

UNIVERZITET U ISTOČNOM SARAJEVU

MEDICINSKI FAKULTET

Jelena B. Krunić

**„OZON U RESTAURATIVNOJ STOMATOLOŠKOJ TERAPIJI:
ANTIBAKTERIJSKI EFEKAT I UTICAJ NA VEGF U ZUBNOJ
PULPI“**

DOKTORSKA DISERTACIJA

Foča, jul 2015. godine

Bibliografski podaci:

UDK	546.214:616.314-089.27
Naučna oblast	Medicinske i zdravstvene nauke
Naučno polje	Klinička medicina
Uža naučna oblast	Stomatologija, oralna hirurgija i medicina
Institucija	Medicinski fakultet Univerziteta u Istočnom Sarajevu
Mentor rada	Prof. dr Dragica Stojić, redovni profesor Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu
Broj stranica	87
Broj slika	2
Broj tabela	22
Broj priloga	0
Broj literaturnih referenci	240

Datum odbrane

Komisija za odbranu:

1. Prof. dr Slavoljub Živković, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, komentor i član komisije
2. Doc. dr Nikola Stojanović, Medicinski fakultet Univerziteta u Istočnom Sarajevu, član komisije
3. Doc. dr Lado Davidović, Medicinski fakultet Univerziteta u Istočnom Sarajevu, član komisije
4. Doc. dr Jelena Roganović, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije
5. Doc. dr Branka Popović, Stomatološki fakultet Univerziteta u Beogradu, član komisije

Rad je odložen u biblioteci Medicinskog fakulteta

...mom Bogdanu na nebu i

mojoj Nadi na zemlji...

Ova doktorska teza je urađena na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Istočnom Sarajevu, u saradnji sa Službom za medicinsku mikrobiologiju sa parazitologijom i virusologijom Univerzitetske bolnice u Foči, Institutom za stomatološku farmakologiju i Institutom za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Dio teze je urađen u sklopu projekta „Ozon u restaurativnoj i endodontskoj stomatološkoj terapiji: antibakterijski efekat i uticaj na VEGF u zubnoj pulpi“ finansiranog od strane Ministarstva nauke i tehnologije RS (broj: 19/06-020/961-174/12).

Žahvaljujem:

mentoru, *prof. dr Dragici Stojić*, sa Instituta za stomatološku farmakologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, koja me je upoznala sa naučnim svijetom i vodila sa velikom profesionalnošću kroz dodiplomske i poslijediplomske studije. Hvala joj što me je, više od deceniju, strpljivo usmjeravala, prijateljski pomagala, nesebično dijelila svoje ogromno znanje i iskustvo, učila da sagledavam kompleksnije i sveobuhvatnije i uvijek bila dostupna i kao učitelj i kao prijatelj;

komentoru, *prof. dr Slavoljubu Živkoviću*, sa Klinike za bolesti zuba Stomatološkog fakulteta u Beogradu, za veliko razumijevanje, svesrdnu podršku u svim fazama rada i sugestijama koje su oblikovale ovaj rad;

doc. dr Nikoli Stojanoviću, koji mi je prenio neprocjenjivo praktično i stručno znanje neophodno za izradu ovog doktorskog rada, na posvećenosti i stalnom podsticaju;

doc. dr Jeleni Roganović i *asist. dr Ljiljani Đukić*, sa Instituta za stomatološku farmakologiju Stomatološkog fakulteta u Beogradu, koje su me upoznale sa ELISA imunoesejskim protokolom, uradile sve potrebne analize, kao i one koje prevazilaze okvire ovog doktorata, a posebno na njihovoj predanosti i nesebičnoj podršci;

doc. dr Branki Popović, sa Instituta za humanu genetiku Stomatološkog fakulteta u Beogradu, za susretljivost, podršku i nesebičnu pomoć u organizaciji i realizaciji molekularnih analiza i dragocjenim smjernicama za interpretaciju rezultata;

doc. dr Ladu Davidoviću, za svesrdnu podršku i angažovanje tokom cijelog istraživanja;

prof. dr Slobodanki Đukić, sa Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta u Beogradu, na konstruktivnim savjetima i smjernicama za definisanje eksperimentalnog protokola za mikrobiološku analizu i tumačenju rezultata;

prim. dr Rade Mrgud i dr Ružici Lukić, kao i svom osoblju Službe za medicinsku mikrobiologiju sa parazitologijom i viruslogijom Univerzitetske bolnice u Foči, koji su otvorili vrata svoje laboratorije za mikrobiološku analizu i učinili da se osjećam dijelom njihovog tima;

dr sc. Ivani Simić, na pomoći pri prikupljanju uzoraka i cjelokupnom angažovanju oko dijela kliničkog istraživanja;

stomatološkim sestrama pri Katedri za bolesti zuba i endodonciju i Katedri za oralnu rehabilitaciju, kao i Službi za biohemiju i hematologiju Univerzitetske bolnice u Foči za tehničku podršku;

kolegama sa *Katedre za bolesti zuba i endodonciju*, a posebno *v. asist. dr Brankici Davidović*, na podršci, pomoći, razumijevanju i smijehu;

prijateljima, jer su uvijek tu.

Najveću zahvalnost dugujem onima koji su me podržavali uvijek i u svemu, i bez kojih ovo sve ne bi bilo moguće-*porodici*.

OZON U RESTAURATIVNOJ STOMATOLOŠKOJ TERAPIJI: ANTIBAKTERIJSKI EFEKAT I UTICAJ NA VEGF U ZUBNOJ PULPI

REZIME

Uvod. Ozon ima široku primjenu u medicini, a posljednjih godina se primjenjuje u stomatologiji zbog izraženog antimikrobnog djelovanja bez pojave antimikrobne rezistencije. Manji broj kliničkih studija ukazuje na mogućnost primjene ozona u terapiji karijesnih lezija i za dezinfekciju kaviteta. Za odontoantiseptike je od značaja njihov farmakodinamski efekat kao i njihov bezbjednosni profil. Najveći broj do sada objavljenih radova o antibakterijskoj efikasnosti ozona na kariogene bakterije odnosi se na rezultate *in vitro* studija, a mali broj radova na ispitivanje biokompatibilnosti ozona na zubnu pulpu *in vivo*.

Cilj. Cilj ove teze je bio da se ispita antibakterijski efekat primjene ozona na ukupan broj bakterija, *Lactobacillus spp.* i pojedine vrste *Lactobacillus spp.* poslije nepotpunog uklanjanja karijesa, kao i da se odredi koncentracija vaskularnog endotelnog faktora rasta (VEGF) i superoksid dismutaze (SOD) u zubnoj pulpi zdravih zuba poslije primjene ozona. **Materijal i metode.** *Studija I* je uključila ukupno 48 zdravih osoba oba pola, starosti od 19-48 godina, kod kojih je dijagnostikovana najmanje jedna duboka karijesna lezija ($>1/2$ debljine dentina) na okluzalnoj ili okluzalnoj i aproksimalnoj površini bočnog zuba. Ispitanici su u zavisnosti od primijenjenog antiseptika za dezinfekciju kaviteta podijeljeni u dvije grupe: eksperimentalna, u kojoj je korišćen ozon u obliku gasa, i komparativna grupa, gdje je primjenjen 2% hlorheksidin. Uzorci dentina su uzeti iz karijesnih kaviteta poslije nepotpunog uklanjanja karijesa i poslije primjene antiseptika i analizirani su kultivisanjem, lančanom reakcijom polimeraze (PCR) i „real-time“ PCR (qPCR). *Studijom II* su obuhvaćene 38 zdrave osobe oba pola, starosti 18-40, kod kojih je indikovana ekstrakcija intaktnih i klinički zdravih donjih molara. Poslije preparacije kaviteta na okluzalnoj površini zuba u eksperimentalnoj grupi je primjenjen ozon u obliku gasa, dok u kontrolnoj grupi kaviteti nisu tretirani (fiziološki rastvor). U zubnim pulpama određen je nivo VEGF imunoesejskom tehnikom (ELISA) i nivo SOD spektrofotometrijskom metodom. **Rezultati.** *Studija I.* Jednokratna primjena ozona i hlorheksidina u preparisani kavitet je dovela do značajnog smanjenja ukupnog broja aerobnih i anaerobnih bakterija, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, ali ne i pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.*, nezavisno od metode identifikacije bakterija. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina ispitivana metodom kultivisanja je pokazala da je ozon izazvao značajno smanjenje broja *Lactobacillus spp.* ($p=0,041$), a hlorheksidin značajno smanjenje broja *Streptococcus spp.* ($p=0,041$). Primjenom PCR i qPCR metode nije zabilježena razlika u efikasnosti ozona i hlorheksidina na kariogene bakterije. *Studija II.* Koncentracija VEGF u grupi tretiranoj ozonom je bila značajno veća ($p<0,0001$), a nivo SOD značajno manji ($p=0,002$) u odnosu na vrijednosti dobijene za pulpe kontrolnih zuba. **Zaključci.** Komparativna analiza rezultata o antibakterijskoj efikasnosti jednokratno primijenjenog ozona i 2% hlorheksidina u ispreparisani kavitet zuba pokazuje da su oba antiseptika podjednako efikasna. Poslije jednokratne primjene ozona kao antiseptika u kavitet zuba povećava se nivo VEGF, koji ne predstavlja patološko povećanje, i aktivira se antioksidativni sistem u tkivu pulpe, što ukazuje na njegovu biokompatibilnost sa zubnom pulpom.

Ključne riječi: ELISA, ispitivanje biokompatibilnosti, kultivisanje, ozon, PCR, SOD, VEGF

OZONE IN RESTORATIVE THERAPY: ANTIBACTERIAL EFFECT AND THE IMPACT ON VEGF IN DENTAL PULP

SUMMARY

Introduction. Ozone is widely used in medicine, and recently it is used in dentistry due to its strong antimicrobial activity without antimicrobial resistance. A small number of clinical studies evaluated the effect of ozone in therapy of dental caries and for cavity disinfection. For dental antiseptics use, both their pharmacodynamic effects and safety profile are of the importance. Most of published works considering the antibacterial effect of ozone on cariogenic bacteria has been conducted *in vitro*, and a small number of studies investigated biocompatibility of ozone on dental pulp *in vivo*. **Aim.** The aim of this thesis was to investigate the effect of ozone on total bacteria, *Lactobacillus* spp., and different *Lactobacillus* spp. strains after incomplete caries removal, as well as to determine the concentration of vascular endothelial growth factor (VEGF) and superoxide dismutase (SOD) in the dental pulp of healthy teeth after ozone application. **Material and methods.** *Study I* included 48 healthy subjects of both gender, aged 19-48 years, with at least one tooth with diagnosed deep caries ($> 1/2$ of the thickness of dentin) on occlusal or occlusal and interproximal tooth surface. Subjects were divided into two groups according to the cavity disinfectant used: the experimental group, where ozone gas was used, and the comparative group, where 2% chlorhexidine was used. Dentine samples were taken from the cavity after partial caries removal and after application of antiseptic, and analyzed using cultivation, polymerase chain reaction (PCR) and "real-time" PCR (qPCR) methods. *Study II* included 38 healthy subjects of both gender, aged 18-40 years, in which the extraction of sound mandibular molars were indicated. After cavity preparation on the occlusal surface of the tooth ozone gas was applied in the experimental group, while saline was applied in the control group. The levels of VEGF and SOD in dental pulp were determined by immunoassay technique (ELISA) and by spectrophotometric method, respectively. **Results.** *Study I.* Single application of ozone and chlorhexidine into the cavity resulted in a significant decrease of the total number of aerobic and anaerobic bacteria, *Streptococcus* spp., and *Lactobacillus* spp., but not of the *Lactobacillus* spp. strains, irrespective of the method for bacteria enumeration. Comparative analysis of antibacterial effect of ozone and chlorhexidine using cultivation revealed that the number of *Lactobacillus* spp. was significantly lower in the ozone group while the number of *Streptococcus* spp. was significantly lower after chlorhexidine treatment ($p=0.041$). By using PCR and qPCR methods, no difference in the effectiveness of ozone and chlorhexidine on cariogenic bacteria was noted. *Study II.* In the group treated with ozone the concentration of VEGF was significantly higher ($p<0.0001$), and the level of SOD was significantly lower ($p=0.002$) compared to the values obtained for the control pulps. **Conclusions.** Comparative analysis of the antibacterial efficiency of once applied ozone and 2% chlorhexidine in tooth cavities indicates that both antiseptics are equally effective. After single application of ozone in tooth cavity the level of VEGF in dental pulp increases, which does not present pathological increase, and the antioxidant system activates, which indicates its biocompatibility with dental pulp.

Key words: ELISA, biocompatibility testing, cultivation, ozone, PCR, SOD, VEGF

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. KARIJES ZUBA I HIPOTEZE O NJEGOVOM NASTANKU	1
1.2. MIKROORGANIZMI PROUZROKOVAČI KARIJESA.....	2
1.3. PRINCIPI TERAPIJE DUBOKOG KARIJESA.....	4
1.4. EFIKASNOST ODONTOANTISEPTIKA U RESTAURATIVNOJ TERAPIJI	5
1.4.1. Hlorheksidin	5
1.4.2. Etilendiaminotetraacetatna kiselina	7
1.4.3. Natrijum hipohlorit.....	7
1.4.4. Vodonik peroksid.....	8
1.4.5. Druga sredstva sa antiseptičkim djelovanjem.....	8
1.5. OZON KAO ODONTOANTISEPTIK.....	9
1.6. PRINCIPI ISPITIVANJA BEZBJEDNOSTI ODONTOANTISEPTIKA.....	12
2. RADNA HIPOTEZA.....	16
3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA.....	18
4. MATERIJAL I METODE.....	20
4.1. DIZAJN STUDIJE	20
4.2. ISPITANICI	20
4.2.1. Studija I: antibakterijski efekat ozona u karijesnim kavitetima zuba.....	20
4.2.2. Studija II: biokompatibilnost ozona u odnosu na zubnu pulpu.....	20
4.2.3. Veličina uzorka	21
4.2.4. Randomizacija	21
4.3. KLINIČKA PROCEDURA I UZIMANJE UZORAKA	21
4.3.1. Studija I.....	21
4.3.2. Studija II.....	22
4.4. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA UZORAKA	23
4.4.1. Određivanje ukupnog broja bakterija, <i>Lactobacillus spp.</i> i <i>Streptococcus spp.</i> metodom kultivisanja.....	23
4.4.2. Identifikacija različitih vrsta <i>Lactobacillus spp.</i> biohemijskim testom	23
4.4.3. Određivanje ukupnog broja anaerobnih bakterija i <i>Lactobacillus spp.</i> „real-time“ lančanom reakcijom polimeraze (qPCR)	24

4.4.4. Određivanje učestalosti vrste <i>Lactobacillus casei/paracasei</i> lančanom reakcijom polimeraze (PCR)	26
4.5. KVANTIFIKACIJA VEGF I SOD U ZUBNOJ PULPI.....	26
4.5.1. Priprema uzoraka	26
4.5.2. Određivanje nivoa VEGF u zubnoj pulpi imunoesejskom tehnikom	26
4.5.3. Određivanje nivoa SOD u zubnoj pulpi spektrofotometrijskom metodom	27
4.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA.....	27
5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA.....	31
5.1. KARAKTERISTIKE ISPITANIK I KARIJESNOG UZORKA	31
5.2. ANTIBAKTERIJSKI EFEKAT OZONA	35
5.2.1. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj bakterija ispitivani metodom kultivisanja	35
5.2.1.1. Broj kaviteta sa aerobnim bakterijama.....	35
5.2.1.2. Prosječan broj aerobnih bakterija	35
5.2.1.3. Broj kaviteta sa anaerobnim bakterijama.....	36
5.2.1.4. Prosječan broj anaerobnih bakterija	37
5.2.2. Efekti ozona i hlorheksidina na <i>Lactobacillus spp.</i> ispitivani metodom kultivisanja i biohemijskom analizom	37
5.2.2.1. Broj kaviteta sa <i>Lactobacillus spp.</i>	37
5.2.2.2. Prosječan broj <i>Lactobacillus spp.</i>	38
5.2.2.3. Učestalost pojedinih vrsta <i>Lactobacillus spp.</i>	39
5.2.3. Efekti ozona i hlorheksidina na <i>Streptococcus spp.</i> ispitivani metodom kultivisanja	42
5.2.3.1. Broj kaviteta sa <i>Streptococcus spp.</i>	42
5.2.3.2. Prosječan broj <i>Streptococcus spp.</i>	42
5.2.4. Korelacija kliničkih karakteristika lezije i prosječnog broja bakterija u cjelokupnom uzorku.....	43
5.2.5. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina ispitivanog metodom kultivisanja.....	44
5.2.5.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na aerobne bakterije, anaerobne bakterije, <i>Lactobacillus spp.</i> i <i>Streptococcus spp.</i> prije primjene antiseptika	44
5.2.5.2. Poređenje prosječnog broja aerobnih bakterija, anaerobnih bakterije, <i>Lactobacillus spp.</i> i <i>Streptococcus spp.</i> prije primjene antiseptika.....	45
5.2.5.3. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na različite vrste <i>Lactobacillus spp.</i> prije primjene antiseptika	46

5.2.5.4. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na aerobne bakterije, anaerobne bakterije, <i>Lactobacillus</i> spp. i <i>Streptococcus</i> spp. poslije primjene antiseptika	47
5.2.5.5. Poređenje prosječnog broja aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, <i>Lactobacillus</i> spp. i <i>Streptococcus</i> spp. poslije primjene antiseptika	48
5.2.5.6. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na različite vrste <i>Lactobacillus</i> spp. poslije primjene antiseptika	48
5.2.6. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj bakterija ispitivani metodom qPCR	50
5.2.6.1. Broj kaviteta sa anaerobnim bakterijama	50
5.2.6.2. Prosječan broj anaerobnih bakterija	50
5.2.7. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj <i>Lactobacillus</i> spp. ispitivani metodom qPCR	51
5.2.7.1. Broj kaviteta sa <i>Lactobacillus</i> spp.	51
5.2.7.2. Prosječan broj <i>Lactobacillus</i> spp.	52
5.2.8. Efekti ozona i hlorheksidina na prisustvo vrste <i>L. casei/paracasei</i> ispitivani metodom PCR	52
5.2.8.1. Broj kaviteta sa <i>L. casei/paracasei</i>	52
5.2.9. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina ispitivanog metodom qPCR	53
5.2.9.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na anaerobne bakterije i <i>Lactobacillus</i> spp. prije primjene antiseptika	53
5.2.9.2. Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i <i>Lactobacillus</i> spp. prije primjene antiseptika	53
5.2.9.3. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na anaerobne bakterije i <i>Lactobacillus</i> spp. poslije primjene antiseptika	55
5.2.9.4. Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i <i>Lactobacillus</i> spp. poslije primjene antiseptika	55
5.2.10. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina na vrstu <i>L. casei/paracasei</i> ispitivanog metodom PCR	56
5.2.10.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na <i>L. casei/paracasei</i> prije i poslije primjene antiseptika	56
5.3. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA I UZORKA	59
5.4. EFEKAT OZONA NA NIVO VEGF U ZUBNOJ PULPI	60
5.5. EFEKAT OZONA NA NIVO SOD U ZUBNOJ PULPI	61
6. DISKUSIJA	63
7. ZAKLJUČCI	72
8. LITERATURA	74



1.

UVOD

1. UVOD

1.1. KARIJES ZUBA I HIPOTEZE O NJEGOVOM NASTANKU

Karijes predstavlja jedno od najčešćih hroničnih oralnih oboljenja modernog doba koje se i pored široke primjene profilaktičke terapije javlja kod školske djece sa učestalošću od 30-90%, a kod odraslih do 100% (Bratthall, 2005; Petersen i sar., 2005). Na pojavu karijesa utiču brojni faktori kao što su ishrana, oralno-higijenske navike i primjena fluorida. Socio-ekonomski status i genetska predispozicija su takođe od značaja u etiologiji karijesa. Karijes zuba nastaje kao posljedica interakcije bakterija iz dentalnog plaka, ugljenih hidrata i brojnih faktora domaćina u funkciji vremena (Selwitz i sar., 2007). Dentalni plak predstavlja mekanu nemineralizovanu naslagu koja se sastoji od mikroorganizama, adhezivnih glikoproteina i vanćelijskog mikrobnog polimernog matriksa. Početna karijesna lezija na površini gleđi se vidi kao kredasto zamućenje-„bijela mrlja“. Ukoliko se ne liječi, lezija napreduje dublje u dentin, uzrokuje gubitak zubne supstance i pojavu kaviteta, a na kraju i infekciju okolnih struktura.

Postoji nekoliko različitih hipoteza o nastanku karijesa, koje su se razvijale uporedo sa istraživanjima o sastavu i organizaciji dentalnog plaka. Jedna o prvih hipoteza je bila „hipoteza o specifičnom plaku“ prema kojoj karijes nastaje kao posljedica djelovanja specifičnih bakterija iz dentalnog plaka (Loesche, 1976), u prvom redu mutans streptococci i *Lactobacillus spp.*. Međutim, uočeno je da do razvoja karijesa može doći i bez prisustva mutans streptococci, kao i da njihovo prisustvo nije uvijek povezano sa procesima demineralizacije (Marsh i sar., 1989). Ovi nalazi su doveli do razvoja „hipoteze o nespecifičnom plaku“ prema kojoj oboljenje nastaje kao posljedica interakcije svih bakterija dentalnog plaka (Theilade, 1986). Iako je karijes posmatran kao nespecifično oboljenje, uočeno je da se određene vrste bakterija češće izoluju sa oboljelih mjesta i da se razlikuju od onih koje se nalaze na zdravim površinama zuba. To je dovelo do razvoja „hipoteze o ekološkom plaku“ (Marsh, 2003; Takahashi i Nyvad, 2011). Prema ovoj hipotezi u dentalnom plaku, kao dinamičkom ekosistemu, ne-mutansne bakterije imaju glavnu ulogu u održavanju homeostaze (stadijum dinamičke stabilnosti). Promjene u spoljašnjoj sredini (smanjeno lučenje pljuvačke ili povećan unos ugljenih hidrata) dovode do povećane produkcije kiselina i povećanja broja acidogenih bakterija kao i bakterija koje tolerišu niske vrijednosti pH. Ovaj poremećaj destabilizuje bakterijsku homeostazu i balans procesa remineralizacije-demineralizacije što za posljedicu ima gubitak mineralnih materija (acidogeni stadijum). Kada se uspostavi acidogena sredina, raste broj mutans grupe *Streptococcus spp.* i drugih bakterija koje podnose kiselu sredinu i tako dovode do nastanka lezije (stadijum acidogene tolerancije). Skoriya istraživanja Simón-Soro i sar. (2013) i Simón-Soro i Mira (2015) ukazuju i na „tkivno-zavisnu hipotezu“ u nastanku karijesa. Ovom hipotezom uočava se razlika u vrsti bakterija prouzrokovaca karijesa u zavisnosti od toga da li je u pitanju karijes dentina ili karijes gleđi. U odnosu na gleđ, dentin predstavlja drugačiju ekološku sredinu za kariogene bakterije jer sadrži više organskih materija i manje mineralnih materija; hidroksiapatit dentina je siromašniji kalcijumom a bogatiji karbonatima, a razgradnja dentina se odvija pri višim vrijednostima pH (Vanuspong i sar., 2002; Berkovitz i

sar., 2009). Karijesne lezije u gleđi karakteriše prisustvo acidogenih bakterija koje adheriraju na zubna tkiva i koje fermentišu ugljene hidrate. Sa druge strane u dentinskim lezijama se u većem broju nalaze proteolitičke, anaerobne bakterije koje su zavisne od osmotskog pritiska (Simón-Soro i sar., 2013; Simón-Soro i sar., 2014; Simón-Soro i Mira, 2015).

1.2. MIKROORGANIZMI PROUZROKOVAČI KARIJESA

Centralna uloga za nastanak karijesa se pripisuje mutans streptococci i *Lactobacillus spp.*. Smatra se da mutans streptococci (*Streptococcus mutans* i *Streptococcus sobrinus*) iniciraju karijesni proces na površini krunice i/ili korijena. Dokazi za ovo su radovi u kojima je pokazano da se ove bakterije često izoluju iz karijesnih kaviteta, uzrokuju karijes u eksperimentalnim uslovima, stvaraju kiseline, dobro podnose kiselu sredinu i imaju sposobnost stvaranja površinskih antigena I/II i u vodi nerastvorljivog glukana, koji olakšavaju njihovu adheziju za zubna tkiva i druge bakterije (Hamada i Slade, 1980). Takođe, mogu da prežive i u nedostatku egzogenih ugljenih hidrata jer deponuju intracelularne polisaharide (Takahashi i sar., 1991). U slučajevima kada se izoluju iz dubokih karijesnih lezija mutans streptococci nisu uvijek najbrojnije vrste na ovom nivou karijesne lezije, što ukazuje na značaj drugih acidogenih bakterija ovog roda u razvoju i progresiji oboljenja (Lima i sar., 2011; Simón-Soro i sar., 2013). Zanimljivo je istaći da kod 10-20% osoba sa aktivnim karijesom nisu izolovane *Streptococcus spp.* iz mutans grupe (Beighton, 2005; Aas i sar., 2008). *Lactobacillus spp.* su najčešće bakterije koje se izoluju iz dubokih karijesnih lezija dentina što ukazuje na njihov veliki značaj za progresiju karijesnog procesa, ali ne i za nastanak karijesa (Aas i sar., 2008; Simón-Soro i sar., 2013; Obata i sar., 2014; Simón-Soro i Mira, 2015). Ove bakterije stvaraju kiseline i podnose izrazito kiselu sredinu. Na činjenicu da *Lactobacillus spp.* nema značaj u nastanku karijesa ukazuju nalazi o maloj količini ovih bakterija u dentalnom plaku (Aas i sar., 2008; Simón-Soro i sar., 2013; Simón-Soro i Mira, 2015)

U posljednjih dvadeset pet godina, zahvaljujući uvođenju metoda molekularne biologije, kao što je lančana reakcija polimeraze (PCR), za izolaciju i identifikaciju bakterija, utvrđeno je da mnogo veći broj bakterija, za koje se do tada nije znalo, različito učestvuje u dinamici karijesnog procesa: zdrava gleđi, početna karijesna lezija u gleđi, karijes dentina i duboka karijesna lezija u dentinu.

Supragingivalni dentalni plak zdravih zuba naseljavaju bakterije *Actinomyces spp.* i *Streptococcus spp.* iz mitis grupe (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus oralis* i *Streptococcus mitis*) (Li i sar., 2004). Sastav dentalnog plaka na zdravim površinama zuba karakteriše prisustvo i drugih, uglavnom Gram pozitivnih bakterija. Tako su Aas i sar. (2008) u opsežnoj molekularnoj studiji izolovali *Kingella oralis*, *Eubacterium saburreum* cl. GT038, *Gemella morbilorum*, *Streptococcus cristatus*, *Streptococcus intermedius*, *Streptococcus sp.* cl. CH016, *Streptococcus sp.* grupa H6, *Leptotrichia sp.* cl. DT031, *Eubacterium sp.* cl. EI074, *Campylobacter showae*, *Fusobacterium nucleatum subsp. polymorphum* i *Capnocytophaga sputigena* u većem broju sa površine intaktne gleđi stalnih zuba. Interesantno je spomenuti da su isti autori uočili razliku u bakterijskom profilu plaka koji prekriva intaktnu gleđ stalnih zuba kod osoba bez

karijesa i restauracija u poređenju sa intaktnom gleđi osoba sa prisutnim karijesnim lezijama (Aas i sar., 2008). Gross i sar. (2010) povezuju bakterije *S. mitis*- *Streptococcus pneumoniae*- *Streptococcus infantis*, *Corynebacterium matruchotii*, *Streptococcus gordonii*, *S. cristatus*, *Capnocytophaga gingivalis*, *Eubacterium* IR009, *Campylobacter rectus* i *Lachnospiraceae* sp. C1 sa zdravljem zuba. Sa površine zdrave gleđi kod osoba bez karijesnih lezija su kao najčešće izolovane *S. sanguinis*, *Treponema* spp., *Capnocytophaga sputigena*, *Anginosus* grupa 3, *Fusobacteria* spp. 4, *S. gordonii*, *Fusobacteria* spp. 1, *Gemella morbillorum* i *S. mitis* u istraživanju Wolff i sar. (2013), odnosno *Streptococcus* spp., *Neisseiria* spp., *Corynebacterium* spp., *Rothia* spp., *Haemophilus* spp. i *Veillonella* spp. u istraživanju Kianoush i sar. (2014).

Početnu karijesnu leziju u gleđi karakteriše prisustvo *Veillonella* spp., *Actinomyces* sp. cl. GU067, *S. sanguinis*, *Leptotrichia* sp. cl. GT018, *Fusobacterium nucleatum* subsp. *polymorphum*, *Eubacterium* sp. cl. EI074, *Fusobacterium animalis*, *Leptotrichia* spp., *Selenomonas* sp. cl. EY047 i *S. mitis* (Aas i sar., 2008). *Streptococcus* spp., *Rothia* spp., *Leptotrichia* spp. i *Veillonella* spp. su najčešće izolovane bakterije iz karijesnih lezija u gleđi u studiji Simón-Soro i sar. (2014).

Karijesnu lezija u dentinu karakteriše prisustvo 6-37 različitih vrsta bakterija, uglavnom anaerobnih Gram pozitivnih koka i štapićastih bakterija i Gram negativnih štapićastih bakterija (Martin i sar., 2002; Chhour i sar., 2005; Aas i sar., 2008; Lima i sar., 2011) i u odnosu na zdravu gleđ i početnu karijesnu leziju u gleđi, bakterijska raznolikost u dentinu je manja (Aas i sar., 2008; Gross i sar., 2010; Wolff i sar., 2013). U dentinskim lezijama se najčešće izoluju *Lactobacillus* spp., *Shlegelella* spp., *Pseudoramibacter* spp., i *Atopobium* spp. (Simón-Soro i sar., 2014). Kianoush i sar. (2014) nalaze da su najzastupljenije bakterije u karijesnim kavitetima *Lactobacillus* spp., *Atopobium* spp., *Olsenella* spp., *Propionibacterium* spp., *Bifidobacterium* spp., *Dialister* spp., *Sphingomonas* spp. i *Parascardovia* spp.. Istraživanje Obata i sar. (2014) je pokazalo prisustvo *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* spp., *Atopobium* spp., *Streptococcus* spp., *Prevotella* spp., *Olsenella* spp., *Actinomyces* spp., *Veillonella* spp., *Pseudoramibacter* spp., *Mitsuokella* spp. i *Scardovia* spp. u karijesnim lezijama u dentinu. Schulze-Schweifing i sar. (2014) su u dentinskim karijesnim lezijama izolovali rodove bakterija *Prevotella*, *Lactobacillus*, *Selenomonas* i *Streptococcus* kao najbrojnije. Isti autori nalaze da su najbrojnije vrste bakterija u uzrocima karijesnog dentina *Lactobacillus gasseri*, *Prevotella denticola*, *Alloprevotella tannerae*, *S. mutans* i *Streptococcus* sp. HOT 070.

Zanimljivo je istaći da su pojedini autori analizirali različite nivoe dentinske karijesne lezije primjenom molekularnih tehnika. Tako, Aas i sar. (2008) nalaze u karijesnim lezijama dentina *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus salivarius*, *Leptotrichia* sp. cl. GT018, *Campylobacter gracilis* i *Selemonas* sp. cl. EY04 kao najčešće bakterijske vrste, dok u dubokim karijesnim lezijama dentina *S. mutans*, *Lactobacillus* spp., *Propionibacterium* sp. FMA5 i *Atopobium genomospecies* C1 kao dominantne bakterije (Aas i sar., 2008). Munson i sar. (2004) su analizirali uzorke središnjeg i najdubljeg sloja duboke karijesne lezije dentina i izolovali različite vrste, ali *S. mutans*, *Rothia dentocariosa* i *Propionibacterium acidifaciens* kao najčešće u oba ispitivana sloja. Lima i sar. (2011) su analizirali tri sloja duboke karijesne lezije dentina: površinski, središnji i duboki. Autori su uočili da su najbrojnije bakterije u površinskom sloju lezije *Atopobium genomospecies* C1, *Streptococcus* spp., *Fusobacterium nucleatum* i *Veillonella* spp.. U

središnjem sloju najbrojnije su bile *Atopobium C1*, *F. nucleatum*, *Veillonella spp.*, *Lactobacillus fermentum* i *Lactobacillus casei*, dok su najdubljim slojevima karijesne lezije dentina najbrojnije bile *Atopobium C1*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, *Streptococcus spp.* i *Veillonella spp.* Međutim, ni u jednoj od studija nije zabilježena značajna razlika u učestalosti različitih vrsta bakterija u odnosu na ispitivani sloj duboke karijesne lezije, osim za učestalost vrste *Olsenella uli* u studiji Lima i sar. (2011).

1.3. PRINCIPI TERAPIJE DUBOKOG KARIJESA

Duboka karijesna lezija predstavlja leziju koja je zahvatila veći dio dentina i gdje tanak sloj razmekšanog dentina razdvaja karijesnu leziju i zubnu pulpu. Terapija dubokog karijesa ima za cilj zaustavljanje karijesnog procesa, očuvanje vitaliteta pulpe i stimulisanje procesa remineralizacije i dentinogeneze. Metode indirektnog i direktnog prekrivanja pulpe se koriste u terapiji dubokih karijesnih lezija (Schwendicke i sar., 2013a).

Postoje dva pristupa indirektnog liječenja dubokog karijesa: jednoseansni i dvoseansni. Kod jednoseansne terapije poslije djelimičnog uklanjanja karijesa kavitet se adherento zatvara definitivnim ispunom u prvoj i jedinoj posjeti. Količina karijesnog tkiva koja se uklanja varira. Naime, u nekim istraživanjima kavitet se definitivno restauriše poslije uklanjanja samo podminirane gleđi bez uklanjanja karijesnog dentina (Mertz-Fairhurst i sar., 1998; Phonghanyudh i sar., 2012), a u drugim poslije uklanjanja gleđi i dijela karijesnog dentina, ostavljajući vlažne i mekane karijesne mase na dnu kaviteta (Lula i sar., 2009). U najvećem broju slučajeva, karijesno tkivo se uklanja u tom obimu da na dnu kaviteta ostane tanak sloj oboljelog tkiva „kožaste“ konzistencije (Casagrande i sar., 2010; Gruythuysen i sar., 2010; Franzon i sar., 2014). Dno kaviteta se zatim prekriva zaštitnom podlogom na bazi kalcijum hidroksida koja ispoljava antibakterijski efekat, stimulira dentinogenezu i remineralizaciju demineralizovanog dentina i kavitet se trajno restauriše. Dvoseansnu terapiju duboke karijesne lezije karakteriše uklanjanje najvećeg dijela karijesom izmijenjenog tkiva, i postavljanje zaštitne podloge prije privremenog zatvaranja kaviteta. U drugoj posjeti, poslije određenog perioda, uklanja se karijesno tkivo u cjelosti, dno kaviteta se prekriva zaštitnom podlogom (kalcijum hidroksid) i kavitet se trajno restauriše. Brojna klinička, mikrobiološka, radiografska i laboratorijska ispitivanja su pokazala da karijesni dentin koji ostaje u kavitetu poslije zatvaranja prelazi u inaktivnu formu, na šta ukazuju klinički nalazi karijesnog dentina koji postaje tvrdi, suvlji i tamnije boje, sa smanjenim brojem bakterija i povećanom radiografskom gustinom (Lula i sar., 2009; Bjørndal i sar., 2010; Lula i sar., 2011; Maltz i sar., 2012b). Sa druge strane, smanjenje broja bakterija i zaustavljanje karijesnog procesa poslije nepotpunog uklanjanja karijesa i restauracije zuba nije zabilježeno u istraživanjima Weerheijm i sar. (1992) i Wicht i sar. (2004). Kada su poredili uspjeh liječenja dubokog karijesa u jednoj ili dvije posjete Orhan i sar. (2008) su našli da je poslije 12 mjeseci uspjeh liječenja približno isti (100% vs. 98%). Sa druge strane uspješan ishod liječenja dubokog karijesa u dvije posjete u trogodišnjem opservacionom periodu je bio znatno manji u odnosu na jednoseansnu terapiju u istraživanju Maltz i sar. (2012a)(91% vs. 61%). Manji uspjeh liječenja autori povezuju sa većim rizikom od ekspanzije pulpe tokom uklanjanja karijesa u drugoj posjeti (Maltz i sar., 2012a; Maltz i sar., 2013). Neki autori ukazuju da

su prednosti jednoseansne terapije u odnosu na dvoseansnu terapiju i ekonomska strana (Schwendicke i sar., 2013c) i manja neprijatnost samog postupka, jer se liječenje završava u istoj posjeti.

Direktno prekrivanje pulpe je terapijska procedura koje se sprovodi u onim slučajevima kada je uklanjanje karijesa dovelo do ekspanzije pulpne komore. Otvaranje pulpne komore se obično dešava kao posljedica uklanjanja karijesnih masa u cjelosti prije postavljanja definitivnog ispuna. Naime, istraživanja pokazuju da je kompletna ekskavacija karijesnog tkiva u jednoj posjeti u terapiji dubokog karijesa povezana sa većim rizikom za otvaranjem pulpne komore i pojavom postoperativnih simptoma u poređenju sa indirektnim jednoseansnim ili dvoseansnim prekrivanjem (Bjørndal i sar., 2010; Schwendicke i sar., 2013a; Schwendicke i sar., 2013b; Ricketts i sar., 2013; Franzon i sar., 2014). Uspješan ishod direktnog prekrivanja je mali u onim slučajevima kada je pulpa ekspanzirana prilikom uklanjanja karijesa (Al-Zayer i sar., 2003; Bjørndal i sar., 2010). Ovi nalazi kao i rezultati preglednih studija i meta analiza pokazuju da indirektna terapija dubokog karijesa ima kliničku prednost u poređenju sa kompletnom ekskavacijom karijesnog dentina (Ricketts i sar., 2006; Hayashi i sar., 2011; Schwendicke i sar., 2013a; Schwendicke i sar., 2013b; Ricketts i sar., 2013).

Poznato je da se kompletnom ekskavacijom karijesnog tkiva ne uklanjaju sve bakterije iz kaviteta (Maltz i sar., 2012b). Problem perzistencije bakterija još je veći kod manje invazivnih terapijskih procedura, koje imaju za cilj maksimalno čuvanje zubne supstance (Maltz i sar., 2002; Maltz i sar., 2012b). Bakterije koje ostaju poslije ekskavacije karijesa i restauracije kaviteta mogu da perzistiraju i prolifериšu u godinu dana poslije postavljanja ispuna i dovedu do sekundarnog karijesa i oštećenja pulpe (Gu i sar., 2010). Važno je istaći da ni jedan od dostupnih restaurativnih materijala ne obezbjeđuje adekvatno zaptivanje kaviteta u dužem vremenskom periodu. Uzimajući ove činjenice u obzir, preporučena je primjena antibakterijskih supstanci poslije završene preparacije kaviteta a prije postavljanja zaštitnih podloga i definitivnog ispuna (Wicht i sar., 2004; Pappas i sar., 2005; Polydorou i sar., 2006; Al-Omari i sar., 2006; Müller i sar., 2007; Gu i sar., 2010; Hosoya i sar., 2010; Shafiei i Memarpour, 2012).

1.4. EFIKASNOST ODONTOANTISEPTIKA U RESTAURATIVNOJ TERAPIJI

Idealan odontoantiseptik u restaurativnoj terapiji bi trebao da, poslije primjene u kavitetu, eliminiše preostale bakterije, spriječi nastanak sekundarnog karijesa i inflamacije pulpe i da smanji postoperativnu osjetljivost zuba bez štetnih uticaja na pulpo-dentinski kompleks i kvalitet adhezije restaurativnih materijala za zubna tkiva.

Odontoantiseptici koji se koriste u restaurativnoj terapiji su hlorheksidin, etilendiaminotetraacetatna kiselina, natrijum hipohlorit i vodonik peroksid (Shafiei i Memarpour, 2012).

1.4.1. Hlorheksidin

Hlorheksidin, hlorfenil bisgvanid, ispoljava širok spektar djelovanja na Gram pozitivne i na Gram negativne bakterije, gljivice, dermatofite i neke lipofilne viruse (Jones, 1997). Hlorheksidin smanjuje ukupan broj kariogenih bakterija, kao i *Streptococcus spp.* i *Lactobacillus spp.* i *Actinomyces naeslundii* (Wicht i sar.,

2004, Borges i sar., 2012; Kollmuss i sar., 2014). Zbog izraženog efekta na bakterije, hlorheksidin u kavitetima smanjuje učestalost karijes recidiva i postoperativnu osjetljivost (Siso i sar., 2009). Gram pozitivne bakterije, kao što su *S. mutans* i *S. sorbinus*, koje se povezuju sa nastankom karijesa, su osjetljivije na djelovanje hlorheksidina od Gram negativnih bakterija (Emilson, 1977). Po nekim autorima osjetljivost *Streptococcus spp.* je izraženija u poređenju sa *Lactobacillus spp.* (van Lunsen i sar., 2000; Botelho, 2000; Ersin i sar., 2006), dok pojedini nalaze da je hlorheksidin podjednako efikasan protiv oba roda bakterija (Borges i sar., 2012). Istraživanja pokazuju da hlorheksidin smanjuje broj *S. mutans in vitro* (Järvinen i sar., 1993; Turkun i sar., 2006; Kollmuss i sar., 2014) i u kliničkim uslovima u okluzalnim fisurama, na površini korijena zuba i u karijesnim kavitetima (Fure i Emilson, 1990; Schaeken i sar., 1991; Ersin i sar., 2006). Hlorheksidin sa pozitivno naelektrisanim azotnim atomima na obje strane heksametilenskog lanca vezuje se za negativno naelektrisane proteine i fosfolipide ćelijske membrane bakterija, čime povećava permeabilnost membrane i uzrokuje izlazak intracelularnih komponenti iz ćelije. U većim koncentracijama ispoljava baktericidno djelovanje koje je posljedica koagulacije citoplazme. Pozitivno naelektrisana molekula hlorheksidina se sa visokim afinitetom vezuje i za druge negativno naelektrisane površine u usnoj duplji, kao što su gleđ, dentin i oralna mukoza što znatno doprinosi njegovoj adsorptivnosti i produženom antibakterijskom djelovanju.

Pored antibakterijskog djelovanja, hlorheksidin u kavitetima inhibira metaloproteinaze (MMP), MMP-2, MMP-8 i MMP-9 što sprječava degradaciju kolagena u hibridnom sloju *in vivo* i *in vitro* (Ricci i sar., 2010; Lindblad i sar., 2012). Takođe, kada se primjeni u obliku vodenog rastvora, hlorheksidin može da rehidrira suv mineralizovani dentin održavajući eksponiranu mrežu kolagena (Soares i sar., 2008). Naime, kolagen predstavlja neophodnu komponentu za vezivanje kompozitnih materijala za dentin. Istraživanja pokazuju da hlorheksidin, bilo da se primjeni prije ili poslije kiselinskog nagrizanja dentina, nema uticaj na kvalitet veze adhezivnih sistema za dentin i kvalitet zaptivanja (Chang i Shin, 2010; Celik i sar., 2010). Međutim, u određenim situacijama, hlorheksidin može da smanji jačinu veze materijala za dentin i poveća mirkocurenje (Pappas i sar., 2005; Saber i El-Askary, 2009; Siso i sar., 2009; Ercan i sar., 2009). Meiers i Kresin (1996) su pokazali da hlorheksidin stvara sloj koji je otporan na kiselinsko nagrizanje što može da smanji penetraciju hidrofilne smole u dentin. Takođe, hlorheksidin koji zaostaje u kavitetu poslije primjene može da interreaguje sa kalcijumovim i fosfatnim jonima i tako smanji jačinu veze (Vieira i da Silva, 2003). Hlorheksidin ne utiče na tvrdoću dentina (Aslantas i sar., 2014), osim u slučajevima produženog djelovanja (Oliveira i sar., 2007). Dugotrajna primjena hlorheksidina može biti povezana i sa nekim drugim neželjenim efektima kao što su: prebojavanje zuba, poremećaj ukusa, stvaranje supragingivalnih konkremenata, u rjeđim slučajevima erozije sluznice, usporeno zarastanje rana i vrlo rijetko uvećanje parotidne pljuvačne žlijezde (Dumitrescu, 2011). Ovi neželjeni efekti nisu izraženi kada se koristi u toku restaurativnog zahvata za dezinfekciju kaviteta, zbog kratkotrajnog djelovanja.

Hlorheksidin ima malu toksičnost koja nije ćelijski specifična (Giannelli i sar., 2008; Bernardi i Teixeira, 2015). Zabilježena je njegova citotoksičnost na humane gingivalne fibroblaste, ćelije oralnog epitela, ćelije periodontalnog ligamenta, ćelije alveolarne kosti i osteoblastne ćelije (Mariotti i Rumpf 1999; Huth i sar., 2006; Almazin i sar., 2009; Lee i sar., 2010). Smatra se da je ovaj efekat zavisao od primjenjene doze i vremena djelovanja (Gomes i sar., 2013; Bernardi i Teixeira, 2015). Citotoksičan efekat hlorheksidina zavisao od primjenjene koncentracije (0,0024%, 0,004% i 0,02%) na ćelije koje liče na odontoblaste

pokazan je i u studiji de Souza i sar. (2007). Oblik primjenjenog lijeka i sastav medijuma na koji hlorheksidin djeluje takođe determinišu citotoksično djelovanje (Babich i sar., 1995; Gomes i sar., 2013; Bernardi i Teixeira, 2015).

1.4.2. Etilendiaminotetraacetatna kiselina

Etilendiaminotetraacetatna kiselina (EDTA) ima slab antibakterijski efekat. Može da smanji broj crno obojenih Gram negativnih anaerobnih bakterija i nekih fakultativnih anaerobnih bakterija, bez uticaja na Gram pozitivne bakterije (Siqueira i sar., 1998; Grawehr i sar., 2003). Zabilježen je i antifugalni efekat ovog sredstva (Ballal i sar., 2011). EDTA predstavlja helator kalcijumovih jona, ali i jona magnezijuma, mangana i cinka, koji su važni u morfogenezi, adherenciji i rastu gljivica (Ates i sar., 2005; Ballal i sar., 2011). Pojedini autori smatraju da smanjenje broja bakterija poslije primjene EDTA nastaje zbog njegovog efekta na razmazni sloj prije nego antiseptičkog djelovanja (Di Lenarda i sar., 2000). Zbog izraženog helatnog djelovanja, odnosno oslobađanja kalcijumovih jona i dekalifikacije dentinskog tkiva, kao i rastvaranja organskih komponenti dentina (Beltz i sar., 2003; Nishitani i sar., 2005) EDTA se koristi za uklanjanje razmaznog sloja u restaurativnoj terapiji.

EDTA smanjuje mikrotvrdoću dentina (Eldeniz i sar., 2005; Aslantas i sar., 2014). Nygaard-Ostby (1957) je ispitivao uticaj 15% EDTA na humanu pulpu i periapeksno tkivo zuba sa vitalnom i nekrotičnom pulpom. Rezultati tog istraživanja pokazali su da EDTA ne dovodi do oštećenja periapexnog tkiva 14 mjeseci poslije iniciranja u periapeksno tkivo, kao i da njegova primjena u trajanju od 28 dana ne dovodi do nekroze pulpe poslije pulpotomije. U komercijalnim preparatima za dezinfekciju kaviteta u kombinaciji sa kvaternim jedinjenjima amonijaka (Tubilicid), EDTA eliminiše bakterije iz kaviteta prije postavljanja ispuna bez štetnog djelovanja na pulpu (Brannstrom i Nyborg, 1973). Druga istraživanja ukazuju na njen izražen citotoksični efekat. Zabilježen je citotoksični efekat EDTA na fibroblaste i makrofage koji je doznno zavisao (Sousa i sar., 2005; Amaral i sar., 2007; Ballal i sar., 2009). Kada se primjeni u tkivo dovodi do izražene iritacije, koja može biti prisutna i 28 dana poslije primjene (Segura i sar., 1996, Segura i sar., 1997; Zaccaro Scelza i sar., 2010).

1.4.3. Natrijum hipohlorit

Natrijum hipohlorit (NaOCl) ispoljava širok spektar nespecifičnog djelovanja na bakterije, spore i viruse (McDonnell i Russell, 1999). Istraživanja pokazuju da ovaj antiseptik djeluje na kariogene bakterije: *S. mutans*, *S. sorbinus* i *Lactobacillus acidophilus* (Ergücü i sar., 2005). Antibakterijski efekat se pripisuje oslobađanju hidroksilnih jona i hlora, koji dovode do ireverzibilne oksidacije sulfhidrilnih grupa esencijalnih bakterijskih enzima.

Pored antiseptičkog dejstva, natrijum hipohlorit takođe rastvara organsko i nekrotično tkivo jer transformiše masne kiseline i masti u soli (sapun) i glicerol (alkohol). Može da se primjeni i kao hemostatik kod direktnog prekrivanja pulpe i vitalne amputacije (Hafez i sar., 2002). Natrijum hipohlorit rastvara kolagen, magnezijumove i fosfatne jone iz dentina dok povećava nivo karbonata i negativno utiče na

mehaničke karakteristike dentina: tvrdoću, modul elastičnosti i otpornost na savijanje (Pascon i sar., 2009; Aslantas i sar., 2014). Zbog djelovanja na organske komponente dentina, može da remeti stvaranje hibridnog sloja u kavitetima i negativno utiče na kvalitet veze adhezivnih sistema za dentin i smanji marginalno zaptivanje kompozitnih restauracija (Erdemir i sar., 2004; Pappas i sar., 2005; Saber i El-Askary, 2009; Ercan i sar., 2009), ali taj efekat zavisi od vrste primjenjenog adheziva (Shinohara i sar., 2004; Shafiei i Memarpour, 2012). Prisustvo radikala porjeklom iz proteina hloramina natrijum hipohlorita može da dovede do preranog završetka polimernog lanca i nepotpune polimerizacije kompozitnih smola (Lai i sar., 2001). Neželjena svojstva natrijum hipohlorita su i neprijatan miris i ukus i izražena toksičnost na oralna tkiva, gingivalne fibroblaste i oralne epitelne ćelije (Barnhart i sar., 2005; Huth i sar., 2006). Smanjenjem koncentracije i dužine djelovanja smanjuje mu se toksičnost, ali i antibakterijski efekat i efekat rastvaranja tkiva (Mohammadi, 2008; Alkahtani i sar., 2014).

1.4.4. Vodonik peroksid

Vodonik peroksid djeluje na veliki broj mikroorganizama: bakterije, gljivice, viruse i spore (McDonnell i Russell, 1999). Bakterije koje ne pokazuju katalaznu aktivnost, kao što su *Streptococcus spp.* i *Lactobacillus spp.*, posebno su osjetljive na djelovanje ovog antiseptika (Turkun i sar., 2006; Ikai i sar., 2010). Antibakterijski efekat se zasniva na djelovanju hidroksilnih radikala koji, kao jaki oksidansi, lako reaguju sa makromolekulima kao što su DNK i lipidi u membrani ćelija i dovode do smrti ćelije.

Pored antiseptičkog, vodonik peroksid ima i dezodorantno dejstvo, jer uklanja i oksidiše organske materije neprijatnog mirisa, hemostatičko djelovanje, jer taloži fibrinogen, a zbog naglog oslobađanja kiseonika i stvaranja obilne pjene mehanički uklanja ostatke tkiva. Sposobnost vodonik peroksida da oksidiše organske komponente zubnih tkiva, koristi se za bijeljenje zuba. To djelovanje nije povezano sa promjenama u proteinskom i mineralnom sastavu gleđi i dentina (Eimar i sar., 2012) iako su nalazi o uticaju sredstava za bijeljenje zuba na mehaničke karakteristike zubnih tkiva često različiti i kontradiktorni (Ittaturut i sar., 2014). Kiseonik oslobođen iz vodonik peroksida inhibira polimerizaciju adhezivnih sistema (Nikaido i Nakabayashi, 1988; Torneck i sar., 1990; Cadenaro i sar., 2006), i negativno utiče na kvalitet veze ovih sistema za dentin (Erdemir i sar., 2004; Ercan i sar., 2009) kao i na fizičke karakteristike kompozitnih materijala (Gurgan i Yalcin Cakir, 2008). Neželjeni efekti koji mogu da se jave usljed primjene vodonik peroksida su ulceracije mukoze (Rees i Orth, 1986) i patološke promjene vezane za pre-neoplastične lezije (Weitzman i sar., 1986). Vodonik peroksid ispoljava citotoksičan efekat na gingivalne fibroblaste i oralne epitelne ćelije (Huth i sar., 2006). Zbog male molekulske mase, vodonik peroksid i njegovi produkti mogu lako da difunduju kroz zubna tkiva i uzrokuju oksidativni stres u pulpnim ćelijama i ćelijsku smrt (Soares i sar., 2014a; Soares i sar., 2014b). Taj efekat je dozno i vremenski zavisn.

1.4.5. Druga sredstva sa antiseptičkim djelovanjem

Zanimljivo je istaći da u savremenoj restaurativnoj stomatologiji postoji tendencija da se u sastav kompozitnih smola i glas jonomer cemenata dodaju različite supstance sa antibakterijskim djelovanjem.

Iako mogu djelovati na bakterije u karijesnim kavitetima, ove supstance istovremeno utiču i na mehaničke karakteristike i vezivanje materijala za zubna tkiva (Imazato, 2003; Li i sar., 2009). Problemi vezani za ove materijale su kontrola kinetike oslobađanja antimikrobne supstance i obezbjeđivanje protraživanog antibakterijskog efekta (Imazato, 2003; Li i sar., 2009).

Interesantan je podatak da su sintetisani monomeri koji omogućavaju dugotrajan antibakterijski efekat adheziva i kompozitnih materijala i poslije njihovog postavljanja u kavitet, bez oslobađanja aktivnih supstanci. Ispoljavaju kontaktni inhibitorni efekat na bakterije izolovane iz karijesnih lezija krunice i korijena (Imazato i sar., 2001; Imazato, 2003; Korkmaz i sar., 2008), a poslije polimerizacije inhibiraju adherenciju i rast bakterija na svojoj površini. Dodavanje ovih monomera ne remeti vezivanje materijala za zubna tkiva, ne utiče na kvalitet polimerizacije, marginalnu adaptaciju i citotoksičnost materijala nosača antibakterijske supstance (Bortolotto i sar., 2007; Imazato i sar., 2007).

Postoje podaci da se dezinfekcija kaviteta može postići i primjenom lasera (Klinke i sar., 1997). Energija lasera može da se koristi samostalno (Walsh i sar., 2003; Xia i sar., 2012) ili mogu da se kombinuju sa fotosenzitivnim supstancama za eliminaciju bakterija u karijesnim lezijama (Walsh i sar., 2003; Lima i sar., 2009). Tretiranje kaviteta laserom ne utiče na vezivanje adheziva za zubna tkiva, ali je sam postupak primjene kompleksan i ekonomski je zahtjevniji oblik terapije u poređenju sa drugim dostupnim metodama dezinfekcije (Siso i sar., 2009).

1.5. OZON KAO ODONTOANTISEPTIK

Ozon je našao široku primjenu u medicini gdje se koristi u terapiji očnih oboljenja, akutnih i hroničnih oboljenja izazvanih bakterijama, virusima i gljivicama, ishemičnih oboljenja, starenjem uzrokovane makularne degeneracije, oboljenja koštanog sistema, kožnih, plućnih, bubrežnih i neurodegenerativnih oboljenja i oboljenja hematopoeznog organa. Posljednjih godina ozon se kao antiseptik primjenjuje i u stomatologiji zbog izraženog djelovanja na bakterije, viruse, gljivice i protozoe, bez pojave antimikrobne rezistencije (Paraskeva i Graham, 2002).

U *in vitro* uslovima ozon primjenjen u obliku gasa efikasno djeluje na kariogene bakterije: *S. mutans*, *L. casei*, *Lactobacillus paracasei*, *A. neaslundii* (Polydorou i sar., 2006; Castillo i sar., 2008; Johansson i sar., 2009; Polydorou i sar., 2012; Kollmuss i sar., 2014). Takođe, ozon pokazuje efikasnost na bakterije koje se nalaze u primarnim karijesnim lezijama korijena zuba (Baysan i sar., 2000; Baysan i Lynch, 2004). Njegova efikasnost u kliničkim uslovima ispitivana je u malom broju studija, a dobijeni rezultati su oprečni. Pojedini autori nalaze da ovaj antiseptik dovodi do smanjenja broja kariogenih bakterija u karijesnim kavitetima (Bysan i Lynch, 2007; Dukić i sar., 2013) dok drugi nisu zabilježili njegov antibakterijski efekat (Hauser-Gerspach i sar., 2009).

Sa kliničkog aspekta značajni su radovi u kojima je ispitivan efekat ozona na kliničke parametre karijesa. Holmes i sar. (2003) su pokazali da je ozon, uz primjenu remineralizacionih sredstava (pasta, vodica za ispiranje i sprej) u opservacionom periodu od 18 mjeseci doveo do značajnog zaustavljanja karijesnih lezija

korijena. Slično, Baysan i Lynch (2007) su zapazili da oko 51% karijesnih lezija korijena očvršćava 6 mjeseci poslije terapije ozonom. U nekoliko studija je ispitivan efekat ozona na okluzalni karijes kod djece i adolescenata u opservacionom periodu od 3 mjeseca (Huth i sar., 2005), 6 mjeseci (Atabek i Oztas, 2011), 8 mjeseci (Dähnhardt i sar., 2006) i 12 mjeseci (Johansson i sar., 2014). Rezultati ukazuju da ozon dovodi do zaustavljanja karijesa i progresije oboljenja, ali ne u svim slučajevima (Johansson i sar., 2014). Uočeno je da kod početnih aproksimalnih karijesnih lezija, 18 mjeseci poslije primjene gasnog ozona, dolazi do uklanjanja bakterija iz spoljašnjih djelova lezije i zaustavljanja demineralizacije, ali bez njegovog uticaja na dublje slojeve (Yazıcıoğlu i Ulukapi, 2014).

Po nekim autorima antimikrobno djelovanje ozon ostvaruje na dva načina: direktnim djelovanjem molekularnog ozona ili preko reaktivnih produkata koji nastaju njegovim razlaganjem, kao što su hidroksilni anjon ($\text{OH}^\cdot$), superoksidni anjon ($\text{O}_2^\cdot$), perhidroksiradikal ($\text{HO}_2^\cdot$) (Khadre i sar., 2001). Nespecifičnim mehanizmom ozon oštećuje ćelijski zid i citoplazmatsku membranu bakterijskih ćelija. Naime, oksidacijom glikoproteina, glikolipida i drugih aminokiselina inhibira i blokira enzimsku kontrolu ćelije i dovodi do povećanja ćelijske permeabilnosti i smrti ćelije. Takođe, ozon može da reaguje sa brojnim biomolekulima koje sadrže cistein, metionin i histidin. Ćelijska smrt usljed dejstva ozona može da nastane i zbog oštećenja enzima i nukleinskih kiselina u citoplazmi mikrobne ćelije (Khadre i sar., 2001; Azarpazhooh i Limeback, 2008).

Antibakterijski efekat ozona zavisi od nekoliko faktora: primjenjene doze, dužine primjene, prisustva organskog sadržaja, bakterijske vrste na koje djeluje, temperature sredine i pH. Još uvijek ne postoje standardizovani protokoli primjene ozona u restaurativnoj proceduri u pogledu dužine primjene i potrebne doze. Istraživanja pokazuju da se sa povećanjem dužine primjene povećava i efikasnost, a da doze ozona na mjestu aplikacije variraju od primjenjenog generatora ozona. U *in vitro* studiji Castillo i sar. (2008) su pokazali da poslije primjene ozona u trajanju od 10, 20 i 40 sekundi na *S. mutans* izolovan iz karijesnih lezija djece sa visokim rizikom za nastanak karijesa, ozon značajno redukuje ove bakterije poslije 10 i 20 sekundi, a potpuno uništava poslije 40 sekundi. Tuncer i sar. (2013) i Kollmuss i sar. (2014) nalaze da se sa povećanjem doze i dužine djelovanja povećava antiseptički efekat ozona na oralne bakterije. Prisustvo organskog sadržaja smanjuje ozonsku efikasnost. Pljuvačka i dentalni plak, kao organski supstrati, u kliničkim uslovima reaguju sa ozonom smanjujući količinu dostupnog ozona za interakciju sa bakterijama. Takođe, bakterije organizovane u biofilmove imaju manju metaboličku aktivnost i otpornije su na djelovanje antiseptika od bakterija koje se nalaze u planktonskom obliku, a polimerni matriks biofilma sprječava difuziju antibakterijskih supstanci (Lima i sar., 2009). Johansson i sar. (2009) su u *in vitro* studiji pokazali da pljuvačka smanjuje efikasnost ozona na kariogene bakterije i da se inhibitroni efekat pljuvačke gubi sa produžavanjem djelovanja. Müller i sar. (2007) su u svojoj *in vitro* studiji pokazali na ograničen antiseptički efekat ozona na različite bakterijske vrste organizovane u kariogene biofilmove, dok, sa druge strane, Nagayoshi i sar. (2004) nalaze izraženi antibakterijski efekat ozonirane vode na bakterije u eksperimentalnom i humanom dentalnom plaku. U pogledu osjetljivosti pojedinih vrsta mikroorganizama na ozon postoji veoma malo slaganja među istraživačima. Takođe, osjetljivost pojedinih vrsta se razlikuje između studija. Vrsta, starost bakterijske kulture, broj bakterija, način primjene ozona, način mjerenja efekta neki su od faktora koji otežavaju komparaciju između studija. Uočeno je da su na djelovanje ozona manje osjetljive Gram pozitivne bakterije u odnosu na Gram negativne, kao i aerobne u

poređenju sa anaerobnim bakterijama. Jedan od razloga manje osjetljivost Gram pozitivnih bakterija u poređenju sa Gram negativnim je veća koncentracija peptidoglikana u ćelijskom omotaču koji je relativno rezistentan na djelovanje ozona. Ozon efikasnije djeluje na obligatne anaerobne bakterije, zbog njihove intolerancije na prisustvo kiseonika. Sa druge strane, on može predstavljati donator kiseonika za aerobne i fakultativno aerobne bakterije koje ga koriste za rast (Bezirtzoglou i sar., 2008) tako da je djelovanje ozona na ove vrste ograničeno, posebno kada se primjeni u nižim koncentracijama. Uticaj temperature na efikasnost ozona se ogleda u smanjenju rastvorljivosti i stabilnost, a povećanju reaktivnosti sa supstratom sa povećavanjem temperature. Na smanjenje stabilnosti ozona utiče i povećanje alkaliteta, iako se smatra da pH u opsegu od 5,7-10,1 nema uticaj na njegovo djelovanje (Khadre i sar., 2001).

Pored antimikrobnog, ozon ispoljava i druge značajne efekte na zubna tkiva. Interesantan je podatak da primjena ozona na nekarijesni dentin sprječava stvaranje biofilmova *S. mutans* i *L. acidophilus* na površini zuba u trajanju od četiri nedjelje (Knight i sar., 2008). Sličan efekat ozona na sprječavanje stvaranja dentalnog plaka zabilježili su Nagayoshi i sar. (2004) primjenom ozonirane vode na površini dekalcifikovanih zuba. Postoje podaci koji ukazuju da oksidativnim djelovanjem ozon može da stimuliše remineralizaciju demineralizovanog dentina (Baysan i Lynch, 2004). Djelovanjem na bakterije koje se nalaze u karijesnoj leziji ozon dovodi do promjene sredine iz acidogene u onu koja pospješuje procese remineralizacije. Takođe, pirogroždanu kiselinu, jednu od najjačih prirodnih kiselina koju stvaraju bakterije, ozon dekarboksiluje u acetatnu kiselinu i ugljen dioksid. Stvaranje ove i drugih kiselina sa visokim pKa u plaku može da utiče na neutralizaciju plaka i procese remineralizacije početnih karijesnih lezija. Ozon reaguje i sa organskim materijama u karijesnim lezijama čime omogućava penetraciju kalcijumovih i fosfatnih jona kroz leziju, što pospješuje remineralizaciju (Tahmassebi i sar., 2014). Ipak, *in vitro* studije pokazuju da kada se primjeni samostalno, ozon ne sprječava demineralizaciju niti pospješuje remineralizaciju dentina (Zaura i sar., 2007; Tahmassebi i sar., 2014), ali i ne potencira procese demineralizacije sveže remineralizovanih dentinskih lezija, kao što je to zabilježeno za natrijum hipohlorit (Zaura i sar., 2007). U kombinaciji sa supstancama koje stimulišu remineralizaciju, ozon ne ispoljava značajan efekat na smanjenje demineralizacije tvrdih zubnih tkiva *in situ* (Duggal i sar., 2012). Ipak, treba uzeti u obzir ograničenja *in vitro* istraživanja i odsustvo reakcije vitalne komponente pulpo-dentinskog kompleksa na djelovanje ozona, uzimajući u obzir ulogu pulpe u procesima remineralizacije i dentinogeneze. Za razliku od drugih oksidativnih supstanci, ozon ne remeti vezivanje adhezivnih sistema za zubna tkiva, čak i povećava jačinu veze, i smanjuje mikrocurenje (Schmidlin i sar., 2005; Cadenaro i sar., 2009; Magni i sar., 2011; Kapdan i Oztas i sar., 2015). Takođe, ozon ne utiče na mikromehaničke karakteristike gleđi (Celiberti i sar., 2006), dentina (Magni i sar., 2010) i kompozitnih materijala (Magni i sar., 2011).

Interesantno je pomenuti da ozon ispoljava i druge farmakodinamske efekte na tkiva. Naime, poboljšava protok krvi i dopremanje kiseonika u tkiva, što dovodi do aktiviranja ćelijskih aerobnih procesa i metabolizma u tkivima. Ozon povećava sintezu antioksidativnih enzima i umjereno aktivira imuni sistem i stimuliše oslobađanje faktora rasta, NO sintaze i aktivira stem ćelije (Bocci, 2005; Sagai i Bocci, 2011; Gupta i Mansi, 2012)

1.6. PRINCIPI ISPITIVANJA BEZBJEDNOSTI ODONTOANTISEPTIKA

Odontoantiseptici su sredstva koja se primjenjuju lokalno za dezinfekciju kaviteta zuba poslije preparacije kaviteta (sredstva za ispiranje kaviteta) ili za ispiranje i dezinfekciju kanala korijena zuba poslije endodontskog liječenja (intrakanalni irigansi i medikamenti).

Za odontoantiseptike, kao i druge stomatološke materijale koji se takođe primjenjuju lokalno na oralna tkiva, od značaja je njihov farmakodinamski efekat, kao i njihov bezbjednosni profil tj. potencijalni rizik da oštete zubna ili oralna tkiva sa kojima dolaze u kontakt. Dva važna fenomena citotoksičnost i biokompatibilnost određuju bezbjednosni profil dentalnih materijala (uključujući i odontoantiseptike) ili šire stomatoloških materijala. Citotoksičnost predstavlja molekularne promjene koje dovode do oštećenja ćelija (Aldridge, 1993). Biokompatibilnost predstavlja reakciju na primjenjeni materijal od strane tkiva ili cijelog organizma (van Loon i Mars, 1997). Preporučeni protokol Međunarodne organizacije za standardizaciju (ISO) za ispitivanje citotoksičnosti i biokompatibilnosti dentalnih materijala uključuje i njihovo poređenje sa pozitivnom i negativnom kontrolom (ISO 10993, 1992; ISO 7405, 1996). Pomenuti ISO protokol ima četiri faze: u prvoj fazi citotoksični efekti materijala se mjere u *in vitro* uslovima na jednoslojnim ćelijskim kulturama što omogućuje dobru reproduktivnost rezultata (Schmalz, 1988; Schmalz i sar., 1996). Materijali koji u ovim testovima pokazuju mali nivo citotoksičnosti se dalje implantiraju u male laboratorijske životinje, obično glodare, i porede sa kontrolama čime se dobijaju *in vivo* citotoksične i biokompatibilne karakteristike (ISO 10993, 1992; ISO 7405, 1996). Materijali koji pokazuju dobru komplijansu u ovim *in vivo* testovima postavljaju se u kavitete V klase zuba primata, ne računajući humani model, uz primjenu kontrole, uslovi koji imitiraju restaurativnu proceduru za ispitivanje biokompatibilnosti i citotoksičnosti (Cox i sar., 1987; Cox i sar., 1998). Poslije ovih testova zubi se ekstrahuju i histološki ispituju. Ukoliko zubna tkiva pokazuju nizak nivo ćelijskih oštećenja zajedno sa odsutnim ili minimalnim stepenom zapaljenja smatra se da je materijal prošao ISO zahtjeve i može se primjeniti u ispitivanjima na pacijentima (ISO 10993, 1992; ISO 7405, 1996). Razumije se da su rezultati o bezbjednosnom profilu dentalnog materijala dobijeni u kliničkim studijama najvalidniji. Ove kliničke studije mogu biti dizajnirane kao retrospektivne, studije presjeka, prospektivne uz randomizaciju, kao kontrolisana studija, po mogućnosti primjenom jednostruko ili dvostruko slijepe metode.

Iako je antimikrobni efekat ozona procjenjivan u brojnim istraživanjima, samo u nekoliko studija je ispitana biokompatibilnost ovog antiseptika sa oralnim tkivima. Tako na primjer, Huth i sar. (2006) su pokazali u *in vitro* studiji na kulturama humanih ćelija oralnog epitela i gingivalnih fibroblasta da ozon, primjenjen u obliku gasa, ispoljava citotoksičan efekat na ćelije, dok primjenjen kao ozonirana voda ispoljava optimalnu biokompatibilnost. U istoj studiji autori su uporedili biokompatibilnost ova dva oblika ozona sa najčešće primjenjivanim oralnim antisepticima: hlorheksidinom, natrijum hipohloritom i vodonik peroksidom. Ozonirana voda ne ispoljava toksičan efekat na humane ćelije oralnog epitela i gingivalne fibroblaste, dok je efekat gasnog ozona u rangui ili čak manji od onog koji je zabilježen za 2% hlorheksidin, 2,25% i 5,25% natrijum hipohlorit i 3% vodonik peroksid (Huth i sar., 2006). Druga studija je takođe pokazala biokompatibilnost ozonirane vode na kulture ćelija fibroblasta (Nagayoshi i sar., 2004) i odontoblasta (Noguchi i sar., 2009). Ozon primjenjen kao ozonirani medijum (ozonirana voda bez fetalnog seruma) u kulturi humanih oralnih epitelnih ćelija, gingivalnih fibroblasta i HeLa ćelija inhibira nuklearni

faktor kapa B (NF- κ B), oslobođen pod uticajem faktora nekroze tumora (Huth i sar., 2007). U istom istraživanju inhibitorni efekat ozoniranog medijuma na NF- κ B je zabilježen i u periodontalnom ligamentu parodontološki kompromitovanih zuba. Ovi rezultati ukazuju na antiinflamatorni i imunomodulatorni potencijal ozona (Huth i sar., 2007).

Ozon predstavlja jako oksidativno sredstvo i njegovo je razlaganje praćeno oslobađanjem vodonik peroksida i drugih reaktivnih vrsta kiseonika (engl. *Reactive oxygen species* (ROS)). ROS predstavljaju produkte metabolizma kiseonika u fiziološkim uslovima i imaju značajnu ulogu u signalnim ćelijskim procesima, proliferaciji ćelija i ćelijskom preživljavanju. Pretjerano stvaranje ROS dovodi do oštećenja ćelijskih struktura, stanja poznatog kao oksidativni stres koji se povezuje sa nastankom brojnih oboljenja (Valko i sar., 2007; Buczko i sar., 2015). Odbrambeni mehanizmi protiv oksidativnog stresa podrazumijevaju: preventivne i reparatorne mehanizme, fiziološku odbranu i antioksidativnu zaštitu (Valko i sar., 2007). Antioksidativnu zaštitu čine neenzimski antioksidansi, kao što su askorbinska kiselina, α -tokoferol, glutation, karetenoidi, flavonoidi, i enzimski antioksidansi, kao što su glutation peroksidaza (GPx), katalaza (CAT) i superoksid dismutaza (SOD) (Valko i sar., 2007). SOD je jedan od najvažnijih antioksidativnih enzima koji reaguje sa ROS, posebno sa superoksidnim anjonskim radikalom stvarajući vodonik peroksid i kiseonik (Davis i sar., 1991). Razlikuju se tri izoforme ovog enzima: citosolna Cu, Zn SOD, mitohondrijalna Mn-SOD i ekstraćelijska SOD. Ovaj oksidativni enzim je nađen u zdravom tkivu pulpe (Davis i sar., 1991; Bödör i sar., 2007). Prisustvo SOD u zubnoj pulpi ukazuje na njen biološki zaštitni mehanizam protiv ROS nastalih tokom inflamacionih promjena (Davis i sar., 1991; Bödör i sar., 2007). Varvara i sar. (2012) su uočili da preparacija kaviteta povećava nivo SOD. Do sličnih nalaza su došli i Baumgardner i sar. (1999) koji su još ukazali da je SOD rani i osjetljivi indikator inflamatornog stresa u pulpi. Povećanje nivoa SOD je zabilježeno i u tkivu ireverzibilno infamirane pulpe (Davis i sar., 1991; Bödör i sar., 2007). Takođe je uočeno da u toku inflamacije različite forme izoenzima SOD, Cu, Zn SOD i Mn-SOD pokazuju različitu ekspresiju, što možda predstavlja jedinstvenu karakteristiku inflamacione reakcije u pulpnom tkivu (Bödör i sar., 2007). Sa druge strane, Varvara i sar. (2005) ukazuju ne na povećanje već na smanjenje SOD u ireverzibilno inflamiranoj pulpi. Ovo smanjenje autori povezuju sa progresijom inflamacije u pulpi koja je dovela do trošenja i razgradnje SOD. Uzimajući u obzir da je SOD glavni enzimski odbrambeni mehanizam protiv toksičnih ROS koje nastaju tokom normalnog oksidativnog metabolizma i tokom inflamacije (Davis i sar., 1991; Varavara i sar., 2012) i na osnovu prikazanih istraživanja može se smatrati da je jedan od načina za mjerenje biokompatibilnosti odontoantiseptika, u odnosu na pulpno tkivo, ispitivanje njihovog uticaja na SOD u zubnoj pulpi.

Faktor rasta vaskularnog endotela (VEGF) ima značajnu ulogu u razvoju tkiva, ćelijskoj migraciji, inflamaciji i reparaciji (Mantellini i sar., 2006). VEGF potencira proces neovaskularizacije kako iz postojeće kapilarne mreže (angiogeneza), tako i *de novo* (vaskulogeneza) u fiziološkim i patološkim uslovima što čini da je ovaj faktor rasta kritična komponenta za rast i reparaciju tkiva i organa. Pored toga što djeluje na vaskularne endotelne ćelije, uočeno je da je VEGF multifunkcionalni signalni faktor koji ostvaruje brojne biološke efekte djelujući i na druge ćelije (Byrne i sar., 2005). Ćelije zubne pulpe ljudi spontano stvaraju VEGF (Artese i sar., 2002; Tran-Hung i sar., 2008), a u pulpi se nalaze receptori za VEGF, VEGF-R1, VEGF-R2 i VEGFR-3 (Matsushita i sar., 1999; Grando Mattuella i sar., 2007, Virtej i sar., 2013). Matsushita i sar. (2000) su pokazali da VEGF stimuliše proliferaciju pulpnih ćelija i povećava nivo alkalne fosfataze važne za

processe biomineralizacije. Ova i druga istraživanja ukazuju da VEGF, pored uloge u angiogenezi koja prethodi formiranju reparatornog dentina, ima direktan uticaj na diferencijaciju odontoblasta i njihovu aktivnost (Matsushita i sar., 2000; Scheven i sar., 2008). Povećan nivo VEGF u odontoblastima i fibroblastima je zabilježen kod zuba sa nezavršenim u odnosu na zube sa završenim rastom korijena, što ukazuje na ulogu VEGF u maturaciji zuba (Wang i sar., 2007). Različita patološka stanja mogu dovesti do promjena u nivou VEGF. Artese i sar. (2002) su ispitujući ireverzibilno promjenjene i zdrave pulpe uočili da je u pulpama sa ireverzibilnim zapaljenjem nivo VEGF povećan u ćelijama koje čine inflamacioni infiltrat, ali smanjen u stromalnim ćelijama pulpe. Bakterije i njihovi produkti, lipopolisaharid i lipoteihoična kiselina, indukuju povećanje VEGF u ćelijama zubne pulpe (Matsushita i sar., 1999; Soden i sar., 2009). Veći nivo VEGF u ćelijama pulpe je zabilježen poslije povrede (Tran-Hung i sar., 2008) i stanjima hipoksije (Aranha i sar., 2010), kao i u tkivu pulpe, odontoblastima i makrofagima poslije primjene 2-hidroksi-etil metakrilata (HEMA) (Mantellini i sar., 2006; Tran-Hung i sar., 2008). Uzimajući u obzir da VEGF daje značajne informacije o vitalnosti i funkcionalnosti ćelija (Paranjpe i sar., 2007) može se koristiti za određivanje biokompatibilnosti odontoantiseptika u odnosu na pulpno tkivo.



2.

RADNA HIPOTEZA

2. RADNA HIPOTEZA

Primjena ozona u trajanju od 40 sekundi na duboku karijesnu leziju značajno smanjuje ukupan broj bakterija i *Lactobacillus spp.* u karijesnim kavitetima. Istovremeno, ozon povećava nivo VEGF i SOD u zubnoj pulpi.



3.

CILJEVI ISTRAŽIVANJA

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Imajući u vidu činjenicu da se najveći broj do sada objavljenih studija o antibakterijskoj efikasnosti ozona na kariogene bakterije odnosi na rezultate dobijene u *in vitro* studijama i sa druge strane činjenicu da postoji mali broj radova koji se odnose na biokompatibilnost ozona na zubnu pulpu u *in vivo* uslovima postavljeni su sljedeći ciljevi:

1. Ispitati antibakterijski efekat primjene ozona i hlorheksidina, pojedinačno na ukupan broj bakterija i *Lactobacillus spp.* u karijesnim kavitetima poslije nepotpunog uklanjanja karijesa.
2. Ispitati antibakterijski efekat primjene ozona i hlorheksidina pojedinačno na pojedine vrste *Lactobacillus spp.* u karijesnim kavitetima poslije nepotpunog uklanjanja karijesa.
3. Uporediti antibakterijsku efikasnost ozona i hlorheksidina u karijesnim kavitetima poslije nepotpunog uklanjanja karijesa.
4. Odrediti koncentraciju VEGF i SOD u zubnoj pulpi poslije primjene ozona na otvorene dentinske kanaliće u ispreparisanim kavitetima intaktnih zuba koji su iz protetskih razloga indikovani za devitalizaciju ili iz ortodontskih razloga za ekstrakciju i uporediti sa koncentracijom VEGF i SOD u zubnoj pulpi intaktnih zuba koji su iz protetskih razloga indikovani za devitalizaciju ili iz ortodontskih razloga za ekstrakciju.

A close-up photograph of a dental procedure. A dental professional is using a high-speed handpiece to work on a patient's tooth. The tooth is partially covered with a clear, protective plastic shield. The handpiece is positioned against the tooth, and a small amount of water is being sprayed from the side. The background is a plain, light-colored surface.

4.

MATERIJAL I METODE

4. MATERIJAL I METODE

4.1. DIZAJN STUDIJE

Ispitivanje predstavlja interventnu randomizovanu kontrolisanu kliničku studiju. Istraživanje je sprovedeno u periodu od januara 2013. do septembra 2014. godine. Sve osobe koje su uključene u istraživanje pismeno su upoznate sa ciljevima i očekivanim ishodima istraživanja, procedurom uzimanja uzorka i potpisale su pristanak za učešće. Sa svim ispitanicima postupalo se po principima dobre kliničke prakse. Etički komitet Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu, Republika Srpska, dao je saglasnost za sprovođenje ovog istraživanja.

4.2. ISPITANICI

U studiji su ispitanici podijeljeni u dvije grupe: studija I: ispitivanje antibakterijskog efekta ozona u karijesnim kavitetima zuba i studija II: ispitivanje biokompatibilnosti ozona u odnosu na zubnu pulpu.

4.2.1. Studija I: antibakterijski efekat ozona u karijesnim kavitetima zuba.

Ispitivanjem su obuhvaćene osobe starije od 18 godina koje su se javile na Katedru za dentalnu patologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu, Republika Srpska, radi sanacije karijesa. Kriterijumi za uključivanje u studiju su bili: postojanje najmanje jedne duboke karijesne lezije na okluzalnoj ili okluzalnoj i aproksimalnoj površini bočnih zuba koja je zahvatila više od polovine debljine dentina, procjenjeno na osnovu retroalveolarnog radiograma; odsustvo kliničkih znakova i simptoma ireverzibilnog oštećenja pulpe, kao što su spontani bolovi ili perzistencija bola poslije djelovanja podražaja; pozitivan test vitaliteta na hladni (Endo-Frost-50C; Coltene/Whaledent, Altstätten, Switzerland) i električni (Analytical Technologies, Redmond, WA) nadražaj, odsustvo apscesa i otoka u parodonticijumu i parodontalnih džepova dubine >4mm; odsustvo radioloških znakova oboljenja apeksnog i lateralnog parodonticijuma, odsustvo radioloških znakova interne i eksterne resorpcije i/ili kalcifikacija u zubnoj pulpi. Osobe sa sistemskim oboljenjima, žene u toku trudnoće i osobe koje su uzimale antibiotsku terapiju najmanje mjesec dana prije uzimanja uzorka nisu uključene u istraživanje. Od svakog ispitanika u istraživanje je uključen samo jedan zub.

4.2.2. Studija II: biokompatibilnost ozona u odnosu na zubnu pulpu.

Ispitivanjem su obuhvaćene osobe starije od 18 godina koje su se javile na Katedru za oralnu rehabilitaciju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Istočnom Sarajevu, Republika Srpska, radi ekstrakcije donjih molara iz ortodontskih razloga ili devitalizacije ovih zuba iz protetskih razloga. U istraživanje su uključeni intaktni

zubi bez kliničkih znakova i simptoma ireverzibilnog oštećenja pulpe koji su reagovali na hladni (Endo-Frost-50C; Coltene/Whaledent, Altstätten, Switzerland) i električni (Analytical Technologies, Redmond, WA) nadražaj i kod kojih nisu zabilježeni apsces i otok u parodoncijumu i parodontalni džep dubine >4mm, kao i radiološki znaci oboljenja apeksnog i lateralnog parodoncijuma, internih i eksternih resorpcija i/ili kalcifikacija u zubnoj pulpi. Ispitanici koji su u anamnezi dali podatak o postojanju sistemskog oboljenja ili koji su uzimali antibiotsku ili antiinflamatornu terapiju najmanje mjesec dana prije uzimanja uzorka pulpe su isključeni iz istraživanja. Od svakog ispitanika u istraživanje je uključen samo jedan zub.

4.2.3. Veličina uzorka

Studija I- Veličina uzorka za ocjenu razlike u antibakterijskom efektu ozona i 2% hlorheksidina određena je na osnovu istraživanja Müller i sar. (2007). Pri statističkoj moći testa od 80% (greška II tipa) i nivoom značajnosti od 5% (greška I tipa) izračunata je veličina uzorka od 48 karijesnih lezija, po 24 u grupi (G*Power 3.1, Faul i sar., 2007).

Studija II- Uzimajući u obzir da nema dostupnih podataka o uticaju ozona na nivo VEGF u zubnoj pulpi, potreban broj uzoraka određen je na osnovu pilot istraživanja na 12 uzoraka. Na osnovu dobijenih srednjih vrijednosti i standardnih devijacija u grupi tretiranoj ozonom i kontrolnoj grupi, najmanje 19 zuba po grupi je bilo potrebno da bi se obezbjedila moć testa od 80% i nivo značajnosti od 5% (G*Power 3.1, Faul i sar., 2007).

4.2.4. Randomizacija

U studiji I i II tretmani su dodijeljeni izvlačenjem terapijskog protokola iz zapečaćene koverta od osobe koja nije bila uključena u istraživanje. Jedna osoba je sprovela sve terapijske procedure u studiji I i II u cilju standardizacije protokola i načina uzimanja uzoraka. Uzimajući u obzir izgled i karakteristike aparata za generisanje ozona, ispitanici su kao i osoba koja je sprovela klinički dio istraživanja bili upoznati sa vrstom tretmana. Da bi se smanjila pristrasnost, u studiji I randomizacija je izvršena neposredno poslije uzimanja prvog uzorka karijesnog dentina, odnosno poslije preparisanja kaviteta na okluzalnoj površini zuba u studiji II. Svi uzorci su bili kodirani brojevima, a osobe koje su sprovele analize uzoraka nisu bile upoznate kojoj terapijskoj grupi uzorak pripada.

4.3. KLINIČKA PROCEDURA I UZIMANJE UZORAKA

4.3.1. Studija I

Poslije primjene lokalnog anestetika (1,8ml, Scandonest 3%, Plain, Septodont, Paris, France) operativno područje je izolovano. Sterilnim rotirajućim okruglim dijamantskim instrumentom za visokoturažnu bušilicu uz vodeno hlađenje otvoren je kavitet i/ili uklonjena podminirana gleđ. Sterilnim rotirajućim okruglim karbidnim instrumentom za kolenjak uklonjen je karijesno promijenjeni dentin sa gleđno-dentinske granice i bočnih zidova kaviteta. Uklonjen je samo površinski dio karijesnog dentina. Klasifikacija

karijesnog dentina je izvršena na osnovu vlažnosti (suv, vlažan), boje (žuta, svijetlo smeđa i tamno smeđa) i konzistencije (tvrda-tvrdoća kao i zdrav dentin, srednje tvrda, („kožasta“ konzistencija)-može da se ukloni ekskavatorom uz primjenu većeg pritiska, i meka konzistencija-lako može da se ukloni ekskavatorom) (Maltz i sar., 2002; Gu i sar., 2010). Poslije ispiranja kaviteta sterilnom destilovanom vodom i posušivanja sterilnom vaticom, prvi uzorak dentina (S1) uzet je sa bukalne polovine karijesne lezije sterilnim karbidnim svrdlom za kolenjak veličine 3 (Kidd i sar., 1993), prethodno natopljenim u sterilni fiziološki rastvor. Da bi se obezbijedilo uzimanje približno istih količina karijesnog dentina sa mjesta uzorokovanja, prije početka istraživanja izvršena je kalibracija istraživača na 20 zuba sa dubokim karijesom, koji nisu uključeni u istraživanje. Težina uzoraka karijesnog dentina kretala se od 0,9 do 1,5 mg, a dobijena je kao razlika težine svrdla sa uzorkom i težine samog svrdla (Adventure TM, OHAUS, Corp., Pine Brook, NY, USA). Uzorak dentina je prenesen u Ependorf posudu (2ml) u kojoj se nalazio 1ml tioglikolata i u roku od pola sata transportovan u mikrobiološku laboratoriju radi daljih analiza. U prvoj, eksperimentalnoj grupi primjenjen je ozon (OZ-grupa) (ElectroMagneTron[®], Biozon Mylius Company, München, Germany) pomoću CA sonde sa silikonskom kapicom na vrhu, u cilju obezbjeđivanja što intimnijeg kontakta sonde sa tretiranom površinom. Kavitet je tretiran ozonom u trajanju od 40 sekundi i pri intenzitetu 5 (jako visoki intenzitet, intenzitet 0-5), prema preporuci proizvođača za dezinfekciju kaviteta. Potom je uzet drugi uzorak dentina (S2) na isti način kao prvi, samo sa oralne polovine lezije. Ovim postupkom omogućeno je da oba uzorka dentina budu uzeta sa iste dubine kaviteta (Massara i sar., 2002). U drugoj, komparativnoj grupi, prema uputstvu proizvođača manja količina 2% hlorheksidina (HH-grupa) (Consepsis, Ultradent, South Jordan, Utah, USA) četkicom je primjenjena u kavitet u trajanju od 60 sekundi. Poslije posušivanja kaviteta, drugi uzorak dentina je uzet na isti način kao u grupi tretiranoj ozonom. Po uzimanju uzoraka, karijesno promijenjeno tkivo je u potpunosti uklonjeno, zubi su zaštićeni subpodlogom na bazi kalcijum hidroksida i restaurisani direktnim restaurativnim ispunima. Ni jedan od primjenjenih antiseptika nije inaktivisan prije uzimanja drugog uzorka dentina.

4.3.2. Studija II

Za lokalnu anesteziju je upotrebljen 1,8 ml 3% mepivakain (Scandonest 3%, Plain, Septodont, Paris, France), anestetik bez adrenalina, da bi se održao nivo intrapulpne cirkulacije. Poslije primjene lokalnog anestetika, operativno područje je izolovano i očišćeno 2% hlorheksidinom. Na okluzalnoj površini zuba visokoturažnom bušilicom uz vodeno hlađenje formiran je kavitet u dentinu sterilnim rotirajućim okruglim i fisurnim dijamantskim instrumentima odgovarajuće veličine. Rotirajući instrumenti su mijenjani poslije svake četvrte preparacije, da bi se spriječilo zagrijavanje zubne pulpe. Širina preparisanog kaviteta je bila 4mm, a dubina kaviteta 2/3 debljine dentina, određena na osnovu preoperativnog retroalveolarnog radiograma i prenesena u kavitet pomoću endodontskog instrumenta sa graničnikom. U grupi tretiranoj ozonom (ElectroMagneTron[®], Biozon Mylius Company, München, Germany) kavitet je izložen djelovanju gasnog ozona u trajanju od 40 sekundi pri intenzitetu 5 (jako visoki intenzitet, intenzitet 0-5), prema preporuci proizvođača za dezinfekciju kaviteta, uz korišćenje CA sonde sa silikonskom kapicom na vrhu (u cilju obezbjeđivanja što intimnijeg kontakta sonde sa kavitetom). U kontrolnoj grupi u kavitet je postavljena sterilna vatica natopljena fiziološkim rastvorom. Trepanacija pulpne komore u obje grupe je urađena sterilnim okruglim i fisurnim dijamantskim rotirajućim instrumentima za visokoturažnu bušilicu

uz vođeno hlađenje. Poslije pažljivog uklanjanja krova komore pulpe, pristupni kavitet je ispran fiziološkim rastvorom da se uklone ostaci dentina. Pulpa je iz komore uklonjena sterilnim pulpektirpatorom odgovarajuće veličine i prenijeta u Ependorf posude (2ml) kojima je prethodno određena težina. Epruvete sa tkivom su opet izmjerene, zamrznute u tečnom azotu i čuvane na temperaturi od -80°C do daljih analiza. Poslije uzimanja uzorka zubi su ili ekstrahovani ili je nastavljeno endodontsko liječenje prema standardnoj proceduri. Mjerenje težine je obavljeno na Adventure™ digitalnoj vagi (OHAUS, Corp., Pine Brook, NY, USA). Težina uzorka određena je kao razlika težine Ependorf posude sa uzorkom i prazne Ependorf posude.

4.4. MIKROBIOLOŠKA ANALIZA UZORAKA

4.4.1. Određivanje ukupnog broja bakterija, *Lactobacillus* spp. i *Streptococcus* spp. metodom kultivisanja

Uzorci karijesnog dentina su vorteksirani u trajanju od 30 sekundi i razblaženi u sterilnom fiziološkom rastvoru. Po 0,1 ml nerazblaženog i razblaženog uzorka, razblaženja do 10^{-6} , zasijano je na različitim hranjivim podlogama. Za izolaciju *Lactobacillus* spp. korišćen je Man, Rogosa i Sharpe agar (MRS) (Difco Laboratories, Teddington, Middlesex, UK). Za izolaciju bakterija *Streptococcus* spp. korišćen je Mitis Salivarius agar (MSA) sa dodatkom sterilnog 1% kalijum telurita (Sigma-Aldrich, Buchs, Switzerland). Ukupan broj bakterija je određen na krvnom agaru sa dodatkom 5% ovčije krvi (Brain heart infusion agar). Sve podloge su inkubirane u uslovima sa 10% CO₂ na temperaturi od 37°C u periodu od 48h (Lima i sar., 2009). Krvni agar je inkubiran i u aerobnim uslovima na temperaturi od 37°C u periodu od 48h radi određivanja ukupnog broja aerobnih bakterija. Prisustvo *Lactobacillus* spp. i *Streptococcus* spp. na hranjivim podlogama potvrđeno je na osnovu makroskopskog izgleda kolonija, bojenja po Gramu i biohemijskih testova. Broj bakterijskih kolonija (engl. *Colony forming units* (CFU)) određen je makroskopski, na hranjivoj podlozi sa određenim razblaženjem na kojoj se nalazilo između 20-300 bakterijskih kolonija, i izražen je po mililitru uzorka (CFU/ml).

4.4.2. Identifikacija različitih vrsta *Lactobacillus* spp. biohemijskim testom

Identifikacija *Lactobacillus* spp. do nivoa vrste urađena je pomoću biohemijskog testa API 50 CH (bioMérieux, Inc., Lyon, France) koji se bazira na fermentaciji 49 različitih ugljenih hidrata. Postupak je sproveden u potpunosti prema uputstvu proizvođača. Sterilnim brisom kolonije *Lactobacillus* spp. različitog izgleda uzete su sa MRS podloge i rastvorene u sterilnom 0,85% rastvoru NaCl dok se nije dobila zamućenost rastvora koja odgovara 2McFarland standardu (Densichek™, bioMérieux, Inc., Lyon, France), a zatim je rastvor dodat API CHL medijumu. Poslije homogenizacije, bakterijski rastvor je inokulisan u 50 epruveta na API 50 CH trakama, vodeći računa da u epruvetama ne zaostanu mjehurići vazduha. Epruvete su zatim prekrivene mineralnim uljem i inkubirane u aerobnim uslovima na temperaturi od 36°C±2°C. Rezultati su očitani poslije 48h. Pozitivan test odgovara promjeni ljubičaste boje bromokrezola u žuto, osim za eculin test (epruveta broj 25) gdje se boja mijenja u crno. Promjena boje je posljedica oksidacije i stvaranja kiseline u anaerobnim uslovima koja djeluje na pH indikator koji se nalazi u epruveti. Epruveta

pod rednim brojem 1. predstavlja negativnu kontrolu i u njoj se ne nalazi niti jedan aktivni sastojak. Nalaz testova je zabilježen na papirnim šemama i konačan biohemijski profil je određen na osnovu identifikacionog softvera *apiweb*TM (bioMérieux, Inc., Lyon, France).

Mikrobiološka analiza uzoraka kultivisanjem i biohemijska identifikacija *Lactobacillus spp.* do nivoa vrste sprovedena je u Službi za medicinsku mikrobiologiju sa parazitologijom i virusologijom Univerzitetske bolnice u Foči, Republika Srpska.

4.4.3. Određivanje ukupnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* „real-time“ lančanom reakcijom polimeraze (qPCR)

Lančana reakcija polimeraze (PCR) predstavlja *in vitro* reakciju umnožavanja unaprijed poznatog segmenta DNK, primjenom dizajniranih prajmera, nukleotida i termostabilne Taq-polimeraze u prisustvu jona Mg^{2+} . Milionsko umnožavanje ciljne sekvence DNK ograničene prajmerima omogućena je smjenom tri procesa koji se odvijaju na različitim temperaturama (denaturacija, 94-95°C; hibridizacija, 50-60°C i elongacija, 72°C) u određenim vremenskim intervalima, kroz niz ponovljenih ciklusa, od 35-40. Za razliku od klasične PCR reakcije, gde se prisustvo specifične ciljne sekvence dokazuje kada je reakcija ušla u plato fazu, kod „real-time“ lančane reakcije polimeraze (qPCR) softverski se prati prinos amplifikacije kroz cikluse, putem detekcije fluorescentnih signala koji emituju fluorescentne boje, koje se vezuju za PCR produkte.

Za procjenu zastupljenosti bakterija putem qPCR u ovom istraživanju korišćeni su odgovarajući referentni sojevi kao standardi (serija različitih razblaženja DNK). Kvantitativna analiza ukupnog broja anaerobnih bakterija izražena je u broju kopija gena za 16S rRNK po miligramu uzorka (genska kopija/mg). U kompleksnoj bakterijskoj populaciji nije moguće procijeniti broj ćelija putem qPCR jer različite bakterijske vrste posjeduju različit broj vezanih gena za rRNK (operoni, od 1 do 15) (Vianna i sar., 2006). Za izolaciju totalne bakterijske DNK (Gram pozitivne i Gram negativne anaerobne bakterije) iz uzorka dentina korišćen je komercijalni kit „Qiaamp DNA Mini Kit“ (Qiagen, Hilden, Germany). Nakon primjenjenog protokola za izolaciju bakterijske DNK je rastvorena u 100 µl pufera za eluciju. Prajmeri koji su korišćeni za detekciju genoma svih anaerobnih bakterijskih vrsta hibridizuju sa visoko konzerviranom sekvencom gena za 16S rRNK (rDNK geni), a koja odgovara poziciji 331-797bp kod *Escherichia coli* (tabela 1.) (Nadkarni i sar., 2002). Amplifikacija date ciljne sekvence u okviru gena za 16S RNK prethodno je dokazana klasičnom PCR reakcijom dok je specifičnost PCR produkta veličine 466bp. provjerena na 8% poliakrilamidnom gelu (PAA). Primjenom komercijalnog kita "Luminaris Color HiGreen qPCR Master Mix" (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) qPCR reakcija je praćena na „Line-Gene“ PCR aparatu (Bioer Technology Co.,Ltd, Tokyo, Japan). Reakcionu smjesu u volumenu od 20 µl za qPCR reakciju činile su sljedeće komponente: 10 µl 2X SYBR Green Master Mix, 0,25 µM prajmera-EuF, EuR (po 1 µl), 6 µl H₂O i 2 µl uzorka DNK izolovane iz dentina. Temperaturni profil reakcije prikazan je u tabeli 1. Za provjeru specifičnosti qPCR reakcije nakon amplifikacije, reakcija je bila podvrgnuta temperaturnom opsegu od 72 do 95°C, koji dovodi do denaturacije produkta od 466bp na određenoj temperaturi (82°C) u svim uzorcima. Svaki uzorak je analiziran u duplikatu.

Kao referentni soj za dobijanje standardne krive korišćena je bakterija *Prevotella melaninogenica* (ATCC 25845). Na osnovu baze podataka (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>) veličina genoma *P. melaninogenica* iznosi 3,17Mb ($3,17 \cdot 10^6$ baza), a što konverzijom u težinu iznosi 3,24fg (težina jedne kopije genoma). Konverzija je urađena na osnovu formule: DNA težina (pg) = veličina genoma (bp) $\cdot 1,023 \cdot 10^{-9}$ (Dolezel i sar., 2003). Za procjenu broja kopija gena za rRNK u svaku qPCR reakciju pored uzoraka koji su analizirani bila je uključena i serija standarda (DNK *P. melaninogenica*) sa faktorom razblaženja od 10X. Pošto 3,24fg DNK vrste *P. melaninogenica* predstavlja jednu ćeliju (jedna kopija bakterijskog genoma), a poznato je da različite vrste *Prevotella spp.* imaju maksimalno 2 rDNK operona (grupe gena za rRNK), napravljena je serija razblaženja za standard od 32,4fg DNA (20 gena za rDNA) do 32,4ng DNA ($2 \cdot 10^7$ gena za rDNA). Kvantitativni podaci su dobijeni primjenom „Line Gene K“ programa (Bioer Technology Co., Ltd, Tokyo, Japan). U svakom analiziranom uzorku dentina određen je broj genskih kopija poređenjem sa brojem genskih kopija standardne krive, odnosno putem putem očitavanja korelacije između Ct vrednosti (vrijeme kada reakcija ulazi u eksponencijalni rast) i broja genskih kopija.

Tabela 1. PCR prajmeri i temperaturni profili za identifikaciju ukupnog broja anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i vrste *Lactobacillus casei/paracasei* metodama qPCR i PCR

Prajmer	Sekvenca	PCR		Temperaturni
		produkt (bp)		profil
EuF	5'TCCTACGGGAGCACAGT 3'	466	94°C 10min.	<u>40 ciklusa</u> 94°C (1min.), 60°C (1min.), 72°C(1min.30s) 72°C (5min.)
EuR	5'GGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTT 3'			
LactoF	5'TGGAAACAGRTGCTAATACCG3'	231-233	95°C 10min.	<u>40 ciklusa</u> 95°C (15s.), 62°C (1min.) 72°C (5min.)
LactoR	5'GTCCATTGTGGAAGATTCCC3'			
LcaseF	5'GCACCGAGATTCAACATGG3'	117	94°C 10min.	<u>40 ciklusa</u> 95°C (15s.), 60°C (1min.) 72°C (5min.)
LcaseR	5' GGTTCTTGGATYTATGCGGTATTAG3'			

Po istom principu kao za ukupan broj anaerobnih bakterija, u karijesnom dentinu analizirana je zastupljenost svih bakterija *Lactobacillus spp.*. Broj različitih vrsta roda *Lactobacillus spp.* izražen je u broju ćelija, odnosno genskih kopija po miligramu uzorka (genska kopija/mg) (sve vrste imaju isti broj gena za rRNK) (Byun i sar., 2004). Kao referentni soj za kvantitativnu analizu bakterija *Lactobacillus spp.* korišćena je vrsta *L. casei* (ATCC 393). Prema podacima o sekvenci genoma prosječna veličina DNK svih vrsta *Lactobacillus spp.* pronađenih u usnoj duplji je 2,2Mb, a primjenom odgovarajuće formule izračunata je težina jednog genoma (1 ćelija) koji ima vrijednost 2,3fg DNK (Byun i sar., 2004). Serija standarda koja je korišćena u qPCR reakciji za kvantifikaciju ukupnog broja *Lactobacillus spp.* predstavljala je seriju razblaženja *L. casei* od 230fg DNK (10^2 ćelija) do 2,3ng DNK (10^6 ćelija). U svakoj PCR reakciji pored uzoraka DNK iz dentina korišćeni su i standardi različite koncentracije sa ciljem da se odredi broj kopija genoma koji je u direktoj korelaciji sa brojem ćelija. Prije qPCR, za dokazivanje prisustva genoma

Lactobacillus spp. od oko 230bp korišćena je klasična PCR reakcija. Sekvence prajmera i temperaturni profil za detekciju ukupnog broja *Lactobacillus spp.* dati su u tabeli 1. Reakciona smeša za qPCR reakciju je bila identična recepturi navedenoj za kvantifikaciju ukupnog broja anaerobnih bakterija. Specifičnost reakcije je dodatno potvrđena na osnovu krive topljenja PCR produkata od 230bp.

4.4.4. Određivanje učestalosti vrste *Lactobacillus casei/paracasei* lančanom reakcijom polimeraze (PCR)

Primjenom klasičnog PCR određena je zastupljenosti vrste *Lactobacillus casei/paracasei* u uzorcima karijesnog dentina. Praimeri specifične sekvence u temperaturnim uslovima, navedenim u tabeli 1., dovode do sinteze PCR produkata dužine 117bp. U svakoj PCR reakciji paralelno sa testiranim uzorcima korišćena je pozitivna (referentni soj) i negativna kontrola (voda) sa ciljem da se izbjegnu lažno negativni i lažno pozitivni rezultati. Za reakciju amplifikacije korišćen je „PCR Master Mix“ (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) i to 10 µl, po 1 µl LcaseF i LcaseR prajmera, 6 µl H₂O i 2 µl uzorka DNK izolovane iz dentina. Putem elektroforeze na 8% PAA gelu provereno je prisustvo specifičnog amplifikata od 117bp. Vizuelizacija PCR produkata izvršena je putem bojenja sa etidijum bromidom.

Mikrobiološka analiza uzoraka metodama qPCR i PCR je sprovedena na Institutu za humanu genetiku, Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Republika Srbija.

4.5. KVANTIFIKACIJA VEGF I SOD U ZUBNOJ PULPI

4.5.1. Priprema uzoraka

Nakon odmrzavanja, u Ependorf posude sa uzorkom unijeta je određena količina pufera za lizu tkiva (20ml/1g tkiva; CellLytic^{MT}, Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland) i uzorak je mašinski homogenizovan na temperaturi od 4°C. Lizat je zatim centrifugiran na 12000-20000xg u trajanju od 10 minuta u mikrocentrifugi Heraeus* Biofuge Primo R (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Izdvojeni supernatant za svaki uzorak je zatim podijeljen u dvije Ependorf posude, alikot za analizu nivoa VEGF i alikot za analizu nivoa SOD. Supernatanti su čuvani na -20°C do daljih analiza.

4.5.2. Određivanje nivoa VEGF u zubnoj pulpi imunoesejskom tehnikom

Kvantitativno određivanje nivoa VEGF u pulpi sprovedeno je sendvič ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) imunoesejskom tehnikom uz korišćenje komercijalnog kompleta „Human VEGF ELISA Kit“ (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland) za ćelijski i tkivni lizat. Postupak je sproveden u potpunosti prema uputstvu proizvođača. U svaku od 96 reakcionih komora na mikrotitracionoj pločici ubačeno je po 100 µl standarda ili uzorka. Poslije inkubacije od 2 sata i 30 minuta na sobnoj temperaturi i ispiranja reakcionih komora uliveno je po 100 µl pripremljenog biotin antitijela i pločica je ponovo inkubirana na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje u trajanju od jednog sata. Poslije ispiranja reakcionih komora dodato je u svaku od njih 100 µl pripremljenog rastvora streptavidina i ponovljena je inkubacija u trajanju

od 45 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje. Zatim je ponovljen postupak ispiranja i dodat je rastvor peroksidaznog supstrata 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (100 µl). Poslije inkubacije od 30 minuta na sobnoj temperaturi uz lagano miješanje bez prisustva svjetlosti, dodato je u svaku od komora 50 µl rastvora 0,2 M sumporne kiseline za prekidanje enzimske reakcije, pri čemu se boja reakcionih rastvora mijenjala iz različitih inteziteta plave boje u žutu boju različitih inteziteta. Odmah zatim je izvršeno očitavanje optičkih gustina rastvora na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Korišćenjem programa Sigma Plot 12 (SyStat Software Inc, IL, USA) određena je formula standardne krive na osnovu optičkih gustina faktora rasta poznatih koncentracija. Za svaki uzorak i standard su sprovedena mjerenja u duplikatu i krajnja koncentracija uzorka i standarda je izračunata kao njihova srednja vrijednost. Nivo VEGF prikazan je po jedinici zapremine (pg/ml).

4.5.3. Određivanje nivoa SOD u zubnoj pulpi spektrofotometrijskom metodom

Aktivnost SOD je određena spektrofotometrijskom metodom pomoću „SOD Assay Kit-WST“ (Sigma Aldrich, Buchs, Switzerland). Postupak je sproveden u potpunosti prema uputstvu proizvođača. U unaprijed određene reakcione komore na mikrotitracionoj pločici aplikovano je po 20 µl uzorka (komore označene kao „sample“ i „blank 2“) i 20 µl dvostruko destilovane vode (komore „blank 1“ i „blank 3“). Zatim je u svaku od komora dodato 200 µl rastvora tetrazolijumske soli (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolijum, mononatrijumska so). U sljedećem koraku po 20 µl pufera je dodato u komore označene kao „blank 2“ i „blank 3“ i po 20 µl enzimskog rastvora u komore označene kao „sample“ i „blank 1“. Pločica je inkubirana na temperaturi od 37°C u trajanju od 20 minuta. SOD aktivnost je određena kao procenat inhibicije stvaranja boje WAST-1 formazana (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H-tetrazolijum, mononatrijumska so) na aparatu Multiskan EX (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) pri absorbansi od 440nm. Aktivnost SOD (% inhibicije) je izračunata matematički prema sljedećoj formuli:

$$\text{SOD aktivnost (\%)} = \frac{[(\text{Ablank1} - \text{Ablank3}) - (\text{Asample1} - \text{Ablank2})]}{(\text{Ablank1} - \text{Ablank3})} \times 100$$

Analize uzoraka pulpe su sprovedene u Istraživačkoj laboratoriji Klinike za bolesti zuba Stomatološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu, Republika Srbija.

4.6. STATISTIČKA OBRADA PODATAKA

Statistička obrada podataka je urađena u SPSS programu 19.0 (IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp, USA). Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti i standardne devijacije (SD) za numerička i učestalosti za atributivna obilježja. Izvršeno je testiranje normalnosti raspodjele u studiji I (Kolmogorov-Smirnovljevi test) i dobijeno je da godine imaju normalnu raspodjelu (Kolmogorov-Smirnovljevi test, $p > 0,05$) dok broj bakterija nije pratio normalnu raspodjelu (Kolmogorov-Smirnovljevi test, $p < 0,05$). Razlike u karakteristikama ispitanika i uzorka između grupa određene su t-testom za dva nezavisna uzorka (godine) i hi-kvadrat testom (pol, kliničke karakteristike uzorka). Za ispitivanje antibakterijskog efekta antiseptika primijenjeni su MekNemarov test za atributivna i Vilksxonov test

ekvivalentnih parova za numerička obilježja. Za komparativnu analizu antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina primjenjeni su hi-kvadrat test za atributivna i Man-Vitnijev test za numerička obilježja. Poveznost kliničkih karakteristika lezije i broja bakterija određena je primjenom Spirmanovog koeficijenta korelacije. U studiji II podaci su pratili normalnu raspodjelu (Kolmogorov-Smirnovljev test, $p > 0,05$), te su za ispitivanje razlika između grupa primjenjeni t-test za dva nezavisna uzorka za numerička (godine, nivo VEGF i SOD) i hi-kvadrat test za atributivna obilježja (pol). Vrijednosti $p < 0,05$ su smatrane statistički značajnim u svim analizama.



5.

REZULTATI

STUDIJA I

-antibakterijski efekat ozona u karijesnim kavitetima zuba-

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA I KARIJESNOG UZORKA

Dijagram 1. predstavlja tok odabira ispitanika i formiranje istraživačkih grupa. Od 72 pregledane osobe, 24 njih je isključeno iz daljeg istraživanja jer nisu ispunile kriterijume za uključivanje u studiju ($n=18$), jer su odbile da učestvuju ($n=4$) ili su isključene zbog drugih razloga ($n=2$). U istraživanje je uključeno ukupno 48 osoba koje su metodom slučajnog uzorka podijeljene u dvije grupe, eksperimentalnu, gdje je kao antiseptik korišćen ozon (OZ-grupa) i komparativnu, gdje je kao antiseptik korišćen hlorheksidin (HH-grupa). Kod svih ispitanika eksperimentalni protokol je sproveden u jednoj posjeti i svi uzorci karijesnog dentina su analizirani. Prilikom izvođenja terapijskog postupka nisu zabilježeni neželjeni efekti.

U tabeli 2. prikazane su demografske karakteristike ispitanika i kliničke karakteristike uzorka u grupi tretiranoj ozonom i grupi tretiranoj hlorheksidinom. Grupu gdje je za dezinfekciju kaviteta korišćen ozon sačinjavalo je po 12 žena i muškaraca, starosti od 20-48 godina, a grupu gdje je korišćen hlorheksidin sačinjavalo je 10 žena i 14 muškaraca starosti od 19-40 godina. Između ove dvije terapijske grupe nije zabilježena značajna razlika u pogledu pola i starosne strukture ($p>0,05$). Uzorak su sačinjavali 14 premolara i 10 molara u grupi gdje je korišćen ozon, odnosno 15 premolara i 9 molara u grupi gdje je primjenjen hlorheksidin. Karijesna lezija je bila lokalizovana kod oko 58,3% zuba na okluzalnoj, odnosno kod oko 41,7% zuba na okluzalnoj i aproksimalnoj površini zuba u grupi gdje je korišćen ozon, dok je u grupi gdje je primjenjen hlorheksidin kod 66,7% zuba lezija lokalizovana samo na okluzalnoj, a kod 33,3% zuba je zahvatila i aproksimalnu površinu zuba. Nije uočena značajna razlika u zastupljenosti zuba u odnosu na morfološku grupu i lokalizaciji karijesa između dvije grupe ($p>0,05$).

Dijagram 1. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa

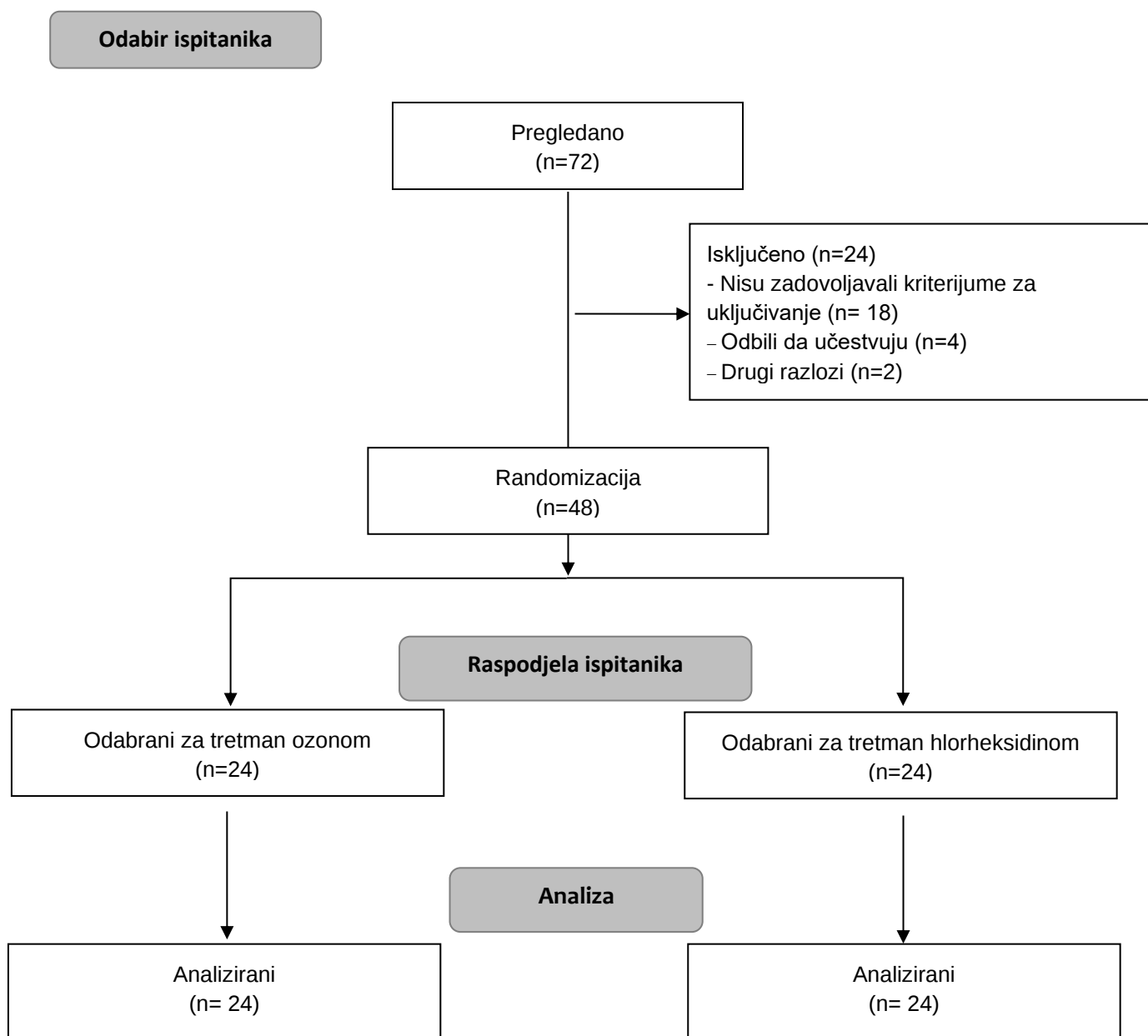


Tabela 2. Demografske karakteristike ispitanika i kliničke karakteristike uzorka u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Karakteristike ispitanika/uzorka	Veličina uzorka (ukupno 48)		OZ-grupa (ukupno 24)		HH-grupa (ukupno 24)		p*
	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
Demografske							
Godine starosti (srednja vrijednost ± SD)	28,40 ± 7,24		29,75 ± 8,07		27,04 ± 6,18		0,198
Pol							
Žene	22	45,8	12	50,0	10	41,7	0,772
Muškarci	26	54,2	12	50,0	14	58,3	
Kliničke							
Morfološka grupa zuba							
Gornji premolari	22	45,8	11	45,8	11	45,8	0,829
Gornji molari	13	27,1	6	25,0	7	29,2	
Donji premolari	7	14,6	3	12,5	4	16,7	
Donji molari	6	12,5	4	16,7	2	8,3	
Površina zuba sa karijesom							
Okluzalna	26	54,2	10	41,7	16	66,7	0,147
Okluzalna i aproksimalna	22	45,8	14	58,3	8	33,3	

* t-test za dva nezavisna uzorka za godine starosti; Hi-kvadrat test za ostale varijable

U tabeli 3. su prikazane karakteristike karijesnog dentina u eksperimentalnoj i komparativnoj grupi. U grupi tretiranoj ozonom kod najvećeg broja kaviteta karijesne mase su okarakterisane kao vlažne (66,7%), srednje-tvrde (kožaste) konzistencije (50%) i svijetlo smeđe boje (41,7%). U grupi gdje je primjenjen hlorheksidin u najvećem broju slučajeva karijes je ocijenjen kao vlažan (62,5%), meke konzistencije (45,8%), a boja karijesa je varirala od žute (33,3%), svijetlo smeđe (37,5%) do tamno smeđe nijanse (29,2%). Nije zabilježena značajna razlika u pogledu ispitivanih kliničkih karakteristika karijesnog dentina između grupa ($p>0,05$).

Tabela 3. Karakteristike karijesnog dentina u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Karakteristike karijesnog dentina	Veličina uzorka (ukupno 48)		OZ-grupa (ukupno 24)		HH-grupa (ukupno 24)		P*
	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
Vlažnost karijesa							
Suv	17	35,4	8	33,3	9	37,5	1,000
Vlažan	31	64,6	16	66,7	15	62,5	
Konzistencija karijesa							
Tvrda	10	20,8	4	16,7	6	25,0	0,335
Srednje tvrda	19	39,6	12	50,0	7	29,2	
Meka	19	39,6	8	33,3	11	45,8	
Boja karijesa							
Žuta	14	29,2	6	25,0	8	33,3	0,817
Svijetlo smeđa	19	39,6	10	41,7	9	37,5	
Tamno smeđa	15	31,3	8	33,3	7	29,2	

* Hi-kvadrat test

5.2. ANTIBAKTERIJSKI EFEKAT OZONA

5.2.1. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj bakterija ispitivani metodom kultivisanja

5.2.1.1. Broj kaviteta sa aerobnim bakterijama

Prije primjene oba antiseptika, kako ozona tako i hlorheksidina, iz svih kaviteta izolovane su aerobne bakterije. Aerobne bakterije su izolovane i iz svih kaviteta poslije primjene ozona, dok poslije primjene hlorheksidina aerobne bakterije nisu izolovane iz 12,5% kaviteta. Smanjenje broja kaviteta iz kojih su izolovane aerobne bakterije nije bilo statistički značajno ni u jednoj od grupa ($p > 0,05$) (tabela 4.).

Tabela 4. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo aerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj uzoraka	Prisustvo aerobnih bakterija				p*
		S1		S2		
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	24	100,0	24	100,0	1,000
HH-grupa	24	24	100,0	21	87,5	0,250
Ukupno	48	48	100,0	45	93,8	0,250

* MekNemarov test

5.2.1.2. Prosječan broj aerobnih bakterija

Prosječan broj aerobnih bakterija izolovanih iz karijesnog dentina prije i poslije dezinfekcije kaviteta prikazan je u tabeli 5. U kavitetima koji su tretirani ozonom prosječan broj aerobnih bakterija je iznosio oko $1,0 \cdot 10^5$ CFU/ml prije primjene ozona, dok je poslije primjene taj broj smanjen na $2,1 \cdot 10^4$ CFU/ml ($p < 0,0001$). Poslije primjene hlorheksidina prosječan broj aerobnih bakterija je značajno smanjen sa $9,2 \cdot 10^4$ CFU/ml na $2,1 \cdot 10^4$ CFU/ml ($p < 0,0001$).

Tabela 5. Prosječan broj aerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj aerobnih bakterija (CFU/ml)		p*
	(X̄±SD)		
	S1	S2	
OZ-grupa	1,0·10 ⁵ ± 1,3·10 ⁵	2,1·10 ⁴ ± 2,5·10 ⁴	<0,0001
HH-grupa	9,2·10 ⁴ ± 1,2·10 ⁵	2,1·10 ⁴ ± 4,3·10 ⁴	<0,0001
Ukupno	9,7·10 ⁴ ± 1,2·10 ⁵	2,1·10 ⁴ ± 3,4·10 ⁴	<0,0001

* Viloksonov test ekvivalentnih parova

5.2.1.3. Broj kaviteta sa anaerobnim bakterijama

U svim netretiranim uzorcima karijesnog dentina izolovane su anaerobne bakterije. Ozon je doveo do eliminacije anaerobnih bakterija iz 4,2% kaviteta dok hlorheksidin iz 16,7% kaviteta. Ni jedan od primjenjenih antiseptika nije doveo do značajnog smanjenja broja kaviteta sa anaerobnim bakterijama (p>0,05) (tabela 6.).

Tabela 6. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo anaerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj uzoraka	Prisustvo anaerobnih bakterija				p*
		S1		S2		
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	24	100,0	23	95,8	1,000
HH-grupa	24	24	100,0	20	83,3	0,125
Ukupno	48	48	100,0	43	89,6	0,063

* MekNemarov test

5.2.1.4. Prosječan broj anaerobnih bakterija

U tabeli 7. je prikazan ukupan broj anaerobnih bakterija koje su izolovane iz karijesnih kaviteta prije i poslije dezinfekcije kaviteta. U uzorcima dentina prije primjene ozona prosječan broj anaerobnih bakterija je iznosio oko $1,1 \cdot 10^5$ CFU/ml dok je poslije primjene taj broj značajno smanjen na $2,7 \cdot 10^4$ CFU/ml ($p < 0,0001$). U komparativnoj grupi, prosječan broj anaerobnih bakterija je poslije primjene hlorheksidina smanjen sa $1,2 \cdot 10^5$ CFU/ml na $2,4 \cdot 10^4$ CFU/ml ($p < 0,0001$).

Tabela 7. Prosječan broj anaerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj anaerobnih bakterija (CFU/ml)		
	($\bar{X} \pm SD$)		
	S1	S2	p*
OZ-grupa	$1,1 \cdot 10^5 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$2,7 \cdot 10^4 \pm 4,0 \cdot 10^4$	<0,0001
HH-grupa	$1,2 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^5$	$2,4 \cdot 10^4 \pm 4,1 \cdot 10^4$	<0,0001
Ukupno	$1,2 \cdot 10^5 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^4 \pm 4,0 \cdot 10^4$	<0,0001

* Vilkoksonov test ekvivalentnih parova

5.2.2. Efekti ozona i hlorheksidina na *Lactobacillus spp.* ispitivani metodom kultivisanja i biohemijskom analizom

5.2.2.1. Broj kaviteta sa *Lactobacillus spp.*

U grupi gdje je korišćen ozon *Lactobacillus spp.* su izolovane iz 75,0% kaviteta prije i iz 66,7% kaviteta poslije primjene lijeka. U grupi gdje je primjenjen hlorheksidin, u inicijalnim uzorcima karijesa izolovane su *Lactobacillus spp.* iz 45,8% kaviteta, a poslije tretiranja kaviteta antiseptikom taj broj je smanjen na 25%. Ni u jednoj od ispitivanih grupa antiseptik nije doveo do značajnog smanjenja broja kaviteta sa *Lactobacillus spp.* ($p > 0,05$), ali značajno smanjenje je zabilježeno na nivou cijelog uzorka ($p = 0,016$) (tabela 8.).

Tabela 8. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Prisustvo <i>Lactobacillus spp.</i>						
Tretman	Ukupan broj uzoraka	S1		S2		p*
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	18	75,0	16	66,7	0,500
HH-grupa	24	11	45,8	6	25,0	0,063
Ukupno	48	29	60,4	22	45,8	0,016

* MekNemarov test

5.2.2.2. Prosječan broj *Lactobacillus spp.*

U tabeli 9. prikazan je prosječan broj bakterija *Lactobacillus spp.* u karijesnom dentinu prije i poslije primjene antiseptika u eksperimentalnoj i komparativnoj grupi. Prosječan broj bakterija je značajno snižen sa $2,0 \cdot 10^4$ CFU/ml na $3,2 \cdot 10^3$ CFU/ml poslije primjene ozona ($p < 0,0001$). Tretiranje karijesnog kaviteta hlorheksidinom dovelo je do značajnog smanjenja prosječnog broja *Lactobacillus spp.* sa početnih $2,7 \cdot 10^4$ CFU/ml na $4,9 \cdot 10^3$ CFU/ml poslije primjene antiseptika ($p = 0,003$).

Tabela 9. Prosječan broj *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj <i>Lactobacillus spp.</i> (CFU/ml)		
	($\bar{X} \pm SD$)		
	S1	S2	p*
OZ-grupa	$2,0 \cdot 10^4 \pm 7,8 \cdot 10^4$	$3,2 \cdot 10^3 \pm 1,0 \cdot 10^4$	<0,0001
HH-grupa	$2,7 \cdot 10^4 \pm 9,2 \cdot 10^4$	$4,9 \cdot 10^3 \pm 2,0 \cdot 10^4$	0,003
Ukupno	$2,4 \cdot 10^4 \pm 8,4 \cdot 10^4$	$4,1 \cdot 10^3 \pm 1,6 \cdot 10^4$	<0,0001

* Vilkoksonov test ekvivalentnih parova

5.2.2.3. Učestalost pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.*

Pomoću biohemijskog testa API 50 CH prije primjene ozona iz 18 kaviteta izolovano je 14 različitih vrsta *Lactobacillus spp.*, najčešće između jedne i dvije različite vrste po uzorku (83,3%). Najčešće su izolovani *Lactobacillus brevis* 1 (38,9%), *Lactobacillus plantarum* 1 (27,8%) *Lactobacillus fermentum* 1 (22,2%), *Lactobacillus rhamnosus* (16,7%), *Lactobacillus acidophilus* 1 (11,1%), *Lactobacillus acidophilus* 2 (11,1%) i *Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii* (11,1%), dok je učestalost ostalih vrsta bila manja od 10%. Poslije primjene ozona *Lactobacillus spp.* su izolovane iz 14 kaviteta. Izolovane su sve vrste *Lactobacillus spp.* koje su izolovane i prije primjene antiseptika, ali u nešto manjem procentu, osim *Lactobacillus brevis* 3, *Lactobacillus fermentum* 2 i *Lactobacillus plantarum* 2 koje nisu nađene ($p>0,05$) (tabela 10.).

U grupi gdje je korišćen hlorheksidin iz 11 karijesnih kaviteta, iz kojih su izolovane *Lactobacillus spp.*, API 50 CH biohemijskim testom izolovano je 8 različitih vrsta. U najvećem broju kaviteta nalazile su se između jedne i dvije vrste (72,7%), a najviše tri. Najčešće izolovane vrste su bile *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* 1 (54,5%), *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* 3 (36,4%), *L. rhamnosus* (36,4%) i *L. brevis* 1 (18,2%). Izlaganje karijesnog kaviteta djelovanju hlorheksidina dovelo je do smanjenja broja kaviteta sa *Lactobacillus spp.* i učestalost pojedinih vrsta, dok vrste *L. plantarum* 1, *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei* 2 i *Lactobacillus salivarius* koje su nađene u inicijalnim uzorcima nisu izolovane ($p>0,05$) (tabela 11.).

Tabela 10. Učestalost pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene ozona (OZ-grupa)

	Učestalost pojedinih vrsta <i>Lactobacillus spp.</i> (ukupan broj pozitivnih uzoraka 18)				p*
	S1		S2		
	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	2	11,1	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 2	2	11,1	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 3	1	5,6	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	7	38,9	5	27,8	0,500
<i>Lactobacillus brevis</i> 2	1	5,6	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus brevis</i> 3	1	5,6	0	0,0	1,000
<i>Lactobacillus fermentum</i> 1	4	22,2	2	11,1	0,500
<i>Lactobacillus fermentum</i> 2	1	5,6	0	0,0	1,000
<i>Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii</i>	2	11,1	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus pentosus</i>	1	5,6	1	5,6	1,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	5	27,8	5	27,8	1,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> 2	1	5,6	0	0,0	1,000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	3	16,7	3	16,7	1,000
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	5,6	1	5,6	1,000

* MekNemarov test

Tabela 11. Učestalost pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene hlorheksidina (HH-grupa)

	Učestalost pojedinih vrsta <i>Lactobacillus spp.</i> (ukupan broj pozitivnih uzoraka 11)				p*
	S1		S2		
	broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
<i>Lactobacillus acidophilus</i> 1	1	9,1	1	9,1	1,000
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	2	18,2	1	9,1	1,000
<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	1	9,1	0	0,0	1,000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	4	36,4	2	18,2	0,500
<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> 1	6	54,5	4	36,4	0,500
<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> 2	1	9,1	0	0,0	1,000
<i>Lactobacillus paracasei ssp. paracasei</i> 3	4	36,4	3	27,3	1,000
<i>Lactobacillus salivarius</i>	1	9,1	0	0,0	1,000

* MekNemarov test

U cjelokupnom uzorku na početku istraživanja iz 29 kaviteta izolovano je 17 različitih vrsta *Lactobacillus spp.*, u najvećem broju između jedne i dvije vrste po uzorku (79,3%). Najčešće su izolovane *L. brevis* 1 (31,0%), *L. rhamnosus* (24,1%), *L. paracasei ssp. paracasei* 1 (20,7%), *L. plantarum* 1 (20,7%) i *L. fermentum* 1 (13,8%), *L. paracasei ssp. paracasei* 3 (13,8%) i *L. acidophilus* 1 (10,3%). Poslije tretiranja kaviteta antiseptikom, zabilježeno je smanjenje broja kaviteta iz kojih su izolovane *Lactobacillus spp.* (45,8%) i učestalost pojedinih vrsta, dok vrste *L. brevis* 3, *L. fermentum* 2, *L. plantarum* 2, *L. paracasei ssp. paracasei* 2, izolovane prije dezinfekcije, nisu nađene.

5.2.3. Efekti ozona i hlorheksidina na *Streptococcus spp.* ispitivani metodom kultivisanja

5.2.3.1. Broj kaviteta sa *Streptococcus spp.*

U svim uzorcima karijesnog dentina u grupi gdje je korišćen ozon izolovane su *Streptococcus spp.* prije tretiranja kaviteta antiseptikom. Poslije primjene ozona došlo je do eliminacije ove bakterijske vrste u samo jednom uzorku ($p>0,05$). U komparativnoj grupi, *Streptococcus spp.* su izolovane iz 95,8% kaviteta prije i iz 50% kaviteta poslije primjene hlorheksidina. Ovo smanjenje broja kaviteta u grupi tretiranoj hlorheksidinom je bilo statistički značajno ($p=0,001$) (tabela 12.).

Tabela 12. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo *Streptococcus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Prisustvo <i>Streptococcus spp.</i>						
Tretman	Ukupan broj uzoraka	S1		S2		p*
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	24	100,0	23	95,8	1,000
HH-grupa	24	23	95,8	12	50,0	0,001
Ukupno	48	47	97,9	35	72,9	<0,001

* MekNemarov test

5.2.3.2. Prosječan broj *Streptococcus spp.*

Prosječan broj *Streptococcus spp.* je značajno snižen sa $5,8 \cdot 10^4$ CFU/ml prije primjene ozona na $1,3 \cdot 10^4$ CFU/ml poslije primjene ($p<0,0001$). Značajno smanjenje prosječnog broja *Streptococcus spp.* sa početnih $5,8 \cdot 10^4$ CFU/ml na $1,2 \cdot 10^4$ CFU/ml zabilježeno je poslije tretiranja karijesnog kaviteta hlorheksidinom ($p<0,0001$) (tabela 13.).

Tabela 13. Prosječan broj *Streptococcus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj <i>Streptococcus spp.</i> (CFU/ml)		
	(X̄±SD)		
	S1	S2	p*
OZ-grupa	5,8·10 ⁴ ± 7,5·10 ⁴	1,3·10 ⁴ ± 2,1·10 ⁴	<0,0001
HH-grupa	5,8·10 ⁴ ± 9,4·10 ⁴	1,2·10 ⁴ ±3,1·10 ⁴	<0,0001
Ukupno	5,8·10 ⁴ ± 8,4·10 ⁴	1,3·10 ⁴ ± 2,6·10 ⁴	<0,0001

* Vilkoksonov test ekvivalentnih parova

5.2.4. Korelacija kliničkih karakteristika lezije i prosječnog broja bakterija u cjelokupnom uzorku

U tabeli 14. prikazana je povezanost kliničkih karakteristika karijesnih lezija (vlažnost, konzistencija i boja karijesnog tkiva) i prosječnog broja *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.*. Vlažnost, konzistencija i boja karijesnog dentina su međusobno značajno povezani (svi $p < 0,0001$). Vlažan karijesni dentin je povezan sa svjetlijom bojom tkiva i mekšom konzistencijom, a karijes koji je okarakterisan kao suv tamnije je boje i tvrđe je konzistencije. Veća kolonizacija karijesnih kaviteta *Lactobacillus spp.* zabilježena je kod lezija sa vlažnim karijesnim masama ($p = 0,033$), a veći broj *Streptococcus spp.* je zabilježen kod lezija tamnije boje ($p = 0,034$).

Tabela 14. Povezanost kliničkih karakteristika lezije i prosječnog broja *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* u cjelokupnom uzorku

	vrijednost koeficijenta*	P
Vlažnost : konzistencija	0,748	<0,0001
Vlažnost : boja	0,825	<0,0001
Konzistencija : boja	0,864	<0,0001
Vlažnost : <i>Streptococcus spp.</i>	-0,239	0,102
Vlažnost : <i>Lactobacillus spp.</i>	0,246	0,093
Konzistencija : <i>Streptococcus spp.</i>	-0,261	0,074
Konzistencija : <i>Lactobacillus spp.</i>	0,305	0,033
Boja : <i>Streptococcus spp.</i>	-0,307	0,034
Boja : <i>Lactobacillus spp.</i>	0,243	0,097
<i>Streptococcus spp.</i> : <i>Lactobacillus spp.</i>	0,168	0,255

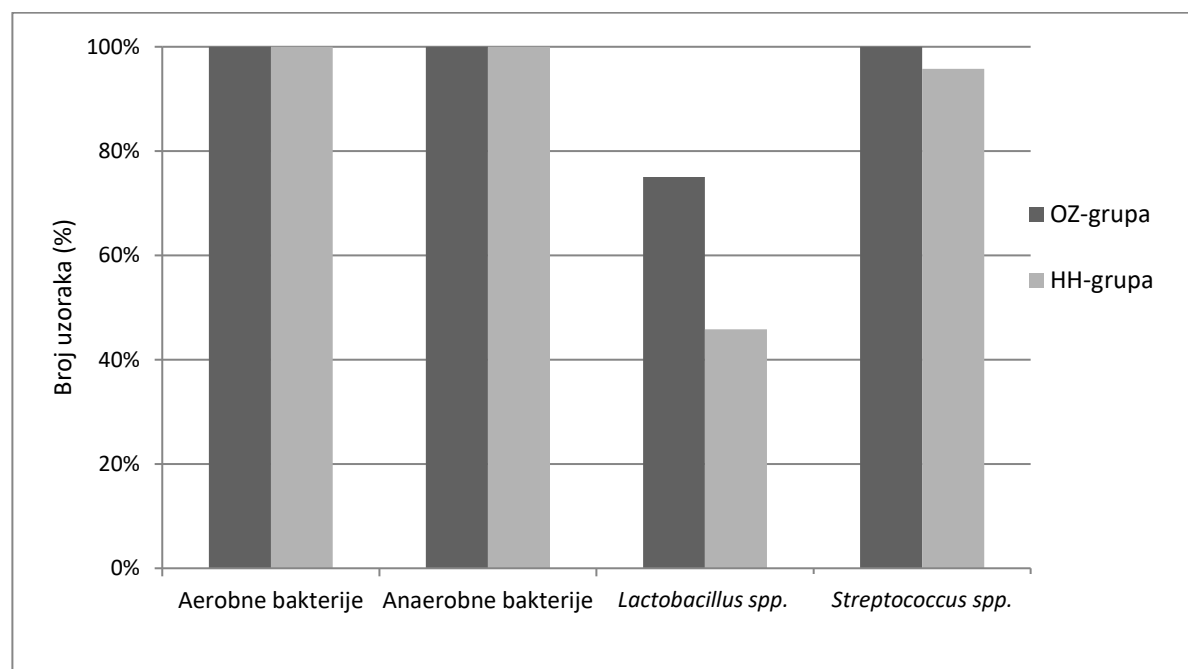
* Spirmanov koeficijent korelacije

5.2.5. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina ispitivanog metodom kultivisanja

5.2.5.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na aerobne bakterije, anaerobne bakterije, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* prije primjene antiseptika

Poređenje broja kaviteta pozitivnih na aerobne bakterije, anaerobne bakterije i *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* prije primjene antiseptika između terapijskih grupa prikazano je na grafikonu 1. Broj kaviteta iz kojih su izolovane aerobne i anaerobne bakterije je bio isti u obje grupe, dok je broj kaviteta pozitivnih na *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* bio nešto veći u eksperimentalnoj u odnosu na komparativnu grupu, ali ta razlika nije bila značajna ($p>0,05$).

Grafikon 1. Poređenje broja kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* prije primjene antiseptika (S1) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)

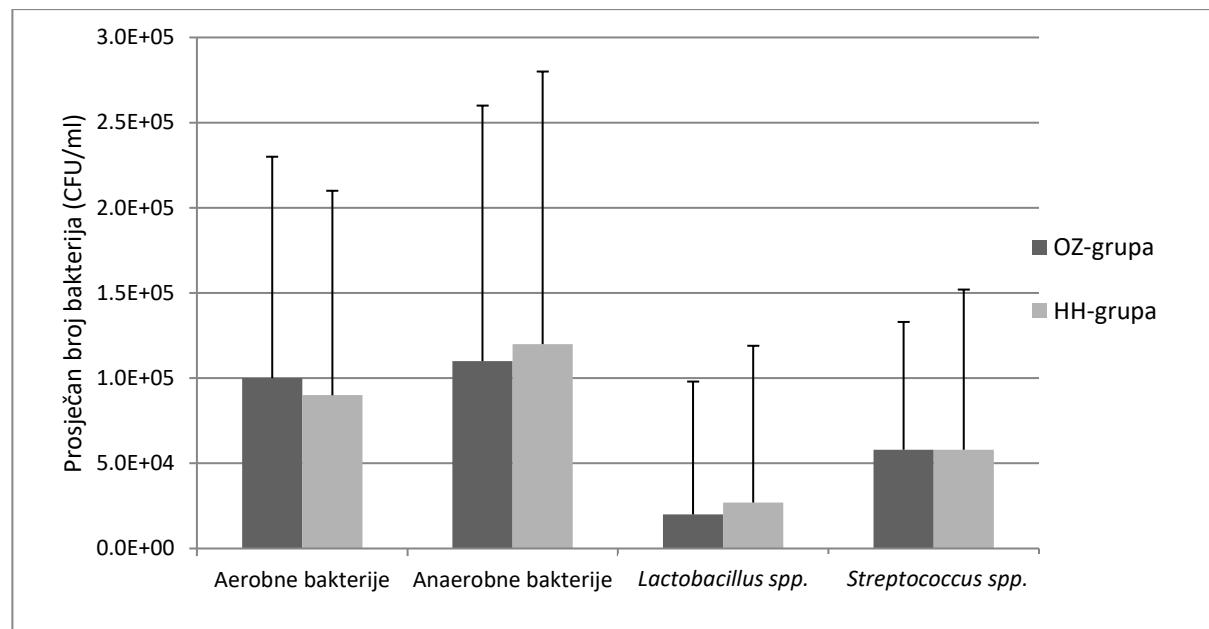


Hi-kvadrat test

5.2.5.2. Poređenje prosječnog broja aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* prije primjene antiseptika

U grupi tretiranoj ozonom prosječan broj aerobnih bakterija je bio veći, a broj anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* manji u odnosu na komparativnu grupu, ali ta razlika nije bila značajna ($p > 0,05$). U obje grupe na početku terapije broj *Streptococcus spp.* je bio približno isti (grafikon 2.).

Grafikon 2. Poređenje prosječnog broja ($\pm$ SD) aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* prije primjene antiseptika (S1) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)

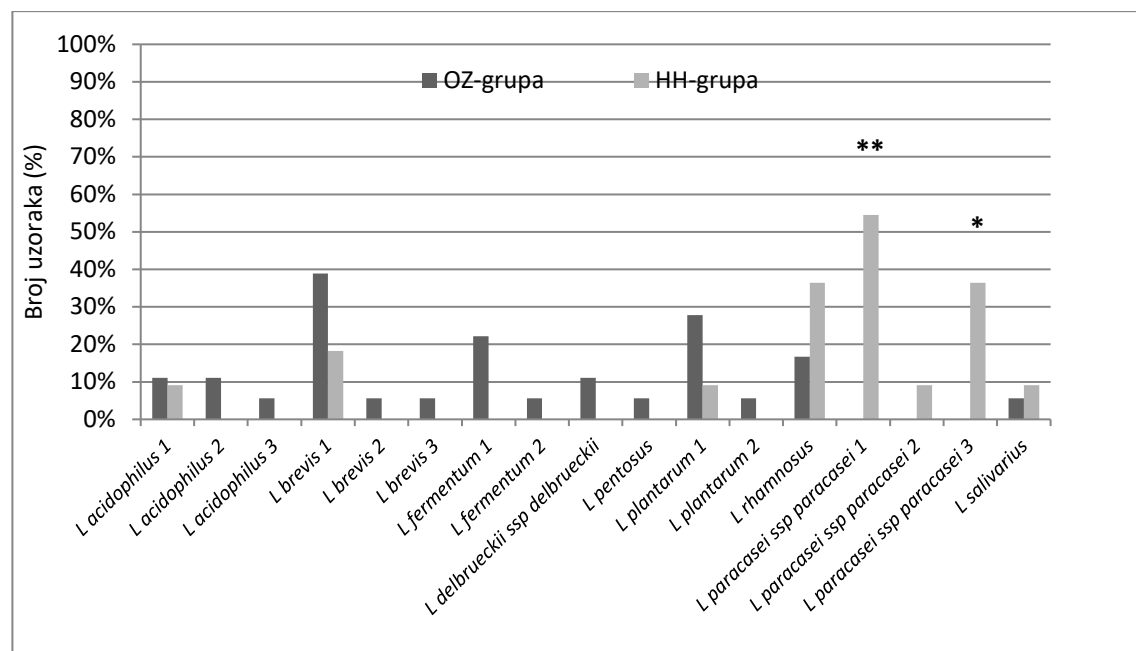


Man-Vitnijev test

5.2.5.3. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na različite vrste *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika

Grafikon 3. prikazuje odnos pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* u karijesnim lezijama na početku liječenja između grupe tretirane ozonom i grupe tretirane hlorheksidinom. *L. acidophilus* 1, *L. brevis* 1, *L. plantarum* 1, *L. rhamnosus* i *L. salivarius* su izolovani u obje grupe, dok su ostale vrste izolovane ili u grupi tretiranoj ozonom ili u grupi tretiranoj hlorheksidinom. Značajna razlika je zabilježena u učestalosti *L. paracasei ssp. paracasei* 1 ($p=0,001$) i *L. paracasei ssp. paracasei* 3 ($p=0,014$), koji su izolovani samo u grupi tretiranoj hlorheksidinom.

Grafikon 3. Poređenje učestalosti pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika (S1) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)

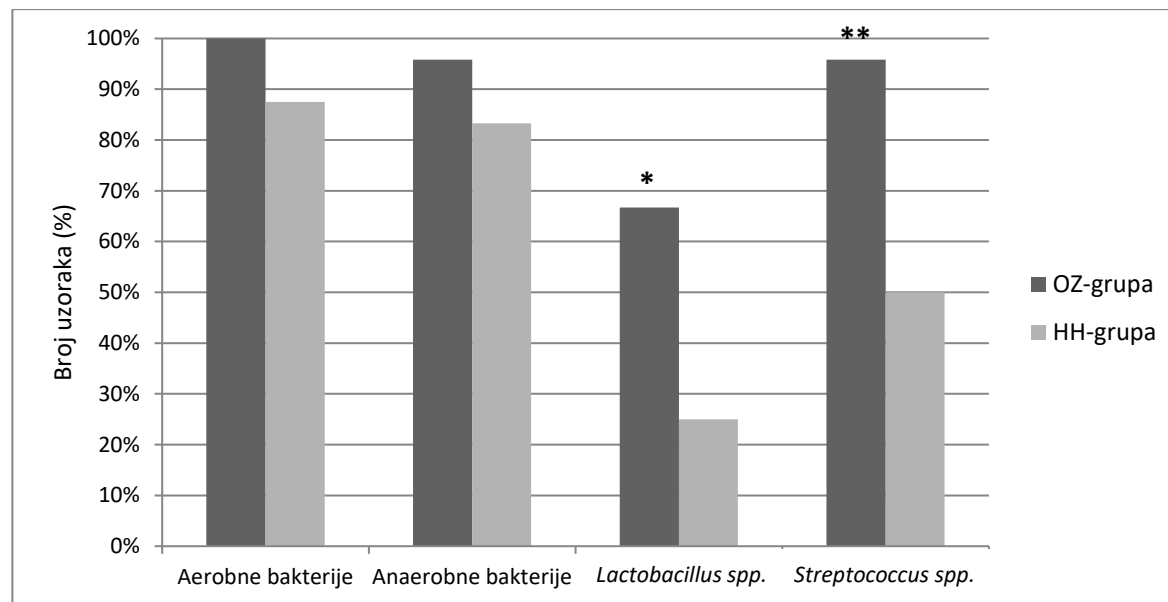


Hi-kvadrat test; * $p=0,014$ i ** $p=0,001$

5.2.5.4. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na aerobne bakterije, anaerobne bakterije, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* poslije primjene antiseptika

Poređenje broja kaviteta iz kojih su izolovane aerobne bakterije, anaerobne bakterije, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* između grupa poslije dezinfekcije prikazano je na grafikonu 4. U grupi tretiranoj ozonom broj kaviteta iz kojih su izolovane aerobne i anaerobne bakterije, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* je bio veći u odnosu na komparativnu grupu, pri čemu je značajna razlika zabilježena za broj kaviteta pozitivnih na *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* (oba $p=0,041$).

Grafikon 4. Poređenje broja kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* poslije primjene antiseptika (S2) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



Hi-kvadrat test; *p=0,008 i **p=0,001

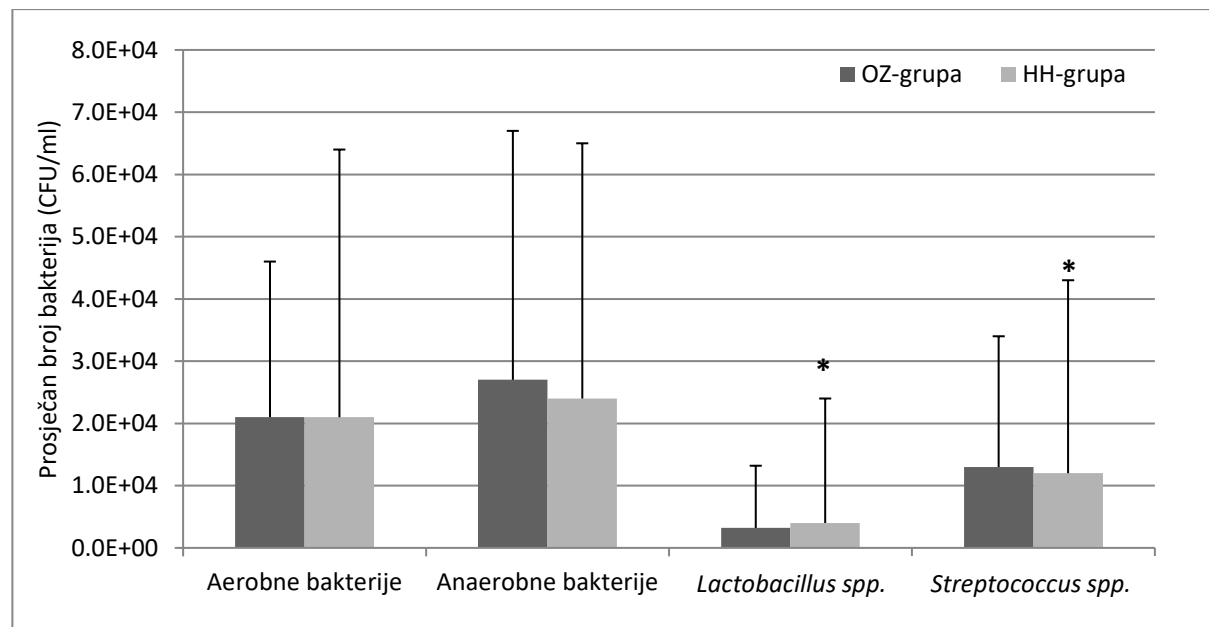
5.2.5.5. Poređenje prosječnog broja aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* poslije primjene antiseptika

Prosječan broj aerobnih i anaerobnih bakterija u uzorcima karijesnog dentina poslije dezinfekcije kaviteta je bio približno isti u obje grupe, eksperimentalnoj i komparativnoj. U grupi u kojoj je korišćen ozon prosječan broj *Lactobacillus spp.* je bio značajno manji (p=0,041), a prosječan broj *Streptococcus spp.* značajno veći (p=0,041) u odnosu na grupu gdje je primijenjen hlorheksidin (grafikon 5.).

5.2.5.6. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na različite vrste *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika

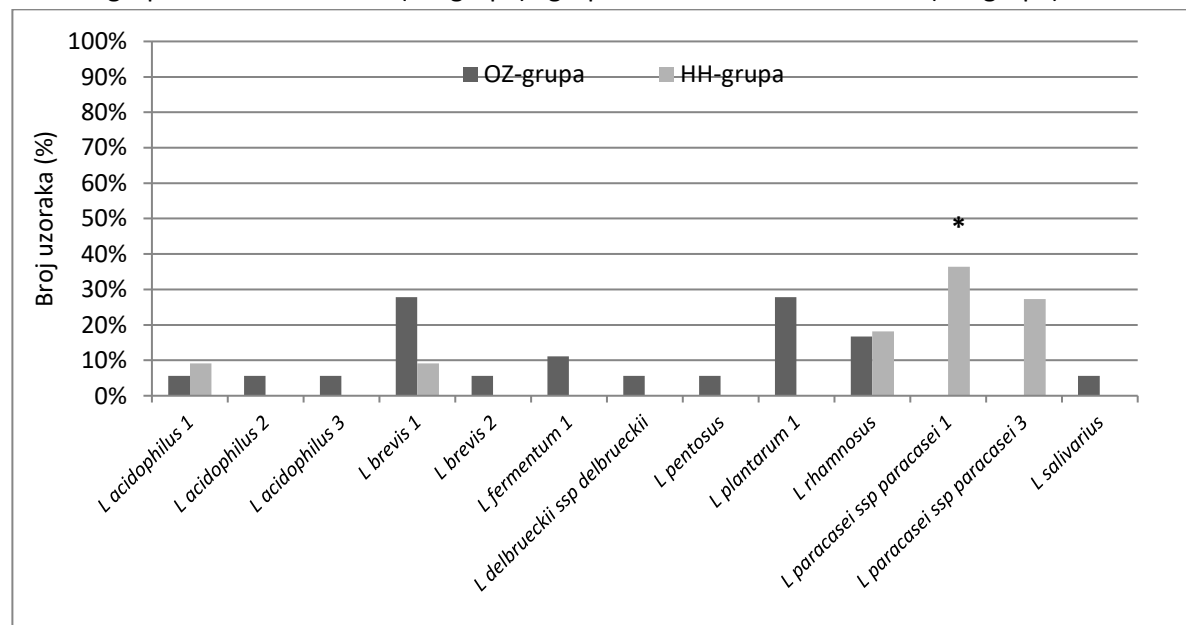
Poslije primjene antiseptika nije zabilježena značajna razlika u učestalosti različitih vrsta *Lactobacillus spp.* između grupe tretirane ozonom i grupe tretirane hlorheksidinom, osim za učestalost *L. paracasei spp. paracasei* 1 (p=0,014), koji je izolovan u grupi tretiranoj hlorheksidinom (grafikon 6.).

Grafikon 5. Poređenje prosječnog broja ($\pm$ SD) aerobnih bakterija, anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* poslije primjene antiseptika (S2) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



Man-Vitnijev test; * $p=0,041$

Grafikon 6. Poređenje učestalosti pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika (S2) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



Hi-kvadrat test; * $p=0,014$

5.2.6. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj bakterija ispitivani metodom qPCR

5.2.6.1. Broj kaviteta sa anaerobnim bakterijama

Broj kaviteta iz kojih su izolovane anaerobne bakterije prije i poslije dezinfekcije kaviteta ozonom i hlorheksidinom, primjenom metode qPCR, prikazan je u tabeli 15. U obje grupe, u svim uzorcima dentina na početku terapije izolovane su anaerobne bakterije kao i poslije primjene antiseptika.

Tabela 15. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo anaerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Prisustvo anaerobnih bakterija						
Tretman	Ukupan broj uzoraka	S1				p*
		S2		S2		
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	24	100,0	24	100,0	1,000
HH-grupa	24	24	100,0	24	100,0	1,000
Ukupno	48	48	100,0	48	100,0	1,000

* MekNemarov test

5.2.6.2. Prosječan broj anaerobnih bakterija

U kavitetima u kojima je primjenjen ozon prosječan broj anaerobnih bakterija je iznosio oko $7,5 \cdot 10^5$ genskih kopija/mg prije primjene ozona, dok je poslije tretiranja kaviteta taj broj smanjen na $2,4 \cdot 10^5$ genskih kopija/mg ($p=0,001$). Prije dezinfekcije kaviteta hlorheksidinom prosječan broj anaerobnih bakterija je iznosio oko $8,7 \cdot 10^5$ genskih kopija/mg. Poslije primjene hlorheksidina broj anaerobnih bakterija je smanjen na $5,7 \cdot 10^5$ genskih kopija/mg ($p=0,001$) (tabela 16.).

Tabela 16. Prosječan broj anaerobnih bakterija prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj anaerobnih bakterija (broj genskih kopija/mg) ($\bar{X} \pm SD$)		p*
	S1	S2	
OZ-grupa	$7,5 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^6$	$2,4 \cdot 10^5 \pm 2,1 \cdot 10^5$	0,001
HH-grupa	$8,7 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^6$	$5,7 \cdot 10^5 \pm 1,6 \cdot 10^6$	0,001
Ukupno	$8,1 \cdot 10^5 \pm 1,2 \cdot 10^6$	$4,1 \cdot 10^5 \pm 1,1 \cdot 10^6$	<0,0001

* Vilkoksonov test ekvivalentnih parova

5.2.7. Efekti ozona i hlorheksidina na ukupan broj *Lactobacillus spp.* ispitivani metodom qPCR

5.2.7.1. Broj kaviteta sa *Lactobacillus spp.*

Lactobacillus spp. je izolovan u svim uzorcima karijesnog dentina i prije i poslije primjene antiseptika u grupi gdje je korišćen ozon kao i u grupi gdje je primjenjen hlorheksidin (tabela 17.).

Tabela 17. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Prisustvo <i>Lactobacillus spp.</i>						
Tretman	Ukupan broj uzoraka	S1		S2		p*
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	24	100,0	24	100,0	1,000
HH-grupa	24	24	100,0	24	100,0	1,000
Ukupno	48	48	100,0	48	100,0	1,000

* MekNemarov test

5.2.7.2. Prosječan broj *Lactobacillus spp.*

Prosječan broj bakterija je značajno snižen sa početnih $5,0 \cdot 10^4$ genskih kopija/mg na $3,5 \cdot 10^4$ genskih kopija/mg poslije tretiranja kaviteta ozonom ($p < 0,0001$). Izlaganje karijesnog kaviteta djelovanju hlorheksidina dovelo je do značajnog smanjenja prosječnog broja *Lactobacillus spp.* sa početnih $5,0 \cdot 10^4$ genskih kopija/mg na $1,7 \cdot 10^4$ genskih kopija/mg ($p < 0,0001$) (tabela 18.).

Tabela 18. Prosječan broj *Lactobacillus spp.* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Tretman	Ukupan broj <i>Lactobacillus spp.</i> (broj genskih kopija/mg) ($\bar{X} \pm SD$)		p*
	S1	S2	
OZ-grupa	$5,0 \cdot 10^4 \pm 1,4 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^4 \pm 1,0 \cdot 10^5$	$< 0,0001$
HH-grupa	$5,0 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$1,7 \cdot 10^4 \pm 5,1 \cdot 10^4$	$< 0,0001$
Ukupno	$5,0 \cdot 10^4 \pm 1,5 \cdot 10^5$	$2,6 \cdot 10^4 \pm 8,2 \cdot 10^4$	$< 0,0001$

* Vilkoksonov test ekvivalentnih parova

5.2.8. Efekti ozona i hlorheksidina na prisustvo vrste *L. casei/paracasei* ispitivani metodom PCR

5.2.8.1. Broj kaviteta sa *L. casei/paracasei*

Učestalost vrste *L. casei/paracasei*, izolovane metodom PCR, u karijesnim uzorcima prije i poslije dezinfekcije kaviteta u grupi tretiranoj ozonom i grupi tretiranoj hlorheksidinom prikazana je u tabeli 19. U grupi gdje je korišćen ozon, ova vrsta je izolovana iz polovine kaviteta i prije i poslije primjene lijeka ($p > 0,05$). U kavitetima gdje je korišćen hlorheksidin, *L. casei/paracasei* je izolovana iz 33,3% uzoraka prije primjene, odnosno iz 29,2% uzoraka poslije primjene komparatora ($p > 0,05$).

Tabela 19. Broj kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo *L. casei/paracasei* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i grupi tretiranoj hlorheksidinom (HH-grupa)

Prisustvo <i>L. casei/paracasei</i>						
Tretman	Ukupan broj uzoraka	S1		S2		p*
		broj uzoraka	%	broj uzoraka	%	
OZ-grupa	24	12	50,0	12	50,0	1,000
HH-grupa	24	8	33,3	7	29,2	1,000
Ukupno	48	20	41,7	19	39,6	1,000

* MekNemarov test

5.2.9. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina ispitivanog metodom qPCR

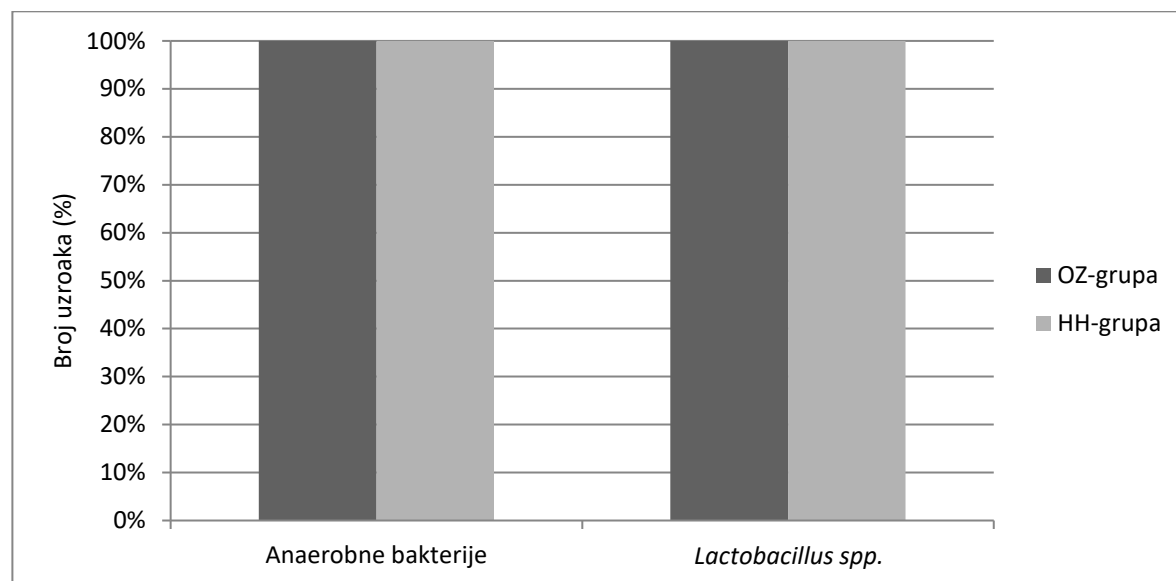
5.2.9.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na anaerobne bakterije i *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika

Iz svih kaviteta prije primjene antiseptika izolovane su anaerobne bakterije i *Lactobacillus spp.* i u grupi tretiranoj ozonom i u grupi tretiranoj hlorheksidinom ($p>0,05$) (grafikon 7.).

5.2.9.2. Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika

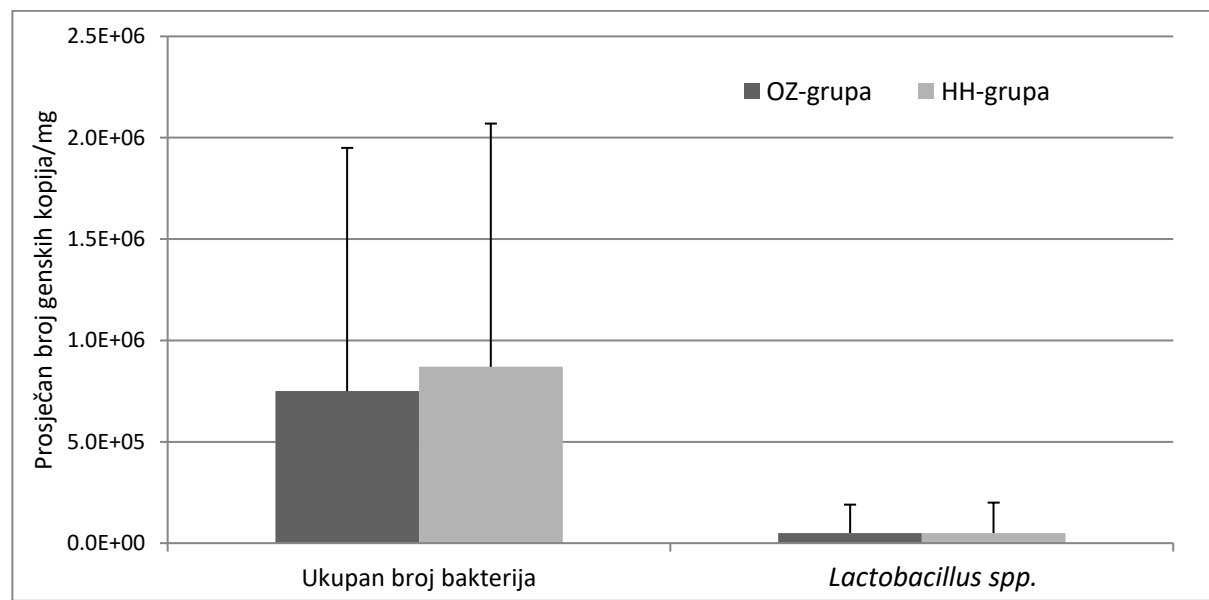
Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* prije dezinfekcije kaviteta između eksperimentalne i komparativne grupe prikazano je na grafikonu 8. Broj anaerobnih bakterija je bio nešto veći u komparativnoj grupi, dok je broj *Lactobacillus spp.* bio približno isti u obje ispitivane grupe, grupe tretirane ozonom i grupe tretirane hlorheksidinom ($p>0,05$).

Grafikon 7. Poređenje broja kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika (S1) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



Hi-kvadrat test

Grafikon 8. Poređenje prosječnog broja ($\pm$ SD) anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* prije primjene antiseptika (S1) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)

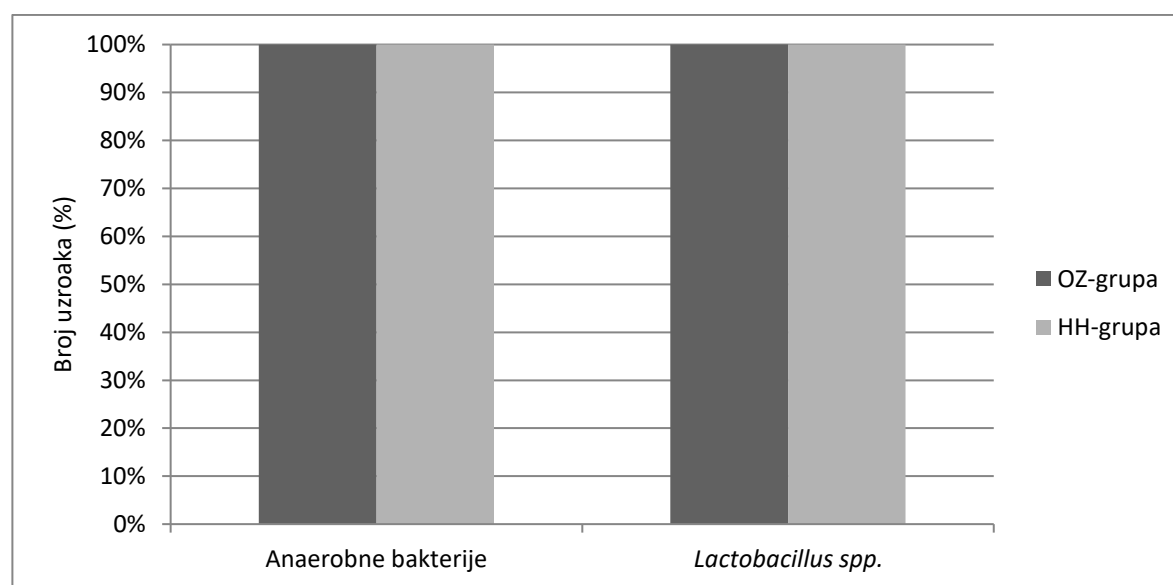


Man-Vitnijev test

5.2.9.3. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na anaerobne bakterije i *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika

Poslije primjene antiseptika anaerobne bakterije i *Lactobacillus spp.* su izolovane iz svih kaviteta i u eksperimentalnoj i u komparativnoj grupi ($p>0,05$) (grafikon 9.).

Grafikon 9. Poređenje broja kaviteta u kojima je zabilježeno prisustvo anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika (S2) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)

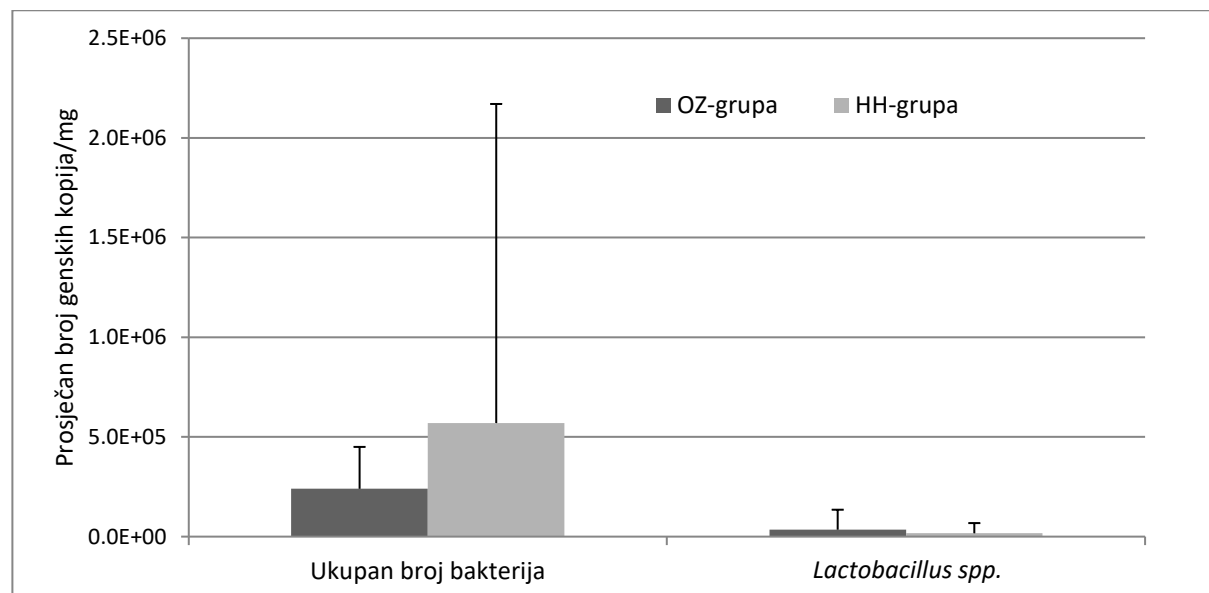


Hi-kvadrat test

5.2.9.4. Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika

Poređenje prosječnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika između eksperimentalne i komparativne grupe prikazano je na grafikonu 10. Poslije primjene antiseptika u komparativnoj grupi je zabilježen veći broj anaerobnih bakterija i manji broj *Lactobacillus spp.* u poređenju sa grupom gdje je korišćen ozon, ali ta razlika nije bila statistički značajna ($p>0,05$).

Grafikon 10. Poređenje prosječnog broja ($\pm$ SD) anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* poslije primjene antiseptika (S2) između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



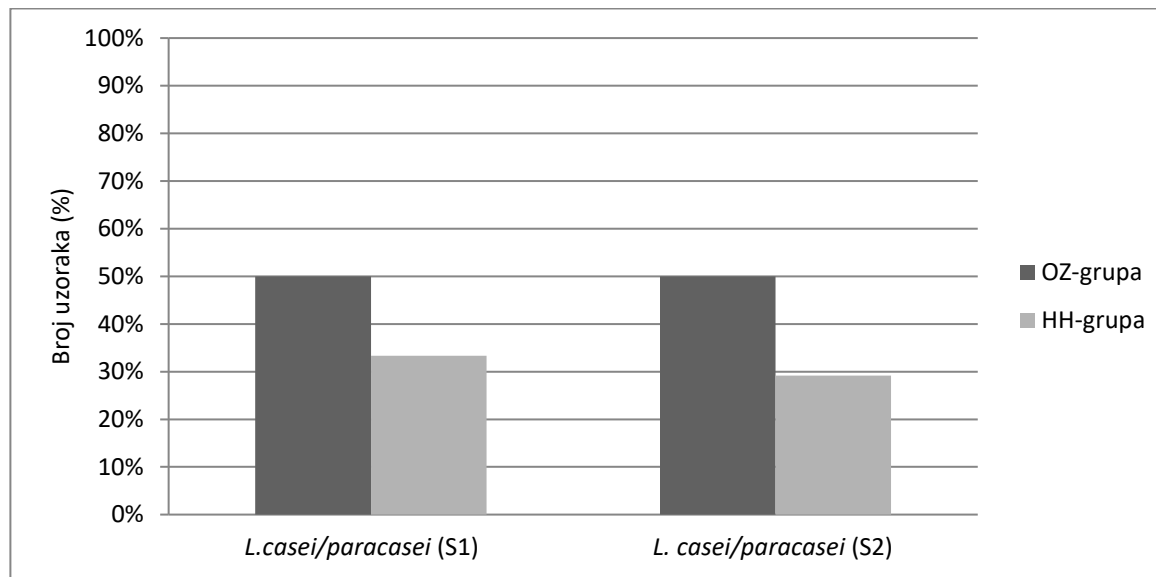
Man-Vitnijev test

5.2.10. Komparativna analiza antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina na vrstu *L. casei/paracasei* ispitivanog metodom PCR

5.2.10.1. Poređenje broja kaviteta pozitivnih na *L. casei/paracasei* prije i poslije primjene antiseptika

Poređenje učestalosti vrste *L. casei/paracasei* u karijesnim kavitetima prije i poslije primjene antiseptika između grupe tretirane ozonom i grupe tretirane hlorheksidinom prikazano je na grafikonu 11. Učestalost *L. casei/paracasei* je bila veća u karijesnim uzorcima u grupi gdje je korišćen ozon, i prije i poslije primjene lijeka, ali ta razlika nije bila statistički značajna ($p > 0,05$).

Grafikon 11. Poređenje broja kaviteta u kojima je izolovan *L. casei/paracasei* prije (S1) i poslije (S2) primjene antiseptika između grupe tretirane ozonom (OZ-grupa) i grupe tretirane hlorheksidinom (HH-grupa)



Hi-kvadrat test

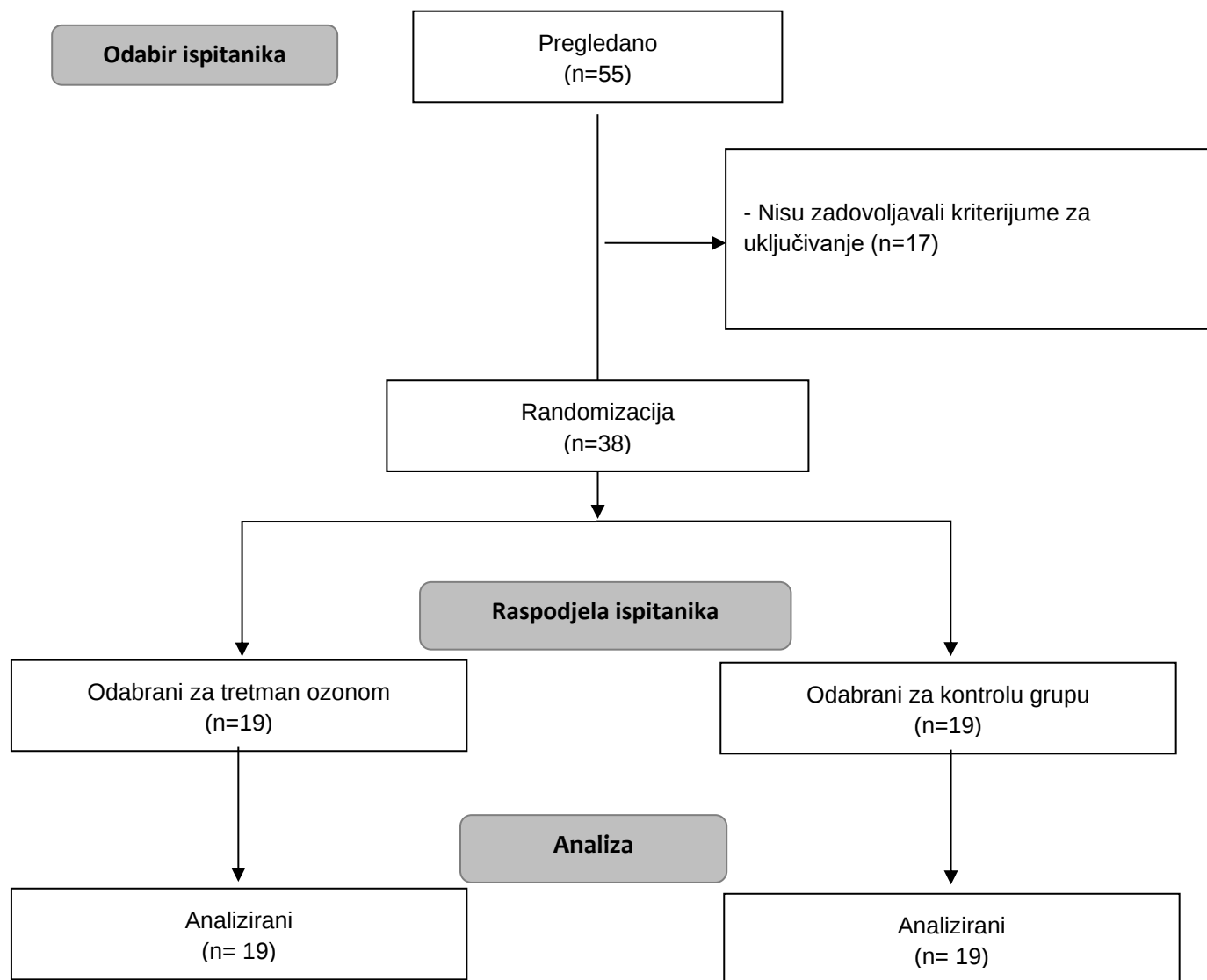
STUDIJA II

-biokompatibilnost ozona u odnosu na zubnu pulpu-

5.3. KARAKTERISTIKE ISPITANIKA I UZORKA

Dijagram 2. predstavlja tok odabira ispitanika i formiranje istraživačkih grupa. Pregledano je 55 osoba i njih 38, koje su ispunile kliničke i radiografske kriterijume, su uključene u istraživanje. Metodom slučajnog izbora ispitanici su podijeljeni u dvije grupe, eksperimentalnu, gdje je korišćen ozon (OZ-grupa) i kontrolnu. Kod svih ispitanika eksperimentalni protokol je sproveden u jednoj posjeti i svi uzorci pulpe su analizirani. Prilikom izvođenja terapijskog postupka nisu zabilježeni neželjeni efekti.

Dijagram 2. Odabir ispitanika i formiranje istraživačkih grupa



U tabeli 20. prikazane su karakteristike ispitanika uključenih u istraživanje u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi. U ispitivanoj populaciji veća je bila zastupljenost osoba ženskog pola: 73,7% u grupi tretiranoj ozonom i 84,2% u kontrolnoj grupi. Ispitanici u grupi gdje je korišćen ozon su imali između 20 i 40 godina (prosječna starost 26,9 godina), dok su ispitanici u kontrolnoj grupi imali između 18 i 40 godina (prosječna starost 25 godina). Nije zabilježena značajna razlika u pogledu pola i starosne strukture između grupa ($p>0,05$).

Tabela 20. Demografske karakteristike ispitanika u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i kontrolnoj grupi

Karakteristike ispitanika	Veličina uzorka (ukupno 38)		OZ-grupa (ukupno 19)		Kontrolna grupa (ukupno 19)		p*
	broj osoba	%	broj osoba	%	broj osoba	%	
Godine starosti (srednja vrijednost $\pm$ SD)	25,97 $\pm$ 6,07		26,95 $\pm$ 6,53		25,00 $\pm$ 5,59		0,330
Pol							
Žene	30	78,9	14	73,7	16	84,2	0,693
Muškarci	8	21,1	5	26,3	3	15,8	

* t-test za dva nezavisna uzorka za godine starosti; Hi-kvadrat test za pol

5.4. EFEKAT OZONA NA NIVO VEGF U ZUBNOJ PULPI

Koncentracije VEGF u grupi tretiranoj ozonom i kontrolnoj grupi su prikazane u tabeli 21. Koncentracije VEGF u zdravoj pulpi zuba čiji su kaviteti izloženi djelovanju gasnog ozona su značajno veće, za oko 24% u odnosu na vrijednosti dobijene za pulpe kontrolnih zuba ($p<0,0001$).

Tabela 21. Koncentracije VEGF u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i kontrolnoj grupi

Tretman	Ukupan broj uzorka	VEGF (pg/ml)			p*
		$\bar{X} \pm SD$	Rang		
			Min.	Max.	
OZ-grupa	19	1023,39 ± 176,59	738,00	1304,00	<0,0001
Kontrolna grupa	19	776,18 ± 207,13	511,00	1185,00	
Ukupno	38	899,79 ± 90,36	511,00	1304,00	

* t-test za dva nezavisna uzorka

5.5. EFEKAT OZONA NA NIVO SOD U ZUBNOJ PULPI

Tabela 22. prikazuje aktivnost SOD u eksperimentalnoj i kontrolnoj grupi. U pulpama zdravih zuba čiji su kaviteti tretirani ozonom aktivnost SOD je bila značajno manja, za oko 6%, u odnosu na kontrolne pulpe (p=0,002).

Tabela 22. Aktivnost SOD u grupi tretiranoj ozonom (OZ-grupa) i kontrolnoj grupi

Tretman	Ukupan broj uzorka	SOD (% inhibicije)			p*
		$\bar{X} \pm SD$	Rang		
			Min.	Max.	
OZ-grupa	19	88,69 ± 3,76	80,30	94,10	0,002
Kontrolna grupa	19	92,04 ± 2,39	87,08	95,23	
Ukupno	38	90,36 ± 3,54	80,30	95,23	

* t-test za dva nezavisna uzorka

A grayscale photograph of a human skull, viewed from the side. A dental probe is held against the right side of the skull, specifically pointing at a dark, irregular lesion on the maxilla. The probe has a long, thin metal shaft and a small, angled tip. The skull is light-colored with some darker areas, possibly indicating bone density or the lesion itself. The background is a plain, light color.

6.

DISKUSIJA

6. DISKUSIJA

U studiji I ispitivan je antiseptički efekat ozona na bakterije u dubokom karijesu poslije djelimičnog uklanjanja karijesnog tkiva. Primjenom kultivisanja ili molekularnih metoda (PCR ili qPCR) određen je ukupan broj bakterija i bakterija *Streptococcus spp.* i *Lactobacillus spp.*, kao i pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* prije i poslije primjene antiseptika. Antibakterijski efekat ozona poređen je sa 2% hlorheksidinom (komparator) jednim od najčešće korišćenih antiseptika za dezinfekciju kaviteta prije primjene restaurativnih materijala (Lafuente, 2012).

U ovom istraživanju je ispitivano ukupno 48 karijesnih lezija od 48 ispitanika. Broj uzoraka je određen prije početka istraživanja, na osnovu nalaza *in vitro* studije o antibakterijskoj efikasnosti gasnog ozona i 2% hlorheksidina, kultivisanjem bakterija (Müller i sar., 2007). Rezultati ove *in vitro* studije moguće da nisu najpodesniji za kontrolu veličine uzorka za ispitivanje efikasnosti antiseptika u kliničkim uslovima, posebno kada se u istraživanju primjenjuje qPCR metod. Međutim, razlog za uzimanje ove studije je taj što su u periodu dizajniranja istraživanja to bili jedini dostupni podaci. Za sada antibakterijska efikasnost ozona i hlorheksidina u *in vivo* uslovima komparativno je ispitivana samo u jednom istraživanju Hauser-Gerspach i sar. (2009), ali je korišćen 1% hlorheksidin. Uključivanjem samo jednog zuba kod jednog pacijenta, ograničen je statistički efekat grupisanja podataka (Schwendicke i sar., 2013a).

Pristrasnost prilikom biranja i randomizacije uzorka je veoma važan faktor u kliničkim istraživanjima kako bi se obezbjedila objektivnost i validnost rezultata (Schwendicke i sar., 2013a). U ovom istraživanju klinički postupak uzimanja uzoraka sproveo je jedan istraživač, u cilju obezbjeđivanje standardizovane procedure. Ispitanici i istraživač su bili upoznati kojoj terapijskoj grupi ispitanik pripada, jer zbog fizičko-hemijskih karakteristika primjenjenih antiseptika nije bilo moguće obezbjediti „slijep“ dizajn. Da bi se umanjila pristrasnost prilikom uzimanja uzoraka, pripadnost grupi je određena tek poslije uzimanja prvog uzorka karijesnog dentina izvlačenjem terapijskog protokola iz zapečaćene koverte. Uzorci su kodirani brojevima i njihova mikrobiološka analiza je vršena simultano, odnosno u istom aktu analizirani su uzorci dentina prije i poslije primjene antiseptika. Analize uzoraka kultivisanjem i molekularnim metodama (PCR i qPCR) su uradila dva istraživača, koja nisu učestvovala u kliničkom dijelu ispitivanja.

Uzorak karijesnog dentina uzet je prema metodologiji preporučenoj od strane Kidd i sar. (1993). Broj bakterija određen kultivisanjem nije izražen u jedinici mase (CFU/mg) već u jedinici volumena (CFU/ml), kao i u drugim sličnim istraživanjima (Toi i sar., 2003; Bönecker i sar., 2003; Orhan i sar., 2008; Duque i sar., 2009; Rolland i sar., 2011). Uzimajući u obzir da je ovom metodom omogućeno uzimanje sličnih količina karijesnog dentina različitih konzistencija sa mjesta uzorkovanja (Bjørndal i sar., 1997, Paddick i sar., 2005) i da je izvršena kalibracija istraživača na ekstrahovanim zubima prije početka istraživanja, može se pretpostaviti da nije postojala značajna razlika u količini uzorkovanog dentina između grupa.

Dobijeni rezultati pokazuju da ne postoji značajna razlika u demografskim karakteristikama ispitanika (pol, starosna dob) i kliničkih karakteristika uzorka (morfološka grupa zuba, površina zuba sa karijesom, vlažnost, konzistencija i boja karijesnog dentina) između ispitivanih grupa. Eksperimentalna i

komparativna grupa nisu se razlikovale u broju aerobnih i anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.* određenih kultivisanjem, kao ni u ukupnom broju anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* određenih metodom qPCR i učestalosti *L. casei/paracasei* određene PCR na početku istraživanja. Jedina značajna razlika je zabilježena u učestalosti vrsta *Lactobacillus spp.* i to *L. paracasei ssp. paracasei* 1 i *L. paracasei ssp. paracasei* 3 jer su izolovane samo u grupi tretiranoj hlorheksidinom kultivisanjem. Stoga, može se pretpostaviti da su sve promjene u broju bakterija zabilježene poslije primjene antiseptika posljedica njihovog direktnog djelovanja.

Identifikacija i određivanje ukupnog broja bakterija (aerobnih i anaerobnih), *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, kao i pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* izvršena je kultivisanjem. Kultivisanje je metod koji se najčešće koristi za određivanje broja i vrste bakterija u karijesnim kavitetima, kao i za ispitivanje efikasnosti različitih antibakterijskih protokola u terapiji karijesa (Frencken i sar., 2007; Orhan i sar., 2008; Duque i sar., 2009; Rolland i sar., 2011; Maltz i sar., 2012a). Ovaj metod se karakteriše zasijavanjem inokuluma odmah po uzimanju uzorka na odgovarajućim hranjivim podlogama u precizno definisanim laboratorijskim uslovima. U našem istraživanju, prosječan broj aerobnih i anaerobnih bakterija, *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.*, određen kultivisanjem poslije djelimičnog uklanjanja karijesa, a prije primjene antiseptika je u okvirima onih koji su zabilježeni u drugim sličnim istraživanjima (Bjørndal i Larsen, 2000; Bönecker i sar., 2003; Orhan i sar., 2008).

Bakterijski sastav lezije predstavlja odraz lokalnih uslova sredine, uključujući i karakteristike same lezije. Sve lezije su prije primjene antiseptika klasifikovane na osnovu boje, vlažnosti i konzistencije tkiva kako bi se ispitao mogući uticaj ovih kliničkih karakteristika na bakterijski sastav. Rezultati korelacione analize su pokazali da sva tri ispitivana klinička parametra lezije međusobno značajno koreliraju. Kako se konzistencija tkiva mijenja od mekših ka tvrdim, tako se mijenja i vlažnost, od vlažnijih ka suvim karijesnim masama, i boja, od svjetlijih ka tamnijim nijansama. Ovi rezultati su u skladu sa nalazima koji ukazuju na povezanost boje i konzistencije dentina kao i na povezanost vlažnosti i konzistencije (Orhan i sar., 2008; Corralo i Maltz, 2013). Rezultati istraživanja o povezanosti kliničkih karakteristika lezija i broja bakterija pokazuju da je ukupan broj bakterija, kao i broj *S. mutans* i *Lactobacillus spp.* je značajno veći u lezijama sa mekšim i vlažnijim karijesnim masama (Ayna i sar., 2003; Orhan i sar., 2008). U našem istraživanju broj *Lactobacillus spp.* je značajno veći u karijesnim lezijama mekše konzistencije, što ukazuje na veću bakterijsku aktivnost u razmekšanom u poređenju sa čvršćim dentinom. Postoje analize koje pokazuju da boja karijesnog dentina nije povezana sa stepenom bakterijske infekcije tako da boja nije adekvatan parametar za dijagnostikovanje oboljenja i određivanje aktivnosti lezije (Orhan i sar., 2008; Lula i sar., 2011; Corralo i Maltz, 2013). Ipak, veoma čest nalaz u karijesnim kavitetima jesu karijesne lezije tamnije boje i mekše konzistencije, što ukazuje na određenu aktivnost lezije. U prilog tome govori i nalaz o značajnoj povezanosti *Streptococcus spp.* sa lezijama tamnije boje u našem istraživanju.

Poslije primjene ozona u trajanju od 40 sekundi na karijesni dentin, kultivisanjem bakterija zabilježeno je značajno smanjenje ukupnog broja bakterija za 75,4%, za aerobne, odnosno za 79% za anaerobne bakterije u poređenju sa vrijednostima prije primjene antiseptika. Slično smanjenje ukupnog broja bakterija je zabilježeno i poslije primjene 2% hlorheksidina u trajanju od 60 sekundi (77,2% za aerobne i 80% za anaerobne bakterije). Razlika između eksperimentalne i komparativne grupe nije bila statistički

značajna. Pored efekta na ukupan broj bakterija, oba terapijska protokola su dovela i do značajnog smanjenja ukupnog broja *Lactobacillus spp.* i *Streptococcus spp.*, kao i smanjenje učestalosti, iako ne značajnog, pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.*. Poređenjem antibakterijskog efekta između grupa uočeno je da je broj *Lactobacillus spp.* bio značajno manji, a broj *Streptococcus spp.* značajno veći poslije primjene ozona u poređenju sa hlorheksidinom. Takođe, broj kaviteta iz kojih su izolovane pomenute bakterijske vrste je bio značajno veći poslije primjene ozona u poređenju sa hlorheksidinom. Posmatrano u odnosu na vrstu, značajna razlika je zabilježena u učestalosti *L. paracasei ssp. paracasei* 1, koja je izolovana u većem broju iz kaviteta u komparativnoj grupi, ali treba imati u vidu da je značajna razlika u učestalosti ove vrste između grupa zabilježena i prije primjene antiseptika. Iako nisu doveli do potpune eliminacije bakterija, značajno smanjenje broja bakterija u karijesnom tkivu poslije primjene ozona i hlorheksidina u ovom istraživanju ukazuje na značaj primjene antiseptika u indirektnoj terapiji dobrog karijesa.

Pored velikog broja *in vitro* i *in situ* istraživanja (Nagayoshi i sar., 2004; Polydorou i sar., 2006; Müller i sar., 2007; Castillo i sar., 2008; Johansson i sar., 2009; Polydorou i sar., 2012; Kollmuss i sar., 2014), samo u nekoliko studija ispitivan je efekat ozona na kariogene bakterije u kliničkim uslovima primjenom metode kultivisanja. U dvije studije zabilježeno je značajno smanjenje broja bakterija poslije djelovanja ozona, ali bez poređenja rezultata sa kontrolnom grupom. Baysan i Lynch (2007) su, ispitujući uticaj ozona na mikroorganizme u primarnim karijesnim lezijama korijena i njegov efekat na progresiju oboljenja, našli da primjena ozona u trajanju od 10 ili 20 sekundi značajno smanjuje ukupan broj mikroorganizama. Takođe, na kontrolnim pregledima 3 i 5,5 mjeseci poslije primjene ozona autori su našli da je kod 50,8% od analiziranih lezija došlo do očvršćavanja dentina, kod 41,5% do smanjenja indeksa oštećenja sa vrijednosti 2 na vrijednost 1, a kod 7,7% lezija nisu zabilježili nikakve promjene poslije primjene ozona u trajanju od 10 ili 20 sekundi. Klinička studija Dukić i sar. (2013) ukazuje da primjena ozona u trajanju od 40 sekundi na karijesni dentin u dubokim karijesnim lezijama na stalnim molarima dovodi do značajnog smanjenja ukupnog broja bakterija, kao i *S. mutans* i *Lactobacillus spp.*.

Nalazi o antibakterijskoj efikasnosti hlorheksidina na karijesni dentin u kliničkim uslovima su različiti. Ersin i sar. (2006) su ispitivali uticaj atraumatske restaurativne terapije, kao i antibakterijski uticaj hlorheksidina kao dezinficijensa u karijesnim kavitetima, i to istog oblika koji je korišćen u našem istraživanju. Autori su uočili da je 6 mjeseci od završene restaurativne terapije, primjena hlorheksidina dovela do značajnog smanjenja broja bakterija u poređenju sa kontrolnom grupom, u kojoj nije korišćen antiseptik za dezinfekciju. Frencken i sar. (2007) su ispitivali efekat dodavanja hlorheksidina glas jonomer cementu u cilju poboljšavanja njegovog antibakterijskog djelovanja u karijesnim kavitetima. Autori su zabilježili da 7 dana poslije primjene, kombinacija ova dva materijala značajno smanjuje ukupan broj bakterija u karijesnom i od karijesa očišćenom dentinu i da je to smanjenje značajno veće u poređenju sa kontrolnom grupom (konvencionalni glas jonomer cement). Sa druge strane, Wicht i sar. (2004) nisu zabilježili značajan antibakterijski efekat laka koji predstavlja kombinaciju 1% hlorheksidina i 1% timola na ukupan broj bakterija 6 nedjelja poslije primjene na karijesno tkivo za razliku od kombinacije demeklociklina (antibiotika) i triamcinolona (kortikosteroida) u obliku paste.

Samo u jednoj kliničkoj studiji poređen je efekat gasnog ozona u odnosu na 1% hlorheksidin, kao pozitivnu kontrolnu grupu, na bakterije koje se nalaze u karijesnim kavitetima mliječnih molara (Hauser-Gerspach i

sar., 2009). Rezultati pomenutog istraživanja pokazuju da primjena gasnog ozona u trajanju od 30 sekundi i 1% hlorheksidina u istom trajanju ne dovodi do značajnog smanjenja broja bakterija u otvorenim karijesnim lezijama mliječnih molara. Značajno smanjenje nije zabilježeno ni poslije djelimičnog uklanjanja karijesa ni u jednoj od ispitivanih grupa, što je u suprotnosti sa rezultatima našeg istraživanja. Razlika u odnosu na naše istraživanje se može pripisati velikom broju bakterija u karijesnom dentinu prije uklanjanja karijesa i primjene antiseptika (log 7,9-odgovara približno 100 miliona ćelija) i u uzorcima dentina poslije djelimičnog uklanjanja karijesa i primjene antiseptika (log 7,5) u pomenutoj studiji. Naime, smanjenje broja bakterija je izražajnije ukoliko je početni broj bakterija manji u odnosu na one karijesne lezije koje karakteriše prisustvo većeg broja bakterija (Thanomsub i sar., 2002), kao što je u istraživanju Hauser-Gerspach i sar. (2009). U obzir treba uzeti i da se bakterijski sastav karijesnih lezija mliječnih zuba značajno razlikuje i manje je raznolik od sastava bakterija koje se nalaze u karijesnim lezijama stalnih zuba (Aas i sar., 2008). Naime, efikasnost antibakterijskih supstanci zavisna je od vrste bakterija na koje djeluju. Važan faktor koji determiniše antibakterijsko djelovanje je i doza primjenjenog antiseptika. U pomenutom istraživanju korišćen je zatvoreni sistem generatora ozona (HealOzone, KaVo, Biberach, Germany) koji proizvodi ozon u tačno određenoj koncentraciji, od 2100 ppm i protoku od 613 cm³/min. Sa druge strane generator ozona primjenjen u našem istraživanju pripada otvorenom sistemu generatora. Prema uputstvu proizvođača generator stvara 2,9 mg/s ozona (AV sonda intnezitet 5), odnosno na mjestu primjene od 1 do 300 000 ppm ozona zavisno od izabranog programa, što predstavlja ograničenje ovog načina primjene antiseptika. Prednost u odnosu na zatvoreni sistem se ogleda u tome što preko posebnih nastavaka-sondi, ozon može biti primijenjen i na manje dostupna mjesta (parodontalni džep i kanal korijena). Pored razlike u koncentracijama ozona, koncentracija primjenjenog 2% hlorheksidina kao komparatora u našem istraživanju je veća od koncentracije primjenjene u studiji Hauser-Gerspach i sar. (2009), gdje je korišćen 1% hlorheksidin.

Identifikacija i kvantifikacija ukupnog broja anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* i vrste *L. casei/paracasei* izvršena je i primjenom molekularnih metoda: qPCR ili PCR. Analiza broja bakterija qPCR pokazuje da se poslije primjene ozona od 40 sekundi značajno smanjuje broj anaerobnih bakterija (68%) i *Lactobacillus spp.* (30%) od početnih vrijednosti, dok je učestalost *L. casei/paracasei*, određena PCR, ostala skoro nepromijenjena. Hlorheksidin (2%) primjenjen u trajanju od 60 sekundi je doveo do značajnog smanjenja broj anaerobnih bakterija, za 34,5%, i broja *Lactobacillus spp.*, za 66%, od vrijednosti koje su zabilježene prije primjene antiseptika. Vrsta *L. casei/paracasei* je poslije primjene hlorheksidina izolovana iz sedam od osam kaviteta koji su bili pozitivni na ovu vrstu prije primjene antiseptika. Komparativna analiza nije pokazala postojanje značajne razlike u antibakterijskoj efikasnosti između ozona i hlorheksidina. Značajno smanjenje broja bakterija poslije primjene antiseptika određeno qPCR metodom, pored već zabilježenog smanjenja broja bakterija kultivisanjem, pokazuje na značaj primjene ozona i hlorheksidina u indirektnoj terapiji dubokog karijesa. Uzimajući u obzir da su molekularne metode korišćene za ispitivanje efikasnosti restaurativnih protokola u veoma malom broju studija (Gu i sar., 2010), kao i da u tim studijama nije ispitivana efikasnost ozona i/ili hlorheksidina, nije moguće izvršiti komparativnu analizu dobijenih rezultata.

PCR predstavlja molekularni metod koji omogućava kvalitativnu identifikaciju određenog mikroorganizma primjenom prajmera za specifičan gen. Nedostatak ove metode, u nemogućnosti kvantifikacije broja

mikroorganizama, prevaziđen je qPCR. qPCR predstavlja enzimsku reakciju u kojoj se dva sintetska oligonukleotidna prajmera i fluorescentna proba hibridizuju sa nukleotidnom baznom sekvencom koja je karakteristična za ciljani organizam u uzorku. Praćenjem oslobađanja fluorescence sa svakim PCR ciklusom, progresija reakcije i količina DNK mogu da se prate u funkciji vremena, čime je omogućeno određivanje ukupnog broja mikroorganizama, bakterija ili pojedinih bakterijskih vrsta. U našem istraživanju ukupan broj anaerobnih bakterija i *Lactobacillus spp.* određen metodom qPCR kao i učestalosti *L. casei/paracasei* određena PCR su značajno veće u poređenju sa vrijednostima dobijenim kultivisanjem, što je u skladu sa nalazima i drugih studija gdje je komparirana osjetljivost ove dvije metode identifikacije i kvantifikacije bakterija (Nadkarni i sar., 2002; Martin i sar., 2002; Byun i sar., 2004). Veći broj kopija gena u odnosu na broj kolonija određen kultivisanjem, posljedica je veće osjetljivosti qPCR, kojom može da se detektuje između 10 i 10^8 ćelija (Heid i sar., 1996). Osim teoretski veće osjetljivosti qPCR, veći broj bakterija određen ovom molekularnom metodom je posljedica i nekih ograničenja kultivisanja. U slučajevima kada se bakterije nalaze u agregatima, kao što je slučaj sa dentalnim plakom i karijesom, disperzija bakterija u pojedinačne ćelije prije zasijavanja na hranjive podloge može biti nepotpuna poslije miješanja uzorka. Sa druge strane, pretjerano miješanje koje se koristi u toku kultivisanja može dovesti do smrti ćelije. Takođe, mogu se kultivisati samo žive ćelije, ukoliko se bakterijama obezbjede metaboličke i fiziološke potrebe koje imitiraju uslove *in vivo*. Uzmajući u obzir kompleksnost oralne flore i specifične nutritivne potrebe pojedinih bakterija nekada je ove uslove teško obezbjediti u eksperimentalnim uslovima. Smatra se da oko 50% oralne flore još uvijek nije moguće kultivisati (Nadkarni i sar., 2002). Treba uzeti u obzir i da jedna kolonija na hranjivoj podlozi ne predstavlja uvijek jednu bakterijsku ćeliju, što je još jedan od razloga manjeg broja bakterija određenih kultivisanjem. Jedan od glavnih nedostataka qPCR metode je što određuje DNK ne samo živih već i mrtvih i liziranih ćelija u uzorku. Tako, stres i oštećenja bakterija uzrokovani djelovanjem antiseptika kao i promjene u njihovoj metaboličkoj aktivnosti (Fogel i sar., 1999) mogu uticati na veći broj bakterija određenih qPCR metodom u poređenju sa kultivisanjem. Primjena „reverse-transcriptase“ qPCR (RT-qPCR), kojom se određuje broj samo metabolički aktivnih bakterija, mogla bi dati realniju sliku o odnosu kultivisanja i molekularnih metoda u određivanju broja bakterija u karijesnim uzorcima, kao i efikasnosti pojedinih terapijskih protokola.

Imajući u vidu da je qPCR osjetljivija metoda za kvantifikaciju bakterija u odnosu na kultivisanje bakterija sa jedne strane, i sa druge strane naše nalaze da se antibakterijski efekat ozona i hlorheksidina ne razlikuje metodom qPCR, zapažene razlike između antibakterijskog efekta ozona i hlorheksidina prema *Lactobacillus spp.* odnosno *Streptococcus spp.* dobijene kultivisanjem su najvjerovatnije posljedica manje osjetljivosti metode kultivisanja, a ne razlike u antibakterijskom efektu ozona i hlorheksidina.

U studiji II ispitivana je biokompatibilnosti ozona u odnosu na tkivo pulpe određivanjem nivoa VEGF i SOD poslije njegove primjene na otvorene dentinske kanaliće u trajanju od 40 sekundi.

Istraživanjem su obuhvaćeni klinički zdravi i intaktni zubi, bez znakova patoloških promjena u pulpnom tkivu ili apeksnom i lateralnom parodoncijumu. Između ispitanika eksperimentalne i kontrolne grupe nije zabilježena značajna razlika u pogledu pola i starosne strukture, uzimajući u obzir da pojedini autori nalaze da starenje ima uticaj na nivo VEGF i SOD u zubnoj pulpi (Davis i sar., 1991; Matsuzaka i sar., 2008). Na svakom zubu ispreparisani su duboki kaviteti (2/3 debljine dentina) da bi se imitirali uslovi koji odgovaraju upotrebi ozona kao odontoantiseptika u terapiji dubokog karijesa. Preparacija kaviteta je sprovedena uz obilno hlađenje i rotirajući instrumenti su mijenjani poslije svake četvrte preparacije da se spriječi uticaj toplote na tkivo pulpe (Costa i sar., 2011). Naime, postoje nalazi koji ukazuju da preparacija kaviteta može dovesti do inflamatorne reakcije u pulpi i povećanja nivoa SOD (Baumgardner i sar., 1999; Varavara i sar., 2012).

Klinički postupak uzimanja uzoraka sproveo je jedan istraživač, u cilju obezbjeđivanja standardizovane procedure. Ispitanici i istraživač su bili upoznati kojoj terapijskoj grupi ispitanik pripada zbog fizičko-hemijskih karakteristika generatora ozona. Da bi se umanjila pristrasnost prilikom uzimanja uzoraka, pripadnost grupi je određena tek poslije završene preparacije kaviteta, izvlačenjem terapijskog protokola iz zapečaćene koverta. Uzorci su kodirani brojevima i analiza je sprovedena od strane osobe koja nije učestvovala u kliničkom dijelu istraživanja.

VEGF je faktor rasta čije prisustvo utiče na vitalnost i funkcionalnosti ćelija (Paranjpe i sar., 2007). Iako postoje istraživanja o nivou VEGF u zdravoj pulpi, ovakvih podataka nema za pulpu izloženu djelovanju ozona. Rezultati ove studije, dobijene ELISA imunoesejom, su pokazali da je koncentracija VEGF u zdravoj pulpi bila 776,2 pg/ml. Ovi nalazi su u skladu sa rezultatima Tran-Hung i sar. (2008) koji su supernatantima dobijenim iz kulture intaktnih ćelija humane pulpe odredili nivo VEGF od 769 pg/ml. Ilić i sar. (2012) su našli koncentraciju VEGF od 68 pg/mg u zubnoj pulpi zdravih osoba, a Roberts-Clark i Smith (2000) su u rastvorljivoj frakciji dentina našli koncentraciju VEGF od 63 pg/mg. Koncentracija VEGF u pulpi 20 minuta poslije primjene ozona na otvorene dentinske kanaliće zdravih zuba u trajanju od 40 sekundi je bila značajno veća u poređenju sa vrijednošću koja je dobijena za kontrolnu pulpu i iznosila je 1023,4 pg/ml. Povećanje nivoa VEGF u zubnoj pulpi ukazuje da ozon može da penetrira kroz dentinske kanaliće i ispolji uticaj na tkivo pulpe poslije primjene u dubokim kavitetima. Prema nekim studijama ozon ispoljava antibakterijsko djelovanje u debljini dentina do 2 mm (Hugh, 2005), ali bez horizontalne difuzije sa mjesta primjene (Nakano i sar., 2012). Sa druge strane, važno je napomenuti da vodonik peroksid, jedan od produkata raspadanja ozona, zbog rastvorljivosti u vodi i male molekulske mase, lako penetrira kroz dentinske kanaliće do tkiva pulpe (Kwon i sar., 2013; Berger i sar., 2013).

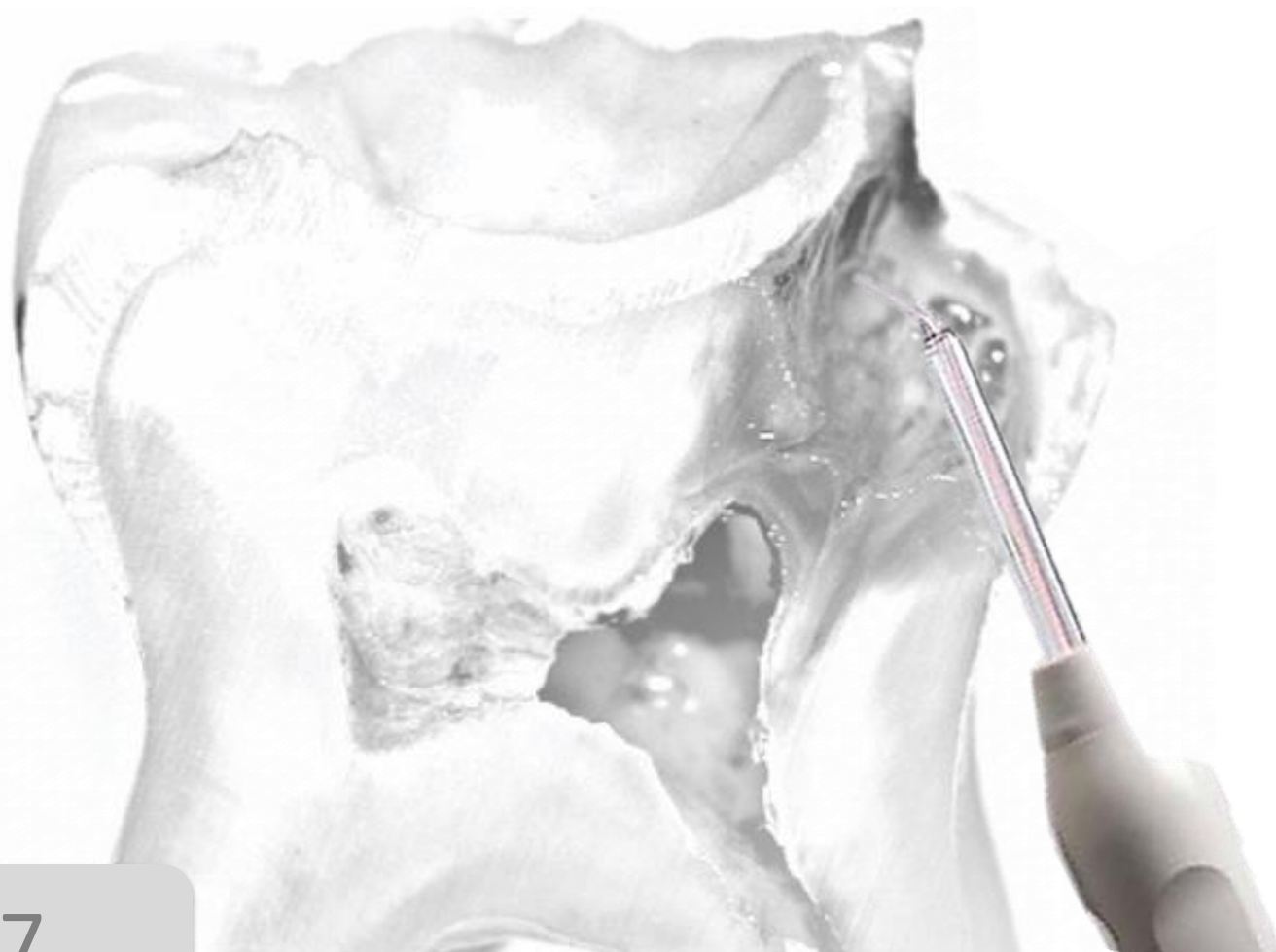
Istraživanja pokazuju da ozon u krvi dovodi do povećanja koncentracije transformišućeg faktora rasta b1 (TGF-b1), faktora rasta trombocita (PDGF), interferona α , β i γ , interleukina 1, 2, 6 i 8 (Bocci i sar., 1998; Bocci 1999; Bocci 2005; Re i sar., 2010). Kim i sar. (2009) su pokazali da lokalna primjena ozona na akutno izazvano oštećenje kože eksperimentalnih životinja povećava nivo PDGF, TGF i VEGF i ubrzava zarastanje oštećenog tkiva. Povećanje vaskularizacije i nivoa VEGF poslije primjene ozona povezuje se sa stvaranjem ROS, produkata raspadanja ozona, i to u prvom redu vodonik peroksida. Poluživot vodonik peroksida u

krvi je veoma kratak, 0,5-1 minuta, jer biva neutralisan od strane antioksidativnog sistema organizma, ali ipak dovoljno dug da aktivira brojne biološke procese među kojima i angiogenezu (Sagai i Bocci, 2011; Pecorelli i sar., 2013). Pokazano je da ekstraćelijski vodonik peroksid stimuliše ekspresiju VEGF-A i VEGFR-2 receptora (receptori za koje se VEGF-A vezuje)(Roy i sar., 2008). Intraćelijski vodonik peroksid je neophodan za uspješnu propagaciju angiogenih signala koji nastaju poslije vezivanja VEGF-A za VEGFR-2 i njegove sljedstvene aktivacije (Roy i sar., 2008).

VEGF je faktor rasta uključen u mnogim fiziološkim i patološkim procesima. Povećan nivo VEGF odgovoran je za patološke promjene kod nekih bolesti, kao što su dijabetes melitus ili neoplazme, tako da je primarni cilj u terapiji ovih oboljenja smanjenje efekata VEGF (prevenstveno angiogeneze) (Ho i sar., 2012, Eichten i sar., 2013). Sa druge strane, povećanje nivoa VEGF, koje je značajno manje od patološki povećanog nivoa VEGF, poželjno je tokom procesa zarastanja rana (Maulik, 2006). U tkivu pulpe VEGF je odgovoran za angiogenezu koja prethodi formiranju reparativnog dentina kao i za diferencijaciju odontoblasta i njihovu aktivnost (Matsushita i sar. 2000; Scheven i sar. 2008). Značajno je istaći da naši rezultati pokazuju da je nivo VEGF u zdravoj, netretiranoj pulpi sličan nivou VEGF koji je dobijen u istim uslovima u drugim studijama (Tran-Hung i sar., 2008; Ilić i sar., 2012). Ovaj nalaz najprije ukazuje na farmakokinetičko svojstvo ozona i njegovih produkata da efikasno prolaze kroz dentinske kanaliće i dopjevaju do pulpnog tkiva. Sa druge strane, povećan nivo VEGF od oko 24% u tkivu pulpe poslije primjene ozona korespondira sa prolaznim povećanjem VEGF koje nastaje poslije mehaničke povrede pulpnog tkiva (oko 23%), kako su to pokazali Tran-Hung i sar. (2008). Međutim, isti autori su pokazali značajno dozno zavisno povećanje VEGF za oko 31% odnosno oko 49% poslije primjene 50 μ M i 100 μ M HEMA (monomer koji ulazi u sastav dentalnih adheziva i kompozita) (Tran-Hung i sar., 2008). Imajući to u vidu, može se pretpostaviti da je ozon biokompatibilniji u odnosu na HEMA. Na biokompatibilnost ozona još više ukazuje podatak da u toku dijabetes melitusa tip 2 patološki porast VEGF u pulpi u odnosu na kontrolne uslove iznosi oko 33% (Ilić i sar., 2012) što je znatno više od onog koji je dobijen poslije primjene ozona (oko 24%). Na kraju treba istaći da povećani nivo VEGF zapažen u našoj studiji najvjerovatnije korespondira sa njegovim remineralizacionim potencijalom, koji je zabilježen u pojedinim kliničkim studijama (Baysan i Lynch, 2004).

Uzimajući u obzir oksidativni potencijal ozona i stvaranje sekundarnih glasnika, ROS i produkata lipidne oksidacije (engl. *Lipid oxydation products* (LOP)), od važnosti je ispitati njegov mogući uticaj na aktivnost antioksidativnih enzima pulpe. SOD se smatra jednim od najvažnijih antioksidativnih enzima, čije je prisustvo dokazano u tkivu pulpe u fiziološkim uslovima (Davis i sar., 1991; Bödör i sar., 2007). SOD ima ulogu u zaštiti ćelija od nekroze i matriksa od degradacije što omogućava reparaciju tkiva tokom inflamacije (Davis i sar., 1991). U ovom istraživanju nivo SOD u zdravoj pulpi kontrolnih zuba je iznosio 92% i bio je značajno veći od onog koji je zabilježen u pulpama izloženim djelovanju ozona (88,7%). U većem broju istraživanja pokazano je da ponovljena primjena ozona u toku dužeg vremenskog perioda (od nekoliko dana do nekoliko nedjelja) povećava antioksidativni status kod pacijenata sa koronarnom bolešću i dijabetičnim stopalom posredstvom povećanja nivoa SOD i drugih antioksidativnih enzima (Martínez-Sánchez i sar., 2005; Martínez-Sánchez i sar., 2012; Re i sar., 2014). Nasuprot tome, u našem istraživanju ispitivan je neposredni efekat jednokratne primjene ozona. U vezi sa tim značajno je istaći da poslije kontakta sa organskim materijama u krvi ozon veoma brzo nestaje (za 2 minute) uz stvaranje ROS i LOP. Nastali ROS izaziva prolazno smanjenje antioksidativnog rezervoara krvi, za 2-25% u zavisnosti od

primijenjene doze, koje se koriguje za manje od 20 minuta (Bocci, 2005). Može se smatrati da je SOD u pulpi smanjen za oko 3% zato što je to količina SOD koja je utrošena za smanjenje ROS izazvanog jednokratnom primjenom ozona u preparisani kavitet zuba. Odsustvo povećanja nivoa SOD neposredno poslije tretiranja ozonom indirektno ukazuje na činjenicu da preparacija kaviteta nije dovela do inflamatornih promjena u pulpi, kako je nađeno u drugim studijama (Varvara i sar., 2012). Moguće je da bi produžavanje opservacionog perioda, poslije jednostruke primjene, ili ponovljene aplikacije, kako je preporučeno u terapiji karijesa, bilo povezano sa povećanjem nivoa antioksidativne zaštite, što bi ukazalo na značajnu ulogu ozona u odgovoru pulpe na povredu i infekciju.



7.

ZAKLJUČCI

7. ZAKLJUČCI

1. Jednokratna primjena ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjena 2% hlorheksidina, kao antiseptika, prouzrokuje značajno smanjenje ukupnog broja aerobnih i anaerobnih bakterija. Rezultati dobijeni kultivisanjem bakterija.
2. Jednokratna primjena ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjena 2% hlorheksidina, kao antiseptika, prouzrokuje značajno smanjenje ukupnog broja *Lactobacillus spp.* Rezultati dobijeni kultivisanjem bakterija.
3. Nema razlike u učestalosti pojedinih vrsta *Lactobacillus spp.* poslije jednokratne primjene ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjene 2% hlorheksidina, kao antiseptika. Rezultati dobijeni kultivisanjem bakterija.
4. Jednokratna primjena ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjena 2% hlorheksidina, kao antiseptika, prouzrokuje značajno smanjenje ukupnog broja bakterija *Streptococcus spp.* Rezultati dobijeni kultivisanjem bakterija.
5. Jednokratna primjena ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjena 2% hlorheksidina, kao antiseptika, prouzrokuje značajno smanjenje ukupnog broja anaerobnih bakterija. Rezultati dobijeni qPCR metodom.
6. Jednokratna primjena ozona u preparisani kavitet zuba kao i primjena 2% hlorheksidina, kao antiseptika, prouzrokuje značajno smanjenje ukupnog broja *Lactobacillus spp.* Rezultati dobijeni qPCR metodom.
7. Nema razlike u učestalosti vrste *L. casei/paracasei* poslije jednokratne primjene ozona kao i 2% hlorheksidina, kao antiseptika u preparisani kavitet zuba. Rezultati dobijeni PCR metodom.
8. Komparativna analiza rezultata o antibakterijskoj efikasnosti jednokratno primjenjenog ozona i 2% hlorheksidina u ispreparisan kavitet zuba pokazuje da su oba antiseptika podjednako efikasna.
9. Poslije jednokratne primjene ozona kao antiseptika u kavitet zuba nivo VEGF u tkivu zubne pulpe je povećan u odnosu na kontrolne netretirane kavitete što ukazuje da ozon i njegovi produkti prolaze kroz dentinske kanaliće i povećavaju nivo VEGF (farmakokinetički aspekt), kao i da je ta količina biokompatibilna sa pulpnim tkivom; šta više da je taj VEGF uključen u procese reparativne dentinogeneze.
10. Poslije jednokratne primjene ozona kao antiseptika u kavitet zuba nivo SOD u tkivu zubne pulpe je za oko 3% smanjen u odnosu na nivo u kontrolnim netretiranim kavitetima što ukazuje da je ozon aktivirao antioksidativni sistem zubne pulpe.

A grayscale photograph of a human skull, viewed from the side. A dental probe is held against the upper jaw area. The skull is positioned in the upper half of the frame, with the lower half being a solid dark gray background.

8.

L I T E R A T U R A

8. LITERATURA

1. Aas JA, Griffen AL, Dardis SR, Lee AM, Olsen I, Dewhirst FE, Leys EJ, Paster BJ. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. *J Clin Microbiol* 2008;46:1407-1417.
2. Aldridge WN. The biochemical principles of toxicology. *Exp Toxicol* 1993;5:56-78.
3. Alkahtani A, Alkahtany SM, Anil S. An in vitro evaluation of the cytotoxicity of varying concentrations of sodium hypochlorite on human mesenchymal stem cells. *J Contemp Dent Pract* 2014;15:473-481.
4. Almazin SM, Dziak R, Andreana S, Ciancio SG. The effect of doxycycline hyclate, chlorhexidine gluconate, and minocycline hydrochloride on osteoblastic proliferation and differentiation *in vitro*. *J Periodontol* 2009;80:999-1005.
5. Al-Omari WM, Al-Omari QD, Omar R. Effect of cavity disinfection on postoperative sensitivity associated with amalgam restorations. *Oper Dent* 2006;31:165-170.
6. Al-Zayer MA, Straffon LH, Feigal RJ, Welch KB. Indirect pulp treatment of primary posterior teeth: a retrospective study. *Pediatr Dent* 2003;25:29-36.
7. Amaral KF, Rogero MM, Fock RA, Borelli P, Gavini G. Cytotoxicity analysis of EDTA and citric acid applied on murine resident macrophages culture. *Int Endod J* 2007;40:338-343.
8. Aranha AM, Zhang Z, Neiva KG, Costa CA, Hebling J, Nör JE. Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *J Endod* 2010;36:1633-1637.
9. Artese L, Corrado R, Ferrero G, Fiorini M, Santinelli A, Piatelli A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in healthy and inflamed human dental pulps. *J Endod* 2002;28:20-23.
10. Aslantas EE, Buzoglu HD, Altundasar E, Serper A. Effect of EDTA, sodium hypochlorite, and chlorhexidine gluconate with or without surface modifiers on dentin microhardness. *J Endod* 2014;40:876-879.
11. Atabek D, Oztas N. Effectiveness of Ozone with or without the Additional Use of Remineralizing Solution on Non-Cavitated Fissure Carious Lesions in Permanent Molars. *Eur J Dent* 2011;5:393-399.
12. Ates M, Akdeniz BG, Sen BH. The effect of calcium chelating or binding agents on *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;100:626-630.
13. Ayna B, Celenk S, Atakul F, Sezgin B, Ozekinci T. Evaluation of clinical and microbiological features of deep carious lesions in primary molars. *J Dent Child (Chic)* 2003;70:15-18.
14. Azarpazhooh A, Limeback H. The application of ozone in dentistry: a systematic review of literature. *J Dent* 2008;36:104-116.
15. Babich H, Wurzburger BJ, RubinYL, Sinensky MC, Blau L. An *in vitro* study on the cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to human gingival cells. *Cell Biol Toxicol* 1995;11:79-88.
16. Ballal NV, Kundabala M, Bhat S, Rao N, Rao BS. A comparative *in vitro* evaluation of cytotoxic effects of EDTA and maleic acid: root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:633-638.

17. Ballal NV, Yegneswaran PP, Mala K, Bhat KS. *In vitro* antimicrobial activity of maleic acid and ethylenediaminetetraacetic acid on endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:696-700.
18. Barnhart BD, Chuang A, Lucca JJ, Roberts S, Liewehr F, Joyce AP. An *in vitro* evaluation of the cytotoxicity of various endodontic irrigants on human gingival fibroblasts. *J Endod* 2005;31:613-615.
19. Baumgardner KR, Law AS, Gebhart GF. Localization and changes in superoxide dismutase immunoreactivity in rat pulp after tooth preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999;88:488-495.
20. Baysan A, Lynch E. Clinical reversal of root caries using ozone: 6-month results. *Am J Dent* 2007;20:203-208.
21. Baysan A, Lynch E. Effect of ozone on the oral microbiota and clinical severity of primary root caries. *Am J Dent* 2004;17:56-60.
22. Baysan A, Whiley RA, Lynch E. Antimicrobial effect of a novel ozone-generating device on microorganisms associated with primary root carious lesions *in vitro*. *Caries Res* 2000;34:498-501.
23. Beighton D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. *Community Dent Oral Epidemiol* 2005;33:248-255.
24. Beltz RE, Torabinejad M, Pouresmail M. Quantitative analysis of the solubilizing action of MTAD, sodium hypochlorite, and EDTA on bovine pulp and dentin. *J Endod* 2003;29:334-337.
25. Berger SB, Tabchoury CP, Ambrosano GM, Giannini M. Hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber and dental permeability after bleaching. *Gen Dent* 2013;61:e21-25.
26. Berkovitz KB, Holland GR, Moxham BJ. *Oral anatomy, histology and embryology*. Mosby St. Louis, MD, USA; 2009.
27. Bernardi A, Teixeira CS. The properties of chlorhexidine and undesired effects of its use in endodontics. *Quintessence Int* 2015;46:575-582.
28. Bezirtzoglou E, Cretoi SM, Moldoveanu M, Alexopoulos A, Lazar V, Nakou M. A quantitative approach to the effectiveness of ozone against microbiota organisms colonizing toothbrushes. *J Dent* 2008;36:600-605.
29. Bjørndal L, Reit C, Bruun G, Markvart M, Kjaeldgaard M, Näsman P, Thordrup M, Dige I, Nyvad B, Fransson H, Lager A, Ericson D, Petersson K, Olsson J, Santimano EM, Wennström A, Winkel P, Gluud C. Treatment of deep caries lesions in adults: randomized clinical trials comparing stepwise vs. direct complete excavation, and direct pulp capping vs. partial pulpotomy. *Eur J Oral Sci* 2010;118:290-297.
30. Bjørndal L, Larsen T, Thylstrup A. A clinical and microbiological study of deep carious lesions during stepwise excavation using long treatment intervals. *Caries Res* 1997;31:411-417.
31. Bjørndal L, Larsen T. Changes in the cultivable flora in deep carious lesions following a stepwise excavation procedure. *Caries Res* 2000;34:502-508.
32. Bocci V, Valacchi G, Corradeschi F, Aldinucci C, Silvestri S, Paccagnini E, Gerli R. Studies on the biological effects of ozone. Generation of reactive oxygen species (ROS) after exposure of human blood to ozone. *J Biol Regul Homeost Agents* 1998;12:67-75.
33. Bocci V. Biological and clinical effects of ozone. Has ozonotherapy a future in medicine? *Br J Biomed Sci* 1999;56:270-279.
34. Bocci V. *Ozone-A new medical drug*. Springer Dordrecht, The Netherlands; 2005

35. Bődör C, Matolcsy A, Bernáth M. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *Int Endod J* 2007;40:128-132.
36. Bönecker M, Toi CS, Cleaton-Jones P. Mutans streptococci and lactobacilli in carious dentine before and after Atraumatic Restorative Treatment. *J Dent* 2003;31:423-428.
37. Borges FM, de Melo MA, Lima JP, Zanin IC, Rodrigues LK. Antimicrobial effect of chlorhexidine digluconate in dentin: *In vitro* and *in situ* study. *J Conserv Dent* 2012;15:22-26.
38. Bortolotto T, Doudou W, Stavridakis M, Ferrari M, Krejci I. Marginal adaptation after aging of a self-etching adhesive containing an antibacterial monomer. *J Adhes Dent* 2007;9:311-317.
39. Botelho MG. The minimum inhibitory concentration of oral antibacterial agents against cariogenic organisms. *Microbios* 2000;103:31-41.
40. Brannstrom M, Nyborg H. Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution: Growth of bacteria and effect on the pulp. *J Prosthet Dent* 1973;30:303-310.
41. Bratthall D. Estimation of global DMFT for 12-year-olds in 2004. *Int Dent J* 2005;55:370-372.
42. Buczek P, Zalewska A, Szarmach I. Saliva and oxidative stress in oral cavity and in some systemic disorders. *J Physiol Pharmacol* 2015;66:3-9.
43. Byrne AM, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JH. Angiogenic and cell survival functions of vascular endothelial growth factor (VEGF). *J Cell Mol Med* 2005;9:777-794.
44. Byun R, Nadkarni MA, Chhour KL, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Quantitative analysis of diverse *Lactobacillus* species present in advanced dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3128-3136.
45. Cadenaro M, Breschi L, Antoniolli F, Mazzoni A, Di Lenarda R. Influence of whitening on the degree of conversion of dental adhesives on dentin. *Eur J Oral Sci* 2006;114:257-262.
46. Cadenaro M, Delise C, Antoniollo F, Navarra OC, Di Lenarda R, Breschi L. Enamel and dentin bond strength following gaseous ozone application. *J Adhes Dent* 2009;11:287-292.
47. Casagrande L, Bento LW, Dalpian DM, García-Godoy F, de Araujo FB. Indirect pulp treatment in primary teeth: 4-year results. *Am J Dent* 2010;21:34-38.
48. Castillo A, Galindo-Moreno P, Avila G, Valderrama M, Liébana J, Baca P. *In vitro* reduction of mutans streptococci by means of ozone gas application. *Quintessence Int* 2008;39:827-831.
49. Celiberti P, Pazera P, Lussi A. The impact of ozone treatment on enamel physical properties. *Am J Dent* 2006;19:67-72.
50. Celik C, Ozel Y, Bagis B, Erkut S. Effect of laser irradiation and cavity disinfectant application on the microtensile bond strength of different adhesive systems. *Photomed Laser Surg* 2010;28:267-272.
51. Chang YE, Shin DH. Effect of chlorhexidine application methods on microtensile bond strength to dentin in Class I cavities. *Oper Dent* 2010;35:618-623.
52. Chhour KL, Nadkarni MA, Byun R, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Molecular analysis of microbial diversity in advanced caries. *J Clin Microbiol* 2005;43:843-849.
53. Corralo DJ, Maltz M. Clinical and ultrastructural effects of different liners/restorative materials on deep carious dentin: a randomized clinical trial. *Caries Res* 2013;47:243-250.
54. Costa CA, Ribeiro AP, Giro EM, Randall RC, Hebling J. Pulp response after application of two resin modified glass ionomer cements (RMGICs) in deep cavities of prepared human teeth. *Dent Mater* 2011;27:e158-170.

55. Cox CF, Hafez AA, Akimoto N, Otsuki M, Suzuki S, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on non-exposed and exposed pulps on non-human primates. *Am J Dent* 1998;10:55-63.
56. Cox CF, Keall CL, Keall H, Ostro E, Bergenholtz G. Biocompatibility of surface-sealed dental materials against exposed dental pulps. *J Prosthet Dent* 1987;57:1-8.
57. Dähnhardt JE, Jaeggi T, Lussi A. Treating open carious lesions in anxious children with ozone. A prospective controlled clinical study. *Am J Dent* 2006;19:267-270.
58. Davis WL, Jacoby BH, Craig KR, Wagner G, Harrison JW. Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue. *J Endod* 1991;17:316-318.
59. de Souza LB, de Aquino SG, de Souza PP, Hebling J, Costa CA. Cytotoxic effects of different concentrations of chlorhexidine. *Am J Dent* 2007;20:400-404.
60. Di Lenarda R, Cadenaro M, Sbaizero O. Effectiveness of 1 mol L-1 citric acid and 15% EDTA irrigation on smear layer removal. *Int Endod J* 2000;33:46-52.
61. Dolezel J, Bartos J, Voglmayr H, Greilhuber J. Nuclear DNA content and genome size of trout and human. *Cytometry A* 2003;51:127-128.
62. Duggal MS, Nikolopoulou A, Tahmassebi JF. The additional effect of ozone in combination with adjunct remineralisation products on inhibition of demineralisation of the dental hard tissues *in situ*. *J Dent* 2012;40:934-940.
63. Dukić W, Jurić H, Andrašević AT, Kovačević V, Dukić OL, Delija B. The efficacy of gaseous ozone on some cariogenic bacteria. *Coll Antropol* 2013;37:109-113.
64. Dumitrescu AL. Antibiotics and Antiseptics in Periodontal Therapy. Springer-Verlag, Berlin; 2011.
65. Duque C, Negrini Tde C, Sacono NT, Spolidorio DM, de Souza Costa CA, Hebling J. Clinical and microbiological performance of resin-modified glass-ionomer liners after incomplete dentine caries removal. *Clin Oral Investig* 2009;13:465-471.
66. Eichten A, Adler AP, Cooper B, Griffith J, Wei Y, Yancopoulos GD, Lin HC, Thurston G. Rapid decrease in tumor perfusion following VEGF blockade predicts long-term tumor growth inhibition in preclinical tumor models. *Angiogenesis* 2013;16:429-441.
67. Eimar H, Siciliano R, Abdallah MN, Nader SA, Amin WM, Martinez PP, Celemin A, Cerruti M, Tamimi F. Hydrogen peroxide whitens teeth by oxidizing the organic structure. *J Dent* 2012;40(Suppl 2):e25-33.
68. Eldeniz AU, Erdemir A, Belli S. Effect of EDTA and citric acid solutions on the microhardness and the roughness of human root canal dentin. *J Endod* 2005;31:107-110.
69. Emilson CG. Susceptibility of various microorganisms to chlorhexidine. *Scand J Dent Res* 1977;85:255-265.
70. Ercan E, Erdemir A, Zorba YO, Eldeniz AU, Dalli M, Ince B, Kalaycioglu B. Effect of different cavity disinfectants on shear bond strength of composite resin to dentin. *J Adhes Dent* 2009;11:343-346.
71. Erdemir A, Ari H, Güngüneş H, Belli S. Effect of medications for root canal treatment on bonding to root canal dentin. *J Endod* 2004;30:113-116.
72. Ergücü Z, Hiller KA, Schmalz G. Influence of dentin on the effectiveness of antibacterial agents. *J Endod* 2005;31:124-129.
73. Ersin NK, Uzel A, Aykut A, Candan U, Eronat C. Inhibition of cultivable bacteria by chlorhexidine treatment of dentin lesions treated with the ART technique. *Caries Res* 2006;40:172-177.

74. Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods* 2007;39:175-191.
75. Fogel GB, Collins CR, Li J, Brunk CF. Prokaryotic Genome Size and SSU rDNA Copy Number: Estimation of Microbial Relative Abundance from a Mixed Population. *Microb Ecol* 1999;38:93-113.
76. Franzon R, Guimaraes LF, Magalhaes CE, Haas AN, Araujo. Outcomes of one-step incomplete and complete excavation in primary teeth: 24-month randomized controlled trial. *Caries Res* 2014;48:376-383.
77. Frencken JE, Imazato S, Toi C, Mulder J, Mickenautsch S, Takahashi Y, Ebisu S. Antibacterial effect of chlorhexidine-containing glass ionomer cement *in vivo*: a pilot study. *Caries Res* 2007;41:102-107.
78. Fure S, Emilson CG. Effect of chlorhexidine gel treatment supplemented with chlorhexidine varnish and resin on mutans streptococci and *Actinomyces* on root surfaces. *Caries Res* 1990;24:242-247.
79. Giannelli M, Chellini F, Margheri M, Tonelli P, Tani A. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro* 2008;22:308-317.
80. Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J* 2013;24:89-102.
81. Grando Mattuella L, Westphalen Bento L, de Figueiredo JA, Nör JE, de Araujo FB, Fossati AC. Vascular endothelial growth factor and its relationship with the dental pulp. *J Endod* 2007;33:524-530.
82. Grawehr M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003;36:411-417.
83. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, Asnani K, Griffen AL. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol* 2010;48:4121-4128.
84. Gruythuysen RJ, van Strijp AJ, Wu MK. Long-term survival of indirect pulp treatment performed in primary and permanent teeth with clinically diagnosed deep carious lesions. *J Endod* 2010;36:1490-1493.
85. Gu F, Bresciani E, Barata TJ, Fagundes TC, Navarro MF, Dickens SH, Fenno JC, Peters MC. *In vivo* acid etching effect on bacteria within caries-affected dentin. *Caries Res* 2010;44:472-477.
86. Gupta G, Mansi B. Ozone therapy in periodontics. *J Med Life* 2012;5:59-67.
87. Gurgan S, Yalcin Cakir F. The effect of three different mouthrinses on the surface hardness, gloss and colour change of bleached nano composite resins. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 2008;16:104-108.
88. Hafez AA, Cox CF, Tarim B, Otsuki M, Akimoto N. An *in vivo* evaluation of hemorrhage control using sodium hypochlorite and direct capping with a one- or two-component adhesive system in exposed nonhuman primate pulps. *Quintessence Int* 2002;33:261-272.
89. Hamada S, Slade HD. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev* 1980;44:331-384.
90. Hauser-Gerspach I, Pfäffli-Savtchenko V, Dähnhardt JE, Meyer J, Lussi A. Comparison of the immediate effects of gaseous ozone and chlorhexidine gel on bacteria in cavitated carious lesions in children *in vivo*. *Clin Oral Investig* 2009;13:287-291.
91. Hayashi M, Fujitani M, Yamaki C, Momoi Y. Ways of enhancing pulp preservation by stepwise excavation-a systematic review. *J Dent* 2011;39:95-107.
92. Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. Real time quantitative PCR. *Genome Res* 1996;6:986-994.

93. Ho AC, Scott IU, Kim SJ, Brown GC, Brown MM, Ip MS, Recchia FM. Anti-vascular endothelial vascular growth factor pharmacotherapy for diabetic macular edema: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 2012;119:2179-2188.
94. Holmes J. Clinical reversal of root caries using ozone, double-blind, randomized, controlled 18-month trial. *Gerodontology* 2003;20:106-114.
95. Hosoya Y, Ando S, Yamaguchi K, Oooka S, Miyazaki M, Tay FR. Quality of the interface of primary tooth dentine bonded with antibacterial fluoride-releasing adhesive. *J Dent* 2010;38:423-430.
96. Hugh D. Ozone therapy for the treatment of caries. In: *Operative Dentistry: a practical guide to recent innovations*. Springer-Verlag, Berlin; 2006
97. Huth KC, Paschos E, Brand K, Hickel R. Effect of ozone on non-cavitated fissure carious lesions in permanent molars. A controlled prospective clinical study. *Am J Dent* 2005;18:223-228.
98. Huth KC, Jakob FM, Saugel B, Cappello C, Paschos E, Hollweck R, Hickel R, Brand K. Effect of ozone on oral cells compared with established antimicrobials. *Eur J Oral Sci* 2006;114:435-440.
99. Huth KC, Saugel B, Jakob FM, Cappello C, Quirling M, Paschos E, Ern K, Hickel R, Brand K. Effect of aqueous ozone on the NF-kappaB system. *J Dent Res* 2007;86:451-456.
100. Ikai H, Nakamura K, Shirato M, Kanno T, Iwasawa A, Sasaki K, Niwano Y, Kohno M. Photolysis of hydrogen peroxide, an effective disinfection system via hydroxyl radical formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2010;54:5086-5091.
101. Ilić J, Radović K, Roganović J, Brković B, Stojić D. The levels of vascular endothelial growth factor and bone morphogenetic protein 2 in dental pulp tissue of healthy and diabetic patients. *J Endod* 2012;38:764-768.
102. Imazato S, Tay FR, Kaneshiro AV, Takahashi Y, Ebisu S. An *in vivo* evaluation of bonding ability of comprehensive antibacterial adhesive system incorporating MDPB. *Dent Mater* 2007;23:170-176.
103. Imazato S, Torii Y, Takatsuka T, Inoue K, Ebi N, Ebisu S. Bactericidal effect of dentin primer containing antibacterial monomer methacryloxydodecylpyridinium bromide (MDPB) against bacteria in human carious dentin. *J Oral Rehabil* 2001;28:314-319.
104. Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding systems. *Dent Mater* 2003;19:449-457.
105. ISO 10993. Biological evaluation of dental devices. International Standards Organization 1992.
106. ISO 7405. Dentistry-Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Test methods for dental materials. International Standards Organization 1996.
107. Ittaturut S, Matangkasombut O, Thanyasrisung P. In-office bleaching gel with 35% hydrogen peroxide enhanced biofilm formation of early colonizing streptococci on human enamel. *J Dent* 2014;42:1480-1486.
108. Järvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. *In vitro* susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 1993;37:1158-1159.
109. Johansson E, Claesson R, van Dijken JW. Antibacterial effect of ozone on cariogenic bacterial species. *J Dent* 2009;37:449-453.
110. Johansson E, van Dijken JW, Karlsson L, Andersson-Wenckert I. Treatment effect of ozone and fluoride varnish application on occlusal caries in primary molars: a 12-month study. *Clin Oral Investig* 2014;18:1785-1792.

111. Jones CG. Chlorhexidine: is it still the gold standard? *Periodontol* 2000 1997;15:55-62.
112. Kapdan A, Oztas N. Effects of chlorhexidine and gaseous ozone on microleakage and on the bond strength of dentin bonding agents with compomer restoration on primary teeth. *J Dent Sci* 2015;10:46-54.
113. Khadre MA, Youself AE, Kim JG. Microbiological Aspects of Ozone Applications in Food: A Review. *Journal of Food Science* 2001;66:1242-1252.
114. Kianoush N, Adler CJ, Nguyen KYT, Browne GV, Simonian M, Hunter N. Bacterial profile of dentine caries and the impact of pH on bacterial population diversity. *PLoS One* 2014;9:e92940.
115. Kidd EA, Joyston-Bechal S, Beighton D. Microbiological validation of assessments of caries activity during cavity preparation. *Caries Res* 1993;27:402-408.
116. Kim HS, Noh SU, Han YW, Kim KM, Kang H, Kim HO, Park YM. Therapeutic effects of topical application of ozone on acute cutaneous wound healing. *J Korean Med Sci* 2009;24:368-374.
117. Klinke T, Klimm W, Gutknecht N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. *J Clin Laser Med Surg* 1997;15:29-31.
118. Knight GM, McIntyre JM, Craig GG, Mulyani, Zilm PS. The inability of *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* to form a biofilm *in vitro* on dentine pretreated with ozone. *Aust Dent J* 2008;53:349-353.
119. Kollmuss M, Kist S, Obermeier K, Pelka AK, Hickel R, Huth KC. Antimicrobial effect of gaseous and aqueous ozone on caries pathogen microorganisms grown in biofilms. *Am J Dent* 2014;27:134-138.
120. Korkmaz Y, Ozalp M, Attar N. Comparison of the antibacterial activity of different self-etching primers and adhesives. *J Contemp Dent Pract* 2008;9:57-64.
121. Kwon SR, Oyoyo U, Li Y. Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: an *in vitro* study. *J Dent*. 2013;41(Suppl 3):e39-45.
122. Lafuente D. SEM analysis of hybrid layer and bonding interface after chlorhexidine use. *Oper Dent* 2012;37:172-180.
123. Lai S, Mak Y, Cheung G, Osorio R, Toledano M, Carvalho R, Tay F, Pashley DH. Reversal of compromised bonding to oxidized etched dentin. *J Dent Res* 2001;80:1919-1924.
124. Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J* 2010;43:430-435.
125. Li F, Chen J, Chai Z, Zhang L, Xiao Y, Fang M, Ma S. Effects of a dental adhesive incorporating antibacterial monomer on the growth, adherence and membrane integrity of *Streptococcus mutans*. *J Dent* 2009;37:289-296.
126. Li J, Helmerhorst EJ, Leone CW, Troxler RF, Yaskell T, Haffajee AD, Socransky SS, Oppenheim FG. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. *J Appl Microbiol* 2004;97:1311-1318.
127. Lima JP, Sampaio de Melo MA, Borges FM, Teixeira AH, Steiner-Oliveira C, Nobre Dos Santos M, Rodrigues LK, Zanin IC. Evaluation of the antimicrobial effect of photodynamic antimicrobial therapy in a situ model of dentine caries. *Eur J Oral Sci* 2009;117:568-574.
128. Lima KC, Coelho LT, Pinheiro IVA, Rocas IN, Siqueira Jr JF. Microbiota of dentinal caries as assessed by reverse-capture checkerboard analysis. *Caries Res* 2011;45:21-30.

129. Lindblad RM, Lassila LV, Salo V, Vallittu PK, Tjäderhane L. One year effect of chlorhexidine on bonding of fibre-reinforced composite root canal post to dentine. *J Dent* 2012;40:718-722.
130. Loesche WJ. Chemotherapy of dental plaque infections. *Oral Sci Rev* 1976;9:65-107.
131. Lula EC, Almeida LJ Jr, Alves CM, Monteiro-Neto V, Ribeiro CC. Partial caries removal in primary teeth: association of clinical parameters with microbiological status. *Caries Res* 2011;45:275-280.
132. Lula EC, Monteiro-Neto V, Alves CM, Ribeiro CC. Microbiological analysis after complete or partial removal of carious dentin in primary teeth: a randomized clinical trial. *Caries Res* 2009;43:354-358.
133. Magni E, Ferrari M, Hickel R, Ilie N. Influence of gasiform ozone on the micromechanical properties of dentin. *Int Dent SA* 2010;11:16-21.
134. Magni E, Ferrari M, Papacchini F, Hickel R, Ilie N. Influence of ozone on the composite-to-composite bond. *Clin Oral Investig* 2011;15:249-256.
135. Maltz M, de Oliveira EF, Fontanella V, Bianchi R. A clinical, microbiologic, and radiographic study of deep caries lesions after incomplete caries removal. *Quintessence Int* 2002;33:151-159.
136. Maltz M, Garcia R, Jardim JJ, de Paula LM, Yamaguti PM, Moura MS, Garcia F, Nascimento C, Oliveira A, Mestrinho HD. Randomized trial of partial vs. stepwise caries removal: 3-year follow-up. *J Dent Res* 2012a;91:1026-1031.
137. Maltz M, Henz SL, de Oliveira EF, Jardim JJ. Conventional caries removal and sealed caries in permanent teeth: a microbiological evaluation. *J Dent* 2012b;40:776-782.
138. Maltz M, Jardim JJ, Mestrinho HD, Yamaguti PM, Podestá K, Moura MS, de Paula LM. Partial removal of carious dentine: a multicentre randomized controlled trial and 18-month follow-up results. *Caries Res* 2013;47:103-109.
139. Mantellini MG, Botero T, Yaman P, Dennison JB, Hanks CT, Nör JE. Adhesive resin and the hydrophilic monomer HEMA induce VEGF expression on dental pulp cells and macrophages. *Dent Mater* 2006;22:434-440.
140. Mariotti AJ, Rumpf DA. Chlorhexidine-induced changes to human gingival fibroblast collagen and non-collagen protein production. *J Periodontol* 1999;70:1443-1448.
141. Marsh PD, Featherstone A, McKee AS, Hallsworth AS, Robinson C, Weatherell JA, Newman HN, Pitter AF. A microbiological study of early caries of approximal surfaces in schoolchildren. *J Dent Res* 1989;68:1151-1154.
142. Marsh PD. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? *Microbiology* 2003;149:279-294.
143. Martin FE, Nadkarani MA, Jacques NA, Hunter N. Quantitative microbiological study of human carious dentine by culture and real-time PCR: association of anaerobes with histopathological changes in chronic pulpitis. *J Clin Microbiol* 2002;40:1698-1704.
144. Martínez-Sánchez G, Al-Dalain SM, Menéndez S, Re L, Giuliani A, Candelario-Jalil E, Alvarez H, Fernández-Montequín JJ, León OS. Therapeutic efficacy of ozone in patients with diabetic foot. *Eur J Pharmacol* 2005;523:151-161.
145. Martínez-Sánchez G, Delgado-Roche L, Díaz-Batista A, Pérez-Davison G, Re L. Effects of ozone therapy on haemostatic and oxidative stress index in coronary artery disease. *Eur J Pharmacol* 2012;691:156-162.
146. Massara ML, Alves JB, Brandão PR. Atraumatic restorative treatment: clinical, ultrastructural and chemical analysis. *Caries Res* 2002;36:430-436.

147. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, Maruyama I, Takada H, Torii M. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infect Immun* 1999;67:1633-1639.
148. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Yamaguchi N, Koga T, Matsuo K, Nagaoka S, Abeyama K, Maruyama I, Torii M. The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: Induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signalling pathway. *J Dent Res* 2000;79:1596-1603.
149. Matsuzaka K, Muramatsu T, Katakura A, Ishihara K, Hashimoto S, Yoshinari M, Endo T, Tazaki M, Shintani M, Sato Y, Inoue T. Changes in the homeostatic mechanism of dental pulp with age: expression of the core-binding factor alpha-1, dentin sialoprotein, vascular endothelial growth factor, and heat shock protein 27 messenger RNAs. *J Endod* 2008;34:818-821.
150. Maulik N. Reactive oxygen species drives myocardial angiogenesis? *Antioxid Redox Signaling* 2006;8:2161-2168.
151. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;12:147-179.
152. Meiers JC, Kresin JC. Cavity disinfectants and dentin bonding. *Oper Dent* 1996;21:153-159.
153. Mertz-Fairhurst EJ, Curtis JW, Ergle JW, Rueggeberg FA, Adair SM. Ultraconservative and cariostatic sealed restorations: results at year 10. *J Am Dent Assoc* 1998;129:55-66.
154. Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J* 2008;58:329-341.
155. Müller P, Guggenheim B, Schmidlin PR. Efficacy of gasiform ozone and photodynamic therapy on a multispecies oral biofilm *in vitro*. *Eur J Oral Sci* 2007;115:77-80.
156. Munson M A, Banerjee A, Watson T F, Wade WG. Molecular analysis of the microflora associated with dental caries. *J Clin Microbiol* 2004;42:3023-3029.
157. Nadkarni MA, Martin FE, Jacques NA, Hunter N. Determination of bacterial load by real-time PCR using a broad-range (universal) probe and primers set. *Microbiology* 2002;148(Pt 1):257-266.
158. Nagayoshi M, Fukuizumi T, Kitamura C, Yano J, Terashita M, Nishihara T. Efficacy of ozone on survival and permeability of oral microorganisms. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:240-246.
159. Nakano M, Takao A, Ozawa T, Igarashi T, Maeda N, Hosoya N. Microbicidal effect of ozone gas *in vitro*: interaction with organic compounds and endodontic irrigation agents. *Asian Pac J Dent* 2012;12:21-25.
160. Nikaido T, Nakabayashi N. Relationship between polymerization and adhesion to teeth. *Adhesive Dent* 1988;6:229-234.
161. Nishitani Y, Yoshiyama M, Tay FR, Wadgaonkar B, Waller J, Agee K, Pashley DH. Tensile strength of mineralized/demineralized human normal and carious dentin. *J Dent Res* 2005;84:1075-1078.
162. Noguchi F, Kitamura C, Nagayoshi M, Chen KK, Terashita M, Nishihara T. Ozonated water improves lipopolysaccharide-induced responses of an odontoblast-like cell line. *J Endod* 2009;35:668-672.
163. Nygaard-Ostby B. Chelation in root canal therapy: ethylenediaminetetraacetic acid for cleansing and widening of root canals. *Odontol Tidskr* 1957;65:3-11.
164. Obata J, Takeshita T, Shibata Y, Yamanaka W, Unemori M, Akamine A, Yamasita Y. Identification of the microbiota in carious dentin lesions using 16S rRNA gene sequencing. *PLoS One* 2014;9:e103712.

165. Oliveira LD, Carvalho CA, Nunes W, Valera MC, Camargo CH, Jorge AO. Effects of chlorhexidine and sodium hypochlorite on the microhardness of root canal dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:e125-128.
166. Orhan AI, Oz FT, Ozcelik B, Orhan K. A clinical and microbiological comparative study of deep carious lesion treatment in deciduous and young permanent molars. *Clin Oral Investig* 2008;12:369-378.
167. Paddick JS, Brailsford SR, Kidd EA, Beighton D. Phenotypic and genotypic selection of microbiota surviving under dental restorations. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:2467-2472.
168. Pappas M, Burns DR, Moon PC, Coffey JP. Influence of a 3-step tooth disinfection procedure on dentin bond strength. *J Prosthet Dent* 2005;93:545-550.
169. Paranjpe A, Cacalano NA, Hume WR, Jewett A. N-acetylcysteine protects dental pulp stromal cells from HEMA-induced apoptosis by inducing differentiation of the cells. *Free Radic Biol Med* 2007;43:1394-1408.
170. Paraskeva P, Graham NJD. Ozonation of municipal wastewater effluents. *Water Environ Res* 2002;74:569-581.
171. Pascon FM, Kantovitz KR, Sacramento PA, Nobre-dos-Santos M, Puppim-Rontani RM. Effect of sodium hypochlorite on dentine mechanical properties. A review. *J Dent* 2009;37:903-908.
172. Pecorelli A, Bocci V, Acquaviva A, Belmonte G, Gardi C, Virgili F, Ciccoli L, Valacchi G. NRF2 activation is involved in ozonated human serum upregulation of HO-1 in endothelial cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013;267:30-40.
173. Petersen PE, Bourgeois D, Ogawa H, Estupinan-Day S, Ndiaye C. The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull World Health Organ* 2005;83:661-669.
174. Phonghanyudh A, Phantumvanit P, Songpaisan Y, Petersen PE. Clinical evaluation of three caries removal approaches in primary teeth: a randomised controlled trial. *Community Dent Health* 2012;29:173-178.
175. Polydorou O, Halili A, Wittmer A, Pelz K, Hahn P. The antibacterial effect of gas ozone after 2 months of *in vitro* evaluation. *Clin Oral Investig* 2012;16:545-550.
176. Polydorou O, Pelz K, Hahn P. Antibacterial effect of an ozone device and its comparison with two dentin -bonding systems. *Eur J Oral Sci* 2006;114:349-353.
177. Re L, Martínez-Sánchez G, Bordicchia M, Malcangi G, Pocognoli A, Morales-Segura MA, Rothchild J, Rojas A. Is ozone pre-conditioning effect linked to Nrf2/EpRE activation pathway *in vivo*? A preliminary result. *Eur J Pharmacol* 2014;742:158-162.
178. Re L, Martínez-Sánchez G, Perez-Davison G, Sirito M. Role of ozone/oxygen in fibroblast growth factor activation. Discovering the facts. *International Journal of Ozone Therapy* 2010;9:55-58.
179. Rees TD, Orth CF. Oral ulcerations with use of hydrogen peroxide. *J Periodontol* 1986;57:689-692.
180. Ricci HA, Sanabe ME, de Souza Costa CA, Pashley DH, Hebling J. Chlorhexidine increases the longevity of *in vivo* resin-dentin bonds. *Eur J Oral Sci* 2010;118:411-416.
181. Ricketts DN, Lamont T, Innes NP, Kidd E, Clarkson JE. Operative caries management in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;3:CD003808
182. Ricketts DN, Kidd EA, Innes N, Clarkson J. Complete or ultraconservative removal of decayed tissue in unfilled teeth. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;3:CD003808

183. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol* 2000;45:1013-1016.
184. Rolland SL, McCabe JF, Imazato S, Walls AW. A randomised trial comparing the antibacterial effects of dentine primers against bacteria in natural root caries. *Caries Res* 2011;45:574-580.
185. Roy S, Khanna S, Sen CK. Redox regulation of the VEGF signalling path and tissue vascularization: Hydrogen peroxide, the common link between physical exercises and cutaneous wound healing. *Free Radic Biol Med* 2008;44:180-192.
186. Saber SE, El-Askary FS. The outcome of immediate or delayed application of a single-step self etch adhesive to coronal dentin following the application of different endodontic irrigants. *Eur J Dent* 2009;3:83-89.
187. Sagai M, Bocci V. Mechanisms of Action Involved in Ozone Therapy: Is healing induced via a mild oxidative stress? *Med Gas Res* 2011;1:29.
188. Schaeken MJ, Keltjens HM, Van Der Hoeven JS. Effects of fluoride and chlorhexidine on the microflora of dental root surfaces and progression of root-surface caries. *J Den Res* 1991;70:150-153.
189. Scheven BA, Man J, Millard JL, Cooper PR, Lea SC, Walsley AD, Smith AJ. VEGF and odontoblast-like cells: Stimulation by low frequency ultrasound. *Arch Oral Biol* 2008;54:185-191.
190. Schmalz G. Agar overlay method. *Int Endod J* 1988;21:59-66
191. Schmalz G, Schweikle H, Esch J, Hiller KA. Evaluation of a dentine barrier test by cytotoxicity testing of various dental cements. *J Endod* 1996;22:112-115.
192. Schmidlin PR, Zimmermann J, Bindl A. Effect of ozone on enamel and dentin bond strength. *J Adhes Dent* 2005;7:29-32.
193. Schulze-Schweifing K, Banerjee A, Wade WG. Comparison of bacterial culture and 16S rRNA community profiling by clonal analysis and pyrosequencing for the characterization of the dentine caries-associated microbiome. *Front Cell Infect Microbiol* 2014;4:164.
194. Schwendicke F, Dorfer CE, Paris S. Incomplete caries removal: a systematic review and meta-analysis. *J Dent Res* 2013a;92:306-314.
195. Schwendicke F, Meyer-Lueckel H, Dörfer C, Paris S. Failure of incompletely excavated teeth-a systematic review. *J Dent* 2013b;41:569-580.
196. Schwendicke F, Stolpe M, Mexer-Lueckel H, Paris S, Dorfer CE. Cost-effectiveness of one- and two-step incomplete and complete excavation. *J Dent Res* 2013c;92:880-887.
197. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Jimenez-Planas A, Sampedro C, Llamas R. EDTA inhibits *in vitro* substrate adherence capacity of macrophages: endodontic implications. *J Endod* 1997;23:205-208.
198. Segura JJ, Calvo JR, Guerrero JM, Sampedro C, Jimenez A, Llamas R. The disodium salt of EDTA inhibits the binding of vasoactive intestinal peptide to macrophage membranes: endodontic implications. *J Endod* 1996;22:337-340.
199. Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet* 2007;368:51-59.
200. Shafiei F, Memarpour M. Antibacterial activity in adhesive dentistry: a literature review. *Gen Den* 2012;60:e346-356.
201. Shinohara MS, Bedran-de-Castro AK, Amaral CM, Pimenta LA. The effect of sodium hypochlorite on microleakage of composite resin restorations using three adhesive systems. *J Adhes Dent* 2004;6:123-127.

202. Simón-Soro A, Belda-Ferre P, Cabrera-Rubio R, Alcaraz LD, Mira A. A tissue-dependent hypothesis of dental caries. *Caries Res* 2013;47:591-600.
203. Simón-Soro A, Guillen-Navarro M, Mira A. Metatranscriptomics reveals overall active bacterial composition in caries lesions. *J Oral Microbiol* 2014;6:25443.
204. Simón-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends Microbiol* 2015;23:76-82.
205. Siqueira JF Jr, Batista MM, Fraga RC, de Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998;24:414-416.
206. Siso HS, Kustarci A, Goktolga EG. Microleakage in resin composite restorations after antimicrobial pre-treatments: Effect of KTP laser, chlorhexidine gluconate and Clearfil Protect Bond. *Oper Dent* 2009;34:321-327.
207. Soares CJ, Pereira CA, Pereira JC, Santana FR, do Prado CJ. Effect of chlorhexidine application on microtensile bond strength to dentin. *Oper Dent* 2008;33:183-188.
208. Soares DG, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy. *J Dent* 2014a;42:185-198.
209. Soares DG, Pastana JV, de Oliveira Duque CC, Dias Ribeiro AP, Basso FG, Hebling J, de Souza Costa CA. Influence of adhesive restorations on diffusion of H₂O₂ released from a bleaching agent and its toxic effects on pulp cells. *J Adhes Dent* 2014b;16:123-128.
210. Soden RI, Botero TM, Hanks CT, Nör JE. Angiogenic signalling triggered by cariogenic bacteria in pulp cells. *J Dent Res* 2009;88:835-840.
211. Sousa SM, Bramante CM, Taga EM. Biocompatibility of EDTA, EGTA and citric acid. *Braz Dent J* 2005;16:3-8.
212. Tahmassebi JF, Chrysafi N, Duggal MS. The effect of ozone on progression or regression of artificial caries-like enamel lesions *in vitro*. *J Dent* 2014;42:167-174.
213. Takahashi N, Iwami Y, Yamada T. Metabolism of intracellular polysaccharide in the cells of *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions. *Oral Microbiol Immunol* 1991;6:299-304.
214. Takahashi N, Nyvad B. The role of bacteria in the caries process: ecological perspective. *J Dent Res* 2011;90:294-303.
215. Thanomsub B, Anupunpisit V, Chanphetch S, Watcharachaipong T, Poonkhum R, Srisukonth C. Effects of ozone treatment on cell growth and ultrastructural changes in bacteria. *J Gen Appl Microbiol* 2002;48:193-199.
216. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. *J Clin Periodontol* 1986;13:905-911.
217. Toi CS, Bönecker M, Cleaton-Jones PE. Mutans streptococci strains prevalence before and after cavity preparation during Atraumatic Restorative Treatment. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:160-164.
218. Torneck CD, Titley KC, Smith DC, Adibfar A. The influence of time of hydrogen peroxide exposure on the adhesion of composite resin to bleached bovine enamel. *J Endodon* 1990;16:123-128.
219. Tran-Hung L, Laurent P, Camps J, About I. Quantification of angiogenic growth factors released by human dental cells after injury. *Arch Oral Biol* 2008;53:9-13.
220. Tuncer D, Yazici AR, Ayturan S, Ozgunaltay G, Dayanganc B. Antimicrobial Effect of Ozone on Cariogenic Microorganisms *In Vitro*. *Ozone: Science & Engineering* 2013;35:456-464.

221. Turkun M, Turkun LS, Ergucu Z, Ates M. Is an antibacterial adhesive system more effective than cavity disinfectants? *Am J Dent* 2006;19:166-170.
222. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44-84.
223. van Loon J, Mars P. Biocompatibility. The latest developments. *Med Device Technol* 1997;8:20-24.
224. van Lunsen DM, de Soet JJ, Weerheijm KL, Groen HJ, Veerkamp JS. Effects of dental treatment and single application of a 40% chlorhexidine varnish on mutans streptococci in young children under intravenous anaesthesia. *Caries Res* 2000;34:268-274.
225. Vanuspong W, Eisenburger M, Addy M. Cervical tooth wear and sensitivity: erosion, softening, and rehardening of dentine: effects of pH, time and ultrasonication. *J Clin Parodontol* 2002;29:351-357.
226. Varvara G, Pinchi V, Caputi S, D'Arcangelo C, Scarano A, Sinjari B, Murmura G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in dental pulp after dental preparation. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012;26:769-773.
227. Varvara G, Traini T, Esposito P, Caputi S, Perinetti G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in healthy and inflamed human dental pulp. *Int Endod J* 2005;38:195-199.
228. Vianna ME, Horz HP, Gomes BP, Conrads G. *In vivo* evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. *Int Endod J* 2006;39:484-492.
229. Vieira Rde S, da Silva IA Jr. Bond strength to primary tooth dentin following disinfection with a chlorhexidine solution: An *in vitro* study. *Pediatr Dent* 2003;25:49-52.
230. Virtej A, Løes S, Iden O, Bletsa A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors signalling in normal human dental pulp: a study of gene and protein expression. *Eur J Oral Sci* 2013;121:92-100.
231. Walsh LJ. The current status of laser applications in dentistry. *Aust Dent J* 2003;48:146-155.
232. Wang Q, Lin XJ, Lin ZY, Liu GX, Shan XL. [Expression of vascular endothelial growth factor in dental pulp of immature and mature permanent teeth in human]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue* 2007;16:285-289.
233. Weerheijm KL, de Soet JJ, van Amerongen WE, de Graaff J. Sealing of occlusal hidden caries lesions: an alternative for curative treatment? *ASDC J Dent Child* 1992; 59:263-268.
234. Weitzman SA, Weitberg AB, Stossel TP, Schwartz J, Shklar G. Effects of hydrogen peroxide on oral carcinogenesis in hamsters. *J Periodontol* 1986;57:685-688.
235. Wicht MJ, Haak R, Schutt-gerowitt H, Kneist S, Noack MJ. Suppression of caries-related microorganisms in dentine lesions after short-term chlorhexidine or antibiotic treatment. *Caries Res* 2004;38:436-441.
236. Wolff D, Frese C, Maier-Kraus T, Krueger T, Wolff B. Bacterial biofilm composition in caries and caries free subjects. *Caries Res* 2013;47:69-77.
237. Xia D, Mo Z, Zhao G, Guo F, You C, Chen Z, Zhu X, Li Z, Chen D, Fan X. Nd:YAG Lasers Treating of Carious Lesion and Root Canal *In Vitro*. *International Journal of Photoenergy* 2012; Article ID 584079
238. Yazicioğlu O, Ulukapı H. The investigation of non-invasive techniques for treating early approximal carious lesions: an *in vivo* study. *Int Dent J* 2014;64:1-11.
239. Zaccaro Scelza MF, da Silva Pierro VS, Chagas MA, da Silva LE, Scelza P. Evaluation of inflammatory response of EDTA, EDTA-T, and citric acid in animal model. *J Endod* 2010;36:515-519.

-
240. Zaura E, Buijs MJ, ten Cate JM. Effects of ozone and sodium hypochlorite on caries-like lesions in dentin. *Caries Res* 2007;41:489-492.

Изјава о ауторству

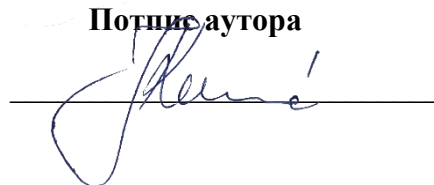
Име и презиме аутора: Јелена Крунић

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом: ОЗОН У РЕСТАУРАТИВНОЈ СТОМАТОЛОШКОЈ ТЕРАПИЈИ: АНТИБАКТЕРИЈСКИ ЕФЕКАТ И УТИЦАЈ НА VEGF У ЗУБНОЈ ПУЛПИ

- ☒ резултат сопственог истраживачког рада;
- ☒ да докторска дисертација у цјелини ни у дјеловима није била предложена за стицање било које дипломе на другим високошколским установама;
- ☒ да су резултати коректно наведени и
- ☒ да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора



Мјесто: Фоча

Датум: 23.1.2023.

Изјава о истовјетности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора: Јелена Крунић

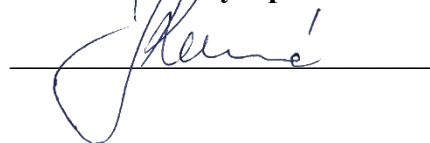
Наслов рада: ОЗОН У РЕСТАУРАТИВНОЈ СТОМАТОЛОШКОЈ ТЕРАПИЈИ:
АНТИБАКТЕРИЈСКИ ЕФЕКАТ И УТИЦАЈ НА VEGF У ЗУБНОЈ ПУЛПИ

Ментор: Проф. Др Драгица Стојић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истовјетна електронској верзији коју сам предао/ла.

Ову изјаву дајем у сврху похрањивања моје докторске дисертације у **Дигитални репозиторијуму Универзитета у Источном Сарајеву**.

Потпис аутора



Мјесто: Фоча

Датум: 23.1.2023.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитет у Источном Сарајеву да унесе моју докторску дисертацију у Дигитални репозиторијум под насловом:

ОЗОН У РЕСТАУРАТИВНОЈ СТОМАТОЛОШКОЈ ТЕРАПИЈИ: АНТИБАКТЕРИЈСКИ ЕФЕКАТ И УТИЦАЈ НА VEGF У ЗУБНОЈ ПУЛПИ

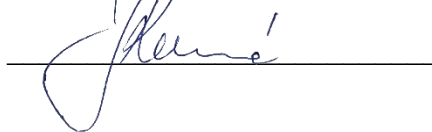
која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Источном Сарајеву и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

- ☐ Ауторство (CC BY)
- ☐ Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- ☒ Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
- ☐ Ауторство – некомерцијално – дијелити под истим условима (CC BY-NC-SA)
- ☐ Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
- ☐ Ауторство – дијелити под истим условима (CC BY-SA)

Потпис аутора



Мјесто: Фоча

Датум: 23.1.2023.

1. **Ауторство (CC BY).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. **Ауторство - некомерцијално (CC BY-NC).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела.

3. **Ауторство - некомерцијално - без прерада (CC BY-NC-ND).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, без промјена, преобликовања или употребе дјела у свом дјелу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дјела.

4. **Ауторство - некомерцијално - дијелити под истим условима (CC BY-NC-SA).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дјела и прерада.

5. **Ауторство - без прерада (CC BY-ND).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, без промјена, преобликовања или употребе дјела у свом дјелу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дјела.

6. **Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA).** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дјела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дјела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.

Напомена: Овај текст није саставни дио изјаве аутора о коришћењу, већ представља објашњење појединих лиценци.