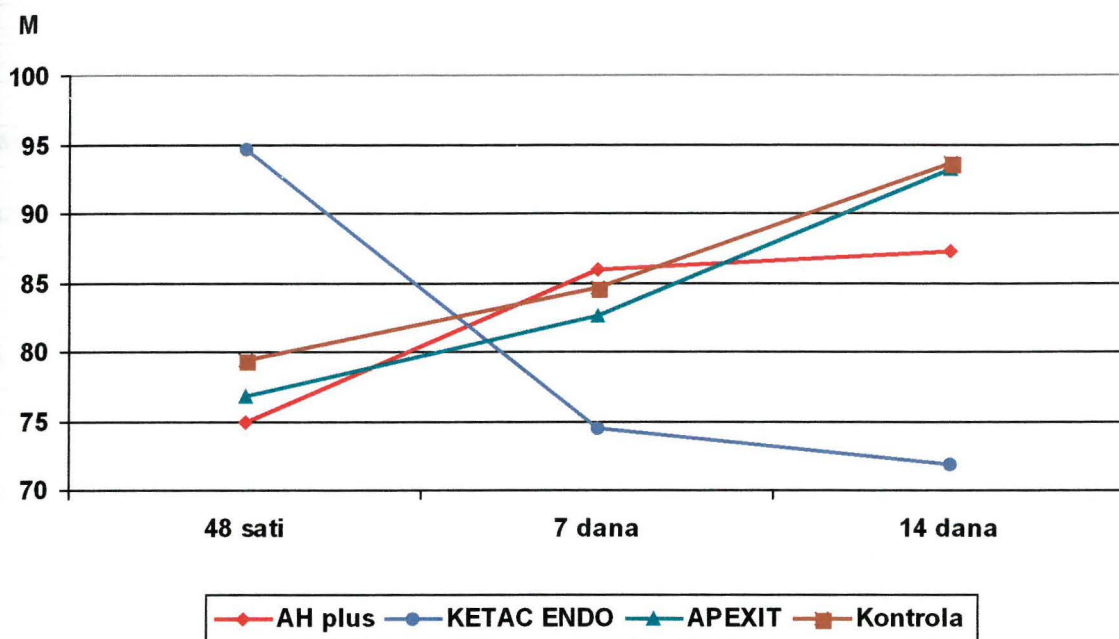
#### 4.1.1. Adherencija

Sposobnost adherencije makrofaga u prisutnosti različitih materijala za punjenje korijenskog kanala izražena je indeksom adherencije (AI) kroz zadane vremenske periode. Dobivena je statistički značajna interakcija između ispitivanih materijala i vremena inkubacije ( $p \leq 0,001$ ) (Tablica 3, slika 2).

Tablica 3. Rezultati dvosmjerne analize varijance za indeks adherencije

Izvor varijable	Suma kvadrata	df	Aritmetička sredina kvadrata	F	p
Korigirani model	2148,786	11	195,344	4,954	$\leq 0,001$
Presjecište	255114,934	1	255114,934	6470,389	$\leq 0,001$
Materijali	149,023	3	49,674	1,260	$\leq 0,001$
Vrijeme	188,316	2	94,158	2,388	$\leq 0,001$
Materijal*vrijeme	1776,708	6	296,118	7,510	$\leq 0,001$
Pogreška	985,702	25	39,428		
Ukupno	258484,193	37			

df – stupnjevi slobode, F – F omjer, p – razina statističke značajnosti



Slika 2. Indeks adherencije (aritmetička sredina) za ispitivane materijale i kontrolu kroz vrijeme inkubacije

Iz slike 2 je vidljivo da postoje razlike u prosječnom AI među pojedinačnim materijalima i u odnosu na kontrolu. Tako se može uočiti da je AI za Ketac Endo u prvih 48 sati znatno veći od kontrole ( $p \leq 0,05$ ), ali naglo pada nakon 7 dana i dalje nastavlja padati do kraja inkubacije. AI za Apexit i AH Plus raste kroz vrijeme, iako je znatno niži u odnosu na kontrolu. LSD testom se pokazalo da u ukupnom vremenskom intervalu niti između ispitivanih materijala, niti između pojedinog materijala i kontrole ne postoji statistički značajna razlika u AI. Međutim, ako se sagledaju pojedine vremenske točke, uočava se da su vrijednosti za Ketac Endo u odnosu na kontrolu i ostala dva materijala statistički značajno različite nakon 2 i 14 dana, a nakon 7 dana samo u odnosu na AH Plus ( $p \leq 0,05$ ). Između ostalih grupa nema statistički značajne razlike u pojedinim vremenskim intervalima.



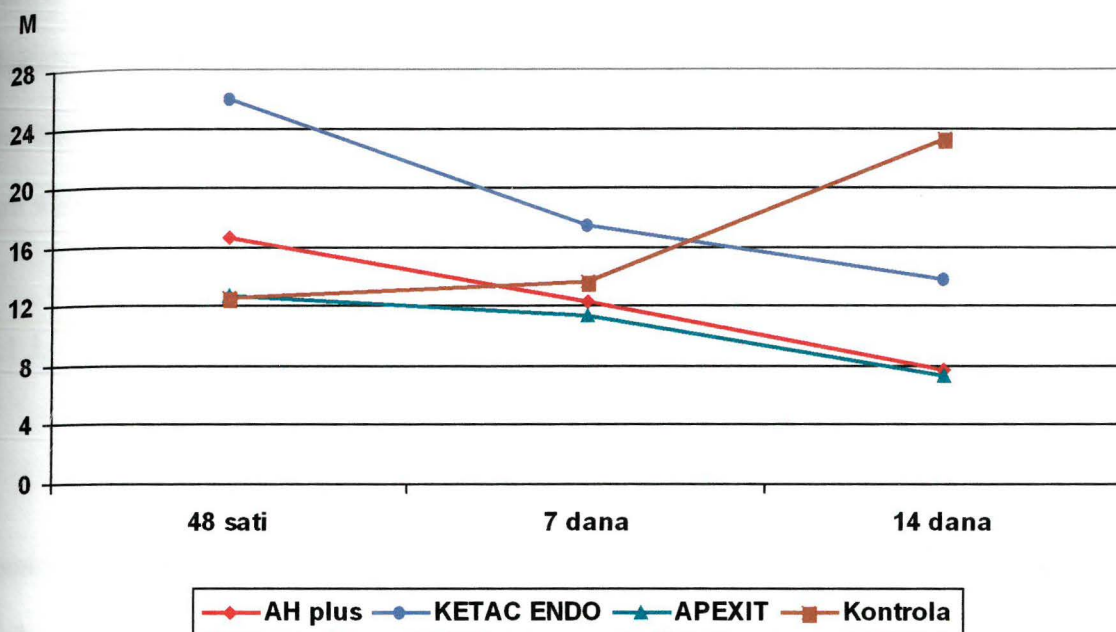
#### 4.1.2. Fagocitoza

Sposobnost fagocitoze makrofaga, izražena kroz indeks fagocitoze (IF), statistički se značajno mijenja za pojedini materijal s obzirom na vrijeme inkubacije ( $p \leq 0,001$ ), što je prikazano u tablici 4 i slici 3.

Tablica 4. Rezultati dvosmjerne analize varijance za indeks fagocitoze

<b>Izvor varijable</b>	<b>Suma kvadrata</b>	<b>df</b>	<b>Aritmetička sredina kvadrata</b>	<b>F</b>	<b>p</b>
Korigirani model	1030,906	11	93,719	17,777	$\leq 0,001$
Presjecište	7811,481	1	7811,481	1481,684	$\leq 0,001$
Materijali	420,353	3	140,118	26,578	$\leq 0,001$
Vrijeme	111,215	2	55,608	10,548	$\leq 0,001$
Materijal*vrijeme	507,613	6	84,602	16,047	$\leq 0,001$
Pogreška	131,801	25	5,272		
Ukupno	9082,950	37			

df – stupnjevi slobode, F – F omjer, p – razina statističke značajnosti



Slika 3. Indeks fagocitoze (aritmetička sredina) za ispitivane materijale i kontrolu kroz inkubacijsko vrijeme

IF je kod kontrole u stalnom porastu tijekom inkubacije, a kod ostalih materijala je vidljivo da on opada kroz isto vrijeme. Ketac Endo je pokazao statistički značajno različit IF u odnosu na kontrolu i AH Plus kroz sve vremenske intervale, a u odnosu na Apexit samo nakon 7 dana ( $p \leq 0,05$ ). AH Plus nakon 48 sati ima statistički značajno viši IF od kontrole i Apexita, a nakon 14 dana samo od Apexita ( $p \leq 0,05$ ). Apexit u odnosu na kontrolu ima statistički značajno manju vrijednost IF tek nakon 14 dana inkubacije ( $p \leq 0,001$ ).

Nadalje je ispitano je li ukupni broj makrofaga koji imaju sposobnost fagocitoze (pozitivni makrofagi) i prosječni broj kandida koje su u njima nađene statistički značajno utjecala na vrijednost IF kod pojedinog materijala ili kontrole. Rezultati dvosmjerne analize varijance pokazuju da ne postoji statistički značajna razlika u prosječnom broju pozitivnih makrofaga, niti s obzirom na materijal, niti s obzirom na vrijeme inkubacije. Međutim, istom

analizom se pokazalo da je prosječni broj kandidate u tim makrofazima statistički značajno različit i s obzirom na materijal i s obzirom na vrijeme, te je daljnjim testiranjem LSD testom dokazana statistički značajna razlika prosječnog broja kandidate između Apexita i ostala dva materijala u svim vremenskim točkama, dok između Ketac Endo i AH Plusa nije bilo razlike niti u jednoj točki ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.3. Mikrobicidna sposobnost makrofaga

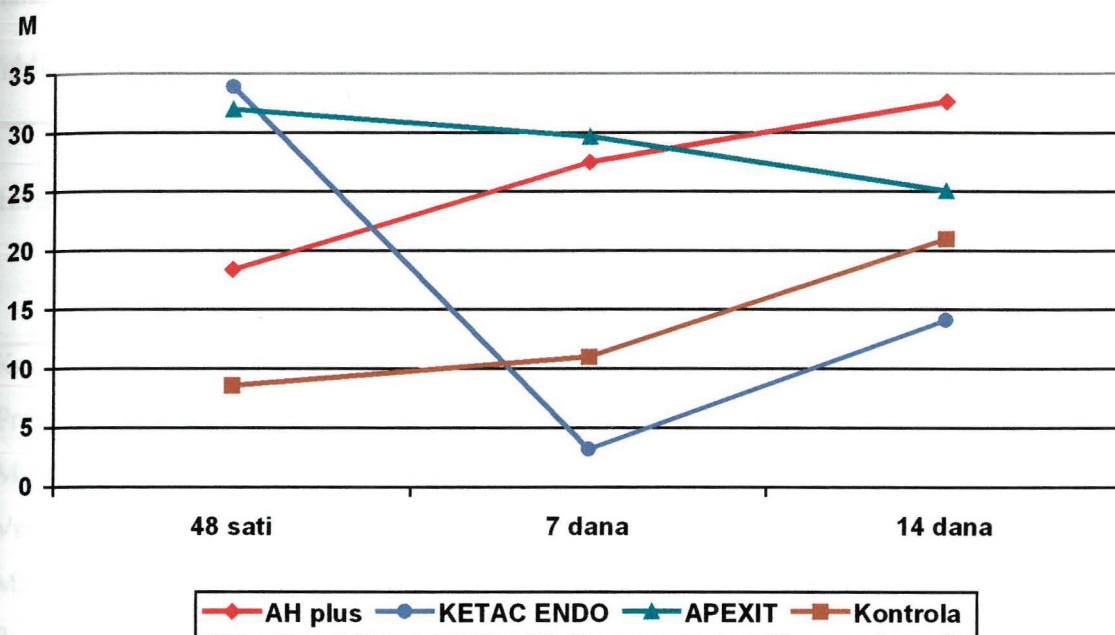
Mikrobicidna sposobnost makrofaga izražena je kao postotak ubijene *C. albicans* u stanici makrofaga. Promjene u prosječnom broju ubijene kandidate su statistički značajne za svaki materijal i za kontrolu, s obzirom na dužinu vremena inkubacije ( $F = 3,146$ ;  $p \leq 0,05$ ). (Tablica 5, slika 4).

Tablica 5. Rezultati dvosmjjerne analize varijence za Killing test

Izvor varijable	Suma kvadrata	df	Aritmetička sredina kvadrata	F	p
Korigirani model	2610,135	11	237,285	3,351	$\leq 0,05$
Presjecište	20593,021	1	20593,021	290,778	$\leq 0,001$
Materijali	1281,236	3	427,079	6,030	$\leq 0,05$
Vrijeme	15,846	2	7,923	0,112	
Materijal*vrijeme	1337,011	6	222,835	3,146	$\leq 0,05$
Pogreška	1770,513	25	70,821		
Ukupno	24856,220	37			

df – stupnjevi slobode, F – F omjer, p – razina statističke značajnosti





Slika 4. Postotak ubijene *C. albicans* (aritmetička sredina) za ispitivane materijale i kontrolu kroz vrijeme

Rezultati pokazuju da svaki ispitivani materijal u odnosu na kontrolu pokazuje statistički značajnu razliku u postotku ubijene kandidate nakon 48 sati i 7 dana ( $p \leq 0,05$ ). Usporedbom materijala međusobno, dobivena je statistički značajna razlika samo između Apexita i AH Plus nakon 48 sati, te između Ketac Endo i AH Plus nakon 48 sati i 14 dana ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.4. Metabolička aktivnost makrofaga

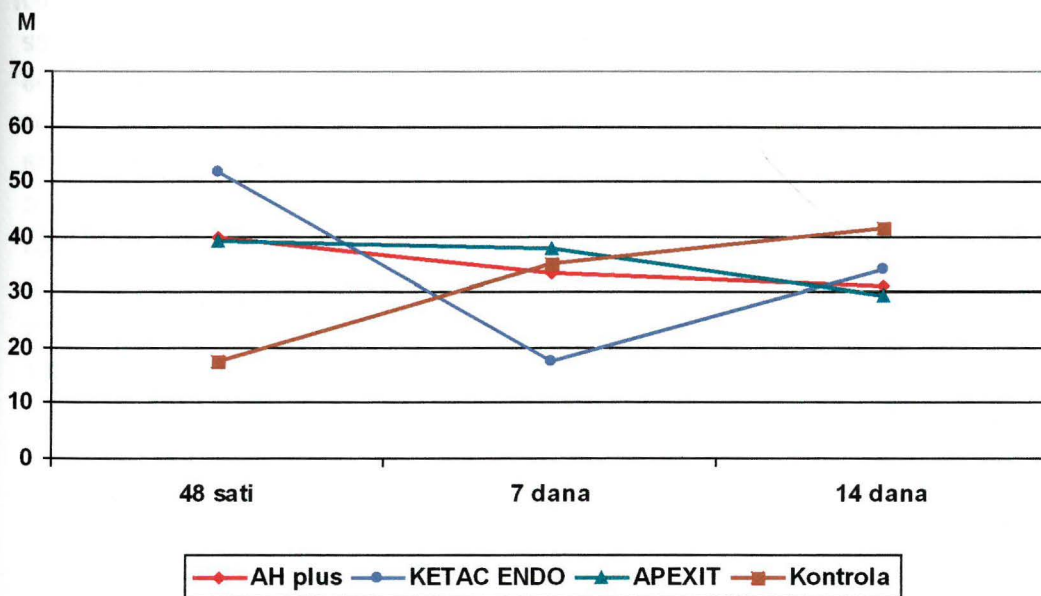
NBT testom ispitana je metabolička aktivnost makrofaga i rezultati su izraženi kao postotak NBT pozitivnih stanica na 100 fagocita.

Dobivena je statistički značajna razlika u postotku pozitivnih NBT stanica kod svakog materijala u odnosu na vrijeme inkubacije ( $p \leq 0,001$ ) (Tablica 6; slika 5).

Tablica 6. Rezultati dvosmjerne analize varijence za NBT test

Izvor varijable	Suma kvadrata	df	Aritmetička sredina kvadrata	F	p
Korigirani model	3117,215	11	283,383	6,166	$\leq 0,001$
Presjecište	42663,934	1	42663,934	928,246	$\leq 0,001$
Materijali	86,229	3	28,743	0,625	$\leq 0,05$
Vrijeme	227,027	2	113,514	2,470	$\leq 0,05$
Materijal*vrijeme	2782,976	6	463,829	10,092	$\leq 0,001$
Pogreška	1149,047	25	45,962		
Ukupno	47594,258	37			

df – stupnjevi slobode, F – F omjer, p – razina statističke značajnosti

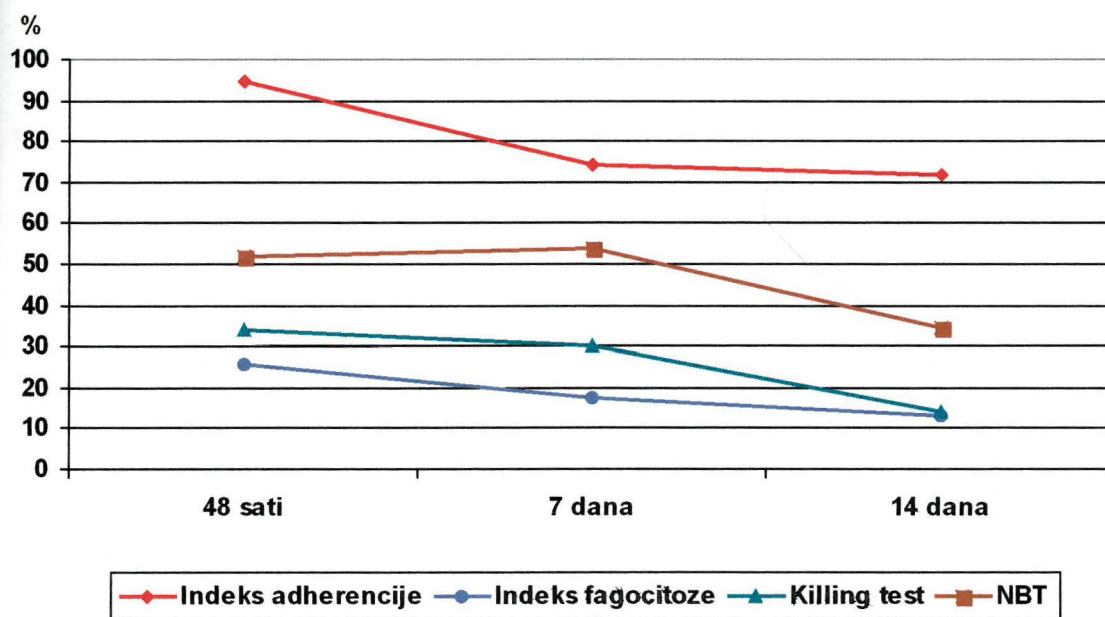


Slika 5. Postotak NBT pozitivnih stanica (aritmetička sredina) za ispitivane materijal i kontrolu kroz vrijeme

Vidljivo je da metabolička aktivnost makrofaga u kontrolnoj grupi postupno raste kroz vrijeme, dok kod Apexita i AH Plusa pada prema 14. danu. Međutim, razlika te vrijednosti kod ova dva materijala u odnosu na kontrolu je statistički značajna samo u prvih 48 sati ( $p \leq 0,05$ ), a u ostalim intervalima, kao i kod Ketac Endo, nije značajna. Između pojedinih parova ispitivanih materijala statistički značajnih razlika ima samo između Ketac Endo i AH Plus i između Ketac Endo i Apeksita nakon 48 sati i 7 dana ( $p \leq 0,05$ ).

#### 4.1.5. Utjecaj materijala na makrofagne funkcije

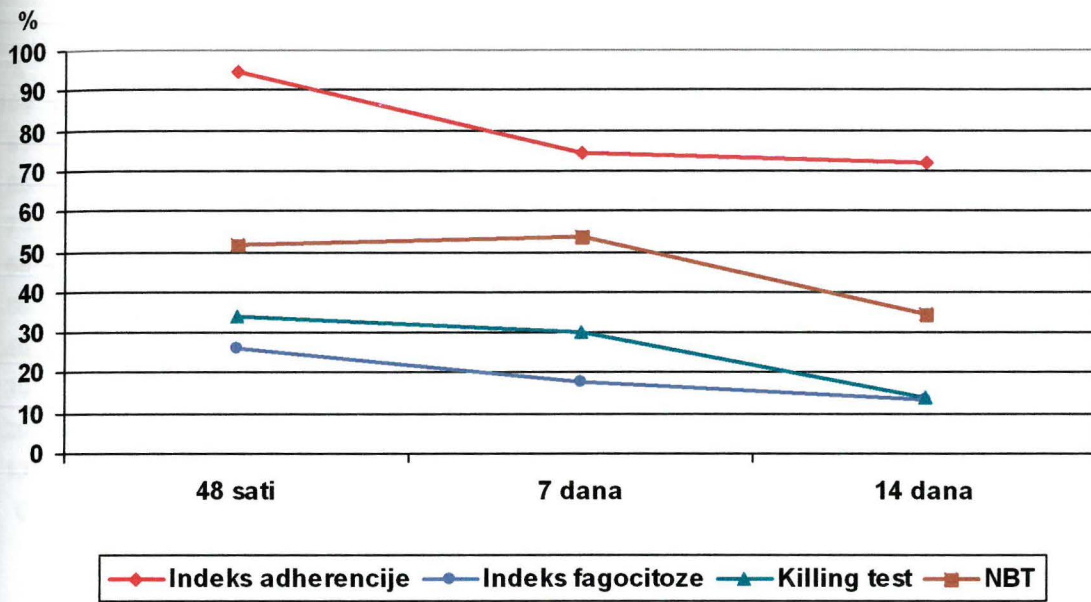
Da bi vidjeli utjecaj pojedinog materijala na ispitivane funkcije makrofaga, rezultate smo objedinili na slikama 6 a-d.



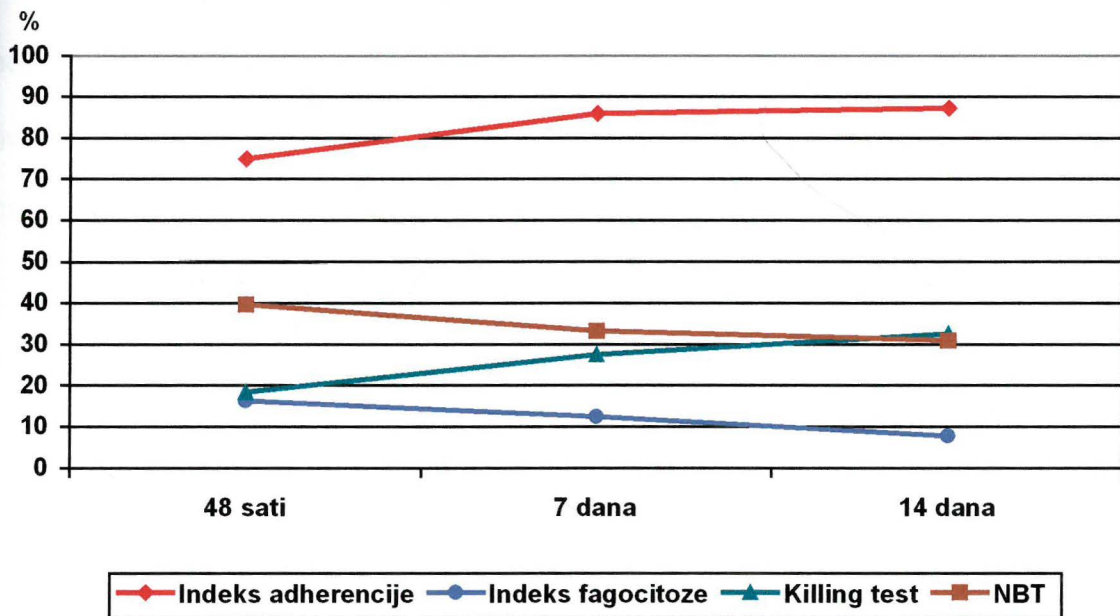
Slika 6. Vrijednosti pojedinih indeksa s obzirom na vrijeme inkubacije za:

a) KETAC ENDO

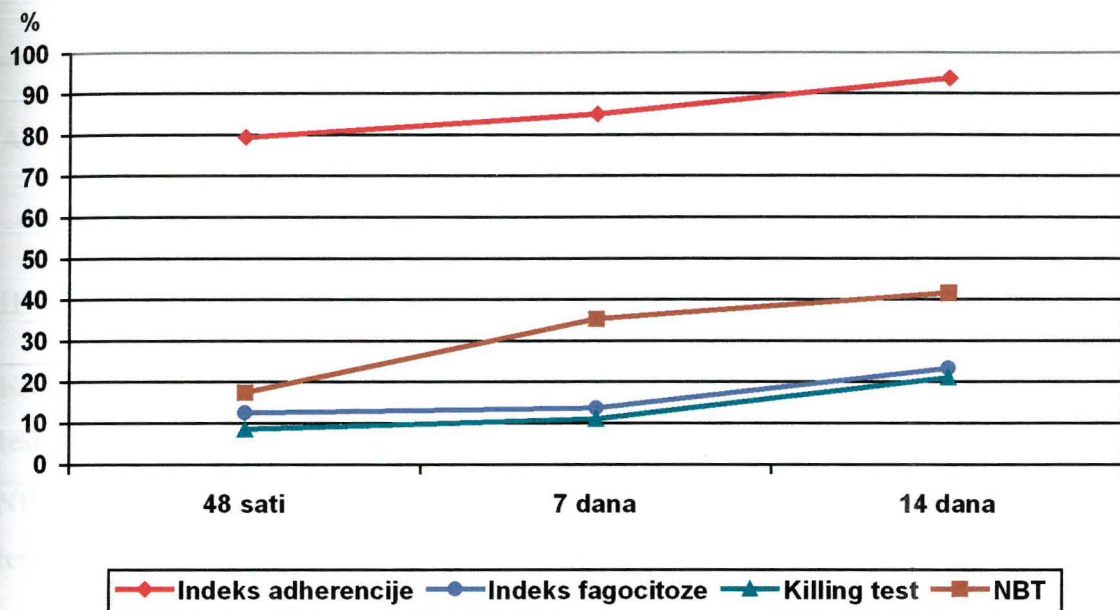




b) APEXIT



c) AH PLUS



#### d) KONTROLNA GRUPA

Promatrajući prosječne vrijednosti svih obrađenih testova za svaki ispitivani materijal može se zaključiti da tijekom ispitivanog vremenskog perioda svi materijali, osim Ketac Endo djeluju poticajno na adherenciju kao prvu fazu u obrambenoj aktivnosti makrofaga. Daljnje funkcije makrofaga mijenjaju se ovisno o materijalu.

Uporabom Pearsonova koeficijenta korelacije ispitali smo odnos između različitih indeksa (Tablica 7).

Tablica 7. Koeficijenti korelacije između ispitivanih indeksa

		<b>AI</b>	<b>IF</b>	<b>Killing test</b>	<b>NBT test</b>
<b>AI</b>	Pearson-ova korelacija	1,000	0,223	0,292	0,027
	Značajnost		0,487	0,356	0,934
	Broj	12	12	12	12
<b>IF</b>	Pearson-ova korelacija	0,223	1,000	0,080	0,678*
	Značajnost	0,487		0,805	0,015
	Broj	12	12	12	12
<b>Killing test</b>	Pearson-ova korelacija	0,292	0,080	1,000	0,550
	Značajnost	0,356	0,805		0,064
<b>NBT test</b>	Pearson-ova korelacija	0,027	0,678*	0,550	1,000
	Značajnost	0,934	0,015	0,064	
	Broj	12	12	12	12

\*  $p \leq 0,05$

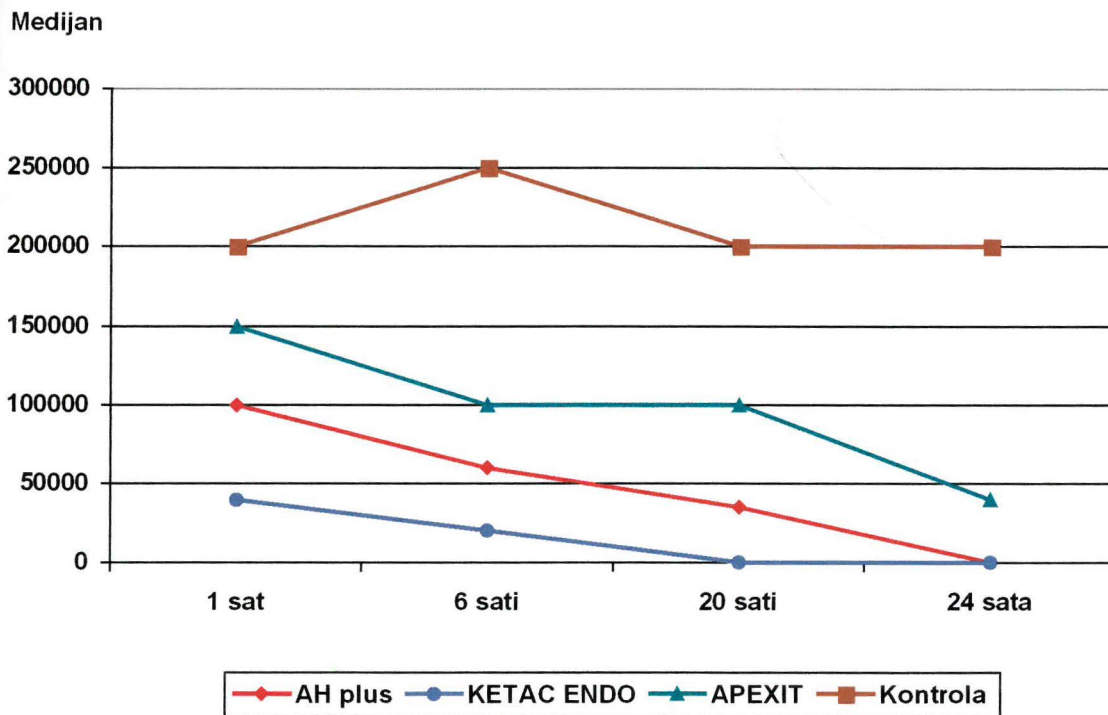
Dobivena je statistički značajna pozitivna povezanost između indeksa fagocitoze i NBT testa ( $p \leq 0,05$ ). Dakle, što je indeks fagocitoze veći, veća je i vrijednost NBT testa i obratno. Između ostalih indeksa nema statistički značajne povezanosti.

## 4.2. Citotoksičnost materijala za punjenje korijenskog kanala

### 4.2.1. Određivanje broja stanica

Glede procjene toksičnog učinka pojedinog ispitivanog materijala na živu stanicu, vitalnim bojanjem je pod svjetlosnim mikroskopom određivan broj živih stanica u uzorcima, s obzirom na vrijeme inkubacije.

Rezultati su pokazali da u kontrolnoj grupi, koju su sačinjavali teflonski diskovi bez materijala, ne dolazi do statistički značajne promjene u broju živih stanica kroz vrijeme, kao ni kod Apexita, dok kod ostala dva materijala: AH plus i Ketac Endo dolazi do statistički značajnog pada u broju živih stanica ( $p \leq 0,05$ ) (Slika 7).



Slika 7. Prosječan broj živih stanica/ml (medijan) kroz četiri inkubacijska perioda



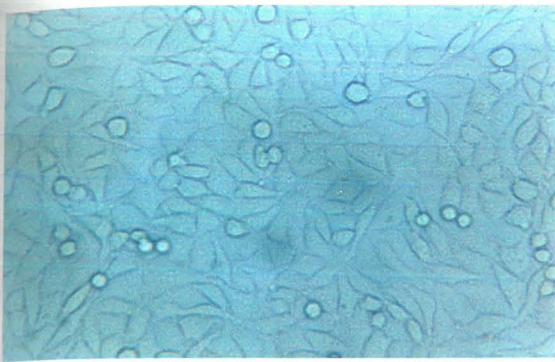
Promatranjem razlike između ispitivanih materijala i kontrole u pojedinim vremenskim točkama dokazano je da jedino Ketac Endo u svim inkubacijskim razdobljima pokazuje statistički značajan pad broja živih stanica ( $p \leq 0,05$ ), dok su kod Apexita i AH Plus te razlike statistički značajne od 6. do 24. sata inkubacije ( $p \leq 0,05$ ). Usporedbom broja stanica između pojedinih parova ispitivanih materijala dobivene su statistički značajne razlike u svim vremenskim periodima ( $p \leq 0,05$ ), osim nakon prvog sata inkubacije. Ispitano je između kojih točno parova materijala postoje razlike

Tako je uočeno da, u odnosu na Apexit, Ketac Endo ima statistički značajno manji broj stanica u svim vremenskim intervalima ( $p \leq 0,05$ ), a AH Plus tek nakon 6, 20. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ). Ketac Endo u odnosu na AH Plus pokazuje statistički značajan pad broja živih stanica samo nakon 1. i 20. sata inkubacije ( $p \leq 0,05$ ), dok u ostalim inkubacijskim periodima ta razlika nije statistički značajna.

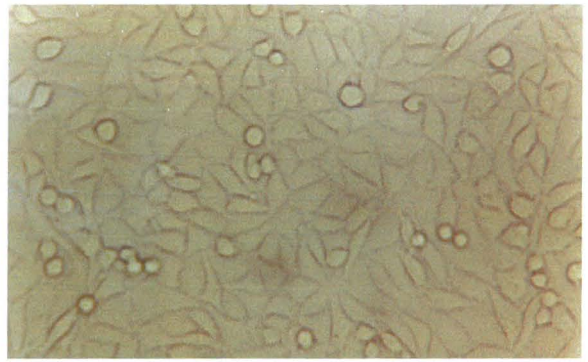
#### 4.2.2. Morfološke promjene stanica

U neposrednom dodiru stanica mišjih fibroblasta i ispitivanih materijala nakon inkubacije od 1, 6, 20 i 24 sata, osim promjene broja stanica, uočena je i promjena u njihovoj morfologiji.

Stanice koje su služile kao kontrola tijekom cijelog inkubacijskog razdoblja su bile guste, zadržavši svoj prirodni vretenasti oblik, a samo neznatni broj stanica je postao okruglast, što je vidljivo na slikama 8 a i b.



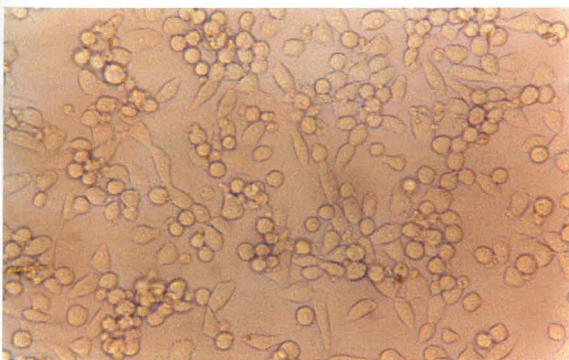
a)



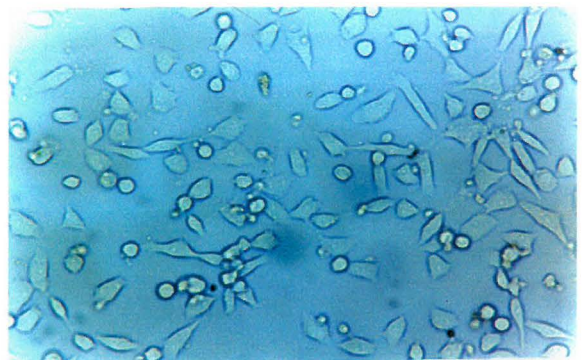
b)

Slika 8. Stanice mišjih fibroblasta L 929 nakon 20-satne (a) i 24-satne (b) inkubacije (pov. 20 x)

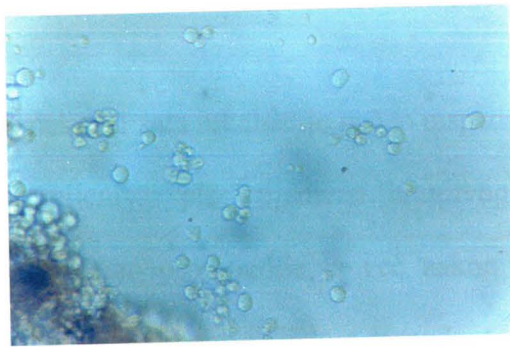
U usporedbi s kontrolom, najmanje su se promijenile stanice koje su bile u dodiru s Apexitom. Nakon 20-satne inkubacije (Slika 9a) stanice se nisu bitno morfološki promijenile, većinom su očuvale vretenasti oblik, uz rijetke nakupine okruglastih stanica. Očuvana morfologija vidljiva je i nakon 24 sata (Slika 9b), ali uz smanjenje broja stanica. Neposredno uz disk, stanice su bile rijetke i poprimile su okrugli oblik (Slika 9c).



a)



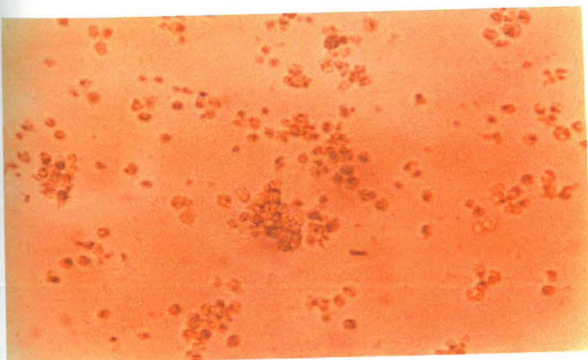
b)



c)

Slika 9. L 929 stanice izložene 20-satnom (a), 24-satnom (b) djelovanju Apexita i 24-satnom djelovanju Apexita neposredno uz teflonski disk (c) (pov. 20 x)

Već nakon 20 sati u kontaktu s AH Plus materijalom došlo je do potpunog gubitka normalnog oblika stanica. Stanice su se smanjile i potpuno zaokružile, te znatno prorijedile (Slika 10a). Oko diska su vidljiva područja potpuno bez stanica, a rijetko očuvane stanice su zrnate strukture, u nakupinama (Slika 10b).



a)



b)



Slika 10. L 929 stanice izložene 24-satnom djelovanju AH Plusa na periferiji (a) (pov. 20 x) i neposredno uz teflonski disk (b) (pov. 10 x)

Ketac Endo se već nakon 1 sata inkubacije počeo raspadati, a nakon 6 sati je bio raspršen po cijelom zdencu promijenivši pH vrijednost hranjivog medija. Stanice su se istom dinamikom morfološki potpuno promijenile, a već nakon 20 sati više nije bilo vidljivih stanica u zdencu, već su samo bili vidljivi dijelovi raspadnutog materijala.

### **4.3. Antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskog kanala**

#### **4.3.1. Test difuzije u agaru (ADT)**

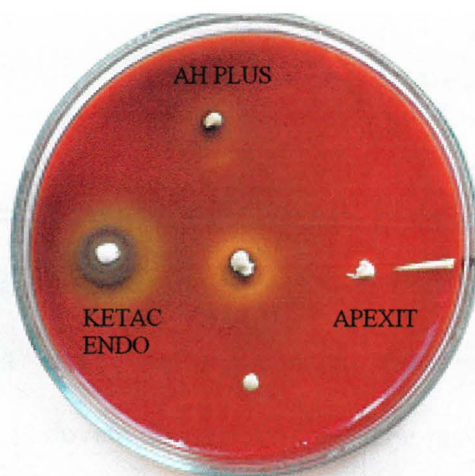
Primjenom ovog testa nakon 24-satne inkubacije, svježe zamiješani Ketac Endo je nakon tri mjerenja pokazao statistički značajno veću ( $p \leq 0,05$ ) zonu inhibicije rasta *E. faecalis* ( $x = 12,26 \pm 1,76$  mm) u usporedbi s AH Plus ( $x = 5,67 \pm 0,66$  mm) i Apexitom ( $x = 0,80 \pm 0,29$  mm) (Tablica 8). Širina zone inhibicije oko ispitivanih materijala prikazana je na slici 11.



Tablica 8. Zone inhibicije ispitivanih materijala u mm primjenom ADT-a

MATERIJAL	Zona inhibicije (mm)	
	x	SD
Ketac Endo	12.26	1.76
AH Plus	5.67	0.66
Apexit	0.80	0.29

x - aritmetička sredina, SD – standardna devijacija



Slika 11. Zone inhibicije rasta *E. faecalis* oko ispitivanih materijala

#### 4.3.2. Test preživljavanja u bujonu (BST)

Rezultati antimikrobnog učinka 5-dnevno odležanog Apexita prikazani su u tablici 9.

Tablica 9 . Broj mikroorganizama (logCFU/ml) nakon inkubacije s Apexitom. Vrijednost je izražena kao aritmetička sredina  $\pm$  standardna devijacija

Vrijeme/h	Mikroorganizmi (logCFU/ml)			
	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. putida</i>
kontrola	6,00 $\pm$ 0,05	7,06 $\pm$ 0,06	7,04 $\pm$ 0,10	7,00 $\pm$ 0,10
1	6,09 $\pm$ 0,01	6,77 $\pm$ 0,02	6,56 $\pm$ 0,06	6,84 $\pm$ 0,04
6	5,79 $\pm$ 0,01	4,36 $\pm$ 0,13*	3,17 $\pm$ 0,02*	3,35 $\pm$ 0,15*
20	5,73 $\pm$ 0,01	2,68 $\pm$ 0,10*	2,71 $\pm$ 0,09*	1,15 $\pm$ 0,05*
24	5,43 $\pm$ 0,07	2,45 $\pm$ 0,05*	1,54 $\pm$ 0,06*	0*

\*  $p \leq 0,05$

Može se uočiti da se broj svih ispitivanih mikroorganizama, osim *C. albicans*, statistički značajno smanjio u odnosu na kontrolu nakon 6, 20 i 24 sata inkubacije.

Zasićena vodena otopina čistog kalcij-hidroksida (pH = 12,4) pokazala je snažnu antimikrobnu aktivnost, te je dovela do potpune inhibicije rasta *C. albicans*, *S. marcescens* i *P. putida* već nakon 1 sat inkubacije. Iznimka je *S. aureus* koji je preživio inkubaciju od 1 sata (logCFU/ml = 2,67  $\pm$  0,25) i 6 sati (1,14  $\pm$  0,14).

#### 4.3.3. Test izravnog dodira (DCT)

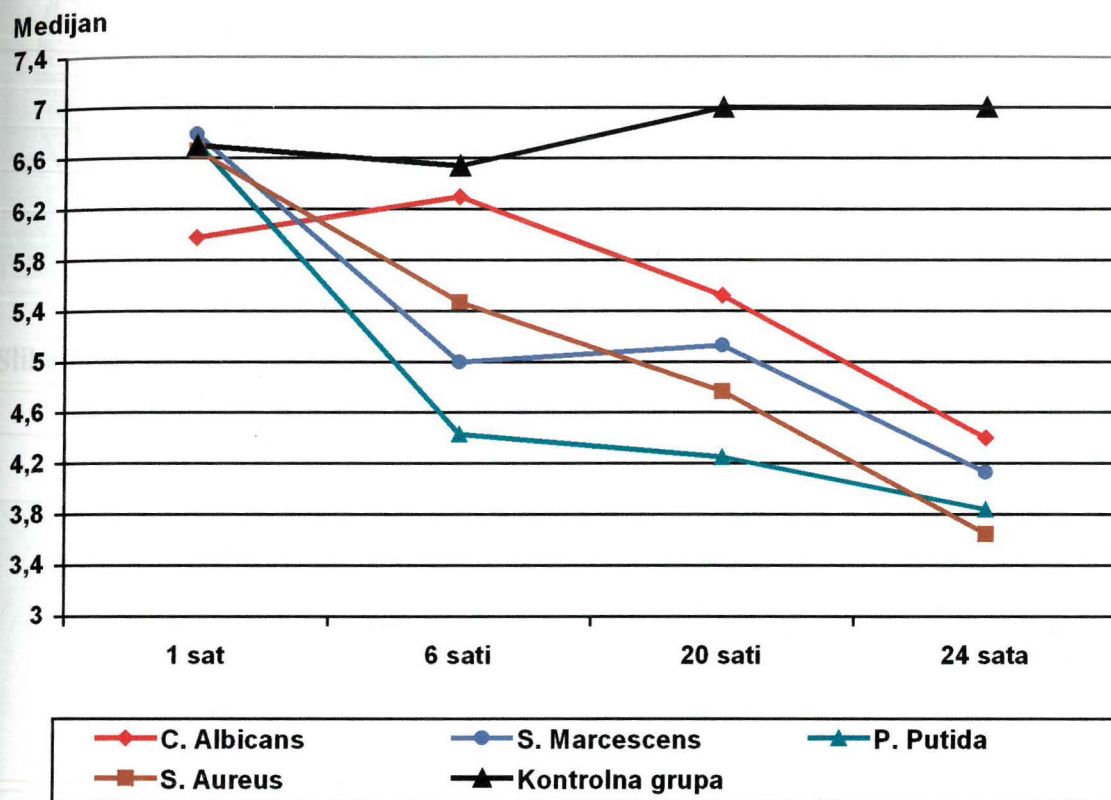
Testom izravnog dodira procjenjivao se antimikrobni učinak svakog ispitivanog materijala s tri različite bakterije i jednom gljivom.

## A. Apexit

Na slici 12 je prikazana promjena u broju ispitivanih mikroorganizama nakon neposrednog dodira s Apexitom tijekom inkubacijskog perioda od 1, 6, 20 i 24 sata.

Broj svih mikroorganizama u dodiru s Apexitom opada s vremenom inkubacije. Statistički značajno pada broj *C. albicans* i to između: 1. i 20, 1. i 24, te između 6. i 20. i 6. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ); *P. putida* između 1. i 6, 1. i 20. i 1. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ) i također statistički značajno pada broj *S. aureus* između 1. i 6, 1. i 20. i 1. i 24. sata, te između 6. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ).

U odnosu na kontrolu, broj *C. albicans* je statistički znatno manji u svim inkubacijskim periodima, a broj *P. putida* i *S. aureus* u svim vremenskim razdobljima, osim u 1. satu ( $p \leq 0,05$ ). *S. marcescens* je samo nakon 6 sati inkubacije s Apexitom pokazala statistički manju vrijednost od kontrole ( $p \leq 0,05$ ).



Slika 12. Utjecaj Apexita na ispitivane mikroorganizme. Rezultati su prikazani kao medijana vrijednost  $\log_{10}$ CFU/ml

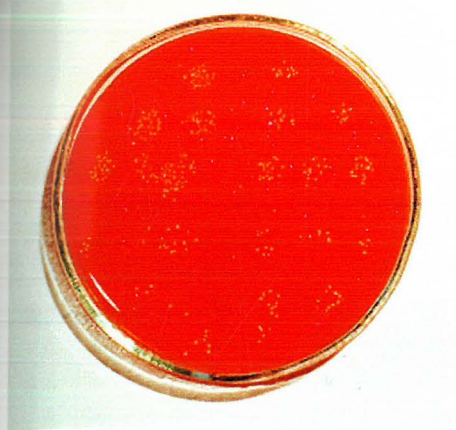
## B. Ketac Endo

Tijekom 24-satne inkubacije s Ketac Endo došlo je do statistički značajnog pada u broju *C. albicans* i *S. aureus* ( $p \leq 0,05$ ), dok je isti materijal već nakon 1. sata inkubacije doveo do potpune inhibicije rasta *S. marcescens* i *P. putida* (Slika 15).

Statistički značajan pad broja kolonija kandidate uočen je samo u periodu između 6. i 20. i 6. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ), a stafilokoka između 1. i 24, 6. i 20, te 6. i 24. sata ( $p \leq 0,05$ ).

U odnosu na kontrolu, *S. aureus* je pokazao statistički značajno manje vrijednosti kroz sve vremenske periode ( $p \leq 0,05$ ), a *C. albicans* nakon 6, 20 i 24 sata ( $p \leq 0,05$ ). Smanjenje broja kolonija ovih mikroorganizama vidljivo je na Slici 13 i 14.

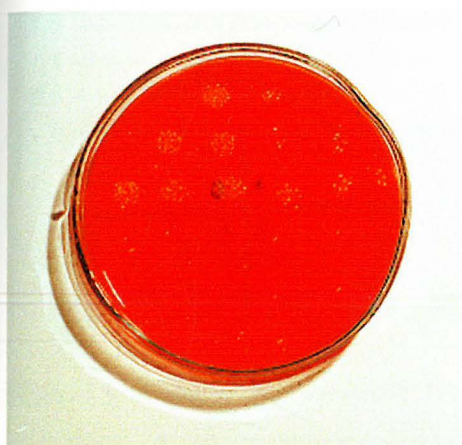




Slika 13. DCT nakon 20-satnog dodira (a) i 24-satnog dodira (b) *C. albicans* s KE

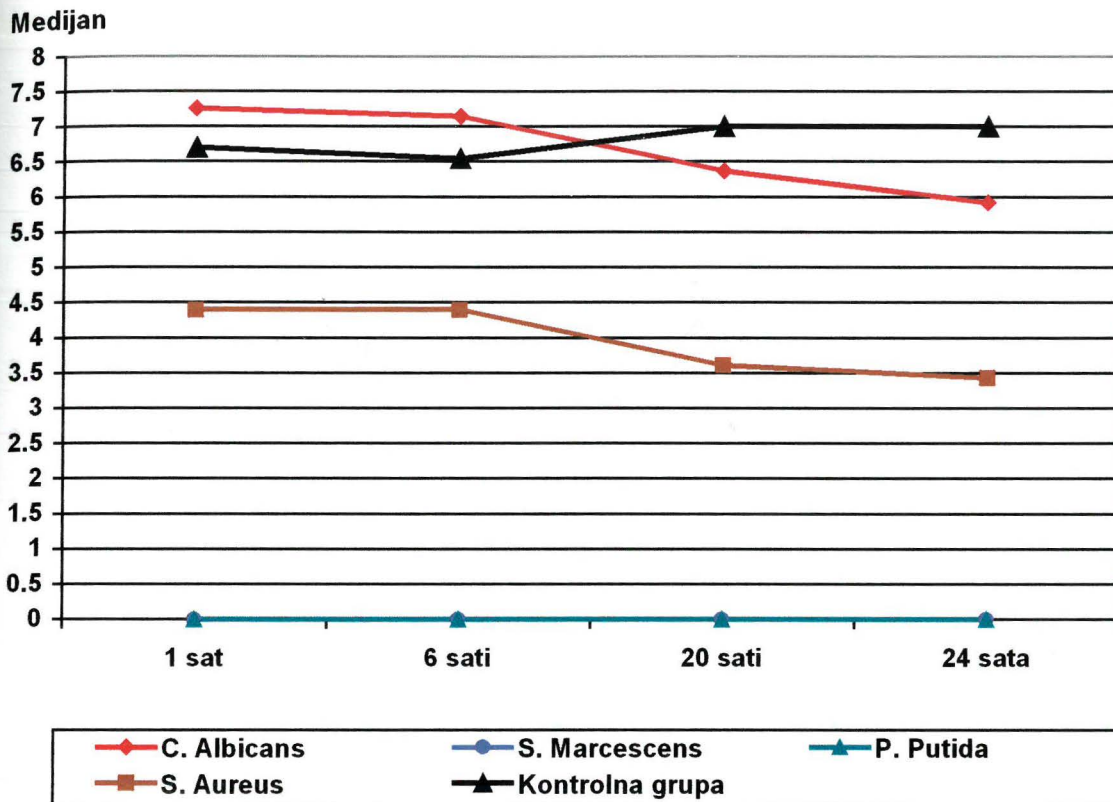
a)

b)



Slika 14. DCT nakon 20-satnog dodira (a) i nakon 24-satnog dodira

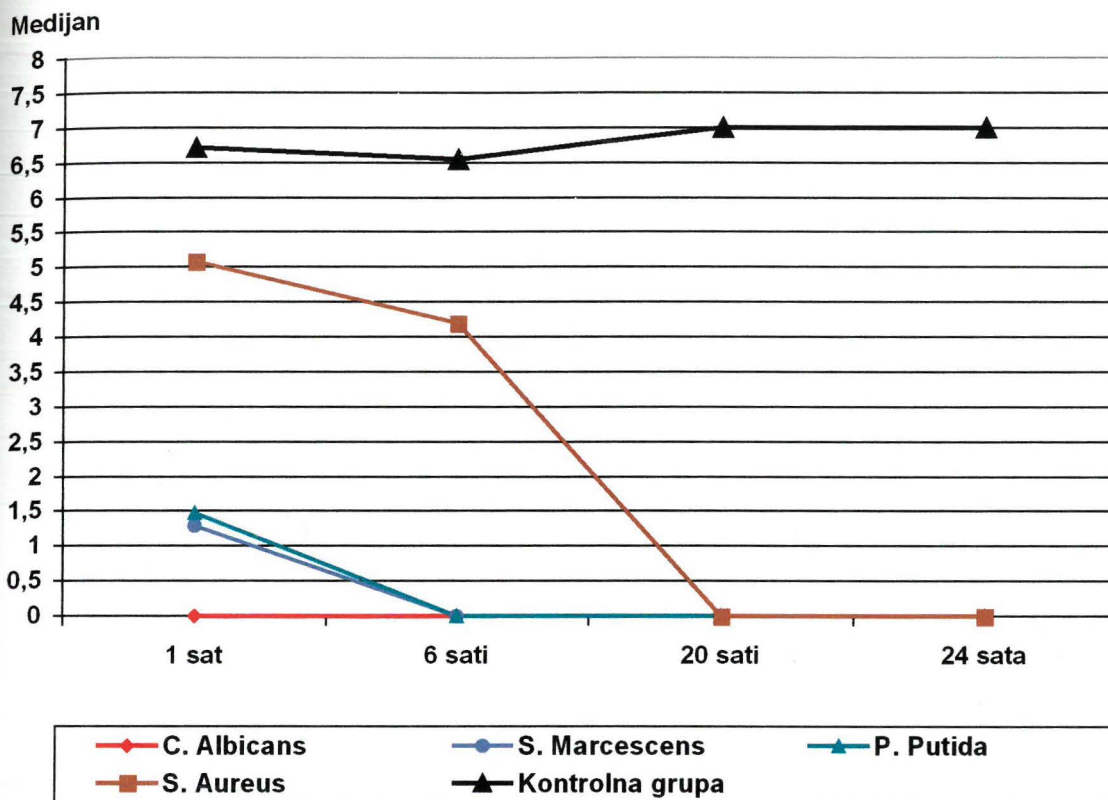
*S. aureus* s KE (b)



Slika 15. Utjecaj Ketac Endo na ispitivane mikroorganizme. Rezultati su prikazani kao medijana vrijednost  $\log_{10}\text{CFU/ml}$

### C. AH Plus

Nakon neposrednog dodira s AH Plus materijalom, došlo je do potpune inhibicije rasta *C. albicans* već nakon 1. sata inkubacije, a *S. marcescens* i *P. putida* nakon 6. sata. Kolonije *S. aureusa* bile su prisutne nakon 1. i 6. sata iako im se broj statistički značajno smanjio ( $p \leq 0,05$ ), a potpuni prestanak rasta uočen je nakon 20 sati (Slika 16).



Slika 16. Utjecaj AH Plusa na ispitivane mikroorganizme. Rezultati su prikazani kao medijana vrijednost  $\log_{10}\text{CFU/ml}$

Kolonije *S. marcescens* prisutne su samo nakon 1 sat inkubacije u statistički znatno nižem broju od kontrole ( $p \leq 0,05$ ). *S. aureus* je u odnosu na kontrolu također pokazao statistički značajno manje vrijednosti nakon 1 sat ( $p \leq 0,05$ ) i nakon 6 sati ( $p \leq 0,05$ ), nakon čega je došlo do potpunog prestanka njihovog rasta (Slika 17).



Slika 17. DCT nakon 1-satnog dodira *S. aureus*  
s AH Plus



## 5. RASPRAVA

Biokompatibilnost je pojam koji ni danas nema precizno određenu i prihvaćenu definiciju, ali podrazumijeva neškodljivost biomaterijala u dodiru s ljudskim tkivom i tekućinama (106).

Testiranja biokompatibilnosti su temeljna i bez njih bi primjena materijala u medicini bila dvojbeno. Mnoge sirovine koje se rabe u sintezi biomaterijala za različite namjene testirane su već tijekom proizvodnje i deklarirane od strane proizvođača ili dobavljača kao biokompatibilne. Međutim, kako pojam biokompatibilnosti nije standardiziran i ujednačen, kao i zato što se sirovina ili sastavni dio može promijeniti procesom obrade ili pripreme, smatramo neophodnim provoditi ispitivanja i na krajnjem proizvodu. U slučaju endodontskih materijala, način i dužina miješanja, vanjska temperatura, stupanj tvrdoće itd, postupci su koji utječu na biokompatibilnost samog materijala. Stoga smo u našim ispitivanjima rabili konačne proizvode, materijale pripremljene prema preporuci proizvođača, onakve kakve rabimo u svakodnevnoj stomatološkoj praksi. Testirali smo tri materijala različitih kemijskih sastava, koji su dostupni na tržištu i koji se rabe u rutinskoj endodontskoj terapiji: Apexit-biološki cement na bazi kalcij-hidroksida; AH Plus-sintetski cement, te Ketac Endo-jedan od novijih, staklo-ionomernih cemenata. Uporabom niza testova ispitivali smo različite aspekte biokompatibilnosti: imunomodulatorna svojstva, citotoksičnost i antimikrobni učinak.

Osnovni cilj punjenja korijenskog kanala, kao završne etape u endodontskoj terapiji, je hermetično ispuniti kanal inertnim, dimenzionalno stabilnim i biološki kompatibilnim materijalom (107). Iz toga proizlazi stalna potreba za traženjem materijala koji bi što bolje zadovoljavao navedenim zahtjevima. U literaturi se za ispitivanje učinka biomaterijala navode mnogobrojne metode *in vivo*, kao što su injiciranje materijala ili implantiranje teflonskih ili polietilenskih tuba ispunjenih materijalom u subkutano tkivo ili kost, uporaba peritonealnih

eksudacijskih stanica nakon dodira s materijalom, kao i *in vitro* metode testiranja citotoksičnosti na staničnoj kulturi. No, nabrojani testovi većinom su ograničenih mogućnosti zbog pomanjkanja fizioloških uvjeta ili zbog problema u razlikovanju reakcije u okolnom zdravom tkivu (108).

Dinamična reakcija između makrofaga i biomaterijala je od iznimne važnosti za opstanak materijala u tkivu kao i za odgovarajući lokalni imunološki odgovor. Naime, materijali kojima se ispunjava endodontski prostor dolaze u izravni dodir s okolnim tkivom periapeksa, a osobito u slučaju prepunjenja. Makrofazi su osnovne imunološke stanice u periapeksnom tkivu odgovorne za njegovo cijeljenje, ali i oštećenje (109). Zbog toga, ukoliko neki od punila utječu na funkcije makrofaga, mogu bitno izmijeniti lokalni imunološki odgovor u periapeksnom tkivu.

U našem istraživanju je kao izvor makrofaga služila trbušna šupljina BALB/c miševa koja predstavlja pogodnu sredinu za ispitivanje stanične reakcije potaknute stranim materijalom budući da je jasno odijeljena od okolnog tkiva. Ujedno, trbušna šupljina miša predstavlja fiziološku sredinu sličnu onoj humanoj gdje se, uz minimalno učešće koagulacijskog sustava, može jednostavno procjenjivati upalna reakcija (108). Dinamični odnos između makrofaga i biomaterijala je od iznimne važnosti za opstanak materijala u tkivu.

Nakon injiciranja endodontskih materijala iz različitih skupina u trbušnu šupljinu, prikupili smo peritonealne makrofage i u *in vitro* uvjetima ispitali neke od njihovih funkcija. Primijetili smo da je početni broj stanica bio najveći u miševa kojima je injiciran KE materijal. To je materijal koji je prihvaćen u kliničkoj praksi zbog dobre sveze sa stijjenkom kanala i minimalnih dimenzionalnih promjena nakon stvrdnjavanja (110). Iako nema dostupnih podataka o njegovoj topivosti (111), tijekom naših pokusa u tekućem okolišu ovaj materijal se raspršio u sitne čestice po cijeloj trbušnoj šupljini, za razliku od ostala dva materijala koja su poput kamenčića ostali stvrdnuti na mjestu injiciranja. Osim toga, nakon 14 dana, u životinja



injiciranih s KE je došlo do povećanja slezene i jetre što može biti posljedica putovanja makrofaga s fagocitiranim materijalom prema udaljenim organima (102). Ranu burnu reakciju na KE potvrđuju i naši rezultati vezani uz adherenciju i fagocitozu peritonealnih makrofaga. Naime, u prvih 48 sati indeks adherencije i fagocitoze je za KE bio znatno veći i u odnosu na kontrolu i na druge ispitivane materijale. Početna stimulacija makrofaga se može dovesti u svezu s konzistencijom samog materijala koji se nakon inokulacije raspršio po cijeloj trbušnoj šupljini, budući je dokazano da veličina čestice ima kritičnu ulogu u procesu fagocitoze (102). Poticajno djelovanje materijala na fagocitozu može biti klinički povoljno ukoliko vodi k uništavanju bakterija i stranih čestica, ali ako aktivacija predugo traje, obično završava kroničnom upalom ili nepotpunim cijeljenjem tkiva. Makrofazi u toj ranoj aktivnoj fazi, osim fagocitoze, imaju ulogu sekretornih stanica jer otpuštaju biološki snažne medijatore koji također mogu imati pozitivnu ulogu i pomoći normalnom cijeljenju tkiva ili djelovati sasvim suprotno pospešujući stvaranje kroničnih granulacija (112).

Ketac Endo je pokazao i snažan citotoksični učinak u kulturi fibroblasta te doveo do statistički značajnog smanjenja njihovog broja kroz 24 sata. Ovakav snažan citotoksični učinak ponovno pripisujemo konzistenciji samog materijala. Kao i u trbušnoj šupljini, KE se vrlo brzo raspršio po zdencu mikrotitracijske pločice, doveo do zakiseljavanja medija te neposredno i posredno utjecao na stanice u kulturi. Naši su rezultati u skladu s rezultatima Pattona i sur. (113), isto kao i s rezultatima Kana i sur. (114) koji su svoja ispitivanja citotoksičnosti proveli na staklo-ionomernim cementima koji se rabe u restorativnoj stomatologiji. Oni citotoksični učinak pripisuju ionima fluora, ali i drugim još nedokazanim tvarima koje se otpuštaju u medij kulture stanica. Postoje međutim i sasvim suprotni rezultati: Pissiotis i Spangberg (115) nisu dokazali citotoksični učinak KE na L 929 stanice, kao ni Beltes i sur. (111) na BHK 21 stanicama. Kolokuris i sur. (116) su usađivanjem KE u subkutano tkivo miša dokazali da nema upalne reakcije u tkivu, ali se ova ispitivanja u *in vivo*

uvjetima teško mogu neposredno usporediti s onima *in vitro* zbog različitosti u metodi ispitivanja. Međutim, *in vitro* pokusi mogu biti od pomoći u procjeni biokompatibilnosti dentalnih materijala.

Ostala dva ispitivana materijala – Apexit i AH Plus također su pokazala utjecaj na adherenciju makrofaga koja je rasla s vremenom inkubacije. Ipak, ukoliko rezultate uspoređujemo s kontrolnom skupinom, može se uočiti da je taj učinak smanjen. Rezultati Segura i sur. (117, 118), kao i Jimenez-Rubio i sur. (119) su također pokazali sniženu sposobnost adherencije mišjih peritonealnih makrofaga na otopine za ispiranje korijenskih kanala. Taj učinak pripisuju kelacijskom učinku nekih od ispitivanih otopina, budući da je za proces adherencije potrebna prisutnost iona kalcija u mediju (120).

Slabija adherencija makrofaga može imati fiziološko značenje i *in vivo* na razini periapeksa nakon punjenja korijenskog kanala ovim materijalima. Kako je adherencija na površinu (substrat) prvi korak u procesu fagocitoze i prezentacije antigena, i Apexit i AH Plus mogu inhibirati daljnje funkcije makrofaga i mijenjati imunološki i upalni odgovor u pulpi i periapeksnom tkivu.

Dobiveni rezultati pokazuju da je sposobnost fagocitoze termički obrađenih blastokonidija, sukladno sposobnosti adherencije, sustavno slabila tijekom vremena kod svih materijala u usporedbi s kontrolom. Smanjivala se također i sposobnost ubijanja fagocitiranih častica, kao i metabolička aktivnost peritonealnih makrofaga. Iznimka su rezultati “Killing” testa za AH Plus. Unatoč inhibitornom utjecaju na fagocitozu, mikrobicidna sposobnost je ostala očuvana, odnosno rasla je prema 14. danu i u svim točkama inkubacije bila viša od kontrole.

U dostupnoj literaturi nismo našli podatke o utjecaju endodontskih materijala na metaboličke procese koji se odvijaju u makrofazima. Međutim, ispitivanja provedena na modelu implantiranih biomaterijala u drugim tkivima pokazala su da složeni proces probave



stranog materijala unutar fagocita ovisi o raznim čimbenicima: površinskim svojstvima materijala, veličini i obliku čestica i mjestu implantiranog materijala (102,121). Veličina čestica ima jednu od značajnijih uloga u aktivaciji makrofaga i njihovoj sposobnosti izazivanja upalnog odgovora. Upravo time se može tumačiti stimulatívni učinak KE materijala na proces fagocitoze u prva dva dana. Već je spomenuto da se ovaj materijal nije odmah stvrdnuo, već raspršio na sitne čestice koje su snažno potaknule adherenciju i fagocitozu makrofaga.

NBT test se može rabiti kao neizravan pokazatelj mikrobicidne sposobnosti makrofaga. Djelovanjem ispitivanih endodontskih materijala došlo je do smanjenja redukcije nitroblue-tetrazoliuma i pada u broju NBT pozitivnih makrofaga, dakle smanjene metaboličke, a stoga i kandidicidne aktivnosti. Očekivali smo i potvrdili pozitivan odnos NBT testa i indeksa fagocitoze.

Kod svih testova koji se, djelomično ili u cijelosti, odvijaju u *in vivo* modelu je teško u potpunosti kontrolirati sve parametre. Stoga, u ocjeni biokompatibilnosti nekog materijala vrlo važnu ulogu imaju testovi *in vitro* u kojima se svi čimbenici mogu savršeno kontrolirati (122).

Za dokazivanje toksičnosti materijala za punjenje korijenskog kanala, kao i njihovih sastavnih dijelova, danas se rabe različite vrste staničnih kultura. U nekim studijama se rabe transformirane ili tumorske stanice ali se pokazalo da zbog bioloških svojstava koja su različita od normalnih diploidnih stanica ne pružaju najpouzdaniju sliku odgovora na toksični podražaj (123). Poslijednjih godina se u pokusima najviše rabe humane diploidne stanice, te mišji fibroblasti (124). Toksičnost se procjenjuje kvalitativno, praćenjem morfoloških promjena samih stanica koje su izložene djelovanju materijala, te kvantitativno, prateći broj živih stanica u kulturi u određenom vremenskom razdoblju.

Učinci Ketac Endo na živu stanicu, kao i na aktivnost makrofaga, već su objašnjeni. Naime, svojim brzim raspadom, KE se raspršio po cijeloj staničnoj kulturi i doveo do brze promjene pH, zbog čega su stanice u roku od 20 sati potpuno nestale. Obzirom da je KE imao i naj snažniji imunomodulacijski učinak, proizlazi da citotoksičnost materijala neposredno utječe na imuno/upalni odgovor makrofaga (125). Ovu smo tezu potvrdili i u slučaju Apexita, iako u sasvim suprotnom smjeru. Apexit, predstavnik kalcij-hidroksid materijala, je pokazao najmanji toksični učinak tijekom 24-sata i u usporedbi s kontrolom i ostalim materijalima. U tom razdoblju nije se statistički značajno smanjio niti broj fibroblasta niti se značajno promijenila njihova morfologija. Tako niski citotoksični učinak cemenata na bazi kalcij-hidroksida potvrđena su u različitim studijama (126,124). Baltés i sur. (111) su ispitujući tri materijala na bazi kalcij-hidroksida (Apexit, Sealapex, CRCS) na kulturama L 929 i BHK 21/C13 stanicama također utvrdili da je upravo Apexit najmanje citotoksičan. Budući da su rezultati ovog ispitivanja pokazali da Apexit ima i najmanje izražen utjecaj na aktivnost makrofaga u usporedbi s drugim materijalima, potvrdili smo hipotezu o međusobnoj ovisnosti citotoksičnosti materijala i fagocitozne sposobnosti makrofaga (100). Međutim, o citotoksičnosti kalcij-hidroksidnih materijala postoje kontroverzni rezultati. Neki autori tvrde da Apexit potiče upalni odgovor tkiva i dovodi do citolize (127,124). Leonardo i sur. (122) taj učinak pripisuju njegovoj jakoj lužnatosti budući da u sastavu nema eugenola koji je prisutan u drugim tvorničkim preparatima na bazi kalcij-hidroksida (kao npr. CRCS), a kojem se pripisuje toksični učinak. Kada su u pitanju smolasti materijali, u koje spada i ovdje ispitivani AH Plus, nalazi su ujednačeniji i podudarniji (128). Naime, u većini ispitivanja je dokazano da su ovi materijali jako toksični u početku primjene i unošenja u korijenski kanal, dok se kasnije, s početkom njihova stvrdnjavanja, ta citotoksičnost znatno smanjuje (107,128,129). Citotoksični učinak AH 26 se pripisuje epoksi-bisfenol smoli u njegovom sastavu koja otpušta formaldehid tijekom stvrdnjavanja (124). Iako su se uvođenjem novijeg AH Plus materijala



željeli prevladati negativni učinci AH 26 na živo tkivo, u nekim je ispitivanjima i ovaj materijal pokazao štetni učinak na živu stanicu (130,131). Rakich i sur. (125) to pripisuju rezidualnim učincima lipofilne smole na funkciju stanične membrane i aminima koji potiču polimerizaciju čime se koči njena metabolička aktivnost u *in vitro* uvjetima. Naše istraživanje potvrđuje ove rezultate budući da je AH Plus izrazito smanjio broj stanica tijekom inkubacije u usporedbi s kontrolom i u potpunosti izmijenio izgled preživjelih fibroblasta. Promjene su osobito bile izražene neposredno uz teflonski disk s materijalom gdje je uočeno područje potpune citolize koje mikroskopski pokazuje samo ostatke membrane, citoplazme i jezgre.

Ovim testovima pokazali smo da ispitivani materijali utječu na živu stanicu, te dovode do promjene makrofagnih funkcija *in vitro*. Točan mehanizam i čimbenici koji su u to uključeni nisu još poznati, ali se u kliničkim uvjetima njihovo djelovanje na okolno tkivo može odraziti na tijek cijeljenja.

Još je jedno bitno svojstvo koje se očekuje od današnjih materijala za punjenje korijenskog kanala i koje svakako doprinosi njihovoj atraktivnosti. To je antimikrobna aktivnost koja može pomoći u uklanjanju mikroorganizama zaostalih nakon biomehaničke obrade kanala (132). Ispitivanje navedenog svojstva se također može provesti u *in vivo* i *in vitro* uvjetima.

Jedan od češće rabljenih *in vitro* testova je test difuzije u agaru (ADT). To je metoda koja najviše sliči rutinskoj disk difuzijskoj metodi antibiograma po Kirby-Bauer-u kojom se ispituje osjetljivost i otpornost izoliranih mikroorganizama prema različitim antibioticima. U slučaju ADT, na površinu podloge, na koju je neposredno prije nasađena kultura *E. faecalis*, stavili smo 0,1 g svježe zamiješanih materijala. Mjerenjem zone inhibicije rasta enterokoka oko ispitivanih materijala, uočili smo da je promjer zone najveći oko KE, znatno manji oko AH Plus, dok izostaje oko Apexita. Materijal na bazi kalcij-hidroksida je u ovom testu iskazao najslabiji antibakterijski učinak. Neučinkovito djelovanje kalcij-hidroksid materijala

AH Plus, dok izostaje oko Apexita. Materijal na bazi kalcij-hidroksida je u ovom testu iskazao najslabiji antibakterijski učinak. Neučinkovito djelovanje kalcij-hidroksid materijala na rast enterokoka istom metodom pokazali su i Siqueira i Uzeda (133), te Barbosa i sur. (134) navodeći kao razlog slabu topivost tih materijala pri čemu se ne otpušta dovoljno hidroksilnih iona koji bi povisili pH vrijednost medija. Naime, pH vrijednost veća od 9 može povratno ili nepovratno onesposobiti djelovanje enzima mikroorganizama dovodeći do uništenja fosfolipida i nesaturiranih masnih kiselina rezultirajući gubitkom cjelovitosti stanične membrane (135). No, kako se radi o difuzijskoj metodi u kojoj antimikrobne čestice moraju difundirati kroz agar, očito mogu biti ispitivani samo materijali topivi u vodi (29). Osim spomenutog, brojni su čimbenici i poteškoće koje također utječu na rezultate ovakvog testiranja. Tako rezultati ADT uvelike ovise i o molekularnoj masi, veličini i obliku antimikrobnih tvari; njihovoj sposobnosti difuzije; gustoći inokuluma; viskoznosti agara; vremenu inkubacije i tijesnom dodiru između materijala i agara (53,54). Zbog navedenih nedostataka i zbog činjenice da se ovim testom ne može odrediti radi li se o mikrobiostatskom ili mikrobicidnom učinku (132), odlučili smo se za test izravnog dodira (DCT) koji je kvantitativan i neovisan o topivosti i difuzibilnosti čestica materijala. Ispitali smo antimikrobnu aktivnost svakog endodontskog punila prema tri bakterije različitih svojstava i jednoj gljivi. To su gram-pozitivni koki *S. aureus*, gram-negativna fermentirajuća bakterija *S. marcescens* i nefermentirajući štapić *P. putida*. Spektar smo proširili kvascem, *C. albicans*, koja je uobičajeni stanovnik usne šupljine i ponekad uzročnik neuspjeha endodontske terapije.

Bez obzira što je metoda sasvim različita od ADT, Apexit ponovno nije pokazao očekivani antimikrobni učinak. Naime, tijekom vremena, Apexit je smanjio broj mikroorganizama ali ih nije uspio potpuno uništiti. Za razliku od Apexita, KE i AH Plus su pokazali baktericidni učinak, posebno prema gram negativnim bakterijama, i to KE već nakon



jednog, a AH Plus nakon 6 sati inkubacije. Dodatno, AH plus je iskazao i kandidicidno djelovanje nakon jednog sata.

Antimikrobna aktivnost materijala za punjenje korijenskog kanala ovisi o tvarima koje se otpuštaju iz punila, pa se tako antimikrobni učinak AH Plusa pripisuje epoksi-smolama, Apexita hidroksilnim ionima, a KE otpuštanjem iona fluora (53,132). Međutim te antimikrobne čestice endodontskih punila nisu selektivno toksične već ispoljavaju toksični učinak i na stanice domaćina, što je potvrđeno i u našem istraživanju.

Rezultati DCT-a ukazuju na najsnažniji antimikrobni učinak AH Plusa, što je u skladu s nalazima Helinga i sur. (136) i Al-Khatiba i sur.(137). Nalazi Abdulkadera i sur. (2) glede antimikrobne aktivnosti Ketac Endo cementa u podudarnosti su s našim rezultatima dobivenim uporabom oba *in vitro* testa u kojima se KE pokazao kao snažan inhibitor rasta ispitivanih bakterija. Isti autori tu učinkovitost pripisuju niskom pH svježe zamiješanog KE i otpuštanjem fluoridnih iona, ali ne isključuju mogućnost istog učinka i drugih sastavnih dijelova ovog cementa.

Za materijale na bazi kalcij-hidroksida se navodi da su u prednosti pred drugim materijalima za punjenje korijenskog kanala jer su relativno biokompatibilni, a ujedno posjeduju značajnu antimikrobnu aktivnost (2,35,138). Ovaj učinak se pripisuje njegovoj sposobnosti razlaganja na ione kalcija i hidroksilne ione koji podižu vrijednost pH i time blokiraju bakterijske enzime (139). No, naši rezultati nisu pokazali značajan antimikrobni učinak Apexita. Možda razlike u rezultatima mogu potjecati iz razlika u proporciji prisutnog kalcij-hidroksida i pH uzoraka tijekom ispitivanja. Iz tog razloga uveli smo u ispitivanje još jedan *in vitro* test – BST. Ispitali smo učinkovitost Apexita koji je pet dana stario u PBS-u, te postigao pH vrijednost 9,7. Kao pozitivnu kontrolu rabili smo zasićenu vodenu otopinu čistog kalcij-hidroksida čiji je pH iznosio 12,4. Očekivano, čisti kalcij-hidroksid iskazao je izuzetno snažan antimikrobni učinak i doveo do potpune inhibicije rasta svih ispitivanih

mikroorganizama već nakon jednog sata. Samo je *S. aureus* preživio 6 sati, pokazavši još jednom svoju otpornost. Ipak, potvrdili smo djelotvornost visokog pH u sprječavanju rasta mikroorganizama (37,139). Izmjereni pH stvrdnutog i odstajalog Apexita bio je znatno niži (pH= 9,7), te je antimikrobni učinak bio slabiji od čistog kalcij-hidroksida, ali izraženiji nego kod svježe zamiješanog materijala.

Zbog međusobne ovisnosti raznih čimbenika koji utječu na biokompatibilnost i antibakterijsko djelovanje materijala za punjenje korijenskog kanala te složenog tkivnog odgovora na njihovu prisutnost potrebno je dalje provoditi sveobuhvatna *in vivo* i *in vitro* istraživanja materijala glede njihove sigurnije kliničke primjene. Pri tome se mora uzeti u obzir da su *in vitro* rezultati relativni i ne mogu se neposredno prenijeti u *in vivo* uvjete. Naime, na *in vitro* ispitivanje biokompatibilnosti mogu utjecati razni čimbenici: tehnika koja se primjenjuje, vrsta stanica i medij, ali i fizička svojstva materijala (veličina čestica, površina i slobodna površinska energija i sl.) (102). Zbog toga u literaturi postoje kontroverzni podaci o biokompatibilnosti i antimikrobnom učinku materijala za punjenje korijenskog kanala dostupnih na tržištu.

Sva ispitivanja koja se provode i koja će se provoditi u budućnosti imaju za cilj što bolje poznavanje ponašanja stanica okolnog vitalnog tkiva s kojima endodontski materijali dolaze u izravni dodir. Posebno se to odnosi na kliničke slučajeve s apeksnim patološkim procesima gdje uporaba materijala koji ne zadovoljavaju zahtjevima biokompatibilnosti može spriječiti proces cijeljenja. Zbog toga je dobro poznavanje navedenih svojstava materijala važno za kliničku praksu, budući da uspješnost endodontske terapije ne ovisi samo o tehnici obrade nego i o odabiru odgovarajućeg materijala za punjenje korijenskih kanala.

## 6. ZAKLJUČAK

1. Materijali za punjenje korijenskih kanala dovode do promjene funkcije makrofaga *in vitro*:
  - a) Ketac Endo u prvih 48 sati djeluje stimulativno na adherenciju, fagocitozu, kandidicidnu i metaboličku aktivnost makrofaga, a nakon 7 i 14 dana, u odnosu na kontrolu, sve su funkcije u opadanju,
  - b) AH Plus djeluje inhibitorno na proces adherencije i fagocitoze nakon 7 i 14 dana, ali je mikrobicidna sposobnost makrofaga u porastu prema 14. danu i u svim točkama je viša od kontrole,
  - c) Apexit smanjuje sposobnost adherencije i fagocitoze makrofaga tijekom ispitivanog vremena. Kandidicidna sposobnost makrofaga je također u opadanju ali je statistički značajno veća od kontrole u prvih 7 dana ( $p \leq 0,05$ ).
2. Usporedbom svih indeksa makrofagne aktivnosti, očekivan je i potvrđen pozitivan odnos između indeksa fagocitoze i NBT testa.
3. Visoku razinu citotoksičnosti na modelu stanične kulture pokazuju Keate Endo i AH Plus, a najmanju Apexit.
4. Apexit dovodi do najmanje morfološke promjene stanica mišjih fibroblasta tijekom 24 sata.
5. Utjecajem na živu stanicu i funkciju makrofaga, ovi materijali u kliničkim uvjetima mogu dovesti do promjene imuno/upalnog odgovora periapeksnog tkiva.
6. Najsnažniji antimikrobni učinak, primjenom DCT-a i ADT-a, iskazuju Ketac Endo i AH Plus, a Apexit, suprotno očekivanju, najslabiji učinak.
7. Primjenom BST-a, dokazana je djelotvornost visokog pH vodene otopine čistog kalcij-hidroksida u sprječavanju rasta mikroorganizama.



## 7. LITERATURA

1. Weine FS. Terapia endodontica. Milano: Scienza e tecnica dentistica edizioni internazionali; 1982, str. 371-385.
2. Abdulkader A, Duguid R, Saunders EM. The antimicrobial activity of endodontic sealers to anaerobic bacteria. *Int Endod J* 1996;29:280-283.
3. Peters LB, Wesselink PR, Moorer WR. The fate and the role of bacteria left in root dentinal tubules. *Int Endod J* 1995;28:95-99.
4. Schilder H. Vertical compaction of warm gutta percha. U: Gerstein H. Techniques in clinical endodontics. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1983; str. 76.
5. Bence R. Handbook of clinical endodontics. St Louis: The C. V. Mosby Company, 1980; str. 1.
6. Nguyen TN. Obturation of the Root Canal System. U: Cohen S, Burns RC. Pathways of the Pulp. St. Louis: Mosby-Year Book, 1994; str. 219.
7. Besner E, Michanowicz AE, Michanowicz JP. Practical Endodontics- A Clinical Atlas. St. Louis: Mosby-Year Book, 1994; str. 137.
8. Castelucci A. Endodonzia. Bologna: Edizioni Martina, 1996; str. 432-457.
9. Ingle JI, Beveridge E, Glick D, Weichman J. The Washington study. U: Ingle JI, Bakland LK. Endodontics. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994; str. 25.
10. Green HA, Wong M, Ingram TA. Comparison of the sealing ability of four obturation techniques. *J Endodon* 1990;16:423-429.
11. Jacobsen EL, Karras LG, BeGole EA, Daniel JC. Long term sealing efficiency of four root surface sealing materials used in endodontic leakage studies. *J Endodon* 1993;19:587-590.
12. Walton RE, Johnson WT. Obturation. U: Walton RE, Torabinejad M. Principles and Practice of Endodontics. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1996; str. 235.

13. Grossman L. *Endodontic Practice*, Philadelphia: Lea & Febiger, 1988; str. 242.
14. Goldberg F, Massone EJ, Artaza LP. Comparison of the sealing capacity of three endodontic filling techniques. *J Endodon* 1995;21:1-3.
15. Das S. Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg* 1981;52:76.
16. Wright KJ, Barbosa SV, Araki K, Spångberg LSW. In vitro antimicrobial and cytotoxic effects of Kri 1 paste and zinc oxide-eugenol used in primary tooth pulpectomies. *Pediatr Dent* 1994;16:102-106.
17. Kadahiro GA. A comparative study of the sealing quality of zinc-free amalgam and Diaket when used as a retrograde filling material. *Hawaii Dent J* 1984;15:8-9.
18. Kettering JD, Torabinejad M. Cytotoxicity of root canal sealer: a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endod J* 1984;17:60-66.
19. Witherspoon DE, Gutmann JL. Analysis of the healing response to gutta-percha and Diaket when used as root-end filling materials in periradicular surgery. *Int Endod J* 2000;33:37-45.
20. Leonardo MR, Silva LAB, Almeida WA, Utrilla LS. Tissue response to an epoxy resin-based root canal sealer. *Endod Dent Traumatol* 1999;15:28-32.
21. Gettleman BH, Messer H, ElDeeb M. Adhesion of sealer cements to dentin with and without the smear layer. *J Endodon* 1991;17:15-20.
22. Pascon EA, Leonardo MR, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991;72:222-237.
23. Spangberg LSW, Barbosa SV, Lavigne GD. AH 26 releases formaldehyde. *J Endod* 1993;19:596-597.

24. Al-Khatar N, Kunzelmann K, Hickel R. Apical leakage of new root canal sealer (abstract). J Dent Res 1995;74:945.
25. Scrimgeour S. Endodontic materials. U: Whitters CJ et al. Journal of Dentistry 1999;27:401-435.
26. Hermann BW. Calciumhydroxyd Als Mittel Zum Behandein und Füllen Von Zahnwurzelkanälen (Dissertation). Würzburg, Med. Diss. V 29.
27. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. Int Endod J 1999;32:361-369.
28. Huang TH, Kao CT. pH Measurement of Root Canal Sealers. J Endodon 1998;24:236-237.
29. Fuss Z, Weiss EI, Shalhav M. Antibacterial activity of calcium hydroxide-containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis* *in vitro*. Int Endod J 1997;30:397-402.
30. Fuss Z, Rafaeloff R, Tagger M, Szajkis S. Intracanal pH changes of calcium hydroxide pastes exposed to carbon dioxide *in vitro*. J Endodon 1996;22:362-364.
31. Milosevic A. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide cements on *Streptococcus sanguis* NCTC 7864. Int Endod J 1993;26:106-111.
32. Sjögren U, Figdor D, Spangberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. Int Endod J 1991;24:119-125.
33. Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. Endod Dent Traumatol 1985;1:170-175.
34. Estrela C, Pesce HF. Chemical Analysis of the Liberation of Calcium and Hydroxyl Ions from Calcium Hydroxide Pastes in Connective Tissue in the Dog-Part I. Braz Dent J 1996;7:41-46.



35. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In Vitro Determination of Direct Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide. *J Endodon* 1998;24:15-17.
36. Gomes IC, Chevitarese O, de Almeida NS, Salles MR, Gomes GC. Diffusion of Calcium through Dentin. *J Endodon* 1996;22:590-595.
37. Silva LAB, Leonardo MR, DaSilva RS, Assed S, Guimaraes LFL. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997;30:205-209.
38. Wesselink PR. The calcium hydroxide myth: fact or fantasy. *Knjiga sažetaka, I hrvatski endodontski kongres. Zagreb. 1996.*
39. Matsumoto K, Inoue K, Matsumoto A. The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endodon* 1989;15:60-67.
40. Briseno MB, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity with human gingival fibroblasts. III Calcium hydroxide-based sealers. *J Endodon* 1992;18:110-113.
41. Torabinejad M, Kahn H, Bankes D. Isopropyl cyano-acrylate as a root canal sealer. *J Endodon* 1984;10:304.
42. Zidan O, El Deeb ME. Use of a dentin bonding agent as a root canal sealer. *J Endodon* 1985;11:176.
43. Wilson AD, Kent BE. A new translucent cement for dentistry. *Br Dent J* 1972;132:133-135.
44. Aboush YEY, Jenkins CBG. An evaluation of the bonding of glass-ionomer restorative to dentine and enamel. *Br Dent J* 1986;161:179-184.
45. Ray H, Seltzer S. A new glass-ionomer root canal sealer. *J Endodon* 1991;17:598-603.
46. Pitt Ford T. The leakage of root filling with glass-ionomer cement and other materials. *Br Dent J* 1979;146:273-278.

47. Torabinejad M, Rastegar AF, Kettering JD, Pitt Ford TR. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *J Endodon* 1995;21:109-112.
48. Keiser K, Johnson CC, Tipton DA. Cytotoxicity of Mineral Trioxide Aggregate Using Human Periodontal Ligament Fibroblasts. *J Endodon* 2000;26:288-291.
49. Balla R, Carmine J i sur.
50. MacDonald A, Newton CV, Moore BK, Brown CE. Evaluation of an apatite cement as root-end filling material. *J Endodon* 1994;12:324-331.
51. Roane JB, Benenati FW. Successful management of a perforated molar using amalgam and hydroxyapatite. *J Endodon* 1987;13:400-404.
52. Siqueira JF, Favieri A, Gahyva SMM, Moraes SR, Lima KC, Lopes HP. Antimicrobial Activity and Flow Rate of Newer and Established Root Canal Sealers. *J Endodon* 2000;26:274-277.
53. Leonardo MR, Silva LAB, Filho MT, Bonifacio KC, Ito IY. In Vitro Evaluation of Antimicrobial Activity of Sealers and Pastes Used in Endodontics. *J Endodon* 2000;26:391-394.
54. Weiss EI, Shalhav M, Fuss Z. Assessment of antibacterial activity of endodontic sealers by a direct contact test. *Endod Dent Traumatol* 1996;12:179-184.
55. Marsh P, Martin M. Oral microbiology. Background and introduction. U: Oral microbiology. London: Chapman & Hall; 1992, str. 1-5.
56. Schuster GS. Oral flora and pathogenic organisms. U: Moellering RC. Infections disease clinics of North America-Oral infection. Philadelphia: W.B.Saunders Company, 1999; str. 757-775.
57. Hamada S, Amano A, Kimura S i sur. The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 1998;13:123.

58. Meyer DH, Fives-Taylor PM. Oral pathogens from dental plaque to cardiac disease. *Curr Opin Microbiol* 1998;1:88.
59. Janeway CA, Travers P. *Basic Concepts in Immunology*. U: Immunobiology: the immune system in health and disease. London: Current Biology Ltd, 1996, str. 1:2.
60. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340.
61. Gomes BPF, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994;27:291-298.
62. Schifferle RE, Shostad SA, Bayere-Thering MT, Dyer DW, Neiders ME. Effect of Protoporphyrin IX Limitation on *Porphyromonas gingivalis*. *J Endodon* 1996;22:352-355.
63. Shah HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*. *Int J Syst Bacteriol* 1988;38:128.
64. Shah HN, Collins MD. *Prevotella*, a new genus to include *Bacteriodes melaninogenicus* and related species formerly classified in the genus *Bacteroides*. *Int J Syst Bacteriol* 1990;40:205.
65. Maurice CG. *Aspetti Microbici dell'endodonzia*. U: Orland FJ. *Microbiologia in clinica odontoiatrica*. Milano: Scienza e Tecnica Dentistica Edizioni Internazionali s.n.c, 1984; str. 169-179.
66. Sundquist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78:522-530.
67. Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A i sur. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. *J Endodon* 1992;18:558.



68. Sobringho APR, Barros MHM, Nicoli JR i sur. Experimental Root Canal Infections in Conventional and Germ-Free Mice. *J Endodon* 1998;24:405-408.
69. Matsushita K, Tajima T, Tomita K i sur. Inflammatory Cytokine Production and Specific Antibody Responses against Possible Causative Bacteria in Patients with Multilesional Periapical Periodontitis. *J Endodon* 1998;24:817-821.
70. Gharbia S, Haapasalo M, Shah H i sur. Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections. *J Periodontol* 1994;65:56.
71. Sundquist G. Ecology of root canal flora. *J Endodon* 1992;18:428.
72. Tanriverdi F, Esener T, Erganis O, Belli S. An In Vitro Test model for Investigation of Disinfection of Dentinal Tubules Infected with *Enterococcus faecalis*. *Braz Dent J* 1997;8:67-72.
73. Kettering JD, Torabinejad M. *Microbiology and Immunology*. U: Cohen S, Burns RC. Pathways of the pulp. St. Louis: Mosby Co, 1994, str. 365.
74. Torabinejad M, Kiger RD. Histological evaluation of a patient with periodontal disease. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;59:198.
75. Oguntebi BR. Dentine tubule infection and endodontic therapy implications. *Int Endod J* 1994;27:218-222.
76. Greenstein GS, Rethman MP. *Diagnosing Destructive Periodontal Diseases*. U: Nevins M, Mellonig JT. Periodontal Therapy-Clinical Approaches and Evidence of Success. Chicago: Quintessence Publishing Co, Inc, 1998, str. 61-74
77. Csernei AJ. Anachoretic effect of chronic periapical inflammation. *J Dent Res* 1939;18:527.
78. Delivanis PD, Fan VSC. The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and overinstrumented canals. *J Endodon* 1984;10:521.

79. Stashenko P. Immunological aspects of pulpal infection. U: Jørgen S. Contemporary oral microbiology and immunology. Mosby-Year Book, Inc, 1992, str. 555-559.
80. Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C, Proust JP. Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super EBA. J Endodon 1997;23:315-319.
81. Rappaport HM, Lilly GE, Kapsimalis P. Toxicity of endodontic filling materials. Oral Surg Oral Pathol 1964; 8:785-802.
82. ISO CD TR 7405. Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry, 1994.
83. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. In vitro reaction of macrophages to metal ions from dental biomaterials. Dent Mater 1995;11:239-245.
84. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of Cell Culture Cytotoxicity of Five Root Canal Sealers. J Endodon 2000;26:328-330.
85. Unanue ER, Allen PM. The Basis for the Immunoregulatory Role of Macrophages and Other Accessory Cells. Science 1987;236:551-557.
86. Douglas RR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of Dentin Bonding Agents on Macrophage Mitochondrial Activity. J Endodon 1998;24:528-533.
87. Stewart CC, Riedy MC, Stewart SJ. The Proliferation and Differentiation of Macrophages. U: Zwilling BS, Eisenstein TK. Macrophage-Pathogen Interactions. New York: Marcel Dekker, Inc. 1994; str. 3-20.
88. Fraser i, Doyle A, Hughes D, Gordon S. Use of surface molecules and receptors for studying macrophages and mononuclear phagocytes. J Immunol Methods 1994;174:95-102.
89. Guyton AC, Hall JE. Otpornost organizma na infekciju: I Leukociti, granulociti, monocitno-makrofagni sustav i upala; II Imunost i alergija. U: Medicinska fiziologija, deveto izdanje. Zagreb: Medicinska naklada, 1999; str. 384-389.

90. Suzuki N, Okiji T, Suda H. Enhanced expression of activation-associated molecules on macrophages of heterogeneous populations in expanding periapical lesions in rat molars. *Archives of Oral Biology* 1999;44:67-79.
91. Dijkstra CD, Damoiseaux JG. Macrophage heterogeneity established by immunocytochemistry. *Progress in Histochemistry & Cytochemistry* 1993;27:1-65.
92. Ezekowitz RAB, Sastry K, Bailly P, Warner A. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *J Exp Med* 1990;172:1785-1794.
93. Auger MJ, Ross JA. *The biology of the macrophage*. U: Lewis CE, McGee JO'D. The Macrophage. Oxford: Oxford University Press, 1992; str. 34-35.
94. Male D, Champion B, Cooke A. *Advanced immunology*. Philadelphia: JB Lippincott Company; 1989, str. 51-98.
95. Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. *Annu Rev Biochem* 1983;52:761-799.
96. Borelli P, Souza IP, Borojević R, Dagli MLZ, Kang HC. Protein Malnutrition: Some Aspects of the in vitro Adhesion of Peritoneal Mouse Macrophages. *Ann Nutr Metab* 1998;42:367-373.
97. Ricevuti G, Mazzone A, Fossati G i sur. Assay of phagocytic cell functions. *Allergie et Immunologie* 1993;25:55-66.
98. Durum SK, Oppenheim JJ. Macrophage derived mediators: Interleukin 1, tumor necrosis factor, interleukin 6, interferon and related cytokines. *Fundamental Immunology*. New York: Raven Press, 1989:639-661.
99. Ofek I, Goldhar J, Keisari Y, Sharon N. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* 1995;49:239-276.



100. Maseki T, Yasumura K, Nanba I, Kobayashi F, Nakamura H. Alterations in Macrophages after Exposure to Root Canal Filling Materials. *J Endodon* 1996;22:450-454.
101. Gonzalez O, Smith RL, Goodman SB. Effect of size, concentration, surface area and volume of polymethylmetacrylate particles on human macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res* 1996;30:463-473.
102. Tomazic-Jezic VJ, Merritt K, Umbreit TH. Significance of the type and the size of biomaterial particles on phagocytosis and tissue distribution. *J Biomed Mater Res* 2001;55:523-529.
103. Glaut TT, Jacobs JJ. Response of three murine macrophage populations to particulate debris: bone resorption in organ cultures. *J Orthop Res* 1994;12:720-731.
104. De la Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin C. *Immunology* 1991;73:205-211.
105. Waltimo TMT, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MPP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999;32:94-98.
106. Czajkowska B, Blazewicz M. Phagocytosis of chemically modified carbon materials. *Biomaterials* 1997;18:69-74.
107. Tagger M, Tagger E. Periapical reactions to calcium hydroxide-containing sealers and AH 26 in monkeys. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:139-146.
108. Freyria AM, Chignier E, Guidollet J, Louisot P. Peritoneal macrophage response: an in vivo model for the study of synthetic materials. *Biomaterials* 1991;12:111-118.
109. Ortega E, Garcia JJ, De la Fuente M. Ageing modulates some aspects of the non-specific immune response of murine macrophages and lymphocytes. *Exp Physiol* 2000: 519-525.

110. Leonardo MR, Almeida WA, Silva LAB, Utrilla LS. Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod Dent Traumatol* 1998;14:257-261.
111. Beltes P, Koulaouzidou E, Kolokuris I, Kortsaris A. In Vitro Evaluation of the Cytotoxicity of Two Glass-Ionomer Root Canal Sealers. *J Endodon* 1997;23:572-574.
112. Trindade MCD, Lind M, Sun D, Schurman DJ, Goodman SB, Smith RL. In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery. *Biomaterials* 2001;22:253-259.
113. Patton WR, Schuster GS, Loushine RJ, Weller RN, Craft DW. Cytotoxic responses of osseous cells to root canal obturating materials. *J Endod* 1996;22:204.
114. Kan KC, Messer LB, Messer HH. Variability in Cytotoxicity and Fluoride Release of Resin modified Glass-ionomer Cements. *J Dent Res* 1997;76:1502-1507.
115. Pissiotis E, Spangberg LSW. Cytotoxicity of a new glass ionomer root canal sealer. *Int Endod J* 1994;27:106.
116. Kolokuris I, Beltes P, Economides N, Vlemmas I. Experimental study of the biocompatibility of a new glass-ionomer root canal sealer (Ketac-Endo). *J Endod* 1996;22:395-398.
117. Segura JJ, Jimenez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR. Comparative Effects of Two Endodontic Irrigants, Chlorhexidine Digluconate and Sodium Hypochlorite, on Macrophage Adhesion to Plastic Surface. *J Endod* 1999;25:243-246.
118. Segura JJ, Jimenez-Rubio A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surface. *Endod Dent Traumatol* 1998;14:72-74.
119. Jimenez-Rubio A, Segura JJ. The Effect of the Bleaching Agent Sodium Perborate on Macrophage Adhesion in Vitro: Implications in External Cervical Root Resorption. *J Endod* 1998;24:229-232.

120. Jimenez-Rubio A, Segura JJ, Llamas R, Jimenez-Planas A, Guerrero JM, Calvo JR. In vitro study of the effect of sodium hypochlorite and glutaraldehyde on substrate adherence capacity of macrophages. *J Endodon* 1997;23:562-564.
121. Uff CR, Scott AD, Pockley G, Phillips RKS. Influence of soluble suture factors on in vitro macrophage function. *Biomaterials* 1995;16:355-360.
122. Leonardo RT, Consolaro A, Carlos IZ, Leonardo MR. Evaluation of Cell Culture Cytotoxicity of Five Root Canal Sealers. *J Endodon* 2000;26:328-330.
123. Arenholt-Bindslev D, Horsted-Bindslev P. A simple model for evaluating relative toxicity of root filling materials in cultures of human oral fibroblasts. *Endod Dent Traumatol* 1989;5:219-226.
124. Willershausen B, Marroquin BB, Schafer D, Schulze R. Cytotoxicity of Root Canal Filling Materials to Three Different Human Cell Lines. *J Endodon* 2000;26:703-707.
125. Rakich DR, Wataha JC, Lefebvre CA, Weller RN. Effects of Dentin Bonding Agents on Macrophage Mitochondrial Activity. *J Endodon* 1998;24:528-533.
126. Granchi D, Stea S, Ciapetti G, Cavedagna D, Stea ST, Pizzoferrato A. Endodontic cements induce alterations in the cell cycle of in vitro cultured osteoblasts. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:359-366.
127. Leonardo MR, Silva LAB, Utrilla LS, Ether SS. Calcium hydroxide root canal sealers- histopathologic evaluation of apical and periapical repair after endodontic treatment. *J Endodon* 1997;23:428-432.
128. Schmalz G, Schweikl H. The induction of micronuclei in V79 cells by the root canal filling material AH Plus. *Biomaterials* 2000;21:939-944.
129. Schedle A, Franz A, Rausch-Fan X i sur. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater* 1998;14:429-440.



130. Miletić I, Anić I, Karlović Z, Maršan T, Pezelj-Ribarić S, Osmak M. Cytotoxic effect of four filling materials. *Endod Dent Traumatol* 2000;16:287-290.
131. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ, Shawley AL. Cytotoxicity of Endodontic Materials. *J Endodon* 1998;24:91-96.
132. Siqueira JF, Favieri A, Gahyva SMM i sur. Antimicrobial Activity and Flow Rate of Newer and Established Root Canal Sealers. *J Endodon* 2000;26:274-277.
133. Siqueira JF, Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endodon* 1997;23:167-169.
134. Barbosa CAM, Goncalves RB, Siqueira JF, Uzeda M. Evaluation of the antibacterial activities of calcium hydroxide, chlorhexidine, and camphorated paramonochlorophenol as intracanal medicament. A clinical and laboratory study. *J Endodon* 1997;23:297-300.
135. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Bras Dent J* 1995;6:85-90.
136. Heling I, Chandler NP. The Antimicrobial Effect within Dentinal Tubules of Four Root Canal Sealers. *J Endodon* 1996;22:257-259.
137. Al-Khatib ZZ, Baum RH, Morse DR i sur. The antimicrobial effect of various endodontic sealers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1990;70:784-790.
138. Estrela C, Pimenta FC, Ito IY, Bammann LL. In Vitro Determination of Direct Antimicrobial Effect of Calcium Hydroxide. *J Endodon* 1998;24:15-17.
139. Estrela C, Pesce HF. Chemical Analysis of the Liberation of Calcium and Hydroxyl Ions from Calcium Hydroxide Pastes in Connective Tissue in the Dog-Part I. *Braz Dent J* 1996;7:41-46.

# ŽIVOTOPIS

## **Datum i mjesto rođenja**

05. siječnja 1970, Rijeka

## **Zaposlenje**

Katedra za Oralnu patologiju, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci, Braće  
Branchetta 20, Rijeka

## **Školovanje**

1984-1988. Centar za kadrove u obrazovanju i kulturi, Rijeka

1988-1993. Medicinski fakultet – stomatološki studij Sveučilišta u Rijeci (prosječna  
ocjena 4.7)

1995. položen državni ispit u Zagrebu

1995-1997. Poslijediplomski studij iz biomedicine na Medicinskom fakultetu  
Sveučilišta u Rijeci

## **Akademski stupnjevi**

14. prosinca 1993. Doktor stomatologije, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

18. prosinca 1998. Magistar medicinskih znanosti, Medicinski fakultet Sveučilišta u  
Rijeci

## **Znanstveni stupnjevi**

1995. stručni suradnik, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1997. mlađi asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

1999. asistent, Medicinski fakultet Sveučilišta u Rijeci

## **Članstvo u strukovnim udruženjima**

Hrvatska stomatološka komora

Hrvatsko endodontsko društvo

Europsko endodontsko društvo

## **Nastavna djelatnost**

Kliničke vježbe i seminari iz predmeta "Dentalna patologija", Medicinski fakultet  
Sveučilišta u Rijeci

## **Radno iskustvo**

1994-1995. pripravnički staž u Domu zdravlja Rijeka

od veljače 1995. Zaposlena na Katedri za Oralnu patologiju – predmet Dentalna  
patologija

## PUBLIKACIJE

### 1. Kvalifikacijski radovi

1. **Brekalo I.** Razina proupalnih prostaglandina i dušičnog monoksida u slini bolesnika s adultnim parodontitisom. 1998. (Magistarski rad)

### 2. Znanstveni radovi

#### a) izvorni znanstveni radovi

1. Legović M, Mady L, Ferreri S, **Brekalo I**, Župan M, Mady B, Vančura I. Malocclusioni in dentizione decidua. *Mondo Ortodontico*, 1998; 1: 31-36
2. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Abram M, Miletić I, Anić I, Ferreri S, Foško-Glavaš L. Antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskih kanala. *Acta Stomatol Croat*, 2000; 34(1): 51-54
3. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Miletić I, Abram M, Karlović Z, Anić I. Antimikrobni učinak Apexita in vitro. *Acta Stomatol Croat*, 2001;35:469-473
4. **Brekalo I**, Čulo F, Aleksić J, Pezelj-Ribarić S. Production of nitric oxide in saliva of adult periodontitis patients. *Periodicum Biologorum*, 2001; 103(3): 251-254
5. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Abram M, Dorić M, Miletić I, Karlović Z. Influence of Calcium Hydroxide Root-Canal Sealer on Microbial Growth in vitro. *Folia Microbiol* 2002; 47(4): 000-000, in press (CC)
6. Pezelj-Ribarić S, Anić I, **Brekalo I**, Miletić I, Hasan M, Šimunović-Šoškić M. Detection of TNF- $\alpha$  in normal and inflamed human dental pulps. *Archives Med Res* 2002; 33, 1-3 in press (CC)

#### b) znanstveni radovi recenzirani, objavljeni u zborniku radova s međunarodnih znanstvenih skupova

1. Martin G, Blašković-Šubat V, **Brekalo I**. Capability of Three Canal Instruments for Preparing Simulated Curved Canals. *Zbornik radova, VII Biennial Congress-European Society of Endodontology, Tel Aviv 1995: 15*
2. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Abram M, Anić I, Ferreri S, Miletić I. Antimikrobni učinak materijala za punjenje korijenskih kanala – in vitro. *Acta Stomatol Croat, Dodatak II međunarodni kongres hrvatskih stomatologa 1998: 129*
3. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Abram M. In vitro determination of antibacterial activity of calcium hydroxide root canal sealer, *Knjiga sažetaka, IX Europski endodontski kongres, Zagreb 1999: 25*
4. **Brekalo I**, Abram M, Pezelj-Ribarić S. The Effect of Three Root Canal Sealers on Macrophage Function, *Knjiga sažetaka, IV Joint meeting IADR/NOF, Warsaw, Poland 2000; Abst.R 278*
5. Pezelj-Ribarić S, **Brekalo I**, Abram M. In vitro determination of antibacterial activity of calcium hydroxide root canal sealer, *Int Endod J* 2000; 33: 162
6. Šimunović-Šoškić M, **Brekalo I**, Pezelj-Ribarić S, Uhač I. Contraction of condensation silicone impression materials. *Zbornik radova, 13<sup>th</sup> Congress of the European anthropological association, 2002.*



c) znanstveni radovi recenzirani, objavljeni u zborniku radova s domaćih znanstvenih skupova

1. Martin G, Blašković-Šubat V, **Brekalo I.** Usporedba “Balanced force” i “Step back” tehnike kanalne obrade simuliranih zakrivljenih korijenskih kanala. Knjiga sažetaka. I Hrvatski endodontski simpozij 1996: 26-27
2. Pezelj-Ribarić S, Blašković-Šubat V, **Brekalo I.** Procjena homogenosti kanalnog ispuna tehnikom protiskivanja tekućine – jednogodišnja studija. Acta Stomatol Croat-zbornik radova. II Hrvatski endodontski simpozij 1997; 31: 277