

Анализа антимиѡробног дејства раствора *MTAD* у инфицираном каналном систему корена зуба техником *PCR*

Александар Митић¹, Надица Митић¹, Јелена Милашин², Славољуб Живковић³, Јованка Гашић¹, Владимир Митић⁴, Јелена Поповић¹

¹Одељење за болести зуба и ендодонѡију, Клиника за стоматологију, Медицински факултет у Нишу, Ниш, Србија;

²Институт за хуману генетику, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

³Клиника за болести зуба и ендодонѡију, Стоматолошки факултет, Универзитет у Београду, Београд, Србија;

⁴Одељење за ортопедију вилица, Клиника за стоматологију, Медицински факултет, Универзитет у Нишу, Ниш, Србија

КРАТАК САДРЖАЈ

Увод Клинички прихватљив интраканални антисептик мора имати органолитичко-минералолитичко дејство и антибактеријску ефикасност и не сме бити токсичан.

Циљ рада Циљ рада је био да се испита постојање генома најчешћих микроорганизама (*Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tannerella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* и *Enterococcus faecalis*) у инфицираним каналима корена зуба пре и после иригације раствором доксициклина, лимунске киселине и детерѡента *Tween-80* (*MTAD*) код особа с клинички дијагностикованим примарним апексним пародонтитисом.

Методѡе рада Као биолошки материјал у којем је доказивано присуство ДНК микроорганизама коришћен је садржај из примарно инфицираних канала пре и после иригације раствором *MTAD*. За откривање бактеријског генома примењена је мултиплексна техника *PCR*.

Резултати Процент позитивних узорака пре обраде канала био је 100%. У инфицираним каналима корена зуба најчешћи је био *E. faecalis* (37%). У релативно високом проценту откривени су и: *P. intermedia* (25%), *A. actinomycetemcomitans* (20%), *T. denticola* (17%), *T. forsythensis* (15%) и *P. gingivalis* (10%). После иригације каналног система раствором *MTAD* утврђено је статистички значајно смањење учесталости *E. faecalis* (12%), *P. intermedia* (0%), *T. forsythensis* (0%) и *P. gingivalis* (0%). Учесталост осталих бактерија такође се смањила, али не статистички значајно.

Закључак Применом мултиплексне *PCR* технике, која омогућава истовремену амплификацију генских секвенци уз коришћење два пара прајмера, у инфицираним каналима корена зуба најчешће је утврђен *E. faecalis*. У релативно високом проценту откривене су *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythensis* и *P. gingivalis*. После хемомеханичке обраде и иригације канала раствором *MTAD* нису забележене *P. intermedia*, *P. gingivalis* и *T. forsythensis*, док је учесталост *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. denticola* смањена, али не статистички значајно.

Кључне речи: инфекција; канални систем; ендодонѡогени микроорганизми; *PCR*

УВОД

Инфекција канала корена зуба је комплексна инфекција каналног система која обухвата главни канал, споредне канале, апексну делту и дентинске тубуле. Микроби доспевају у канални систем директно, најчешће из каријесне лезије, пукотина глеђи и дентина, или индиректно, преко коронарне микропропустљивости, порозних каналних пуњења и крвљу [1]. У каналном систему микроорганизми се размножавају и образују бактеријске колоније, а у микропросторима стварају биофилмове.

Опстанак бактерија у каналном систему корена зуба зависи од количине кисеоника у локалној средини, доступних хранљивих материја, позитивних и негативних интеракција са другим микроорганизмима и одбрамбеног система домаћина. Количина кисеоника у некротичном ткиву канала ко-

рена је врло мала, што подстиче анаеробне бактерије. Учесталост стриктних анаеробних врста у затвореном каналу је 70–100%, док је код експонираних канала учесталост микроаерофилних и факултативних Грампозитивних бактерија већа него у тзв. затвореним каналним системима [2]. Могући извори хранљивих материја су некротично ткиво пулпе и запаљењски ексудат који улази кроз апексни форамен, латералне канале и проходне дентинске каналиће. Ове чињенице могу објаснити како се микроаерофилне и факултативне Грампозитивне врсте које су из каријесне лезије доспеле у пулпу и изазвале пулпитис замењују у инфицираном каналном систему Грам-негативним анаеробним врстама *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythensis*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [3]. Ове микробне врсте се могу наћи и у дубљим слојевима

Correspondence to:

Aleksandar MITIĆ
Klinika за стоматологију
Medicinski fakultet
Dr Zorana Đinđića 52, 18000 Niš
Srbija
alek.mitic@yahoo.co.uk

дентинских каналића, где могу dospети из канала корена, али и из пародонталног џепа [4]. Андо (*Ando*) и Хошино (*Hoshino*) [5] много су чешће бележили Грампозитивне бактерије у параканалном дентину на дубинама од 0,5 до 2 mm: *Lactobacillus spp.*, *Streptococcus spp.*, *Propionibacterium*, *Enterococcus faecalis* и *Actinomyces*.

С обзиром на велики број микроорганизама у усној дупљи, микробни састав у коренском каналу је полиморфан и променљив, а њихов број је најчешће 10^3 – 10^7 . Елементи контроле ендодонтске инфекције су: одбрамбени систем домаћина, пратећа антибиотска терапија (само повремено и с посебним индикацијама) и локална инструментација и иригација каналног система. На микроорганизме који се налазе у главном каналу може се локално деловати инструментацијом и иригацијом. Међутим, како је пречник дентинских тубула у интраканалном дентину довољно велики (1–3 μm), а дентински тубули се пружају релативно право, постојање микроорганизама унутар дентинских каналића је не само могуће, већ и доказано у многим студијама [5–9]. Дубина продирања микроба у дентинске каналиће је од 150 μm до 1 mm [10]. Инокулација дентина дешава се у 50–80% зуба с апексним пародонтитисом [11, 12].

Бактерије ће преживети и размножити се у каналу корена зуба и остати непромењене без обзира на запаљење и имунску реакцију коју изазивају у ткивима ван зуба. Ово објашњава зашто бактерије са слабом вируленцијом могу изазвати и одржавати апексни пародонтитис. Осим тога, реакција периапексног ткива је слична реакцији било где у организму када је одбрамбена реакција организма добра и зато долази до развоја гранулома [12].

Улога различитих бактерија у патогенези периапексних лезија је сложена. Неке бактерије могу имати директно токсично дејство на ткиво преко протеолитичких ензима, цитотоксина и хемолизина. Добар пример је леукотоксин који производи *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Овај леукотоксин је веома моћан и убија неутрофилне леукоците и моноците, укључујући и макрофаге, а врши и супресију лимфоцита. *A. actinomycetemcomitans* такође ствара колагеназе, јаке алкалне, киселе фосфатазе, фактор инхибиције фибробласта и моћне липополисахариде и изазива додатну ресорпцију кости [7].

Prevotella intermedia је Грам-негативни анаероб и сам по себи није патоген, али постаје када се удружи са другим бактеријама. Ствара колагеназу и хијалуронидазу, што је довољно да потпуно разори основну супстанцу ткива и колаген. *P. intermedia* је резистентна на конвенционалне дезинфицијенсе, што намеће потребу да се она током дезинфекције каналног система потпуно елиминише.

Бактерије на површини интраканалног дентинског зида у створеним микропросторима (зјап, гап) могу формирати биофилм. Биофилмови су колоније бактерија које приањају на површине и образују структуру од полисахарида, беланчевина и других супстанци које зависе од околине у којој се налазе. Бактерије стварају ове биофилмове ради преживљавања и у њима

повећавају отпорност на биокиселине у спољашњој средини. Антибиотици су неефикасни за бактерије у биофилму због њихове механичке, метаболичке и генетске отпорности [12, 13].

У сврху елиминације микроорганизама из каналног система корена зуба користе се различити антисептични ириганси. Један од новијих финалних интраканалних ириганса је раствор *MTAD* (*Biopure, Tulsa Dentsply, Tulsa, OK, USA*), који представља смесу доксициклина, лимунске киселине и детерџента *Tween-80*. Досадашњи резултати показују да *MTAD* после испирања канала ефикасно уклања размазни слој и не мења структуру дентина [12]. Његово антимикробно дејство у истраживањима *in vivo* мање је познато. Уколико овај финални ириганс има и антимикробни ефекат, онда се може сматрати антисептичним иригансом који испуњава све клиничке захтеве.

ЦИЉ РАДА

Циљ истраживања је био да се методом *PCR* (енгл. *polymerase chain reaction* – реакција ланчаног умножавања ДНК) открије неколико најчешћих ендопатогених микроорганизама у инфицираном каналном систему (*P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *T. denticola* и *E. faecalis*) пре и после иригације раствором *MTAD*.

МЕТОДЕ РАДА

Испитаници

У истраживање је укључено 40 особа старости 29–56 година са дијагнозом примарног апексног пародонтитиса које су лечене на Одељењу за болести зуба и ендодонцију Клинике за стоматологију Медицинског факултета Универзитета у Нишу. Као извор материјала за анализу коришћени су узорци инфективног материјала из канала корена зуба пре хемомеханичке обраде и после иригације раствором *MTAD* (Слика 1).



Слика 1. Раствор *MTAD* (*Biopure, Tulsa Dentsply, Tulsa, OK, USA*)
Figure 1. Solution *MTAD* (*Biopure, Tulsa Dentsply, Tulsa, OK, USA*)

Дијагноза је постављена на основу анамнезе, објективног прегледа и помоћних дијагностичких метода (испитивање виталитета електротестом и радиографијом). Сви испитивани зуби су били са дијагнозом примарних апексних пародонтитиса, с оштећеним круницама зуба, али без испуна, и без протетичких надокнада. Све интервенције су рађене у условима потпуно сувог радног поља (кофердам).

Дезинфекција крунице и приступних кавитета вршена је тропроцентним раствором натријум-хипохлорита. Стерилни папирни поени апликовани су у апексни део канала корена у трајању од 60 секунди. Овако добијени материјал стављан је у микротубе уз додатак 50 μ l физиолошког раствора. Раствор се користио за изолацију ДНК. Изолација је урађена инкубацијом на 100°C у трајању од 10 минута, а затим је центрифугирањем у трајању од два минута на 10.000 обртаја у минути издвојен супернатант. Тако изолована ДНК чувана је на -20°C и употребљена за PCR амплификацију.

PCR метода

Основне методе за откривање микроорганизама су микробиолошка култура и PCR. PCR је *in vitro* амплификација дефинисане ДНК секвенце и представља имитацију процеса ДНК репликације. Реакција користи два олигонуклеотида (прајмера) који су комплементарни крајевима секвенце која се умножава. Синтеза ДНК је катализована термостабилном ДНК полимеразом. Понављање циклуса, од којих се сваки састоји од денатурације ДНК, хибридизације прајмера и екстензије хибридизованих прајмера од стране термостабилне ДНК полимеразе, доводи до експоненцијалне амплификације специфичног ДНК фрагмента. Крајеви амплификованог фрагмента су дефинисани 5' крајевима прајмера, а њихова величина одређена је растојањем између секвенци које прајмери „препознају“.

Узорци из инфицираног каналног садржаја су испитани на постојање следећих микроорганизама: *P. gingi-*

valis, *A. actinomycetemcomitans*, *T. forsythensis*, *P. intermedia*, *T. denticola* и *E. faecalis*. Секвенце свих прајмера као и дужине очекиваних ампликона дате су у табели 1.

Мултиплексна PCR омогућава симултану амплификацију различитих генских секвенци уз коришћење прајмера, употребљених за откривање *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, пар бактерија *P. intermedia* и *T. forsythensis*. Стандардном техником PCR, која подразумева коришћење једног пара прајмера, установљене су у засебним реакцијама *E. faecalis* и *T. denticola*.

PCR анализа је вршена у смеси запремине од 25 μ l, а реакциона смеша је била следећег садржаја: стерилна деминерализована и дестилирана вода (*dd H₂O*), PCR пуфер, 25 mM MgCl₂, 200 μ M dNTP, 5 μ M прајмери, 1 U Taq полимеразе и 4 μ l узорка с претпостављеном бактеријском ДНК. Производи PCR анализирани су електрофорезом на осмопроцентном полиакриламидном гелу у једном TBE пуферу, при константном напону струје од 200 V у трајању од 60 минута. За визуелизацију амплификованих фрагмената ДНК гел је обојен етидијум-бромидом и осветљен УВ-трансилуминатором.

Статистичка обрада

Статистичка анализа урађена је поређењем средњих вредности оцена за четири групе, а коришћен је непараметријски Краскал-Волисов (*Kruskal-Wallis*) тест. *Post hoc* анализа је вршена Ман-Витнијевим (*Mann-Whitney*) U-тестом, како би се утврдиле појединачне, међугрупне разлике средњих вредности оцена.

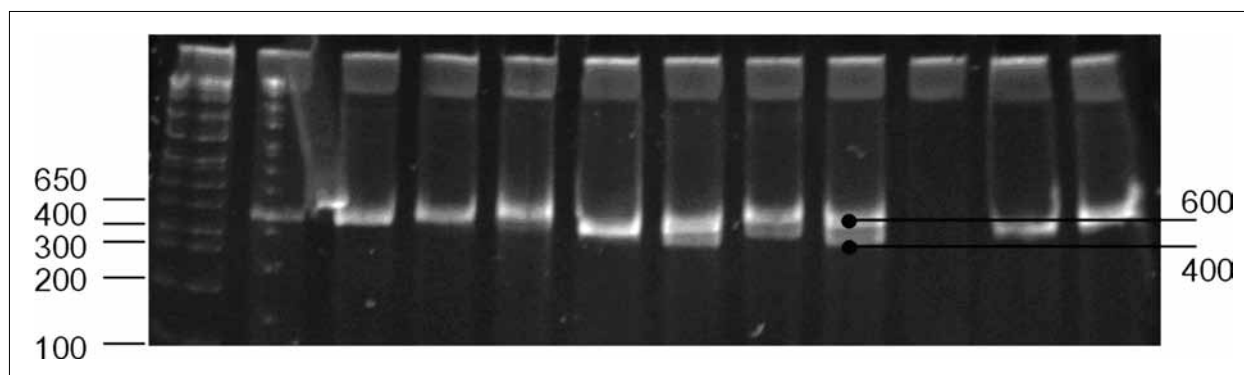
РЕЗУЛТАТИ

Електрофоретске траке очекиване дужине на гелу означавале су позитиван налаз (Слика 2).

У инфицираним каналима корена зуба најчешћи је био *E. faecalis* (37%). У релативно високом проценту откривене су и следеће бактерије: *P. intermedia* (25%), *A. actinomycetemcomitans* (20%), *T. denticola* (17%),

Табела 1. Секвенце прајмера, температура хибридизације и дужина ампликона
Table 1. PGE₂ concentrations in apical tissue fluids of two groups

Прајмери Primer sequence	Температура хибридизације (°C) Annealing temperature (°C)	Дужина ампликона (bp) PCR product lenght (bp)
<i>Universal 16S rDNA forward primer Escherichia coli</i> AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG		
<i>Porphyromonas gingivalis</i> CAA TAC TCG TAT CGC CCG TTA TTC	55	400
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> CAC TTA AAG GTC CGC CTA CGT GC	55	600
<i>Tannerella forsythensis</i> GTA GAG CTT ACA CTA TAT CGC AAA CTC CTA	53	840
<i>Prevotella intermedia</i> GTT GCG TGC ACT CAA GTC CGC C	53	660
<i>Treponema denticola</i> TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T TCA AAG AAG CAT TCC CTC TTC TTC TTA	60	316
<i>Enterococcus faecalis</i> TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G AAC TTC GTC ACC AAC GCG AAC	55	112



Слика 2. Полиакриламидни гел с тракама које одговарају *P. gingivalis* (400 bp) и *A. actinomycetemcomitans* (600 bp)
Figure 2. Polyacrilamide gel with bands corresponding to *P. gingivalis* (400 bp) and *A. actinomycetemcomitans* (600 bp)

Табела 2. Број инфицираних канала
Table 2. Number of infected root canals

Врсте бактерија Bacterial species	Број инфицираних канала Number of infected root canals		χ^2	<i>p</i>
	Пре терапије Before therapy	После терапије After therapy		
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	8 (20%)	4 (10%)	1.72	0.185
<i>Prevotella intermedia</i>	9 (25%)	0		0.002*
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	4 (10%)	0		0.11*
<i>Tannerella forsythensis</i>	6 (15%)	0		0.022*
<i>Enterococcus faecalis</i>	15 (37%)	5 (12%)	8.17	0.004
<i>Treponema denticola</i>	7 (17%)	3 (7%)	1.96	0.161

* Фишеров тест

* Fischer test

T. forsythensis (15%) и *P. gingivalis* (10%). После хемомеханичке обраде и иригације канала раствором *MTAD* у трајању од 60 секунди нису нађене *P. intermedia*, *P. gingivalis* и *T. forsythensis*. *E. faecalis* је утврђена у 12% узорака, *A. actinomycetemcomitans* у 10%, а *T. denticola* у 7%. Нису сви узорци били позитивни на све анализирание бактерије, већ је код различитих испитаника доказано постојање неких од анализираних бактерија.

Преваленција микроорганизама у инфицираним каналима корена зуба пре и после примене раствора *MTAD* дата је у табели 2. Поређењем учесталости бактерија у зубним каналима пре и после иригације раствором *MTAD*, статистички значајно смањење броја канала у којима су установљене бактерије уочено је код *P. intermedia* (0%), *T. forsythensis* (0%) и *E. faecalis* (12%). Учесталост осталих бактерија такође је била смањена, али не статистички значајно.

ДИСКУСИЈА

Постоји неколико метода за препознавање и изоловање микроорганизама: узгој култура, електронска микроскопија, откривање антигена коришћењем имуноцитохемијских и имунофлуоресцентних техника, молекуларне технике (ДНК-ДНК хибридизација) и техника *PCR*. Најстарија и најчешће коришћена метода је култивисање бактерија. Од 1982. године могуће је култивисати и анаеробне сојева под строго устро-

јеним и контролисаним условима [2]. Ова метода је спора, захтева доста времена за извођење, а постоје и врсте које је веома тешко или чак немогуће култивисати (*Treponema spp.*). Међутим, предност ове методе над *PCR* јесте у томе што она даје информације о учесталости бактерија у узорку, односно броју живих бактеријских ћелија као колониформних јединица.

У нашем истраживању је препознавање микроорганизама вршено методом *PCR*. То је савремена, изузетно осетљива и високо специфична метода једноставна за примену. Теоретски је могуће доказати постојање само једне бактеријске ћелије (живе или мртве) у узорку, мада се број од 10 ћелија сматра доњом границом детекције. У студији је коришћена и мултиплексна *PCR* за откривање више микроорганизама истовремено (*P. gingivalis* откривана заједно са *A. actinomycetemcomitans*, а *P. intermedia* са *T. forsythensis*). Предност методе *PCR* је у могућности изоловања бактеријских врста које се иначе не могу култивисати *in vitro* или када је број ћелија у испитиваном материјалу веома мали [14].

Метода *PCR* има и своја ограничења. Тако се, рецимо, врсте које нису откривене неком другом методом и врсте које се циљно не траже не могу препознати. Методом *PCR* се потврђује постојање или непостојање одређене бактерије у узорку, а не да ли је препозната ћелија жива или мртва. Друго ограничење конвенционалне методе *PCR* односи се на немогућност потпуне квантификације заступљених бактерија. Међутим,

описана је тзв. *real-time PCR* метода, којом се може утврдити број бактерија у „стварном времену“ [15].

Циљ нашег истраживања био је да се у инфицираном каналном систему утврди постојање следећих бактеријских врста: *P. gingivalis*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. intermedia*, *T. forsythensis*, *E. faecalis* и *T. denticola*. Све ове бактерије (изузев *E. faecalis*) припадају Грам-негативним, стриктно анаеробним врстама, од којих већину називају ендодонтогенним. Разлог за избор баш ових врста налази се у чињеници да подаци из литературе показују да управо оне имају најзначајнију улогу у инфекцији ендодонтског кавума дентис и инфламаторним процесима у апексном пародонцијуму [3, 16, 17]. Поред њих, у инфицираном ендодонтском простору јављају се и Грам-позитивне анаеробне стрептококе: *Peptostreptococcus spp.*, *Eubacterium spp.*, *Actinomyces spp.* и *Propionibacterium spp.* [18, 19, 20]. У анализираном материјалу поједине бактерије су откривене у мањем броју узорака. Тако је *P. gingivalis*, као позната ендодонтогена бактерија, изолована у 10% узорака. Разлог се може тражити у чињеници да састав бактеријске флоре у каналу корена зуба зависи и од стадијума инфекције, односно интеракције између микробиолошких фактора, притиска кисеоника и доступних хранљивих материја [13]. Бактеријске врсте које енергију добијају ферментацијом угљених хидрата временом бивају замењене онима које као енергенте користе аминокиселине и пептиде. Мора се имати у виду и чињеница да факултативни анаероби, као рани колонизатори каналног простора, три месеца након инфекције бивају савладани стриктним анаеробима, јер су све залихе кисеоника за то време потрошене. Према резултатима других аутора, *P. gingivalis* је у инфицираном каналу корена установљен у 8,33% узорака [21].

P. gingivalis и *P. intermedia* разградњом нативних протеина омогућавају раст фузобактерија (*Fusobacteria*), које стварају пептидазе, али нису у стању да врше хидролизу интактних протеина.

У нашем истраживању *P. intermedia* је утврђена у 25% узорака. У студији која је такође анализирала састав микробне флоре у каналу корена код ендодонтогенних лезија ова бактерија је методом *PCR* откривена у истом проценту испитиваних узорака (25%) [22]. Неки аутори сматрају да *P. intermedia* и *T. forsythensis* делују синергистички [23]. *P. intermedia* је Грам-негативни анаероб и сам по себи није патоген, али постаје када се удружи са другим бактеријама. Ствара колагеназу и хијалуронидазу, што је довољно да потпуно разори основну супстанцу деполимеризацијом мукополисахарида и колагена. *P. intermedia* је резистентна на конвенционалне дезинфицијенсе. Међутим, раствор *MTAD* потпуно елиминира ову бактерију у инфицираном каналном систему, што је изузетно значајно, јер бактеријски хистолитички ензими које она ствара директно доводе до распадања ткива.

Постојање генома врсте *A. actinomycetemcomitans* утврђено је у 20% узорака инфицираних канала корена зуба. *A. actinomycetemcomitans* је факултативни анаероб с великим потенцијалом разарања пародонцијума,

а према налазима других аутора, ретко се изолује из инфицираних канала [24]. У другом истраживању постојање његове ДНК утврђено је у 16,67% узорака [23]. Врсте које немају изражену особину инвазивности, односно способности размножавања у ткивима, налазе се код особа с клинички здравим пародонталним ткивима и показују изразито малу учесталост [24].

T. denticola је утврђена у 17% узорака и била је најчешћа од свих спирохета у инфицираним каналима корена зуба. Други аутори су је изоловали у 13–78% инфицираних канала [25]. Баумгартнер (*Baumgartner*) и Фокнер (*Falkner*) [21] сматрају да је велика учесталост *T. denticola* (78%) у некротичним каналима у директној вези с појавом симптома, док Сикеира (*Siqueira*) и Росас (*Rôças*) [17] оповргавају такву зависност.

Однедавно се сматра да врста *T. forsythensis* такође има значајну улогу у настанку и развоју обољења ткива пародонталног система. *T. forsythensis* је Грам-негативни, стриктно анаеробни бацил који је у нашем истраживању установљен у 15% узорака, што говори у прилог чињеници да је ова врста снабдевана великим бројем различитих фактора вируленције који јој дају изразити ендодонтогени потенцијал [23]. *T. forsythensis* је пример интеракције међу микроорганизмима јер она не може самостално да опстане, већ јој је неопходно присуство других бактеријских врста. Зато је било скоро немогуће култивисати је у условима *in vitro*. Према налазима других аутора, применом *PCR* анализе *T. forsythensis* је изолована у инфицираном каналу корена с учесталошћу од 16% до 55% [13, 17, 24]. Наши резултати од 15% су знатно нижи (на доњој граници) од оних који су досад објављени у литератури, што се може објаснити чињеницом да микробиолошки налаз у инфицираном каналу корена зуба одређују стадијум инфекције, интеракција између микробиолошких фактора, притисак кисеоника и доступност хранљивих материја [13].

Најчешће изолована бактерија у инфицираном каналу корена у нашем истраживању била је *E. faecalis*, која је откривена у чак 37% узорака. То је Грам-позитивна кока која својом сахаролитичком активношћу ствара киселине које отварају пут другим бактеријама, нарочито Грам-негативним кокама и спирохетама. Најбоље се елиминира антибиотикима широког спектра (тетрациклинима). У инфицираном каналу корена *E. faecalis* се јавља у оквиру мешовите микробне инфекције као доминантни микроб. Сандквист (*Sundqvist*) [13, 14] је установио преминацију *E. faecalis* у 38% случајева перзистентних апексних пародонтитиса, што је истоветно нашим налазима. Сајрен (*Siren*) и сарадници [24] су истраживали однос између процедура клиничког лечења и појаве ентеричних бактерија код инфицираних канала корена зуба и установили да је *E. faecalis* најчешћи и уобичајен налаз.

Лав (*Love*) [25] је проучавао могуће механизме који би објаснили како је *E. faecalis* могао да преживи и расте у оквиру дентинских тубула и доведе до поновне инфекције већ пуњених канала. Он сматра да ова бактерија задржава способност продирања у дентинске тубуле и да се припаја за колагену структуру при

постојању дентинске течности. Тип и комбинација микробних ћелија развијени су као одговор на средину, а фактори који утичу на то да ли ће микроорганизам преживети или не укључују еколошку нишу, исхрану, анаеробиозу, *pH* и такмичење са другим микроорганизмима. *E. faecalis* је резистентан на калцијум-хидроксид при вредности *pH* од 11,1 али не и при вредности 11,5. Опстанак *E. faecalis* у калцијум-хидроксиду није повезан с изазваном синтезом, али функционисање протонске пумпе било је критично за опстанак *E. faecalis* при високој вредности *pH* (изнад 11,5) [26]. Вероватно је да су микроорганизми могли да преживе, прилагоде се и поднесу критичне еколошке услове. Спрат (*Spratt*) и сарадници [27] су проучавали бактерицидно дејство *NaOCl*, хлорхексидина, повидон-јода и *EDTA* на *P. intermedia* и *E. faecalis* и закључили да је ефикасност одређених ириганса зависила од природе микроорганизма у биофилму и од времена дејства ириганса. Међутим, њихова клиничка ефикасност мора се посматрати у светлу комплексности анатомије канала корена зуба и полимикробне природе инфекције у каналном систему. Абдулах (*Abdullah*) и сарадници [28] су упоредном анализом истих ириганса на клиничком изолату *E. faecalis* узгајаном као биофилм или фенотип планктонске суспензије установили да је *NaOCl* био најефикаснији за ову бактерију већ након два минута. Ова истраживања су потврдила сва тумачења која инфициран канал посматрају у склопу полиморфне инфекције и стварања биофилма у заосталим нишама [29, 30].

E. faecalis је у инфицираним каналима корена зуба установљен у 37% испитиваних узорака у нашој студији. Већ после препарације канала и иригације водоник-пероксидом и раствором *MTAD* његова учесталост је сведена на 12%. Имајући у виду чињеницу да се терапија инфицираних канала наставља интраканалном медијацијом, уношењем пасте калцијум-хидроксида, чија вредност *pH* је већа од 12,0, сасвим је реално очекивати потпуну елиминацију *E. faecalis*.

Антимикробно дејство раствора *MTAD* заснива се на бактериостатском ефекту доксициклина. Уклањање размазног слоја остварује лимунска киселина, а детергент *Tween-80*, који има низак површински напон, обезбеђује продор раствора дубоко у микроканални систем [30]. Шабаханг (*Shabahang*) и сарадници [29] у својој студији *in vitro* истичу задовољавајућу антибактеријску ефикасност раствора *MTAD*. У пилот-студији Торабинејада (*Torabinejad*) и сарадника [30] обрађени канали су инфицирани плувачком и *E. faecalis* током две недеље, а потом испирани са 5 ml различитих концентрација доксициклина у различитим временским интервалима. Добијени резултати су показали да је иригација малим концентрацијама доксициклина канала корена зуба у трајању од пет минута ефикасно спречила раст бактерија (100%). Слични покушаји с пеницилином и еритромицином нису дали добре резултате. Антимикробно дејство антибиотика из породице тетрациклина на уклањање размазног слоја с површина обрађених канала корена дало је позитивне резултате [14, 29, 30].

Налази нашег истраживања показују да је антибактеријски ефекат троцентног H_2O_2 и раствора *MTAD* као финалног ириганса у односу на испитиване бактеријске врсте задовољавајући, нарочито ако се има у виду време финалне иригације од једног минута. Претходна истраживања се односе на време од пет минута. Време финалне иригације у нашем истраживању је истоветно оном које је коришћено за уклањање размазног слоја и отварање дентинских тубула без ризика нарушавања морфолошке структуре интраканалног дентина. С друге стране, време од пет минута је доста ризично због могућег ерозивног ефекта лимунске киселине на структуру интраканалног дентина. После финалне интраканалне иригације раствором *MTAD* у трајању од пет минута добија се потпуно чиста, али морфолошки потпуно измењена дентинска површина услед јаке ерозије инертубуларног, перитубуларног и интрагубуларног дентина. Отвори дентинских тубула су левкасти, назупчени и местимично кавернозно спојени. Дентински тубули су неједнаког пречника и облика, а због хелирања Ca^{2+} из дентина, стварају се кристалне формације калцијум-цитрата [12]. Због тога нисмо мењали услове у погледу контактности времена финалног ириганса. Смањење учесталости *E. faecalis* ($p < 0,01$), *P. intermedia* ($p < 0,01$) и *T. forsythensis* ($p < 0,05$) било је статистички значајно, док за *T. denticola*, *A. actinomycetemcomitans* и *P. gingivalis* није. Финална иригација раствором *MTAD* у трајању од једног минута довољна је за његово антибактеријско дејство, при чему је морфолошка структура интраканалног дентина потпуно очувана. Стога је време интраканалне финалне иригације раствором *MTAD* у трајању од једног минута оправдано.

Уколико би се раствор *MTAD* користио као једини ириганс, довели би се у питање ефекти уклањања размазног слоја. Неоспорно је да раствор *MTAD* коришћен као финални ириганс у трајању од једног минута показује позитивне резултате у уклањању размазног слоја и елиминацији највећег броја микроорганизма. Интраканална дентинска структура је у свим случајевима остала нетакнута и морфолошки непромењена, а антибактеријско дејство је било задовољавајуће, што му даје значајну клиничку референтност [12]. Како оксидациона средства не делују на анаеробне бактерије, за чији опстанак кисеоник није ни потребан, мора се нагласити да је у нашем истраживању постигнут антибактеријски ефекат раствором *MTAD*. Водоник-пероксид има значајну допунску улогу у синергистичком ефекту. Ослобођени кисеоник доводи до оксидације и спречавања даљег интраћелијског метаболизма, уништавања цитоплазматских органела и елиминацији нарочито Грам-позитивних бактерија.

Мора се нагласити да је антибактеријско дејство ових ириганса процењивано на основу једног бриса, непосредно по обради канала, и да није узета у обзир чињеница да након тога увек следи интраканална медијација пастом калцијум-хидроксида, која има вредност *pH* већу од 12,0, што ефикасно елиминише перзистентне облике *E. faecalis*.

ZAKLJUČAK

Применом технике PCR, која омогућава истовремену амплификацију различитих генских секвенци уз коришћење неколико парова прајмера, у инфицираним каналима корена зуба најчешћа је била бактерија *E. faecalis*. Такође су у релативно високом проценту откривене и *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythensis* и *P. gingivalis*. После хемомеханичке обраде и иригације канала корена раствором MTAD нису изоловане *P. intermedia*, *P. gingivalis* и *T. forsythensis*, док су *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans* и *T. denticola* устано-

вљене у мањем броју. Смањење учесталости *E. faecalis*, *P. intermedia* и *T. forsythensis* било је статистички значајно, док код осталих испитиваних бактерија није.

Раствор MTAD коришћен као финални интраканални антисептик у трајању од једног минута делотворно уклањања размазни слој, интраканална дентинска структура остаје нетакнута и морфолошки непромењена, а елиминише се и највећи број микроорганизама. Анализа резултата и процена антибактеријске ефикасности раствора MTAD даје овом финалном иригансу клиничку референтност у лечењу инфицираних канала корена зуба.

LITERATURA

- Torabinejad M, Ung B, Kettering JD. In vitro bacterial penetration of coronally unsealed endodontically treated teeth. *J Endod.* 1990; 16:566-9.
- Fabricius L, Dahlen G, Holm SE, Moller AJ. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scan J Dent Res.* 1982; 90:200-6.
- Dahlen G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. *Periodontol* 2000. 2002; 28:206-39.
- Giuliana G, Ammatuna P, Pizzo G, Capone FD, Angelo M. Occurrence of invading bacteria in radicular dentin of periodontally diseased teeth: microbiological findings. *J Clin Periodontol.* 1997; 24:478-85.
- Ando N, Hoshino E. Predominant obligate anaerobes invading the deep layers of root canal dentine. *Int Endod J.* 1990; 23:20-7.
- Horiba N, Maekawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod.* 1990; 16:331-4.
- Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic and dressing of experimentally infected dentinal tubules. *Dent Traumatol.* 1990; 6:142-9.
- Perez F, Rochd T, Lodter JP, Calas P, Michel G. In vitro study of the penetration of three bacterial strains in root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1993; 76:97-103.
- Siqueira JF, de Uzeda M, Fonseca A. A scanning electron microscopic evaluation of in vitro dentinal tubules penetration by selected anaerobic bacteria. *J Endod.* 1996; 22:674-6.
- Siqueira JF, Rôças LN, Souto R, De Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species, streptococci and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *J Endod.* 2002; 28:168-72.
- Siqueira JF, Rôças LN. Bacteroides forsythus in primary endodontic infections as detected by nested PCR. *J Endod.* 2003; 29:390-3.
- Mitić A, Mitić N, Živković S, Tošić G, Savić V, Dačić S, et al. Eфикасност sredstava за završnu иригацију канала korena zuba u uklanjаnju razmaznog sloja. *Srp Arh Celok Lek.* 2009; 137(9-10):482-9.
- Sundqvist G. Associations between microbial species in dental root canal infection. *Oral Microbiol Immunol.* 1992; 7:257-62.
- Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen: ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endod Top.* 2003; 6:3-28.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative. *Genome Res.* 1996; 6:986-94.
- Moore WC, Morre LH, Ranney RR, Smibert RM, Burmetster JA, Schenkein HA. The microflora of periodontal sites showing active destructive progression. *J Clin Periodontol.* 1991; 18:729-39.
- Siqueira JF, Rôças LN. PCR-based identification of Treponema maltophilum, T amylovorum, T medium and T lecithinolyticum in primary root canal infections. *Arch Oral Biol.* 2003; 48:495-502.
- Calt S, Serper A. Time-dependent effects of EDTA on dentine structures. *J Endod.* 2002; 28:17-29.
- Haapasalo M, Endal U, Homan Z, Jeffrey M. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endodontic Topics.* 2005; 10(1):77-102.
- Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T. Microbiological status of root filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J.* 1998; 31:1-7.
- Baumgartner JC, Falkner WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endod.* 1991; 17:380-3.
- Salvatorelli G, De Lorenzi S. Biofilms: stato dell'arte. *L'Internista.* 2002; 10(4):222-31.
- Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth Methodological studies (thesis). *Odontol Tidskr.* 1966; 74(5):Suppl:1-380.
- Siren EK, Haapasalo PP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo ENJ. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J.* 1997; 30:91-5.
- Love RM. Enterococcus faecalis – a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* 2001; 34:399-405.
- Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of Enterococcus faecalis to calcium hydroxide. *Int Endod J.* 2002; 35:221-8.
- Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J.* 2001; 34:300-7.
- Abdullah M, Ng YL, Gulabivala K, Moles D, Spratt DA. Susceptibilities of two Enterococcus faecalis phenotypes to root canal medications. *J Endod.* 2005; 31:30-6.
- Shabahang S, Pouresmail M, Torabinejad M. In vitro antimicrobial efficacy of MTAD and sodium. *J Endod.* 2003; 29:450-2.
- Torabinejad M, Shabahang S, Aprecio RM, Kettering JD. The antimicrobial effect of MTAD: an in vitro investigation. *J Endod.* 2003; 29:400-3.

Analysis of Antimicrobial Effect of MTAD Solution in Infected Canal System Using PCR Technique

Aleksandar Mitić¹, Nadica Mitić¹, Jelena Milašin², Slavoljub Živković³, Jovanka Gašić¹, Vladimir Mitić⁴, Jelena Popović¹

¹Department of Restorative Dentistry and Endodontics, Clinic of Dentistry, Medical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia;

²Institute of Genetics, Faculty of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

³Department of Restorative Dentistry and Endodontics, Faculty of Dental Medicine, University of Belgrade, Belgrade, Serbia;

⁴Department of Jaw Orthopedics, Clinic of Dentistry, Medical Faculty, University of Niš, Niš, Serbia

SUMMARY

Introduction Clinically acceptable antiseptic should possess organolithic-mineralolithic properties and antimicrobial efficacy, and should be non-toxic.

Objective The aim of the paper was to assess the presence of genomes of the most common microorganisms (*Porphyromonas gingivalis*, *Agregatibacter actinomycetemcomitans*, *Tanarella forsythensis*, *Prevotella intermedia*, *Treponema denticola* and *Enterococcus faecalis*) in infected tooth root canals before and after rinsing with solution of doxycycline, citric acid and detergent Tween-80 (MTAD) in patients with clinically diagnosed primary apex periodontitis.

Methods The content of primarily infected canals before and after using the MTAD solution was used as a biological material in which the presence of microorganisms DNA was proved. For the detection of bacterial genome the multiplex PCR technique was applied.

Results The percentage of positive samples before canal treatment was 100%. In infected root canals *E. faecalis* was most

dominant (37%). In a relatively high percentage we detected *P. intermedia* (25%), *A. actinomycetemcomitans* (20%), *T. denticola* (17%), *T. forsythensis* (15%) and *P. gingivalis* (10%). After rinsing the canal system using MTAD solution, there was a statistically significant decrease in *E. faecalis* (12%), *P. intermedia* (0%), *T. forsythensis* (0%) and *P. gingivalis* (0%). The presence of other bacteria was also diminished but not statistically significantly.

Conclusion With the application of multiplex PCR technique which provided a simultaneous amplification of various genomic sequences, using several pairs of primers, the most dominant in infected root canals were *E. faecalis*, *P. intermedia*, *A. actinomycetemcomitans*, *T. denticola*, *T. forsythensis* and *P. gingivalis*. After mechanic treatment and irrigation of root canals with MTAD solution, *P. intermedia*, *P. gingivalis* and *T. forsythensis* were not found. The presence of *E. faecalis*, *A. actinomycetemcomitans* and *T. denticola* was diminished, however, not statistically significantly.

Keywords: infection; root canal; endopathogenic bacteria; PCR