

Uniwersytet Jagielloński
Collegium Medicum

Barbara Czopik

Ocena bezpieczeństwa stosowania antyseptyków z grupy biguanidów
w protokole płukania kanałów korzeniowych w leczeniu endodontycznym

Safety assessment of biguanide antiseptics application in irrigation
protocol in endodontic treatment

Praca doktorska

Promotor: prof. dr hab. n. med. Joanna Zarzecka

Drugi Promotor: dr hab. n. chem. Michał Woźniakiewicz, prof. UJ

Pracę wykonano w Katedrze Stomatologii Zachowawczej z Endodoncją
Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum

Kierownik jednostki: prof. dr hab. n. med. Joanna Zarzecka

oraz w Zakładzie Chemii Analitycznej Wydziału Chemii
Uniwersytetu Jagiellońskiego

Kierownik: dr hab. n. chem. Jolanta Kochana, prof. UJ

Kraków, rok 2023

Dziękuję Promotorom

Prof. dr hab. n.med. Joannie Zarzeckiej

za nieocenioną pomoc i wyrozumiałość

oraz

Dr hab. Michałowi Woźniakiewiczowi, prof. UJ

za bezcenny wkład merytoryczny i wszelką pomoc

*Pracę dedykuję moim Wspaniałym Rodzicom
Annie i Romanowi Czopik
w podziękę za Ich bezwarunkową miłość i wsparcie*

SPIS TREŚCI

I. Wstęp i uzasadnienie celu badań

I. 1. Cel leczenia endodontycznego

I. 2. Cel chemicznej preparacji przestrzeni endodontycznej

I. 3. Płyiny stosowane w protokole płukania kanałów korzeniowych

I. 4. Interakcje płynów do płukania kanałów korzeniowych

I. 5. Techniki aktywacji płynów do płukania kanałów korzeniowych

II. Cel pracy

III. Materiały i metody

III. 1. Eksperyment nr 1

III.1.1. Materiały

III.1.2. Metoda

III.1.2.1. Przygotowanie roztworów podstawowych i wzorcowych

III.1.2.2. Procedura przygotowania próbki

III.1.2.3. Analiza UHPLC-MS

III.2. Eksperyment nr 2

III.2.1. Materiały

III.2.2. Metoda

III.2.2.1. Podział próbek na grupy doświadczalne i procedura agitacji CHX

III.2.2.2. Przygotowanie próbek do analizy HPLC

III.2.2.3. Analiza statystyczna

IV. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

V. Publikacje

VI. Wyniki

VI.1. Eksperyment 1

VI.1.1. Zmieszanie CHX i NaOCl

VI. 1.2. Zmieszanie ALX z NaOCl

VI. 2. Eksperyment 2

VI. 2.1. Zmiany temperatury podczas aktywacji CHX

VI. 2.2. Produkcja PCA podczas aktywacji 2% CHX metodami US i
MDI

VI. 2.3. Uwalnianie PCA z roztworu 2% CHX przechowywanej na półce

VII. Dyskusja

VIII. Wnioski

VIII.1. Eksperyment nr 1

VIII.2. Eksperyment nr 2

IX. Streszczenie w języku polskim

X. Streszczenie w języku angielskim

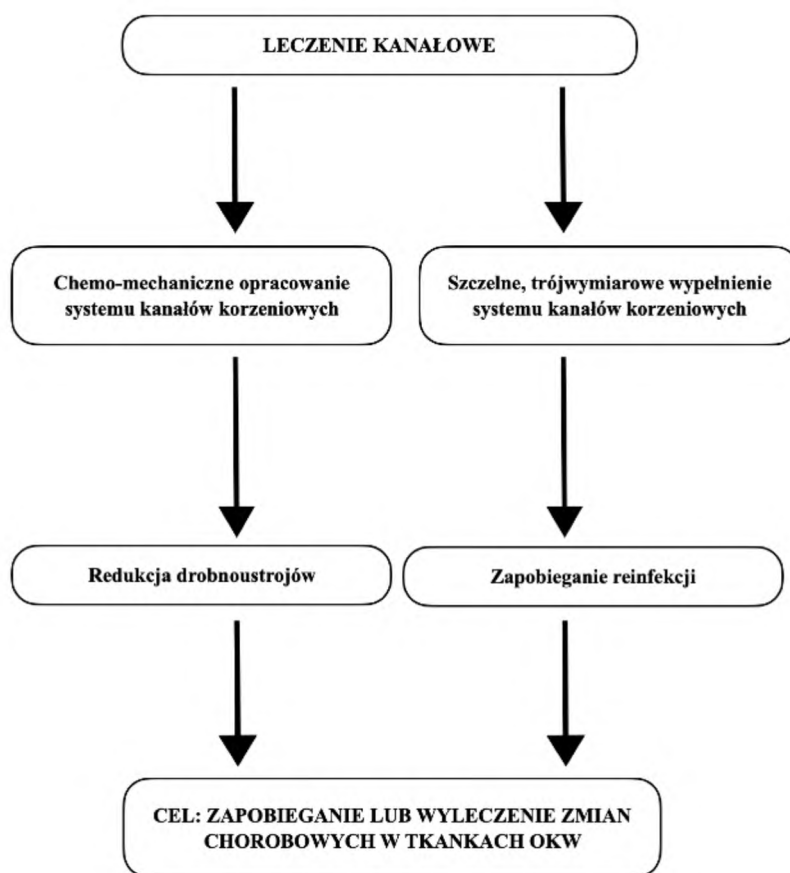
XI. Piśmiennictwo

XII. Oświadczenia współautorów

I. Wstęp i uzasadnienie celu badań

I. 1. Cel leczenia kanałowego

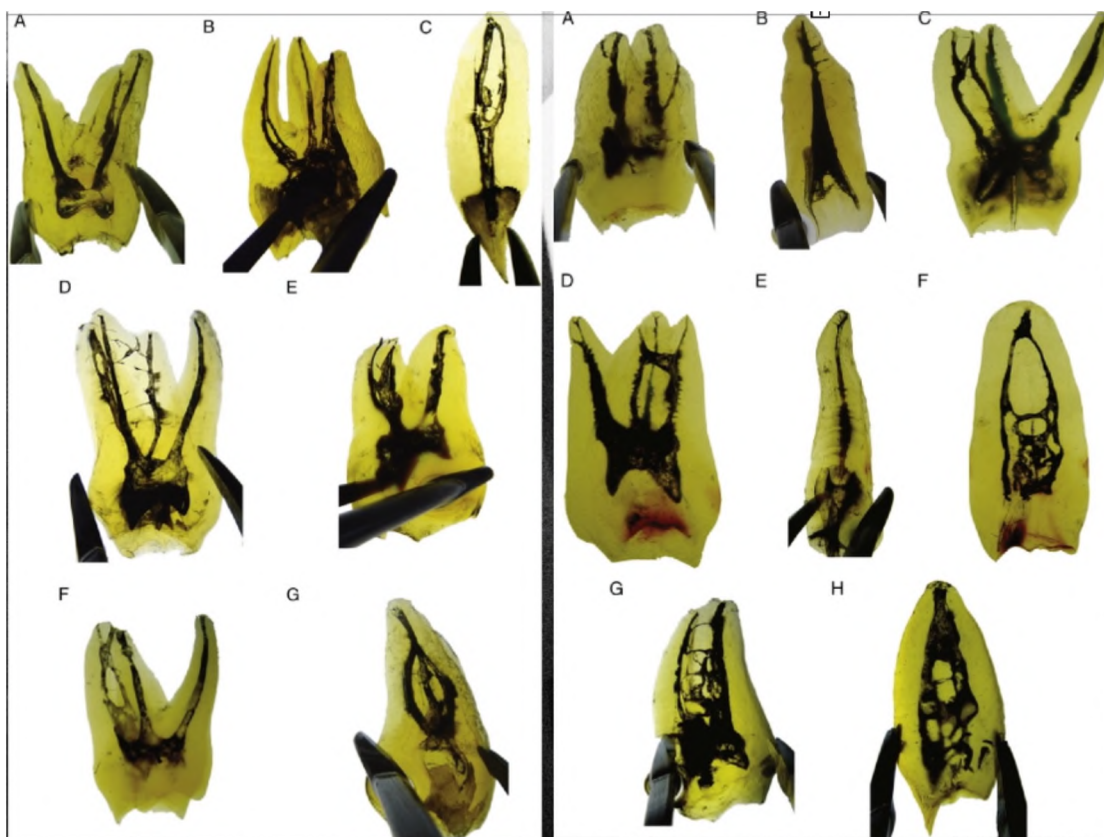
Celem leczenia kanałowego jest stworzenie warunków dla prawidłowego funkcjonowania przyzębia okołowierzchołkowego, w tym zapobieganie lub



Ryc. 1 Cel leczenia kanałowego i składowe jego osiągnięcia

wygojenie zmian chorobowych w tkankach okołowierzchołkowych. Cel ten osiągnany jest na drodze przestrzegania elementów algorytmu leczenia kanałowego, na który składa się: izolacja pola zabiegowego, preparacja dostępu koronowego, chemiczne i mechaniczne opracowanie przestrzeni endodontycznej oraz szczelne, ostateczne wypełnienie systemu kanałowego i korony. Działania te mają na celu redukcję drobnoustrojów oraz zapobieżenie ponownemu namnożeniu patogennej mikroflory (Ryc. 1).

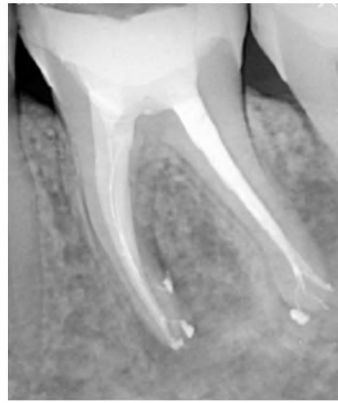
Dynamiczny rozwój technik obrazowania radiologicznego oraz wprowadzenie do praktyki klinicznej mikroskopu zabiegowego przyczyniły się do rozwoju wiedzy w obszarze anatomii zębów i umożliwiły uszczegółowienie nazewnictwa. W świetle ujawnionej złożoności struktur endodontycznych zęba uzasadnione jest zastąpienie nazwy „kanał korzeniowy” przez „system kanałów korzeniowych” lub „przestrzeń endodontyczna”. Taka terminologia wydaje się bardziej odpowiednia dla opisu skomplikowanej, trójwymiarowej przestrzeni wnętrza zęba, którą należy efektywnie opracować, a następnie szczelnie wypełnić (Ryc. 2) [1,2]. Kanałem korzeniowym możemy w świetle obecnej wiedzy nazwać jedynie najszerszy przekrój przestrzeni endodontycznej, który jest dostępny dla mechanicznej preparacji narzędziami kanałowymi, natomiast reszta elementów tej przestrzeni, takich jak cieśni, kanały



Ryc. 2 System kanałów korzeniowych uwidoczniony metodą wg. Weng i wsp. [4]



Ryc. 3 Kanał boczny widoczny po obturacji przestrzeni endodontycznej w zębie 24- przypadek własny



Ryc. 4 Delta wierzchołkowa widoczna po wypełnieniu przestrzeni endodontycznej w korzeniach bliższym i dalszym zęba 46- przypadek własny



Ryc. 5 Przykład cieśni, która łączy kanały korzenia bliższego w zębie 46 oraz szeroki kanał boczny, będący przyczyną zmiany w furkacji- przypadek własny



Ryc. 6 Kanały policzkowy i podniebienny w zębie 15 połączone cieśnią na różnym etapie przebiegu- przypadek własny

boczne, kanaliki zębinowe, ramifikacje i delta korzeniowa mogą być opracowane tylko na drodze chemicznej preparacji (Ryc. 3-6) [3].

Fakt ten podnosi wagę chemicznej składowej chemo-mechanicznej preparacji w leczeniu endodontycznym, jako niezwykle istotnego etapu leczenia, mającego wpływ na długotrwałe rokowanie. Jest to powodem poszukiwania coraz bardziej

efektywnych środków płuczących oraz udoskonalania protokołów płukania kanałów korzeniowych.

I. 2. Cel chemicznej preparacji przestrzeni endodontycznej

Celem chemicznej preparacji przestrzeni endodontycznej, czyli płukania kanałów korzeniowych jest kontrola infekcji (ang. infection control), albowiem już w latach 50-tych XX wieku dostarczono przekonujących dowodów naukowych na to, że zapalenie miazgi i tkanek okołowierzchołkowych nie rozwinie się bez obecności drobnoustrojów [5,6]. Kontrola infekcji osiągnięta jest poprzez: usunięcie miazgi z przestrzeni endodontycznej, redukcję patogenów w tej przestrzeni oraz usunięcie warstwy mazistej. Osiągnięcie tych celów uwarunkowane jest min. właściwościami chemicznymi stosowanych płynów irygujących oraz sposobem ich stosowania (protokół płukania) (Ryc. 7). Na protokół płukania składa się: stężenie i objętość stosowanego płynu, rodzaj i czas aktywacji środka płuczącego, czas płukania, kolejność stosowanych związków chemicznych.

Podchloryn sodu	Usuwanie miazgi = zdolność do rozpuszczania tkanek organicznych
Podchloryn sodu	Eliminacja patogenów = właściwości antymikrobiologiczne
Chlorheksydyna	
Kwas cytrynowy	Usunięcie komponenty nieorganicznej warstwy mazistej = zdolności chelatujące
EDTA	
Podchloryn sodu	Usunięcie komponenty organicznej warstwy mazistej = zdolność do rozpuszczania tkanek organicznych

Ryc. 7 Podstawowe płyny do płukania kanałów korzeniowych i ich właściwości korzystne w procesie leczenia kanałowego

I. 3. Płyyny stosowane w protokole płukania kanałów korzeniowych

Do chwili obecnej nie istnieje jeden antyseptyk, który spełniałby wszystkie kryteria idealnego płynu do płukania kanałów korzeniowych. Zehnder [7] zdefiniował te kryteria jako:

- posiadanie szerokiego spektrum antymikrobiologicznego i wysokiej efektywności w usuwaniu bakterii i ich biofilmów,
- zdolność do efektywnego rozpuszczania tkanek organicznych, zarówno miazgi żywej, jak i jej nekrotycznych pozostałości,
- zdolność do inaktywacji endotoksyn,
- zdolność do zapobiegania formowania warstwy mazistej na ścianach kanałów podczas mechanicznej preparacji lub zdolność do usuwania tej warstwy, gdy dojdzie do jej uformowania,
- inne, pomniejsze: niski koszt, brak toksyczności, brak zdolności do przyżegania tkanek periodontium w razie kontaktu, brak potencjału do powodowania reakcji uczuleniowych.

Najbliżej spełnienia tych kryteriów jest podchloryn sodu (NaOCl). Jest on używany w stężeniach od 2% do 6% (najczęściej 5,25%). Jego najważniejszą cechą z punktu widzenia endodontycznego jest unikalna zdolność do rozpuszczania tkanek organicznych, co pozwala na usunięcie miazgi, resztek tkankowych i mikroorganizmów z rejonów przestrzeni endodontycznej, które nie są osiągalne dla mechanicznej preparacji. Nie mniej ważne jest szerokie spektrum właściwości antymikrobiologicznych podchlorynu sodu oraz zdolność do usuwania komponenty organicznej warstwy mazistej [8]. NaOCl jest używany podczas całego leczenia endodontycznego, co nie tylko redukuje mikroflorę systemu kanałów, ale też przyspiesza mechaniczną preparację, skraca czas leczenia, minimalizuje ryzyko separacji narzędzi w przestrzeni endodontycznej. W końcowym protokole płukania natomiast używany jest do ostatecznej redukcji mikrobioty kanałów korzeniowych oraz usunięcia komponenty organicznej warstwy mazistej [9].

Chelatory - do których należą 40% kwas cytrynowy (CA) oraz 17% kwas etylenodiaminoczteroocowy (EDTA) - mają zdolność do wiązania jonów wapnia, co doprowadza do odwapnienia, a tym samym zmniejszenia twardości zębiny oraz zwiększenia jej przepuszczalności [10]. Związki te są używane w końcowym protokole płukania kanałów korzeniowych w celu usunięcia komponenty nieorganicznej warstwy mazistej [11,12].

Związki z grupy biguanidów: 2% chlorheksydyna (CHX) i mniej znana 1% aleksydyna (ALX) są trzecią grupą roztworów najczęściej stosowanych w endodoncji. Roztwór 2% chlorheksydyny wykorzystuje się jako dodatkowy związek przeciwbakteryjny, ze względu na szerokie spektrum antymikrobiologiczne i unikalną zdolność do przedłużonego działania odkażającego, trwającego nawet po ewakuacji tego płynu z przestrzeni endodontycznej, zwanego „substantywnością” (ang. substantivity) [13]. Ze względu na swoje właściwości, chlorheksydyna dedykowana jest szczególnie jako ostatni płyn stosowany w końcowym protokole płukania zainfekowanych kanałów korzeniowych, aby jak najskuteczniej usunąć bakterie z kanalików zębinowych, gdyż penetracja NaOCl do ich wnętrza jest niska [14].

I. 4. Interakcje płynów do płukania kanałów korzeniowych

Aby spełnić wszystkie cele chemicznej preparacji przestrzeni endodontycznej, konieczne jest użycie sekwencji kilku płynów do płukania kanałów korzeniowych. Ich interakcja musi więc stanowić przedmiot pogłębionych badań, ze względu na prawdopodobieństwo ich zmieszania w przestrzeni endodontycznej.

Szczególnie korzystne jest synergistyczne działanie NaOCl i CHX przeciwko patogenom endodontycznym. Jednak w praktyce klinicznej związków tych nie można mieszać w przestrzeni kanału korzeniowego, gdyż ich interakcja powoduje powstawanie brązowego osadu i uwalnianie toksycznego, kancerogennego związku p-chloroaniliny (PCA) [15-17]. Nierozpuszczalny osad o barwie brązowej działa jak chemiczna warstwa mazista, zmniejszając przepuszczalność zębiny w wierzchołkowej 1/3 części przestrzeni endodontycznej [18] i w związku z tym zmniejsza penetrację uszczelniacza, co skutkuje pogorszeniem szczelności

wypełnienia kanałów. Ponadto należy unikać mieszaniny CHX i NaOCl ze względu na potencjał przebarwienia tkanek twardych korony zęba [19]. Dlatego rozpoczęto poszukiwanie alternatywnego dla CHX związku, który posiadałby korzystne cechy chlorheksydyny bez potencjału do tworzenia osadów i związków toksycznych po zmieszaniu z NaOCl.

Dichlorowodorek aleksydyny (ALX), biguanid bardzo podobny do CHX, po raz pierwszy wprowadzony do stomatologii w testach jako płyn do płukania jamy ustnej [20], został zaproponowany jako alternatywa dla CHX w protokole płukania kanałów korzeniowych. Przemawiały za tym właściwości chemiczne podobne do CHX, w tym wysoka skuteczność w usuwaniu *Enterococcus faecalis* [21] i dłuższa substancywność przeciwdrobnoustrojowa w porównaniu z 2% CHX [22]. W 2012 roku Kim i wsp. przetestowali ALX jako alternatywę dla CHX [23] i zbadali jej interakcję z NaOCl pod kątem powstawania osadu i pochodnych PCA. W tym badaniu cztery różne stężenia ALX (0,125%, 0,25%, 0,5% i 1% (w/v)) zmieszano z 4% (w/v) roztworem NaOCl i analizowano za pomocą spektrometrii mas z jonizacją przez elektrorozpylanie (ESI-MS), aby określić, czy ta interakcja powoduje powstanie PCA i wytrącenie brunatnego osadu. W rezultacie interakcja ALX i NaOCl nie spowodowała powstania PCA ani osadów, jednakże dotychczas nie podjęto żadnych kroków w celu identyfikacji związków chemicznych powstających w tej reakcji. Konieczność pełnej identyfikacji uwalnianych produktów ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia natury tej interakcji i dalszej oceny ich potencjalnej toksyczności.

I. 5. Techniki aktywacji płynów do płukania kanałów korzeniowych

Kolejnym czynnikiem wpływającym na skuteczność dezynfekcji systemu kanałowego jest sposób podawania środków płuczących do przestrzeni endodontycznej [24]. Konwencjonalny sposób podawania środka płuczącego za pomocą igły i strzykawki (ang. syringe and needle irrigation, SNI) nie spełnia kryteriów efektywnej irygacji, czyli rozprowadzenia środka płuczącego w miejscach, do których nie można dotrzeć za pomocą mechanicznej preparacji [24].

W miarę zwiększania się wiedzy lekarzy dentystów na temat hydrodynamiki w przestrzeni endodontycznej, zaczęto stosować techniki aktywacji płynów używanych do płukania systemu kanałów korzeniowych (ang. irrigation agitation techniques, IAT) [25]. Najczęściej stosowane metody IAT obejmują pasywną irygację ultradźwiękową (ang. passive ultrasonic irrigation, PUI), gdy środki irygujące są aktywowane za pomocą ultradźwięków (ang. ultrasonic, US), aktywację dźwiękową (ang. sonic activation, SA), gdy płyny aktywuje się za pomocą częstotliwości dźwiękowych, a także ręczną irygację dynamiczną (ang. manual dynamic irrigation, MDI lub ang. manual dynamic agitation, MDA).

Wszystkie te metody mają na celu zmianę przepływu laminarnego na turbulentny, co zwiększa działanie roztworów chemicznych rozprowadzanych w przestrzeni endodontycznej za pomocą fal ciśnienia płynu generowanych ultradźwiękowo, dźwiękowo lub ręcznie [26]. Dzięki temu możliwa jest skuteczniejsza dezynfekcja przestrzeni endodontycznej [26,27].

Uważa się, że PUI, metoda wykorzystująca US do aktywacji, jest najskuteczniejszą metodą usprawnienia preparacji chemicznej w aspekcie oczyszczania kanałów korzeniowych [26,27,28], usuwania mikroflory z przestrzeni endodontycznej [29,30] oraz penetracji roztworów do kanalików zębinowych [29,31]. Intensywność aktywacji ultradźwiękowej o częstotliwości 28–36 kHz wpływa na przenoszenie energii przez swobodnie oscylujący pilnik wewnątrz przestrzeni kanałów korzeniowych wypełnionej roztworem płuczącym [26,31]. Powoduje to powstawanie drgań akustycznych, nie tylko na końcu, ale wokół całej długości pilnika ultradźwiękowego [27,28,31].

MDI poprawia działanie przeciwdrobnoustrojowe środków do płukania endodontycznego, ułatwia oczyszczanie przestrzeni endodontycznej i zapewnia drożność wierzchołka [32]. W tej technice stosuje się świek gutaperkowy (GP), wykonując ruch w górę i w dół w kanale korzeniowym z częstotliwością co najmniej 100 ruchów na minutę [32]. MDI można stosować do wszystkich środków irygacyjnych, nie wymaga stosowania zaawansowanych urządzeń i specjalnie zaprojektowanych pilników, w związku z czym metoda ta dedykowana jest dla mniej doświadczonych praktyków [32].

O ile agitacja NaOCl i chelatorów w świetle przestrzeni endodontycznej jest zalecana, o tyle aktywacja biguanidu chlorheksydyny budzi kontrowersje. Z jednej strony wzburzenie roztworu CHX za pomocą PUI w systemie kanałów korzeniowych zwiększa jego działanie przeciwdrobnoustrojowe i penetrację do kanalików zębowych [31], z drugiej jednak aktywacja ultradźwiękowa zwiększa temperaturę 2% CHX [33,34], a ogrzewanie CHX powoduje jej degradację i powstawanie para-chloroaniliny (PCA) [35]. Dlatego też postawiono hipotezę badawczą, że aktywacja CHX przy użyciu ultradźwięków prowadzi do uwolnienia PCA.

Ciągła ekspozycja na PCA powoduje u szczurów wiele typów nowotworów: włókniakomięsak i kostniakomięsak śledziony, guz chromochłonny nadnerczy, naczyniakomięsak wątrobowy, a także methemoglobinemię u ludzi [36,37]. Ponadto w nieprawidłowo przeprowadzonym protokole płukania kanałów zębowych, brązowy osad powstający w reakcji CHX i NaOCl, zawierający PCA, nie może zostać całkowicie usunięty ze ścian kanałów korzeniowych, co wiąże się z pogorszeniem jakości wypełnienia kanałów korzeniowych [36,38] i w konsekwencji może skutkować niepowodzeniem leczenia. W związku z tym, w środowisku endodontycznym panował niepisany konsensus, aby unikać aktywacji CHX ultradźwiękami, preferując te metody aktywacji, które nie powodują podgrzania roztworu (MDI). Niemniej jednak dotychczas nie przedstawiono bezpośredniego dowodu naukowego potwierdzającego ten potencjalnie toksyczny efekt aktywacji CHX metodą PUI, ani też na bezpieczeństwo stosowania metody MDI dla aktywacji tego biguanidu w leczeniu endodontycznym. Co więcej, nie przeprowadzono nigdy analizy ilościowej PCA uwolnionego z 2 % CHX aktywowanej US lub metodą manualną. Nie ma więc bezpośrednich dowodów naukowych potwierdzających bezpieczeństwo aktywacji CHX metodami manualnymi, jak również niebezpieczeństwo aktywacji tego płynu przy użyciu ultradźwięków.

II. Cel pracy

Głównym celem badań było :

1. ocena bezpieczeństwa stosowania 1% aleksydyny jako alternatywy dla dotychczas stosowanej 2% chlorheksydyny w protokole płukania systemu kanałów korzeniowych,
2. ocena bezpieczeństwa aktywacji 2% chlorheksydyny metodą PUI i MDI w protokole płukania systemu kanałów korzeniowych.

Określając cele szczegółowe dążyliśmy do poszerzenia wiedzy na temat natury reakcji chemicznej połączenia 1% aleksydyny z podchlorynem sodu, poprzez zastosowanie zaawansowanych metod laboratoryjnych (Ultra wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas - UHPLC-MS), jak również analizy ilościowej uwolnionego PCA z nieaktywowanej i aktywowanej różnymi metodami 2% CHX.

Na cele szczegółowe składała się:

W eksperymencie nr 1:

1. identyfikacja związków chemicznych powstałych podczas reakcji połączenia 1% ALX z 5,25 % NaOCl,
2. ocena, czy połączenie 1% ALX z 5,25% NaOCl doprowadza do powstania makroskopowo widocznego osadu,
3. potwierdzenie, że połączenie 2% CHX z 5,25% NaOCl skutkuje powstaniem pochodnych PCA, przy użyciu bardziej zaawansowanych i dokładniejszych metod chemii analitycznej,
4. potwierdzenie, że połączenie 1% ALX z 5,25% NaOCl nie skutkuje powstaniem pochodnych PCA, przy użyciu bardziej zaawansowanych i dokładniejszych metod chemii analitycznej.

W eksperymencie nr 2:

1. zbadanie ilości uwolnionego PCA z ultradźwiękowej agitacji 2%CHX metodą PUI,
2. zbadanie ilości uwolnionego PCA z manualnej agitacji 2%CHX metodą MDI,
3. zbadanie ilości uwolnionego PCA z butelki 2% CHX nieaktywowanej, przechowywanej w warunkach pokojowych,
4. zbadanie zmian temperatury w roztworze 2% CHX poddanej aktywacji ultradźwiękowej metodą PUI i aktywacji manualnej metodą MDI,
5. zbadanie zależności pomiędzy ilością uwolnionej PCA a czasem aktywacji w grupie PUI,
6. zbadanie zależności pomiędzy ilością uwolnionej PCA a czasem aktywacji w grupie MDI,
7. zbadanie zależności pomiędzy ilością uwolnionej PCA a grubością pilnika w grupie PUI,
8. zbadanie zależności pomiędzy ilością uwolnionej PCA a rozmiarem ćwieka w grupie MDI,
9. zbadanie zależności pomiędzy ilością uwolnionej PCA a czasem przechowywania butelki z 2% CHX w warunkach temperatury pokojowej,
10. przeprowadzenie porównania ilości uwolnionego PCA z 2% CHX nieaktywowanej i przechowywanej w temperaturze pokojowej, aktywowanej ultradźwiękami metodą PUI i manualnie metodą MDI.

Badania zostały sfinansowane ze środków własnych na działalność statutową Katedry Stomatologii Zachowawczej Instytutu Stomatologii WL UJCM i Wydziału Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego i nie wymagały uzyskania zgody Komisji Bioetycznej Uczelni.

III. Materiały i metody

III. 1. Eksperyment nr 1

III.1.1. Materiały

- metanol i acetonitryl (stopień czystości MS) (Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- kwas mrówkowy i etanol (Merck, Darmstadt, Niemcy),
- dichlorowodorek aleksydy (stopień czystości > 98%) (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Teksas, USA),
- roztwory stosowane w protokołach endodontycznych: Gluco-chex (2%, w/v, roztwór diglukonianu chlorheksydy), CHLORAN 5,25% (5,25% roztwór podchlorynu sodu) i CHLORAN 2% (2% (w/v) roztwór podchlorynu sodu) (Chema-Elektromet (Rzeszów, Polska),
- 4-Chloroanilina (p- chloroanilina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA),
- woda ultraczysta (18,2 MΩcm, TOC < 5 ppb) (otrzymano stosując system Milli-Q Plus, Merck-Millipore, Burlington, MA, USA).

III.1.2. Metoda

III.1.2.1 Przygotowanie roztworów podstawowych i wzorcowych

Roztwór podstawowy ALX (4 mg ml⁻¹ w przeliczeniu na związek zasadowy) przygotowano przez rozpuszczenie standardu analitycznego w mieszaninie wody i etanolu 4:1 (v/v). Roztwór podstawowy PCA (1 mg ml⁻¹) otrzymano przez rozpuszczenie PCA w metanolu. Standardowy roztwór roboczy ALX i niestandardowy roztwór roboczy CHX (500 ng ml⁻¹) przygotowano poprzez rozcieńczenie roztworu podstawowego ALX lub roztworu handlowego CHX stosowanych w protokołach endodontycznych odpowiednio w wodzie i acetonitrylu 1:1 (v/v). Roztwory robocze NaOCl przygotowano poprzez rozcieńczenie 5,25% (w/v) roztworu NaOCl w wodzie (1:0, 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49, 1:99, v/ v). Ponadto zastosowano dostępny na rynku 2% (v/w) roztwór NaOCl, bez wcześniejszego

rozcieńczania. Roztwór wzorcowy PCA (200 ng mL^{-1}) przygotowano przez rozcieńczenie roztworu podstawowego w mieszaninie wody i acetonitrylu w stosunku 1:1 (v/v). Wszystkie roztwory przechowywano w lodówce ($+4^{\circ}\text{C}$).

III.1.2.2. Procedura przygotowania próbki

Roztwory ALX i CHX zmieszano z równoważną objętością ($100 \mu\text{l}$) roboczych roztworów NaOCl. Zastosowano procedurę przemywania w celu usunięcia jonów sodu, które mogą zakłócać wykrywanie analitów i tworzyć addukty w źródle jonów spektrometru mas oraz powodując supresję jonów. Najpierw z każdej próbki pobrano ciekły supernatant, a osad przemyto zimną wodą ($+4^{\circ}\text{C}$). Następnie próbkę mieszano i odwirowano (10 min, $10\,000 \text{ obr./min}$, 0°C). Procedurę przemywania powtórzono trzykrotnie. Następnie osad rozpuszczono w $500 \mu\text{l}$ metanolu. Roztwory mieszaniny CHX i NaOCl oraz mieszaniny ALX i NaOCl rozcieńczono odpowiednio 1000-krotnie i 50-krotnie mieszaniną woda-acetonitryl ($\text{H}_2\text{O}-\text{ACN}$, 1:1, v/v). Przygotowane próbki poddano analizie UHPLC-MS. Próbkę ciekłego supernatantu rozcieńczono 10 000-krotnie $\text{H}_2\text{O}-\text{ACN}$ 1:1 (v/v) i poddano analizie UHPLC-MS.

III.1.2.3. Analiza UHPLC-MS

Badania przeprowadzono z wykorzystaniem systemu UHPLC-MS. System składał się z układu chromatografii cieczowej UltiMate 3000 RS (Dionex, Sunnyvale, Kalifornia, USA) sprzężonego z tandemowym spektrometrem mas z kwadrupolem i analizatorami czasu przelotu (Micro-TOF-Q II, Bruker, Bremen, Niemcy). Faza ruchoma składała się z wody z dodatkiem 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego (faza A) i acetonitrylu z 0,1% kwasu mrówkowego (faza B). W strumień eluenta wprowadzano $5 \mu\text{l}$ próbki za pomocą autosamplera, a rozdzielanie prowadzono w trybie izokratycznym (30% A, 70% B) w kolumnie Hypersil Gold Phenyl ($50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm}$ I.D., cząstki $1,9 \mu\text{m}$, Dionex, Sunnyvale, Kalifornia, USA) przez 16 min. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła $0,4 \text{ mL min}^{-1}$. Kolumnę termostatowano w

temperaturze 25°C. Źródło jonów przez elektrozpylanie pracowało w warunkach dodatniej jonizacji (ESI+). Pozostałe parametry MS były następujące: ciśnienie nebulizatora: 2,0 bar; przepływ suchego gazu: 5,5 L min⁻¹; temperatura gazu suszącego: 200°C; napięcie na kapilarze interfejsu źródła jonów: -500 V. Spektrometr kalibrowano z wykorzystaniem klastrow mrówczanu sodu (mieszanina kalibrująca). Do przewidywania sumarycznych wzorów cząsteczkowych wykorzystano oprogramowanie SmartFormula oraz ProfileAnalysis (Bruker). Zakres mas wynosił od 50 do 1500 m/z.

III.2. Eksperyment nr 2

III.2.1. Materiały

- stały wzorzec 4-chloroaniliny (PCA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, czystość 99%) rozpuszczony w metanolu w celu uzyskania roztworu podstawowego o stężeniu 10 mg/ml, przechowywany w temperaturze -20°C.
- płyn do płukania kanałów korzeniowych Gluco-Chex (Cerkamed, Polska) zawierający 2% diglukonianu chlorheksydyny, przechowywany w warunkach zalecanych przez producenta.
- bufor octanowy o pH 6,0 o sile jonowej 150 mmol l⁻¹, przygotowany poprzez dodanie 160 µL kwasu octowego o stężeniu 2 mol/L (Sigma-Aldrich, USA, czystość 99,8%) i 7,5 mL wcześniej przygotowanego octanu amonu o stężeniu 1 mol l⁻¹ do kolby miarowej o pojemności 50 ml, następnie dopełniono do kreski ultraczystą wodą,
- 1 mol l⁻¹ octan amonu, przygotowany przez rozpuszczenie ok. 1,927 g stałego octanu amonu (Sigma-Aldrich, USA) w 25 ml ultraczystej wody,
- woda ultraczysta (18,2 MΩcm, TOC < 5 ppb) (otrzymana stosując system Milli-Q Plus, Merck-Millipore, Burlington, MA, USA),
- metanol (Honeywell, czystość LC-MS ≥ 99,9%) jako faza ruchoma i acetonitryl (Honeywell, czystość LC-MS ≥ 99,9%) jako płyn do płukania strzykawki w chromatografii cieczowej,

- dichlorometan (Sigma-Aldrich, USA) do ekstrakcji związku docelowego,
- wysokosprawny chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Tokio, Japonia) sprzężony z detektorem z matrycą fotodiodową (detekcja przy 210 nm)

III.2.2. Metoda

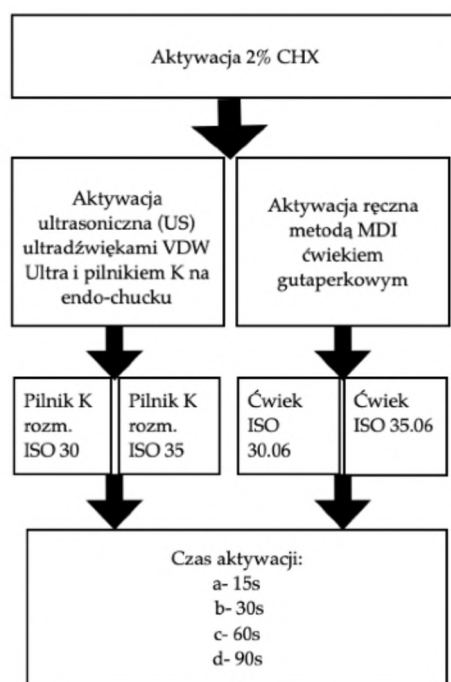
We wszystkich eksperymentach wykorzystano wysokosprawny chromatograf cieczowy LaChrom (Merck-Hitachi, Tokio, Japonia) sprzężony z detektorem z matrycą fotodiodową (detekcja przy 210 nm). Rozdzielanie prowadzono na kolumnie analitycznej Spheri-5 C18 (100 × 4,6 mm, 5 µm, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) w temperaturze 40°C. Separację przeprowadzono w trybie gradientowym, stosując natężenie przepływu 1 ml min⁻¹. Jako fazę A i fazę B zastosowano odpowiednio ultraczystą wodę i acetonitryl. Program gradientu rozpoczął się od 50% fazy A, którą utrzymywano przez 7 minut, A obniżono do 5% w ciągu 2 minut, a następnie utrzymywano przez kolejne 4 minuty. Następnie w ciągu 2 minut przywrócono skład fazy ruchomej do warunków początkowych i kolumnę stabilizowano przez kolejne 4 minuty. Całkowity czas analizy wynosił 20 minut. Każdorazowo, po analizie próbki wstrzykiwano próbki ślepe (mieszaninę woda-acetonitryl, 1:1, v/v), aby przepłukać układ chromatograficzny i tym samym uniknąć potencjalnego efektu przeniesienia. Objętość wstrzykniętej próbki wynosiła 15 µl.

III.2.2.1. Podział próbek na grupy doświadczalne i procedura agitacji CHX

Aby zbadać różne warunki wpływające na stabilność CHX podczas leczenia endodontycznego, zaprojektowano dwie grupy eksperymentalne w zależności od rodzaju procedury aktywacji przy użyciu 2% roztworu CHX: (1) irygację ultradźwiękową (US); (2) i ręczną irygację dynamiczną (MDI).

Schemat eksperymentu przedstawiono na Ryc. 8.

150 µl 2% CHX w 200 µL próbówce PCR aktywowano w czterech różnych czasach aktywacji: 15, 30, 60 i 90 s, a każde doświadczenie powtarzano trzykrotnie. Dodatkowo główne grupy eksperymentalne (US i MDI) podzielono na dwie



Ryc. 8 Schemat eksperymentu nr 2

podgrupy w zależności od grubości pilnika ultradźwiękowego (w grupie US) lub ćwieka gutaperkowego (w grupie MDI), użytych do aktywacji. Aby jak najlepiej naśladować warunki panujące w przestrzeni endodontycznej aktywację CHX w grupie US przeprowadzono za pomocą endodontycznego aparatu ultradźwiękowego VDW Ultra (VDW, Germany) z dedykowanym ultradźwiękowym pilnikiem K w dwóch rozmiarach: ISO 30 i ISO 35 (wielkość średnicy końcówki 0,30 mm i odpowiednio 0,35 mm, oba wyprodukowane przez VDW, Germany), zamontowanym na końcówce endo-chuck 90° o częstotliwości oscylacji 28–36 kHz. Pilnik US wprowadzano do próbki tak, aby swobodnie w niej oscylował z intencją nie dotykania ścianek.

Manualną aktywację 2% CHX metodą MDI wykonano przy użyciu ćwieków gutaperkowych o rozmiarach ISO 30 (o średnicy 0,30 mm na końcówce) i ISO 35 (o średnicy 0,35 mm na końcówce). Zastosowano ćwieki GP o sześcioprocentowej zbieżności, co oznacza, że średnica stożka zwiększała się o 0,06 mm na każdy mm jego długości. Częstotliwość ruchu push-pull ćwieka GP wynosiła ~3,3 Hz.

Zmiany temperatury roztworów CHX sprawdzano we wszystkich próbkach dla grup US i MDI przed i po każdej aktywacji.

III.2.2.2. Przygotowanie próbek do analizy HPLC

Wstępnie aktywowane próbki mieszano przez kilka sekund na wytrząsarce typu vortex w celu ujednoludnienia roztworów. Następnie 150 μ l próbki przeniesiono do świeżej probówki typu Eppendorf o pojemności 1,5 mL i dodano 300 μ l buforu octanowego o pH 6,0. Wartość pH buforu dobrano tak, aby p-chloroanilina ($pK_a=3,98$ [39]) występowała w roztworze w postaci deprotonowanej (hydrofobowej), natomiast CHX ($pK_a=10,8$ [40]) był protonowany i miał skłonność do pozostawania w fazie wodnej. W kolejnym etapie PCA ekstrahowano trzykrotnie, dodając do próbek każdorazowo 0,5 ml dichlorometanu. Po dodaniu każdej porcji próbki wytrząsano przez 5 minut przy 2100 obr./min, a następnie wirowano przez 5 minut ($11200 \times g$). Oddzieloną warstwę DCM (0,4 ml) przeniesiono do nowej 1,5 ml probówki typu Eppendorfa. Zebrane ekstrakty wirowano przez kilka sekund, a następnie 1,2 mL ekstraktu przeniesiono do nowej 1,5 mL probówki typu Eppendorf i odparowano pod delikatnym strumieniem azotu w temperaturze pokojowej ($\sim 23^\circ\text{C}$). Do powstałego osadu dodano 50 μ l roztworu ACN:H₂O (20:80, v/v) i wirowano przez 5 minut (2100 obr/min). Po rozpuszczeniu osadu 20 μ l próbki przeniesiono do fiolki ze szkła oranżowego z mikrowkładką 100 μ l, rozcieńczono 80 μ l roztworem ACN:H₂O (20:80) i poddano analizie chromatograficznej.

III.2.2.3. Analiza statystyczna

Dane zebrane podczas badania zostały przetworzone przy użyciu programu MS Excel (Office 365, Microsoft Redmond, WA, USA) w celu gromadzenia danych, obróbki wstępnej i obliczeń. Ryciny przygotowano przy użyciu oprogramowania (Compass Data Analysis, SmartFormula, Bruker, Brema, Niemcy) oraz Origin 2020 (OriginLab, Northampton, MA, USA).

Analizę statystyczną przeprowadzono w programie Statistica 13.3 PL (Tibco, Palo Alto, Kalifornia, USA). Wyniki porównano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA), przyjmując poziom istotności $\alpha = 0,05$. Dane

sprawdzono pod kątem normalności rozkładu wykorzystując test Lillieforsa ($\alpha = 0,05$). Początkowo dane sprawdzono pod kątem równości wariancji za pomocą testu Levene'a. Po wykryciu różnicy pomiędzy średnimi w teście ANOVA, przeprowadzono analizę *post-hoc* za pomocą testu Tukeya. W przypadkach, gdy nie zostały spełnione założenia analizy wariancji, zwłaszcza gdy test Levene'a wykazał istotną różnicę w wariancji, zastosowano test Kruskala–Wallisa na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, a następnie test *post-hoc* Dunna.

IV. Wykaz publikacji stanowiących rozprawę doktorską

1. **Barbara Czopik**, Monika Ciechomska, Joanna Zarzecka, Maciej Góra, Michał Woźniakiewicz. *Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. **Molecules**, 2021; 26(6):1623.*
2. **Barbara Czopik**, Aneta Woźniakiewicz, Natalia Świętoniowska, Joanna Zarzecka, Michał Woźniakiewicz. *Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. **Molecules**, 2023; 28(16):6159.*

V. Publikacje

Publikacja nr 1

Barbara Czopik, Monika Ciechomska, Joanna Zarzecka, Maciej Góra, Michał
Woźniakiewicz

Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in
Endodontic Treatment

Molecules

DOI: 10.3390/molecules26061623

Article

Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment

Barbara Czopik ^{1,*}, Monika Ciechomska ², Joanna Zarzecka ¹, Maciej Góra ³ and Michał Woźniakiewicz ²

- ¹ Jagiellonian University Medical College, Faculty of Medicine, Institute of Stomatology, Department of Conservative Dentistry with Endodontics, Montelupich 4, 30-155 Kraków, Poland; j.zarzecka@uj.edu.pl
² Laboratory for Forensic Chemistry, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland; monikaciechomska@wp.pl (M.C.); michal.wozniakiewicz@uj.edu.pl (M.W.)
³ Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland; maciej.gora74@gmail.com
 * Correspondence: bczopik@o2.pl; Tel.: +48-608505816



Citation: Czopik, B.; Ciechomska, M.; Zarzecka, J.; Góra, M.; Woźniakiewicz, M. Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. *Molecules* **2021**, *26*, 1623. <https://doi.org/10.3390/molecules26061623>

Academic Editor:
Diego Munoz-Torrero

Received: 31 January 2021
Accepted: 9 March 2021
Published: 15 March 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Therapeutic success in endodontic treatment depends on successful infection control. Alexidine dihydrochloride (ALX) was recently proposed as a potential alternative to 2% chlorhexidine (CHX) as it possesses similar antimicrobial properties, expresses substantivity and does not produce p-chloroaniline (PCA) when mixed with sodium hypochlorite (NaOCl). However, the products released in this reaction have not been described to date. The aim of this study was to identify detected chemical compounds formed in the reaction of ALX and NaOCl with the ultra-high-performance liquid chromatography–mass spectrophotometry (UHPLC-MS) method and assess whether precipitates and PCA are formed in this reaction. Solutions of ALX were mixed with the equivalent volume of 2% and 5.25% (*w/v*) NaOCl solutions. As control, 2% (*w/v*) CHX was mixed with 2% and 5.25% (*w/v*) NaOCl. Samples were subjected to the UHPLC-MS analysis. The mixture of ALX and NaOCl resulted in a yellowish precipitate formation, the amount of which depended on NaOCl concentration. Interaction of ALX and NaOCl resulted in the production of aliphatic amines. No PCA was formed when NaOCl was mixed with ALX. However, for the first time, we identified the possible products of the interaction. The interaction between NaOCl and ALX results in the formation of aliphatic amines; therefore, these compounds should not be mixed during endodontic treatment.

Keywords: alexidine; sodium hypochlorite; chlorhexidine; root canal treatment; ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry; p-chloroaniline

1. Introduction

One of the main objectives of endodontic treatment is the eradication of infection from root canal systems by chemical and mechanical preparation. It has been widely proved that microbial reduction improves the prognosis of root canal treatment and therefore is the key to achieving endodontic success, as no apical periodontitis will develop without the presence of bacteria [1]. It is a general agreement that final therapeutic success is usually dependent on successful infection control [2].

Sodium hypochlorite (NaOCl), a basic solution used in irrigation protocol due to its unique tissue-dissolving capacities and broad antimicrobial spectrum, is not able to fulfill all criteria of effective chemical preparation, especially regarding smear layer removal and total eradication of microbiota. One-third to one-half of treated root canals remain infected when irrigated with 5.25% NaOCl only [3]. It is therefore suggested that adjunctive chemical solutions be used.

For enhancing the bactericidal effect of NaOCl, 2% chlorhexidine (CHX) was advocated as an additional antimicrobial agent used in irrigation protocol [4]. It is highly

effective in killing Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as yeasts [5]. Additionally, CHX possesses the unique feature of a prolonged antimicrobial effect, even after its removal from root canals, which is a clinical phenomenon called substantivity [6,7]. Hence, it is mainly useful as a final irrigant, especially in retreatment cases in which the root canal system is colonized with high proportions of Gram-positive bacteria [8]. CHX administration as a final rinse is particularly important for effective bacteria removal from dentinal tubules, as NaOCl penetration inside them is very small or nonexistent [9]. Therefore, an adjunct synergistic action of NaOCl and CHX against endodontic pathogens would be advised; however, these two chemical compounds cannot be mixed inside the root canal space, as their interaction results in a brown precipitate formation and the release of the toxic compound p-chloroaniline (PCA) [10–12]. The insoluble brown-colored precipitate acts as a chemical smear layer reducing the dentinal permeability in the apical third of the root canal [13] and therefore decreases the penetration of the sealer, which results in impaired sealing and causes microleakage. Furthermore, a mixture of CHX and NaOCl should be avoided because of the possibility of color changes in dental structures [14]. Therefore, an alternative solution would be beneficial, one that possesses the advantageous features of CHX and lacks its potential to form precipitates and toxic compounds when mixed with NaOCl.

Alexidine dihydrochloride (ALX), a biguanide very similar to CHX, was first introduced to dentistry when tested as a mouth-rinse [15]. It possesses chemical properties similar to CHX and was reported to have an even greater affinity for bacterial virulence factors [16]. A solution of 1% (*w/v*) ALX was equally effective in *Enterococcus faecalis* removal as 2% (*w/v*) CHX when tested on infected bovine dentin blocks [17]. Furthermore, 1% and 2% ALX provide longer antimicrobial substantivity against these pathogens, compared to 0.5% and 2% (*w/v*) CHX, respectively [18].

Kim et al. tested ALX as an alternative to CHX as a root canal irrigating solution [19]. In that study, four different concentrations (0.125%, 0.25%, 0.5% and 1% (*w/v*)) of ALX were mixed with a 4% (*w/v*) solution of NaOCl and analyzed with electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) to determine whether PCA or precipitates were formed. As a result, the interaction of ALX and NaOCl did not produce PCA or precipitates; however, to date, no steps have been undertaken to identify chemical compounds formed in this reaction. The need for complete identification of products released is crucial for understanding the nature of this interaction and further assessment of the potential toxicity of these chemical compounds. The aim of this study was to determine and identify detected chemical compounds formed in the reaction of ALX and NaOCl with the ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrophotometry (UHPLC-MS) method.

2. Results

2.1. Mixture of CHX and NaOCl

The mixing of CHX and NaOCl resulted in the formation of a red-brown precipitate. The amount of precipitate varied depending on NaOCl concentration (with constant CHX concentration), but the precipitate was always present even if NaOCl concentration was highly diluted (5.25% (*w/v*) NaOCl–H₂O, 1:99 (*v/v*)). Figure 1 shows pictures of obtained precipitate in each mixture.

Previously, some researchers claimed that PCA was not formed after the reaction of CHX with NaOCl [10,11,19], while others claimed that it was [12,20]. As NaOCl is quite a strong oxidative agent, the authors of the present paper hypothesized that PCA is generated under the conditions used. To confirm that statement, the precipitate formed in each mixture (Figure 1) was dissolved in methanol then examined by means of UHPLC-MS. Acquired chromatograms and mass spectra were analyzed and compared with those obtained after the analysis of PCA and CHX standard solutions.

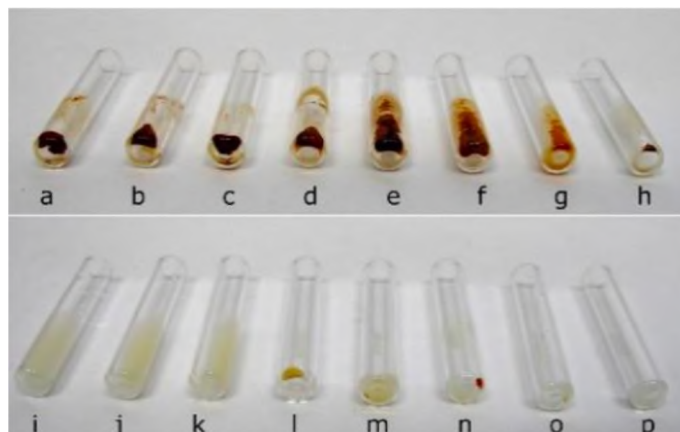


Figure 1. Precipitates obtained after adding chlorhexidine (CHX) to 5.25% sodium hypochlorite (NaOCl) (a); 2% (w/v) NaOCl (b); and 5.25% (w/v) NaOCl:H₂O (c–h) mixed in the ratio of 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49 and 1:99 (v/v), respectively, and precipitates obtained after adding alexidine dihydrochloride (ALX) to 5.25% (w/v) NaOCl (i); 2% NaOCl (j); and 5.25% (w/v) NaOCl:H₂O (k–p), mixed in the ratio of 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49 and 1:99 (v/v), respectively.

Under the positive electrospray (ESI+) condition, a PCA molecule gives a characteristic ion: $128.0262\ m/z\ [M + H]^+$, which was monitored ($\pm 0.0050\ m/z$) during the analysis of the PCA standard mixture. The retention time of PCA was 0.56 min. The analysis of the precipitate mentioned above revealed the peak at the retention time of 0.56 min, corresponding to the ion of $128.0262 \pm 0.0050\ m/z$. The UHPLC-MS analysis of diluted supernatant showed no significant analytical signals, which may be attributed to significant ion suppression related to high salt concentration.

2.2. Mixture of ALX and NaOCl

When mixing ALX and NaOCl, a yellowish precipitate was formed. Similarly to the CHX–NaOCl reaction, the amount of precipitate depended on the NaOCl concentration (with constant ALX concentration). Correspondingly, the precipitate appeared in each case, even for the lowest NaOCl concentration (5.25% (w/v) NaOCl–H₂O 1:99 (v/v), see Figure 1).

Because of the lack of an aromatic ring (or moieties that could react with NaOCl to form aromatic rings) in the ALX structure, no PCA is formed. However, ALX might be oxidized in a similar way to CHX, resulting in the formation of aliphatic amines. As was assumed, no peak characteristic of PCA was present either on a mass spectrum or on a chromatogram of any analyzed precipitate formed in an ALX–NaOCl mixture. However, some other compounds that could be the products of the reaction between ALX and NaOCl were found. Their presence was predicted on the basis of possible reactions occurring in the mixture and confirmed by identifying these compounds on chromatograms (Figure 2) and corresponding MS spectra (see Supplementary Materials, Figure S1) used for prediction of the molecular formula using the dedicated software (Compass Data Analysis, SmartFormula, Bruker, Bremen, Germany). The postulated chemical structures of identified compounds are presented in Table 1. In some cases, two products are possible as products 2a and 2b, and also 3a and 3b, exhibits in tautomeric forms that can easily interconvert. Product 4 is a dehydrogenated form of N-(diaminomethylidene)-N''-(2-ethylhexyl)guanidine. However, the site of dehydrogenation remains unknown: it depends on the reaction conditions and cannot be determined by the used method. Product 5 is a dehydrogenated form of ALX; there are four fewer hydrogen atoms in product 5 than in ALX. Similarly to the situation mentioned above, the exact site of dehydrogenation remains unknown. The possible situations are, e.g., formation of double bonds or an aliphatic ring. Moreover, an ALX peak was also observed on all chromatograms of the ALX–NaOCl

mixture. The scheme of predicted reactions of ALX with NaOCl (Figure 3) was proposed on the basis of the results of the present experiment and the work of Lüttringhaus et al. [21]. Similarly, as in case of CHX, the UHPLC-MS analysis of diluted supernatant showed no significant analytical signals.

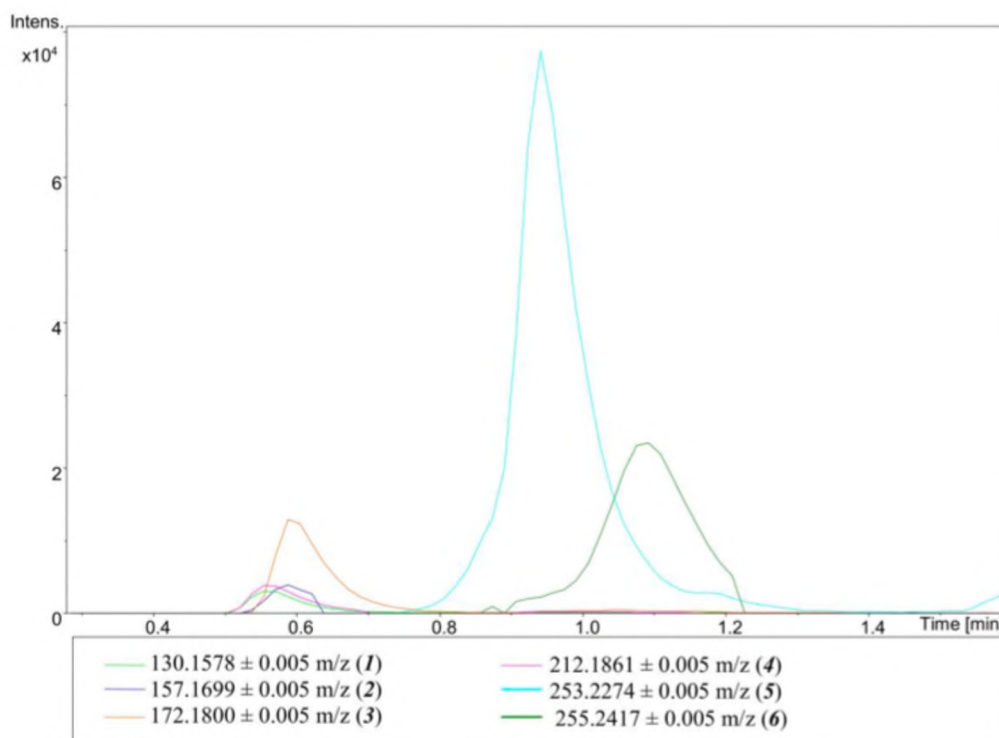
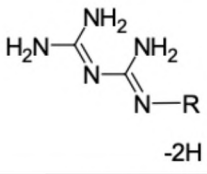
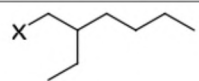


Figure 2. Chromatogram obtained for a mixture of ALX and 5.25% NaOCl–H₂O 1:49 (v/v). The numbers in the brackets correspond with the numbers in Table 1.

Table 1. Compounds identified as generated in the reaction between ALX and NaOCl.

No.	Formula	Predicted Structure	Name	Characteristic Ion <i>m/z</i>	Retention Time (min)
1	C ₈ H ₁₉ N	H ₂ N–R	2-ethylhexylamine	130.1578 [M + H] ⁺	0.57
2a	C ₉ H ₂₀ N ₂		N-(2-ethylhexyl)methanimidamide	157.1694 [M + H] ⁺	0.59
2b			N'-(2-ethylhexyl)methanimidamide		
3a	C ₉ H ₂₁ N ₃		N-(2-ethylhexyl)guanidine	172.1800 [M + H] ⁺	0.61
3b			N''-(2-ethylhexyl)guanidine		

Table 1. Cont.

No.	Formula	Predicted Structure	Name	Characteristic Ion m/z	Retention Time (min)
4	$C_{10}H_{21}N_5$ *		N-(diaminomethylidene)-N''-(2-ethylhexyl)guanidine	212.1861 $[M + H]^+$	0.96
5	$C_{26}H_{52}N_{10}$ *	ALX-4H	-	253.2274 $[M + 2H]^{2+}$	1.14
6	$C_{26}H_{56}N_{10}$	**	alexidine (ALX)	255.2417 $[M + 2H]^{2+}$	1.09
R	C_8H_{17}		2-ethylhexyl-	113.1330 $[M]$	-

* More than two structures are possible. ** See Figure 3 for structure (6).

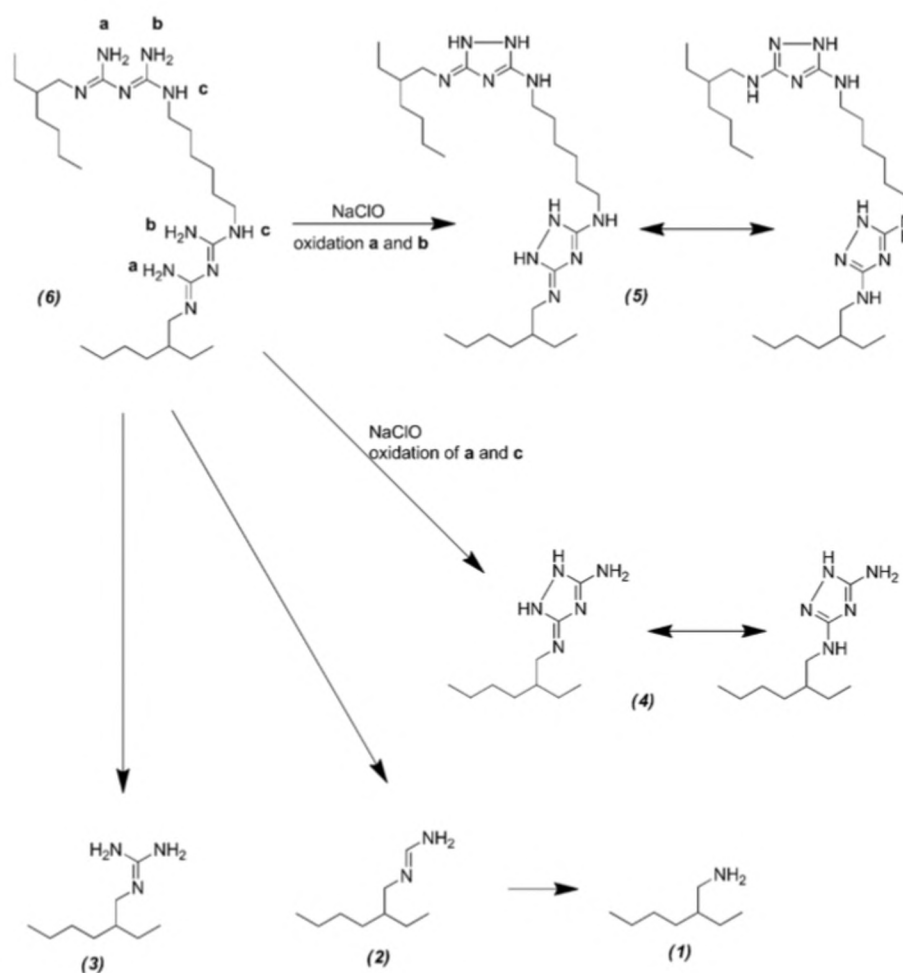


Figure 3. The scheme of possible reactions between ALX and NaOCl (numbers in the brackets correspond with the numbers from Table 1). Letters a, b, c and label nitrogen atoms in the amino groups of guanidine moieties in ALX molecule.

The relative reaction rates of the products depending on the concentration of NaOCl reagent have also been investigated and elaborated as the percentage of a particular peak area among investigated compounds (ALX has been skipped due to significantly higher values; see Supplementary Materials Figure S2).

3. Discussion

Previous studies examining the precipitate formed in the mixture of CHX and NaOCl either confirmed [10,11,19] or denied [12,20] the presence of PCA in the precipitate. The present work asserts that PCA was actually formed in each tested mixture of CHX and NaOCl. PCA induces hemato-, spleno-, hepato- and nephrotoxicity and has stronger cyanogenic potential than aniline [22,23]. Exposure to PCA can result in cyanosis, methemoglobinemia and increased sulfhemoglobin levels, the development of anemia and acute intoxication [22]. From that point of view, the inappropriate root canal disinfection regimen could have a noxious effect.

Interaction between ALX and NaOCl has been described and discussed previously [19,24,25]. Kim et al. [19] and Jain et al. [24] suggested that ALX can be a potential alternative for CHX solution in endodontic treatment. ALX was reported to have a similar chemical structure and properties and be even more potent in deactivating bacteria virulence factors than CHX. If so, ALX would be particularly useful as the final irrigant in the irrigation protocol, making it the last chemical compound that has contact with root canal dentin. However, the authors of those studies did not identify any product formed in the mixture of ALX and NaOCl [19,24,25]. Moreover, those studies on ALX–NaOCl interaction denied precipitate formation [19,24]. In the present work, it has been affirmed that different aliphatic amines are produced from the reaction of ALX and NaOCl. These amines are formed by breaking bonds in the ALX chain or dehydrogenation caused by NaOCl. Furthermore, the cytotoxicity of postulated products of the ALX and NaOCl reaction has been proved [26], and the toxicity of others needs to be further examined, as compounds with a similar structure we identified have neurotoxic potential [27].

The reaction between ALX and NaOCl should be characterized as a complex system. Nevertheless, based on the literature, it is possible to propose the mechanism of this process. Following the work of Hawkins et al. [28], the reaction mechanism depicted in Figure 4 proposes the formation of 2-ethylhexylamine (2), N-(diaminomethylidene)-N''-(2-ethylhexyl) guanidine (4) and ALX-4H found in the precipitate. One should also note that there is no substantial trend in formation of products in the precipitate; however, in highly diluted NaOCl, the production of compound 5 seems predominant, while simultaneously the amounts for compounds 1 and 2 decrease (see Figure S2 in the Supplementary Materials for details). It may indicate that oxidation at positions a and b (Figure 3) requires a lower concentration of the oxidative agent than in positions a and c.

For the first time, we have confirmed that the precipitate formed from the reaction of ALX and NaOCl is likewise formed from the reaction of CHX and NaOCl. The color of the precipitate is yellowish, and PCA is not formed. The differences regarding precipitate detection between our study and previous studies [19,24] may be due to different methodologies and experimental designs. Kim et al. [19] and Jain et al. [24] mixed ALX with NaOCl and observed color changes in the reaction solutions in test tubes, which was followed by observation of precipitates on the dentinal surfaces of teeth samples irrigated with an ALX–NaOCl mixture in scanning electron microscopy (SEM) under $\times 500$ and $\times 1000$ magnification. They did not observe precipitate formation on the dentinal surface [19,24]. In the present study, we have confirmed with more advanced analytical techniques that the yellowish precipitate is formed in the reaction of ALX–NaOCl. However, the sole fact of precipitate formation may not impair root canal obturation in the aspect of microleakage promotion, as the occlusion of dentinal tubules was not observed in SEM by other authors [19,24]. Therefore, further testing should be conducted to assess the influence of ALX on dentin properties, dentinal tubule penetration and root canal sealing

parameters. Only then can it be concluded that this compound has a better therapeutic value in endodontic treatment than the widely used CHX.

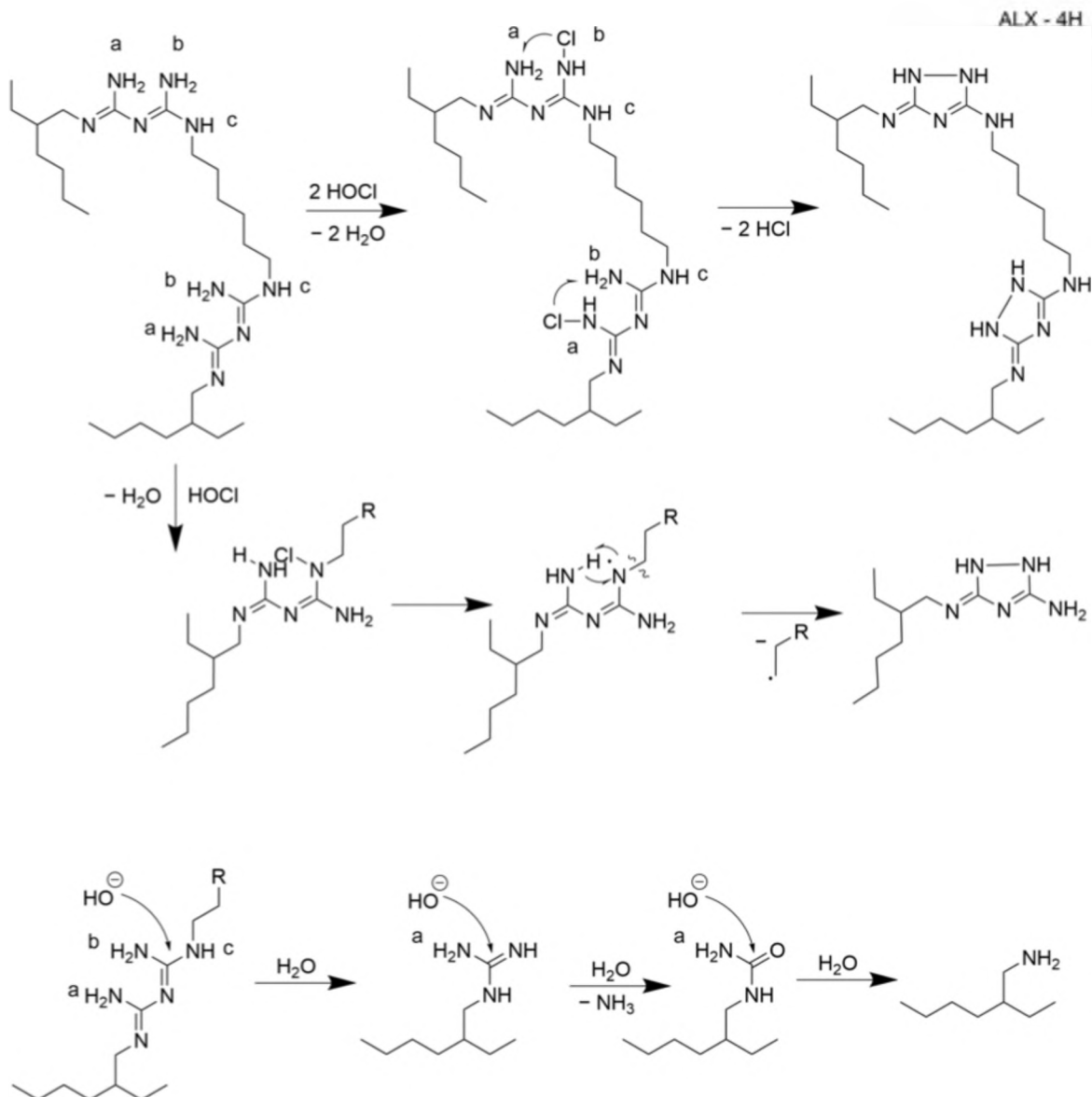


Figure 4. The scheme of reaction mechanism between ALX and NaOCl (the numbers in the brackets correspond with the numbers from Table 1). Letters a, b, and c label nitrogen atoms in the amino groups of guanidine moieties in ALX molecule.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

Methanol and acetonitrile (MS purity grade) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Formic acid and ethanol were supplied by Merck (Darmstadt, Germany). Alexidine dihydrochloride (> 98% purity grade) was purchased from Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA). Solutions used in endodontics protocols, namely Gluxodent (2% (*w/v*) solution of chlorhexidine digluconate), CHLORAN 5.25% (5.25% solution of sodium

hypochlorite) and CHLORAN 2% (2% (*w/v*) solution of sodium hypochlorite), were purchased from Chema-Elektromet (Rzeszów, Poland). 4-Chloroaniline (p-chloroaniline) was supplied by Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ultrapure water was generated in-lab using a Milli-Q system from Merck Millipore (Darmstadt, Germany).

4.2. Preparing of Stock and Standard Solutions

The stock solution of ALX (4 mg mL^{-1} calculated for base compound) was prepared by dissolving analytical standard in a mixture of water and ethanol 4:1 (*v/v*). The stock solution of PCA (1 mg mL^{-1}) was obtained by dissolving PCA in methanol. The standard working solution of ALX and the nonstandard working solution of CHX (500 ng mL^{-1}) were prepared by diluting ALX stock solution or CHX commercial solution used in endodontics protocols in water–acetonitrile 1:1 (*v/v*), respectively. Standard solutions of NaOCl were prepared by diluting 5.25% (*w/v*) NaOCl solution in water (1:0, 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49, 1:99 (*v/v*)). Moreover, a 2% (*v/w*) NaOCl commercial solution was used, without previous diluting. The standard solution of PCA (200 ng mL^{-1}) was prepared by diluting stock solution in water and acetonitrile 1:1 (*v/v*). All solutions were stored in a refrigerator ($+4^\circ\text{C}$).

4.3. Sample Preparation Procedure

Solutions of ALX and CHX were mixed with the equivalent volume ($100 \mu\text{L}$) of NaOCl standard solutions. A washing procedure was used to remove sodium ions, which can interfere with analytes and form adduct ions in the ion source of the mass spectrometer. Firstly, liquid supernatant from each sample was withdrawn and the precipitate was washed with cold water ($+4^\circ\text{C}$). Then, the sample was stirred and centrifuged (10 min, 10,000 rpm, 0°C). The washing procedure was repeated three times. Afterward, the precipitate was dissolved in $500 \mu\text{L}$ of methanol. Solutions made from a mixture of CHX and NaOCl and a mixture of ALX and NaOCl were 1000-fold and 50-fold diluted, respectively, in water–acetonitrile mixture (H_2O –ACN) 1:1 (*v/v*). Prepared samples were subjected to the UHPLC-MS analysis.

The liquid supernatant samples were 10,000-fold diluted in H_2O –ACN 1:1 (*v/v*) and subjected to the UHPLC-MS analysis.

4.4. UHPLC-MS Analysis

The UHPLC-MS system consisted of the UltiMate 3000 RS liquid chromatography system (Dionex, Sunnyvale, CA, USA) coupled with a tandem mass spectrometer with quadrupole and time-of-flight analyzers (Micro-TOF-Q II, Bruker, Bremen, Germany). A mobile phase consisted of water with 0.1% (*v/v*) formic acid (phase A) and acetonitrile with 0.1% formic acid (phase B). In each analysis, $5 \mu\text{L}$ of sample was injected by an autosampler, and the separation was carried out in isocratic mode (30% A, 70% B) within a Hypersil Gold Phenyl column ($50 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm I.D.}$, particles $1.9 \mu\text{m}$, Dionex, Sunnyvale, CA, USA) for 16 min. The flow rate of the mobile phase was 0.4 mL min^{-1} . The column was thermostated at 25°C . The electrospray ion source was operated under positive ionization conditions (ESI+). The other MS parameters were as follows: nebulizer pressure: 2.0 bar; dry gas flow: 5.5 L min^{-1} ; drying gas temperature: 200°C ; capillary voltage: -500 V . The accurate mass of each ion was calibrated using sodium formate clusters. SmartFormula (Bruker) was used for the prediction of molecular formulas. The mass range was from 50 to $1500 m/z$.

5. Conclusions

The interaction of ALX and NaOCl results in the formation of aliphatic amines. This study showed that the reaction does not result in PCA formation. However, for the first time, we have shown that this interaction results in the formation of a yellowish precipitate, and we identified possible products of the reaction that can be potentially harmful. Therefore, ALX and NaOCl should not be mixed in endodontic irrigation protocol.

Supplementary Materials: The following are available online, Figure S1: Mass spectra of investigated compound generated during the reaction between ALX and NaOCl, Figure S2: Relative abundance of investigated ALX – NaOCl reaction products depending on dilution of 5.25% (*w/v*) NaOCl reagent (in *v/v*).

Author Contributions: Conceptualization: B.C.; methodology: B.C., M.C., M.G. and M.W.; investigation: M.C., M.G. and M.W.; resources: B.C. and J.Z.; data curation: M.C., M.W. and M.G.; writing—original draft preparation: B.C. and M.C.; writing—review and editing: B.C., M.C., J.Z. and M.W.; supervision: J.Z. and M.W.; project administration: B.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Kakehashi, S.; Stanley, H.R.; Fitzgerald, R.J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg.* **1965**, *20*, 340–349. [\[CrossRef\]](#)
2. Chugal, N.M.; Clive, J.M.; Spangberg, L.S. A prognostic model for assessment of the outcome of endodontic treatment: Effect of biologic and diagnostic variables. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* **2001**, *91*, 342–352. [\[CrossRef\]](#)
3. Byström, A.; Sundqvist, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int. Endod. J.* **1985**, *18*, 35–40. [\[CrossRef\]](#)
4. Kuruvilla, J.P.; Kamath, P. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined endodontic irrigants. *J. Endod.* **1998**, *24*, 472–476. [\[CrossRef\]](#)
5. Russell, A.D.; Day, M.J. Antibacterial activity of chlorhexidine. *J. Hosp. Infect.* **1993**, *25*, 229–238. [\[CrossRef\]](#)
6. Komorowski, R.; Grad, H.; Wu, X.Y.; Friedman, S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. *J. Endod.* **2000**, *26*, 315–317. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Rosenthal, S.; Spangberg, L.; Safavi, K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* **2004**, *98*, 488–492. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Zehnder, M. Root canal irrigants. *J. Endod.* **2006**, *32*, 389–398. [\[CrossRef\]](#)
9. Berutti, E.; Marini, R.; Angeretti, A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J. Endod.* **1997**, *23*, 725–727. [\[CrossRef\]](#)
10. Basrani, B.R.; Manek, S.; Sodhi, R.N.; Fillery, E.; Manzur, A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J. Endod.* **2007**, *8*, 966–969. [\[CrossRef\]](#)
11. Basrani, B.R.; Manek, S.; Mathers, D.; Fillery, E.; Sodhi, R.N. Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J. Endod.* **2010**, *36*, 312–314. [\[CrossRef\]](#)
12. Thomas, J.; Sem, D. An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J. Endod.* **2010**, *36*, 315–317. [\[CrossRef\]](#)
13. Akisue, E.; Tomita, V.S.; Gavini, G.; de Figueiredo, J.A. Effect of the Combination of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on Dentinal Permeability and Scanning Electron Microscopy Precipitate Observation. *J. Endod.* **2010**, *36*, 847–850. [\[CrossRef\]](#)
14. Souza, M.; Cecchin, D.; Barbizam, J.V.; Almeida, J.F.; Zaia, A.A.; Gomes, B.P.; Ferraz, C.C. Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by the interaction between 2% chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust. Endod. J.* **2013**, *39*, 107–111. [\[CrossRef\]](#)
15. Roberts, W.R.; Addy, M. Comparison of the bisbiguanide antiseptics alexidine and chlorhexidine: I. Effect on plaque accumulation and salivary bacteria. *J. Clin. Periodontol.* **1981**, *8*, 213–219. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zorko, M.; Jerala, R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *62*, 730–737. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
17. Kim, H.S.; Chang, S.W.; Baek, S.H.; Han, S.H.; Lee, Y.; Zhu, Q.; Kum, K.Y. Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *Int. J. Oral Sci.* **2013**, *5*, 26–31. [\[CrossRef\]](#)
18. Barrios, R.; Ferrer-Luque, C.M.; Arias-Moliz, M.T.; Ruiz-Linares, M.; Bravo, M.; Baca, P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J. Endod.* **2013**, *39*, 1413–1415. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
19. Kim, H.-S.; Zhu, Q.; Baek, S.-H.; Jung, I.-Y.; Son, W.-J.; Chang, S.-W.; Lee, W.; Gu, Y.; Lee, Y.; Hong, S.-T.; et al. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J. Endod.* **2012**, *38*, 112–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
20. Nowicki, J.B.; Sem, D.S. An in vivo spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J. Endod.* **2011**, *37*, 983–988. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
21. Lüttringhaus, A.; Jander, J.; Schneider, R. Cyclische Hydrazine aus α,ω -Diaminen. *Chem. Ber.* **1959**, *92*, 1756–1765. [\[CrossRef\]](#)

22. Boehncke, A.; Kielhorn, J.; Konnecker, G.; Pohlenz-Michel, C.; Mangelsdorf, I. *4-Chloroaniline (CICADS 37, 2002)*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.
23. Dial, L.D.; Anestis, D.K.; Kennedy, S.R.; Rankin, G.O. Tissue distribution, subcellular localization and covalent binding of 2-chloroaniline and 4-chloroaniline in Fischer 344 rats. *Toxicology* **1998**, *131*, 109–119. [\[CrossRef\]](#)
24. Jain, K.; Agarwal, P.; Jain, S.; Seal, M.; Adlakha, T. Alexidine versus chlorhexidine for endodontic irrigation with sodium hypochlorite. *Eur. J. Dent.* **2018**, *12*, 398–402. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Wright, P.P.; Kahler, B.; Walsh, L.J. Alkaline Sodium Hypochlorite Irrigant and Its Chemical Interactions. *Materials* **2017**, *10*, 1147. [\[CrossRef\]](#)
26. 2-Ethylhexylamine | C₈H₁₉N—PubChem (nih.gov). Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Ethylhexylamine> (accessed on 22 January 2021).
27. Greim, H.; Bury, D.; Klimisch, H.J.; Oeben-Negele, M.; Ziegler-Skylakakis, K. Toxicity of aliphatic amines: Structure-activity relationship. *Chemosphere* **1998**, *36*, 271–295. [\[CrossRef\]](#)
28. Hawkins, C.L.; Pattison, D.I.; Davies, M.J. Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* **2003**, *25*, 259–274. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Publikacja nr 2

Barbara Czopik, Aneta Woźniakiewicz, Natalia Świętoniowska, Joanna Zarzecka,
Michał Woźniakiewicz

Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine
Activation Methods in Endodontic Treatment

Molecules

DOI: 10.3390/molecules28166159

Article

Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment

Barbara Czopik ^{1,*}, Aneta Woźniakiewicz ², Natalia Świętoniowska ², Joanna Zarzecka ¹ and Michał Woźniakiewicz ² 

- ¹ Department of Conservative Dentistry with Endodontics, Faculty of Medicine, Institute of Stomatology, Jagiellonian University Medical College, Montelupich 4 St., 31-155 Kraków, Poland; j.zarzecka@uj.edu.pl
² Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Gronostajowa 2, 30-387 Kraków, Poland; aneta.wozniakiewicz@uj.edu.pl (A.W.); michal.wozniakiewicz@uj.edu.pl (M.W.)
 * Correspondence: barbara.czopik@uj.edu.pl; Tel.: +48-124245425

Abstract: The aim of the study was a quantitative analysis of p-chloroaniline (PCA) formation during 2% CHX activation with US and MDI methods in a root canal-like environment with the HPLC-DAD method and, thus, a safety assessment of US and MDI agitation of CHX in endodontic treatment. Two percent CHX was activated with the US method using ISO 30 and 35 K-file, and the MDI method using ISO 30.06 and 35.06 GP cones for 15, 30, 60, and 90 s. PCA concentration was assessed with the HPLC-DAD method. PCA concentration was also assessed for 2% CHX after 0, 3, 18, and 21 days of storage in ambient conditions. PCA was detected in all samples in all methods of activation. The concentration of PCA was dependent on time of activation in US ISO 30 and ISO 35 group ($p < 0.05$). In the MDI ISO 30.06 and ISO 35.06 groups, a similar trend was observed but without statistical significance ($p > 0.05$). PCA was detected in shelf-stored 2% CHX and the concentration was related to the time of storage. PCA is released after CHX activation with US and MDI, but mean concentrations are not higher than those observed from self-degradation of shelf-stored 2% CHX.

Keywords: chlorhexidine; PCA; endodontic treatment; root canal treatment; endodontics; root canal irrigation



Citation: Czopik, B.; Woźniakiewicz, A.; Świętoniowska, N.; Zarzecka, J.; Woźniakiewicz, M. Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. *Molecules* **2023**, *28*, 6159. <https://doi.org/10.3390/molecules28166159>

Academic Editors: Victoria Samanidou, Gabriel Ilancu, Aura Rusu and Andreea Pricopie

Received: 14 June 2023
 Revised: 10 August 2023
 Accepted: 17 August 2023
 Published: 21 August 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The main objective of root canal treatment (RCT) is to prevent or cure apical periodontitis (AP) by achieving effective three-dimensional chemo-mechanical preparation of endodontic space. Cleaning of root canal system is performed by mechanical preparation with hand or rotary instruments and by chemical preparation with endodontic solutions. Traditional shaping objectives, now redefined from “shaping and cleaning” to “shaping for cleaning”, emphasize the role of chemical preparation as the only part of the treatment that can disinfect and debride all elements of the root canal system, including isthmi, apical delta, lateral canals, and dentinal canaliculi [1,2].

The most important chemical solution used in endodontics is sodium hypochlorite (NaOCl) [3]. It is used in concentrations of 2–5.25% due to its excellent tissue dissolving capacities, broad antimicrobial spectrum, and ability to remove the organic component of the smear layer [4]. NaOCl is used throughout the whole treatment in order to eradicate microbiota, chemically prepare parts of the endodontic space that cannot be reached with mechanical preparation, and in the final irrigation protocol for additional antimicrobial effect and removal of the organic part of the smear layer [5].

Chelators—40% citric acid (CA) or 17% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) have the ability to bind calcium ions, demineralize and soften the dentin, and increase its permeability [6], and are, therefore, used in the final irrigation protocol to remove the inorganic component of the smear layer [7,8].

Two percent chlorhexidine (CHX) is the third most widely applied solution in endodontics. It is used for additional antibacterial action due to its broad antimicrobial spectrum and clinical phenomenon called “substantivity” [9]. Chlorhexidine is dedicated as a last flush in the final irrigation protocol to enhance the disinfection of the endodontic space and preserve a prolonged antimicrobial effect of the chemical preparation [9].

The mode of irrigants application into endodontic space is another factor influencing the effectiveness of the root canal system disinfection [10]. The conventional way of irrigant delivery: syringe and needle irrigation (SNI) fails to fulfill the criteria of effective chemical preparation, which is to distribute the irrigant throughout places that cannot be reached with mechanical preparation [10]. Therefore, irrigants agitation techniques (IAT) began to be used as dental practitioners became more aware of the subject of endodontic hydrodynamics [11]. IAT methods include passive ultrasonic irrigation (PUI), when irrigants are activated with ultrasounds (US), sonic activation (SA), as well as manual dynamic irrigation (MDI). All those methods aim at changing the flow of root canal irrigants from laminar into turbulent, which increases the action of chemical solutions distributed throughout the endodontic space by ultrasonically, sonically, or manually generated streaming forces [12]. This results in more effective disinfection of the root canal space [12,13].

PUI, the method using US for activation, is believed to be the most effective way for enhancing chemical preparation in the aspect of debridement of root canals [12–14], for removal of microbiota from the endodontic space [15,16], and for better penetration of solutions into dentinal tubules [15,17]. The intensity of ultrasonic activation influences the energy transmission by a freely oscillating file inside the root canal space filled with irrigating solution [13,17]. This results in acoustic streaming not only at the tip but all around the ultrasonic file [13,14,17]. PUI is considered a golden standard among methods of irrigant activation and is most preferred by endodontic practitioners.

MDI improves antimicrobial action of endodontic irrigants, enhances debridement of the endodontic space, and provides apical patency [18]. In this technique, gutta-percha (GP) cone is used with up and down motion in the root canal with the frequency of at least 100 push/pull movements per minute [18]. MDI can be applied for all irrigants, does not require application of advanced devices and specially designed files, and is dedicated for less equipped and less experienced practitioners [18].

As other root canal irrigants, CHX was proposed to be activated with PUI in order to increase its antimicrobial action and penetration into dentinal canaliculi [17]. However, ultrasonic activation increases the temperature of 2% CHX solution [19,20] and heating of CHX was reported to cause the formation of a highly toxic compound para-chloroaniline (PCA) [21]. Therefore, it was hypothesized that CHX activation with the US method leads to PCA release. Nevertheless, direct proof for this potential toxic effect of CHX agitation with either PUI or MDI method has not been provided up to date. Moreover, a quantitative analysis of PCA released from US or any other IAT of 2% CHX has not previously been conducted.

Constant exposition to PCA was proved to cause multiple types of cancer in rats: fibrosarcoma and osteosarcoma in the spleen, pheochromocytoma in the adrenal gland, hemangiosarcoma in the liver, as well as methemoglobinemia in humans [22,23]. Moreover, brown precipitate, which is produced in the reaction of CHX and NaOCl and contains PCA, cannot be removed from the root canal walls completely and can compromise the quality of root canal obturation [22,24], which can result in treatment failure.

The aim of the study was a quantitative analysis of PCA formation during activation of 2% CHX with the US and MDI methods in root canal-like conditions with high-performance liquid chromatography (HPLC) technique with a DAD detector and, thus, the assessment of the safety of ultrasonic and manual agitation of CHX solutions in endodontic treatment. Moreover, we decided to conduct a quantitative analysis of the amount of PCA released from shelf-stored 2% CHX in ambient conditions in order to compare those results with the results obtained in experimental groups (2% CHX activated with the US and MDI method). The null hypothesis was that: (1) there will be PCA release from 2% CHX activated with the

US method, as the temperature of the solution will rise, and that the amount of PCA will correlate with the time of activation and will be higher for a thicker file; (2) there will be no PCA release from 2% CHX activated with the MDI method, as there will be no temperature rise, regardless of the size of the GP cone and time of agitation; (3) there will be PCA release from shelf-stored 2% CHX in ambient conditions and the amount of PCA will correlate with the time of storage but will be significantly lower than the amount released in the US experimental group.

2. Results

2.1. CHX Activation and Temperature Effect

The changes of temperature of 2% CHX solution before and after activation with US and MDI methods are presented in Table 1. US activation caused a noticeable increase of temperature, while in case of MDI, no change of temperature was detected.

Table 1. Changes of 2% CHX solution before and after agitation with US and MDI.

Activation Type	Activation Time [s]	Temperature Change ΔT , [°C]	
		ISO 30	ISO 35
US	15	+3	+4
	30	+3	+3
	60	+3	+3
	90	+4	+4
MDI	15	0	0
	30	0	0
	60	0	0
	90	0	0

2.2. PCA Release during US and MDI Activation of 2% CHX

The chromatographic analysis of activated 2% CHX enabled us to determine PCA release during US activation. For the ISO 30 file, the amount of PCA released increased with the time of activation. When 2% CHX was activated with a thicker file (ISO 35), PCA formation was also observed, but it did not change significantly with time (Figure 1b). Nevertheless, the ANOVA analysis revealed that there is a statistical difference between mean PCA concentration in the case of the ultrasonic activation method with ISO 30 ($p = 0.02$; $MS_{\text{between}} = 0.116$, $MS_{\text{error}} = 0.014$). Particularly, the Tukey post-hoc test revealed that application of US ISO 30 generates statistically significant higher amounts of PCA than those found in the control group if it is applied for 60 s ($q_{\text{control-60s}} = 0.041$, $p < 0.05$) or 90 s ($q_{\text{control-90s}} = 0.004$, $p < 0.05$). The increase in PCA concentration also results in a significant difference between results for 60 and 90 s ($q_{\text{control-90s}} = 0.036$, $p < 0.05$), which supports the observation of positive effect of time on PCA generation. In the case of the US ISO 35 method, the assumption on the equality of variances was not met; thus, the Kruskal–Wallis test was applied. The analysis show that there is a difference between the control group and processed samples ($H_{4,n=17} = 12.340$, $p = 0.015$); however, the particular difference may be found for 60 s, taking into account the post-hoc Dunn test results ($p = 0.021$).

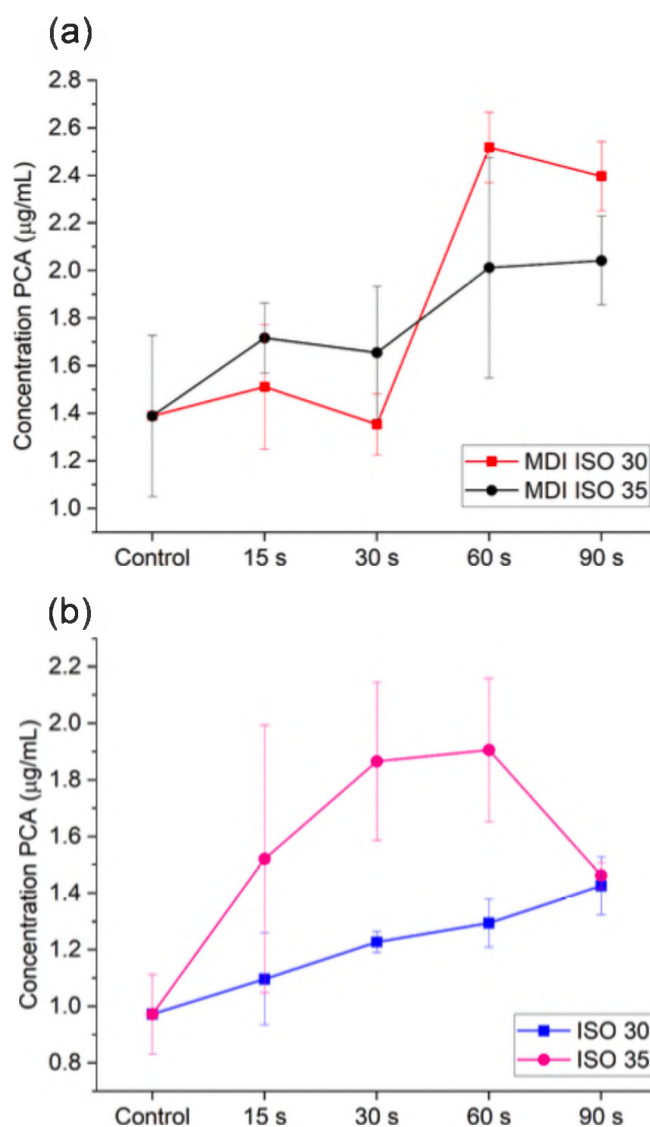


Figure 1. PCA formation upon time of activation of 2% CHX with (a) the MDI method and (b) the US method.

PCA was also detected in 2% CHX solution after activation with the MDI method. When CHX was agitated with the ISO 30.06 GP cone, a rise of PCA formation was observed for 60 and 90 s time of activation. When the ISO 35.06 GP cone was used, PCA was also released and its amount decreased at the initial stage of activation, which was followed by a rise of its concentration in 60 and 90 s. In this case, the ANOVA analysis revealed that there is a statistical difference between mean PCA concentration released in 60 and 90 s of MDI ISO 30.06 activation ($p = 0.0002$; $MS_{\text{between}} = 0.928$, $MS_{\text{error}} = 0.049$), which was indicated by the results of the Tuckey post-hoc test ($q_{\text{control-60s}} = 0.003$; $q_{\text{control-90s}} = 0.003$, $q_{15-60s} = 0.003$, $q_{15-90s} = 0.006$, $q_{30-60s} = 0.002$, $q_{30-90s} = 0.002$, $p < 0.05$). In case of ISO 35.06, a similar trend may be observed (see Figure 1a). However, the ANOVA analysis did not confirm the difference in the average PCA concentration between tested activation at the level of significance $\alpha = 0.05$. Furthermore, analysis using the t -test indicated there is no

significant difference between PCA release using ISO 30.06 and ISO 35.06 both for 60 s ($p = 0.146$; $t_{n=3} = 1.803$) and 90 s ($p = 0.06$; $t_{n=3} = 2.593$).

2.3. PCA Release from Shelf-Stored 2% CHX

PCA was detected in negative control in samples of 2% CHX collected from shelf-stored 2% CHX and the concentration of PCA was related to the time of storage. The concentrations of PCA were assessed after 0, 3, 18, and 21 days of storage for each experimental group for the volume the bottle of Gluco-CHX solution (400 g) (Figure 2).

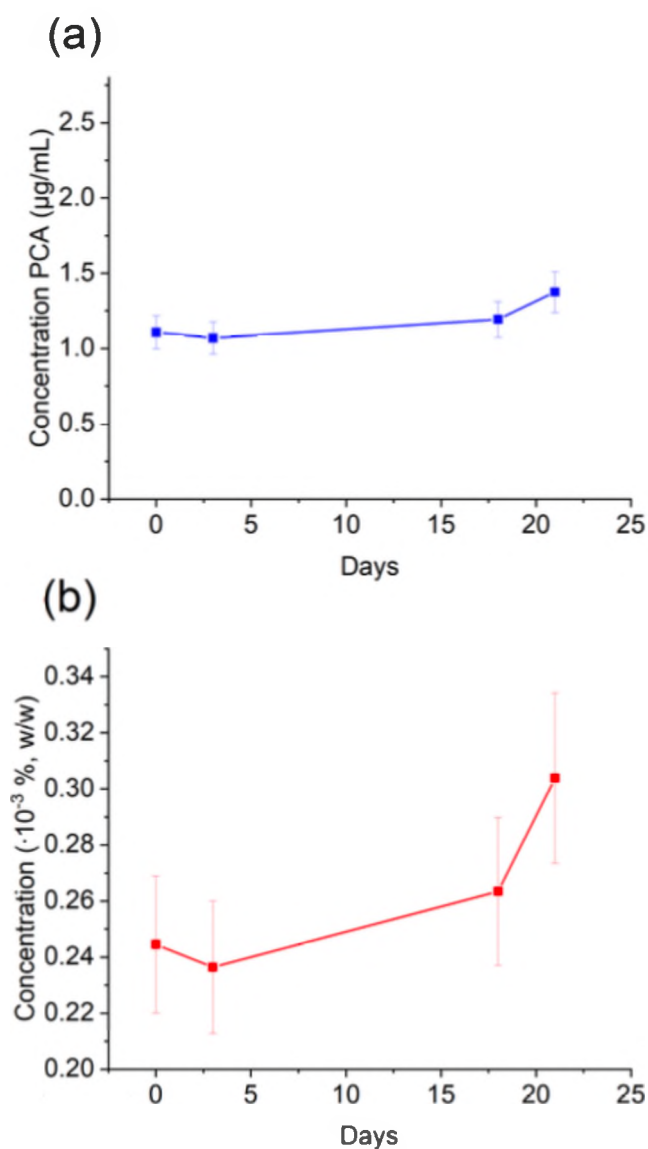


Figure 2. PCA concentration changes found in CHX 2% stored in ambient conditions. (a)—data in absolute values; (b)—concentration in percentage.

3. Discussion

The root canal system can be considered as a closed system, where laminar flow of endodontic solutions should be changed into a turbulent one, in order to enhance

cleaning efficacy of root canal irrigants with ultrasonic or manually generated streaming forces. As dentists use IAT more frequently and 2% CHX was proposed to be agitated with those techniques [11,17], it is crucial to assess the safety of this treatment technique in the aspect of PCA formation. PCA is toxic [25], cancerogenic [26], and it can cause methemoglobinemia [27]. While PCA release from the interaction between CHX and other endodontic antiseptics, such as sodium hypochlorite [28] and calcium hydroxide [29], is a well-known fact, its formation during CHX agitation with US was only hypothesized. Furthermore, MDI was thought to be a method of choice for CHX agitation, as it did not heat the solution and, thus, it was postulated that it will not lead to PCA release. However, there was no direct scientific evidence provided regarding whether MDI activation of 2% CHX does not cause PCA formation.

Basrani et al. [21] warmed 2% CHX solution in a water bath for 45 min and detected PCA release at 45 °C but not at 37 °C. After this experiment, US activation of 2% CHX was hypothesized to be dangerous, as PUI increases the temperature of irrigation solutions, but there was no direct proof provided for PCA formation from 2% CHX activated with US. Moreover, a quantitative analysis of PCA release from 2% CHX activated with the US method has not previously been conducted. We confirmed in our experiment that there is PCA release from 2% CHX activated with the US method. For US tip ISO size 30, we observed a rise of PCA concentration over time for all times of activation, while in the ISO 35 group, the PCA amount increased for 15 s, 30 s, and 60 s time of agitation. Moreover, once again, we confirmed the result from previous research, that the PUI method increases the temperature of CHX solutions. However, the temperature rise did not correlate with the agitation time or size of the ultrasonic tips, contrary to previous studies [20,30]. These differences can be explained with the fact that our in vitro experimental model was closer to a clinical treatment methodology, in terms of solution volume and times of activation, as well as the endodontic equipment used. The sizes of the ultrasonic tips (ISO 30 and ISO 35) were chosen as those most widely used for this purpose in clinical practice. The general rule is that the tip should oscillate freely in the root canal without touching the walls in order to produce the most effective acoustic streaming. Smaller sizes of ultrasonic files tend to separate more frequently inside the endodontic space; therefore, ISO 30 and 35 files seems to be the sizes of choice with reasonable consensus. Moreover, the times of activation 15 s and 30 s were chosen as those applied for US agitation in clinics and 60 s and 90 s were inspected for correlation and trend-observing purposes.

Since the MDI method does not cause a temperature rise of 2% CHX, it was hypothesized to be safer and the preferable method of CHX activation in RCT. However, although we confirmed that the MDI method did not cause a temperature rise of 2% CHX solution, we detected PCA in 2% CHX samples after MDI activation. In the MDI method, we used bigger taper gutta-percha cones (35 ISO size 6% taper and 30 ISO size 6% taper), as it was proved that tapered cones are more effective in this technique than non-tapered ones [18]. When a bigger size GP cone was used in the MDI method (35.06), we observed initial PCA decrease when comparing to non-agitated solution, with PCA rise after 60 and 90 s of agitation. This can be hypothetically explained with PCA sedimentation on GP cones, and the total mass and volume of 35.06 cone is bigger than 30.06, which can explain why in 30.06 MDI samples, this effect was not observed. This hypothesis requires further investigation.

Moreover, we detected PCA in the control samples, as well as in the bottle of shelf-stored 2% CHX, which once again confirmed self-degradation of CHX solutions during shelf storage over time [29,31]. This finding shows that it would be preferable to use a high volume of fresh portions of 2% CHX in irrigation protocol from smaller bottles, in order to finish them quicker and not to over-store them in clinics. Moreover, it emphasizes the importance of proper storage of 2% CHX irrigating solutions, and the future perspective is to inspect how storage conditions (e.g., not proper closure of the bottle, UV light, temperature of storage) influence the quantity of PCA release from 2% CHX solutions.

It is important to know that root canal dentin can be considered as a biological substrate, which through irrigation protocol is prepared for further stage of endodontic treatment, that is, obturation with gutta-percha and sealer application. Sealer penetration into the dentinal tubules is a consequence of effective smear layer removal and can be compromised by PCA formation. Therefore, detection of the formation of reactive compounds during chemical preparation of root canals is important in the aspect of obtaining proper bonding strength between different types of sealers and dentin [32,33]. This problem requires further research.

4. Materials and Methods

The solid 4-chloroaniline (PCA) standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA, purity 99%) was dissolved in methanol to obtain a of 10 mg/mL stock solution and then it was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Gluco-Chex (Cerkamed, Poland) containing 2% Chlorhexidine digluconate (CHX)—a solution used for root canal irrigation—was used in all experiments. The solution was stored in conditions advocated by the manufacturer.

Acetate buffer of pH 6.0 and ionic strength 150 mmol/L was prepared by adding 160 μL of 2 mol/L acetic acid (Sigma-Aldrich, USA, purity 99.8%) and 7.5 mL of previously prepared 1 mol/L ammonium acetate to a 50 mL volumetric flask, then filled up to line with ultrapure water. Then, 1 mol/L ammonium acetate was prepared by dissolving ca. 1.927 g of solid ammonium acetate (Sigma-Aldrich, USA) in 25 mL of ultrapure water.

Ultrapure water (18.2 M Ωcm , TOC < 5 ppb) was obtained using the Milli-Q Plus system (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA). Other reagents used, among others, as mobile phase and for syringe rinsing in the liquid chromatograph were methanol (Honeywell, purity for LC-MS $\geq 99.9\%$) and acetonitrile (Honeywell, purity for LC-MS $\geq 99.9\%$). Dichloromethane (Sigma-Aldrich) was used for extraction of a target compound.

4.1. Instrumentation

The LaChrom (Merck-Hitachi, Tokyo, Japan) high-performance liquid chromatograph coupled with photodiode array detector (detection at 210 nm) was used during all experiments. It was equipped with a Spheri-5 C₁₈ separation column (100 $\times$ 4.6 mm, 5 μm , Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). The separation was carried out in gradient mode at 40 $^{\circ}\text{C}$ using the flow rate of 1 mL/min. Ultrapure water and acetonitrile were used as phase A and phase B, correspondingly. The gradient program started with 50% of phase A, which was kept for 7 min, A decreased down to 5% within 2 min, then kept for the following 4 min. The mobile phase composition was then restored within 2 min to initial conditions and the column was equilibrated for 4 min. Total time of analysis was 20 min. Blank samples were injected each time after the analysis of a sample to rinse the chromatographic system and, thus, avoid the carryover effect. The sample injection volume was 15 μL .

4.2. Design of Experiment: Experimental Groups and CHX Agitation Procedure with Dental Equipment

To investigate various conditions affecting the stability of CHX during endodontic treatment, two experimental groups were designed depending on the type of activation procedure using 2% CHX solution: ultrasonic (US) and manual dynamic irrigation (MDI). The general scheme of the experiment is depicted in Figure 3.

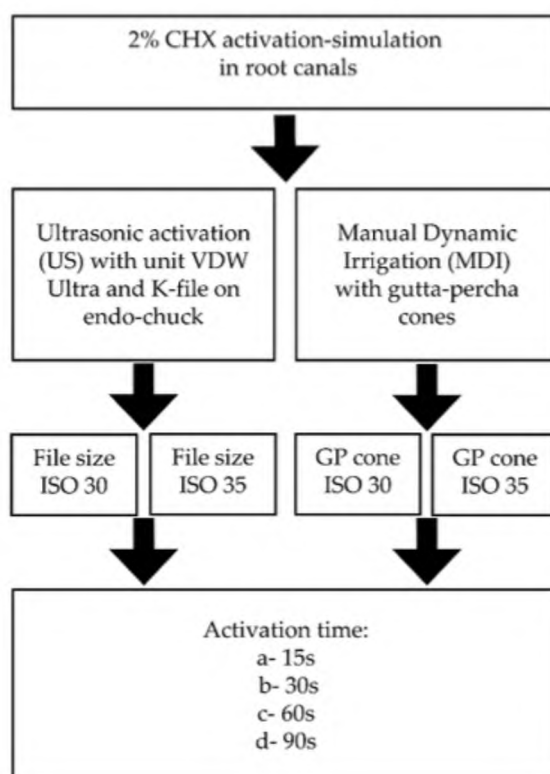


Figure 3. Experimental groups scheme.

In US and MDI, the amount of 150 μL of 2% CHX in 200 μL PCR probe was activated for four different times of activation: 15, 30, 60, and 90 s, and each experiment was done in triplicate. Additionally, US and MDI activation techniques were divided into two subgroups depending on tip or GP cone size: for US agitation file size 30 and 35 ISO were used and in MDI group the same sizes of gutta-percha cones were applied. This was set in order to mimic the conditions that occur in the endodontic root canal space. US activation of CHX was done with Endodontic Ultrasonic unit (VDW, Frankfurt am Main, Germany) with dedicated ultrasonic K-File mounted on endo-chuck tip in two sizes: ISO 30 and ISO 35 (size 0.3 mm in diameter at the tip and 0.35 mm in diameter at the tip, respectively, both manufactured by VDW, Germany) mounted on 90° endo-chuck with an oscillation frequency of 28–36 kHz. The US file, when introduced into the probe, oscillated freely inside it with the intention of not touching its walls.

The MDI agitation method of 2% CHX was done with ISO 30 GP cone (size 0.3 mm in diameter at the tip) and ISO 35 GP cone (size 0.35 mm in diameter at the tip). Six percent taper GP cones were used, which means that the diameter of the cone increased with 0.06 mm for every mm of its length. The frequency of push-pull motion of the GP cone was ~ 3.3 Hz (~ 100 strokes per 30 s).

Changes in the temperature of the CHX solutions were inspected in all samples for US and MDI groups before and after every activation.

4.3. Preparation of Samples for HPLC Analysis

The pre-activated samples were mixed for a few seconds on a shaker to homogenize solutions. Subsequently, 150 μL of the sample was transferred to a fresh 1.5 mL Eppendorf-type tube and 300 μL of acetate buffer, pH 6.0, was added. The pH of the buffer was chosen so that p-chloroaniline was present in the solution in a deprotonated (hydrophobic)

form, while CHX was protonated and prone to stay in a water-based phase. In a further step, the PCA was extracted three times by adding 0.5 mL of dichloromethane to the samples each time. After the addition of each portion, the samples were vortexed for 5 min at 2100 rpm and then centrifuged for 5 min ($11,200\times g$). The separated DCM layer (0.4 mL) was transferred to a new 1.5 mL Eppendorf-type tube. The collected extracts were vortexed for a few seconds and then 1.2 mL of extract was transferred to a new 1.5 mL Eppendorf-type tube and evaporated under the gentle stream of nitrogen at room temperature ($\sim 23^\circ\text{C}$). To the resulting precipitate, 50 μL of ACN:H₂O solution (20:80, *v/v*) was added and vortexed for 5 min (2100 rpm). Once the precipitate was dissolved, 20 μL of the sample was transferred to an amber glass vial with a 100 μL microinsert, diluted with 80 μL with ACN:H₂O solution (20:80) and subjected to the chromatographic analysis.

4.4. Statistical Analysis

Data acquired during the study were processed using MS Excel (Office 365, Microsoft, Redmond, WA, USA) for data collection, pretreatment, and calculations. The figures were prepared using Origin 2020 (OriginLab, Northampton, MA, USA) software.

The statistical analysis was accomplished in Statistica 13.3 PL (Tibco, Palo Alto, CA, USA). The results were compared using the one-way analysis of variance (ANOVA), taking the level of significance $\alpha = 0.05$. Initially, data were tested for equality of the variance using the Levene test. Once the difference between means was detected, the post-hoc analysis with the Tukey test was performed. In cases when the assumptions of the analysis of variance were not met, particularly when the Levene test indicated a significant difference in variance, the Kruskal–Wallis test was applied at the level of significance $\alpha = 0.05$, followed by the Dunn post-hoc test.

5. Conclusions

In conclusion, we would like to come back to the null hypotheses put at the beginning of the study. The mean concentrations of PCA released during activation were not higher than those observed from the self-degradation of shelf-stored 2% CHX. When 2% CHX was activated with US, PCA release was not dependent on the size of the ultrasonic file but was dependent on the time of activation ($p < 0.05$). In the MDI method, a similar trend was observed visually, nevertheless without statistical significance ($p > 0.05$). We did not observe a significant difference between PCA release using ISO 30.06 and ISO 35.06 GP cones ($p > 0.05$) when 2% CHX was activated with the MDI method. On the basis of these findings, it can be concluded that PCA is released during CHX activation with both US and MDI methods. However, these values are still lower than the threshold given in approved norms [34]. This suggests that PCA release from 2% CHX agitated with irrigation agitation techniques may not pose a higher safety risk in the root canal final irrigation protocol, compared to the degradation of CHX over time when stored on the shelf. Therefore, at this state of research, on the activation of 2% CHX with US and MDI methods we did not find increased generation of *p*-chloroaniline, which is considered a major chemical hazard related to the agitation of 2% CHX in root canal treatment. However, dental practitioners should undertake precautions when using CHX in the endodontic treatment. These clinical considerations include the use of fresh portions of 2% CHX and short time of storage of CHX bottles, as well as not prolonging the time of activation with agitation techniques in the endodontic irrigation protocol, in order to ensure patient safety and optimal treatment outcomes.

The conducted research provides valuable insights into the stability of 2% chlorhexidine (CHX) under various storage conditions, opening up avenues for future investigations. This will facilitate the improvement of consumable management in endodontic practice, allowing for enhanced quality control and product optimization.

It is important to note that while the study provides valuable insight into PCA release as a result of CHX activation, further research and evaluations may be needed to comprehensively assess the safety and potential implications of PCA formation in the

endodontic treatment and patient general health condition. The experiments presented in this study were limited to in vitro settings, which provide a preliminary understanding of the degradation process. However, to fully assess the safety and efficacy of root canal irrigation with 2% CHX, it is essential to further investigate potential para-chloroaniline (PCA) deposits within artificial root canals, such as those created using 3D printing techniques, in order to inspect its potential to create microleakage between the root canal wall and obturating material and, therefore, compromise the quality of root canal obturation. Additionally, expanding the research to include animal experiments would provide a more realistic evaluation of the safety and potential adverse effects of the irrigation procedure in order to examine if released amounts of PCA have any influence on patient general health condition [25,27].

Furthermore, it is worthwhile to explore other medicaments, such as mouth rinsing liquids containing CHX, as potential sources of p-chloroaniline. This broader evaluation would contribute to a comprehensive understanding of the potential formation and exposure routes of PCA in clinical settings.

Author Contributions: Conceptualization, B.C. and M.W.; methodology, M.W., A.W. and N.Š.; validation, M.W. and A.W.; investigation B.C., M.W., A.W. and N.Š.; resources, B.C. and M.W.; data curation, M.W., A.W. and N.Š.; writing—original draft preparation, B.C. and M.W.; writing—review and editing, B.C. and M.W.; supervision, M.W. and J.Z.; project administration, B.C. and M.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Sample Availability: Samples of the compounds are not available from the authors.

References

1. Liang, A.; Huang, L.; Li, B.; Huang, Y.; Zhou, X.; Zhang, X.; Gong, Q. Micro-CT Evaluation of Different Root Canal Irrigation Protocols on the Removal of Accumulated Hard Tissue Debris: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* **2022**, *11*, 6053. [\[CrossRef\]](#)
2. Vashisht, R.; Kumar, U.; Jhamb, S.; Singla, R. Comparative evaluation of cleaning efficiency of single file NiTi rotary system during root canal treatment procedure—A scanning electron microscope study. *J. Conserv. Dent.* **2023**, *26*, 316–320. [\[CrossRef\]](#)
3. Haapasalo, M.; Shen, Y.; Wang, Z.; Gao, Y. Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* **2014**, *216*, 299–303. [\[CrossRef\]](#)
4. Cai, C.; Chen, X.; Li, Y.; Jiang, Q. Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *BioMed Res. Int.* **2023**, *13*, 8858283. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Chalub, L.O.; Nunes, G.P.; Strazzi-Sahyon, H.B.; Ferrisse, T.M.; dos Santos, P.H.; Gomes-Filho, J.E.; Cintra, L.T.A.; Sivieri-Araujo, G. Antimicrobial effectiveness of ultrasonic irrigation in root canal treatment: A systematic review of randomized clinical trials and meta-analysis. *Clin. Oral Investig.* **2023**, *27*, 1343–1361. [\[CrossRef\]](#)
6. Hülsmann, M.; Heckendorff, M.; Lennon, A. Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use. *Int. Endod. J.* **2003**, *36*, 810–830. [\[CrossRef\]](#)
7. Machado, R.; Garcia, L.D.F.R.; da Silva Neto, U.X.; Cruz Filho, A.M.D.; Silva, R.G.; Vansan, L.P. Evaluation of 17% EDTA and 10% citric acid in smear layer removal and tubular dentin sealer penetration. *Microsc. Res. Tech.* **2018**, *81*, 275–282. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Gómez-Delgado, M.; Camps-Font, O.; Luz, L.; Sanz, D.; Mercade, M. Update on citric acid use in endodontic treatment: A systematic review. *Odontology* **2023**, *111*, 1–19. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Souza, M.; Cecchin, D.; Farina, A.P.; Leite, C.E.; Cruz, F.F.; Pereira, C.d.C.; Ferraz, C.C.R.; Figueiredo, J.A.P. Evaluation of Chlorhexidine Substantivity on Human Dentin: A Chemical Analysis. *J. Endod.* **2012**, *38*, 1249–1252. [\[CrossRef\]](#)
10. Siqueira, F.S., Jr.; Rôças, I.D.N.; Marceliano-Alves, M.F.; Pérez, A.R.; Ricucci, D. Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz. Oral Res.* **2018**, *32* (Suppl. S1), e65. [\[CrossRef\]](#)
11. Natanasabapathy, V.; Durvasulu, A.; Krithikadatta, J.; Namasivayam, A.; Deivanayagam, K.; Manali, S.; Sureshbabu, N.M. Current Trends in the Use of Irrigant Activation Techniques Among Endodontists & Post-Graduate Dental Students in India—A Knowledge, Attitude and Practice Based Survey. *Eur. Endod. J.* **2020**, *5*, 73–80. [\[CrossRef\]](#)

12. Adcock, J.M.; Sidow, S.J.; Looney, S.W.; Liu, Y.; McNally, K.; Lindsey, K.; Tay, F.R. Histologic Evaluation of Canal and Isthmus Debridement Efficacies of Two Different Irrigant Delivery Techniques in a Closed System. *J. Endod.* **2011**, *37*, 544–548. [CrossRef] [PubMed]
13. Jiang, L.-M.; Verhaagen, B.; Versluis, M.; Langedijk, J.; Wesselink, P.; van der Sluis, L.W. The Influence of the Ultrasonic Intensity on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation. *J. Endod.* **2011**, *37*, 688–692. [CrossRef] [PubMed]
14. Jiang, L.-M.; Lak, B.; Eijssvogels, L.M.; Wesselink, P.; van der Sluis, L.W. Comparison of the Cleaning Efficacy of Different Final Irrigation Techniques. *J. Endod.* **2012**, *38*, 838–841. [CrossRef] [PubMed]
15. Jain, S.; Patni, P.M.; Jain, P.; Raghuwanshi, S.; Pandey, S.H.; Tripathi, S.; Soni, A. Comparison of Dentinal Tubular Penetration of Intracanal Heated and Preheated Sodium Hypochlorite Through Different Agitation Techniques. *J. Endod.* **2023**, *49*, 686–691. [CrossRef]
16. Rico-Romano, C.; Zubizarreta-Macho, Á.; Baquero-Artigao, M.-R.; Mena-Alvarez, J. An analysis in vivo of intracanal bacterial load before and after chemo-mechanical preparation: A comparative analysis of two irrigants and two activation techniques. *J. Clin. Exp. Dent.* **2016**, *8*, e9–e13. [CrossRef]
17. Salas, H.; Castrejon, A.; Fuentes, D.; Luque, A.; Luque, E. Evaluation of the penetration of CHX 2% on dentinal tubules using Conventional Irrigation, Sonic Irrigation (EDDY) and Passive Ultrasonic Irrigation (PUI) techniques: An in vitro study. *J. Clin. Exp. Dent.* **2021**, *13*, e37–e42. [CrossRef]
18. Machtou, P. Manual Dynamic Activation (MDA) Technique. In *Endodontic Irrigation*, 1st ed.; Basrani, B., Ed.; Springer: Cham, Switzerland, 2015; Volume 1, pp. 149–155.
19. Gonzalez, C.; Forner, L.; Llena, C.; Lozano, A. Temperature changes in 2% chlorhexidine gluconate using two activation methods with different intensity levels. *J. Clin. Exp. Dent.* **2018**, *10*, e458–e461. [CrossRef]
20. Zeltner, M.; Peters, O.A.; Paqué, F. Temperature Changes During Ultrasonic Irrigation with Different Inserts and Modes of Activation. *J. Endod.* **2009**, *35*, 573–577. [CrossRef]
21. Basrani, B.R.; Manek, S.; Fillery, E. Using Diazotization to Characterize the Effect of Heat or Sodium Hypochlorite on 2.0% Chlorhexidine. *J. Endod.* **2009**, *35*, 1296–1299. [CrossRef]
22. Jeong, J.W.; Sarmast, N.D.; Terlier, T.; van der Hoeven, R.; Holland, J.N.; Parikh, N. Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Int. Endod. J.* **2021**, *54*, 1892–1901. [CrossRef] [PubMed]
23. Chhabra, R.; Huff, J.; Haseman, J.; Elwell, M.; Peters, A. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* **1991**, *29*, 119–124. [CrossRef] [PubMed]
24. Bui, T.B.; Baumgartner, J.C.; Mitchell, J.C. Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Root Dentin. *J. Endod.* **2008**, *34*, 181–185. [CrossRef]
25. Burkhardt-Holm, P.; Oulmi, Y.; Schroeder, A.; Storch, V.; Braunbeck, T. Toxicity of 4-Chloroaniline in Early Life Stages of Zebrafish (*Danio rerio*): II. Cytopathology and Regeneration of Liver and Gills After Prolonged Exposure to Waterborne 4-Chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **1999**, *37*, 85–102. [CrossRef]
26. Hazardous Substances Data Bank (HSDB): A Database of the National Library of Medicines. Compound Summary: 4-Chloroaniline. Available online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7812> (accessed on 12 April 2023).
27. van der Vorst, M.M.J.; Tamminga, P.; Wijburg, F.A.; Schutgens, R.B.H. Severe methaemoglobinaemia due to para-chloraniline intoxication in premature neonates. *Eur. J. Pediatr.* **1990**, *150*, 73. [CrossRef] [PubMed]
28. Basrani, B.R.; Manek, S.; Sodhi, R.N.; Fillery, E.; Manzur, A. Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *J. Endod.* **2007**, *33*, 966–969. [CrossRef] [PubMed]
29. Barbin, L.E.; Saquy, P.C.; Guedes, D.F.C.; Sousa-Neto, M.D.; Estrela, C.; Pêcora, J.D. Determination of para-Chloroaniline and Reactive Oxygen Species in Chlorhexidine and Chlorhexidine Associated with Calcium Hydroxide. *J. Endod.* **2008**, *34*, 1508–1514. [CrossRef]
30. Macedo, R.G.; Verhaagen, B.; Wesselink, P.R.; Versluis, M.; van der Sluis, L.W.M. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int. Endod. J.* **2014**, *47*, 147–154. [CrossRef]
31. De Bem, S.H.C.; Estrela, C.; Guedes, D.F.C.; Sousa-Neto, M.D.; Pêcora, J.D. Determination of chemical components derived from 2% chlorhexidine gel degradation using gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Odontol. Scand.* **2014**, *72*, 630–638. [CrossRef]
32. Özdemir, O.; Kopac, T. Cytotoxicity and biocompatibility of root canal sealers: A review on recent studies. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **2022**, *20*, 22808000221076325. [CrossRef]
33. Tartari, T.; Wichniewski, C.; Silva, R.M.; Letra, A.; Duarte, M.A.H.; Bramante, C.M. Final irrigation protocols can be used to promote stable long-term bond strength of AH Plus to dentin. *J. Appl. Oral Sci.* **2023**, *31*, e20230005. [CrossRef] [PubMed]
34. U.S. Environmental Protection Agency. Available online: <https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Chloroaniline.pdf> (accessed on 12 April 2023).

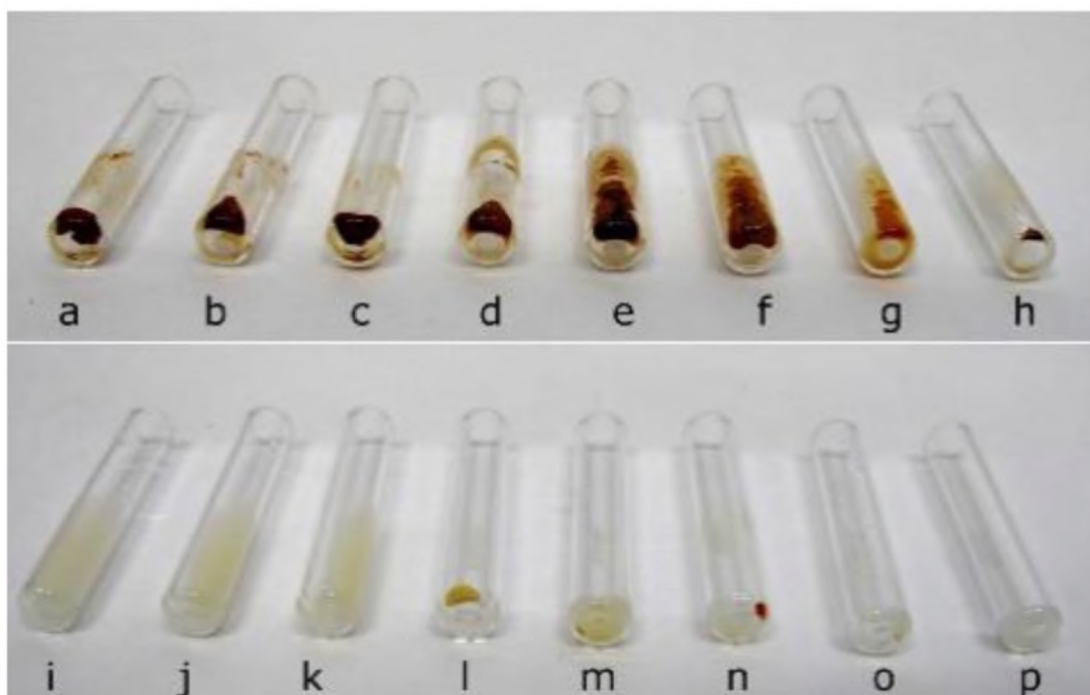
Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

VI. Wyniki

VI.1. Eksperyment 1

VI.1.1. Zmieszanie CHX i NaOCl

Zmieszanie CHX i NaOCl spowodowało utworzenie czerwono-brązowego osadu. Ilość osadu różniła się w zależności od stężenia NaOCl (przy stałym stężeniu CHX), ale osad był zawsze obecny, nawet jeśli stężenie NaOCl było mocno rozcieńczone (5,25% (w/v) NaOCl-H₂O, 1:99 (v/v)). Rycina 9 przedstawia zdjęcia otrzymanego osadu w każdej mieszance.



Ryc. 9 Osad otrzymany po dodaniu 2% chlorheksydy (CHX) do 5,25% podchlorynu sodu (NaOCl) (a); 2% (w/v) NaOCl (b); oraz 5,25% (w/v) NaOCl:H₂O (c–h) zmieszane w proporcjach 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49 i 1:99 (v/v), odpowiednio i osady otrzymane po dodaniu dichlorowodoru aleksydy (ALX) do 5,25% (w/v) NaOCl (i); 2% NaOCl (j); i 5,25% (w/v) NaOCl:H₂O (k–p), zmieszane w proporcjach 1:1, 1:4, 1:9, 1:19, 1:49 i 1:99 (v/v) odpowiednio

Wcześniejsze badania nad naturą reakcji CHX z NaOCl prowadziły do sprzecznych wniosków, albowiem niektórzy badacze twierdzili, że PCA nie powstaje

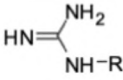
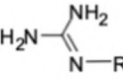
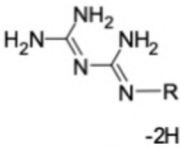
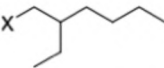
[17], a inni, że powstaje w wyniku tej reakcji [15,16,23,38]. Ponieważ NaOCl jest dość silnym utleniaczem, autorzy niniejszej pracy postawili hipotezę, że w stosowanych warunkach powstaje PCA. Aby potwierdzić to stwierdzenie, osad utworzony w każdej mieszaninie (Ryc. 9) rozpuszczono w metanolu, a następnie zbadano za pomocą UHPLC-MS. Uzyskane chromatogramy i widma masowe poddano analizie i porównano z uzyskanymi po analizie roztworów wzorcowych PCA i CHX.

W warunkach elektrorozpylania w polaryzacji dodatniej (ESI+) cząsteczka PCA daje charakterystyczny jon: 128,0262 m/z $[M + H]^+$, który monitorowano ($\pm 0,0050$ m/z) podczas analizy mieszaniny wzorcowej PCA. Czas retencji PCA wynosił 0,56 min. Analiza wspomnianego osadu wykazała pik przy czasie retencji 0,56 min, odpowiadający jonowi $128,0262 \pm 0,0050$ m/z (realizacja celu szczegółowego nr 3). Analiza UHPLC-MS rozcieńczonego supernatantu nie wykazała znaczących sygnałów analitycznych, co można przypisać znacznej supresji jonów związanej z wysokim stężeniem soli.

VI. 1.2. Zmieszanie ALX z NaOCl

Podczas mieszania ALX i NaOCl utworzył się żółtawy osad. Podobnie jak w przypadku reakcji CHX–NaOCl, ilość wytrąconego osadu zależała od stężenia NaOCl (przy stałym stężeniu ALX)(realizacja celu głównego nr 1, szczegółowego nr 2). Odpowiednio osad pojawiał się w każdym przypadku, nawet przy najniższym stężeniu NaOCl (5,25% (w/v) NaOCl–H₂O 1:99 (v/v)(Ryc. 9).

Przyjęto założenie, że ze względu na brak pierścienia aromatycznego (lub ugrupowań, które mogłyby reagować z NaOCl tworząc pierścienie aromatyczne) w strukturze ALX, nie tworzy się PCA. Jednakże ALX może zostać utleniony w podobny sposób jak CHX, co powoduje wytworzenie produktów w postaci amin alifatycznych. Weryfikując ww. założenie, ani w widmie masowym, ani na chromatogramie żadnego analizowanego osadu utworzonego w mieszaninie ALX – NaOCl nie stwierdzono piku charakterystycznego dla PCA(realizacja celu

No.	Wzór	Przewidywana struktura	Nazwa	Charakterystyczny jon m/z	Czas retencji [min]
1	C ₈ H ₁₉ N	H ₂ N-R	2-Ethylhexylamine	130.1578 [M+H] ⁺	0.57
2a	C ₉ H ₂₀ N ₂		N-(2-ethylhexyl)methanimidamide	157.1694 [M+H] ⁺	0.59
2b			N'-(2-ethylhexyl)methanimidamide		
3a	C ₉ H ₂₁ N ₃		N-(2-ethylhexyl)guanidine	172.1800 [M+H] ⁺	0.61
3b			N''-(2-ethylhexyl)guanidine		
4	C ₁₀ H ₂₁ N ₅ *		N-(diaminomethylidene)-N''-(2-ethylhexyl)guanidine -2H	212.1861 [M+H] ⁺	0.96
5	C ₂₆ H ₅₂ N ₁ 0 *	ALX - 4H	-	253.2274 [M+2H] ²⁺	1.14
6	C ₂₆ H ₅₆ N ₁ 0	**	alexidine (ALX)	255.2417 [M+2H] ²⁺	1.09
R	C ₈ H ₁₇		2-Ethylhexyl-	113.1330 [M]	-

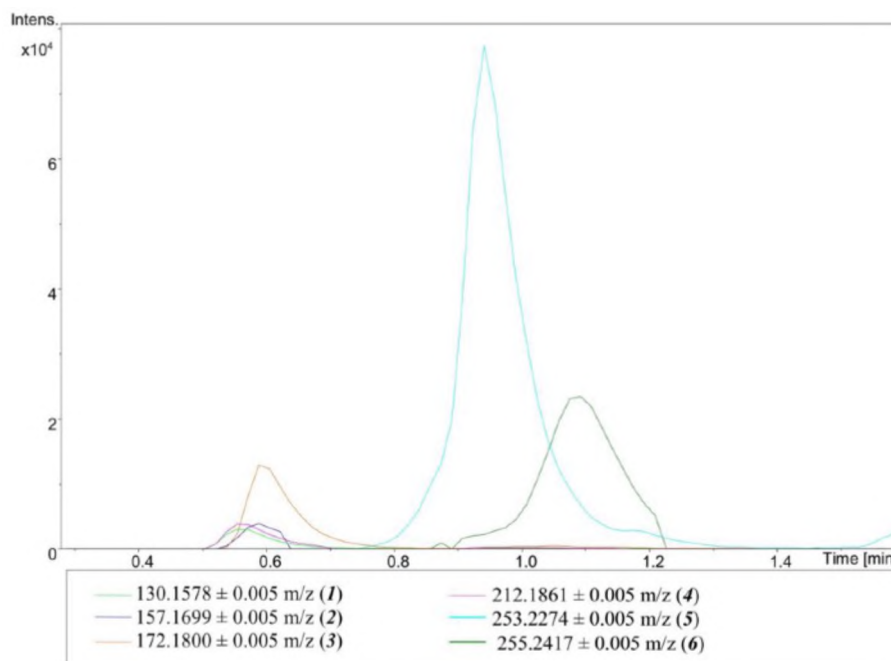
* Możliwe więcej niż 2 struktury

** Zobacz Ryc. 3 dla wzoru (6)

Tabela 1. Związki zidentyfikowane jako powstające w reakcji pomiędzy ALX i NaOCl

szczegółowego nr 4). Znalezione jednak inne związki, które mogą być produktami reakcji ALX z NaOCl. Ich obecność przewidywano na podstawie możliwych reakcji zachodzących w mieszaninie i potwierdzano poprzez identyfikację tych związków na

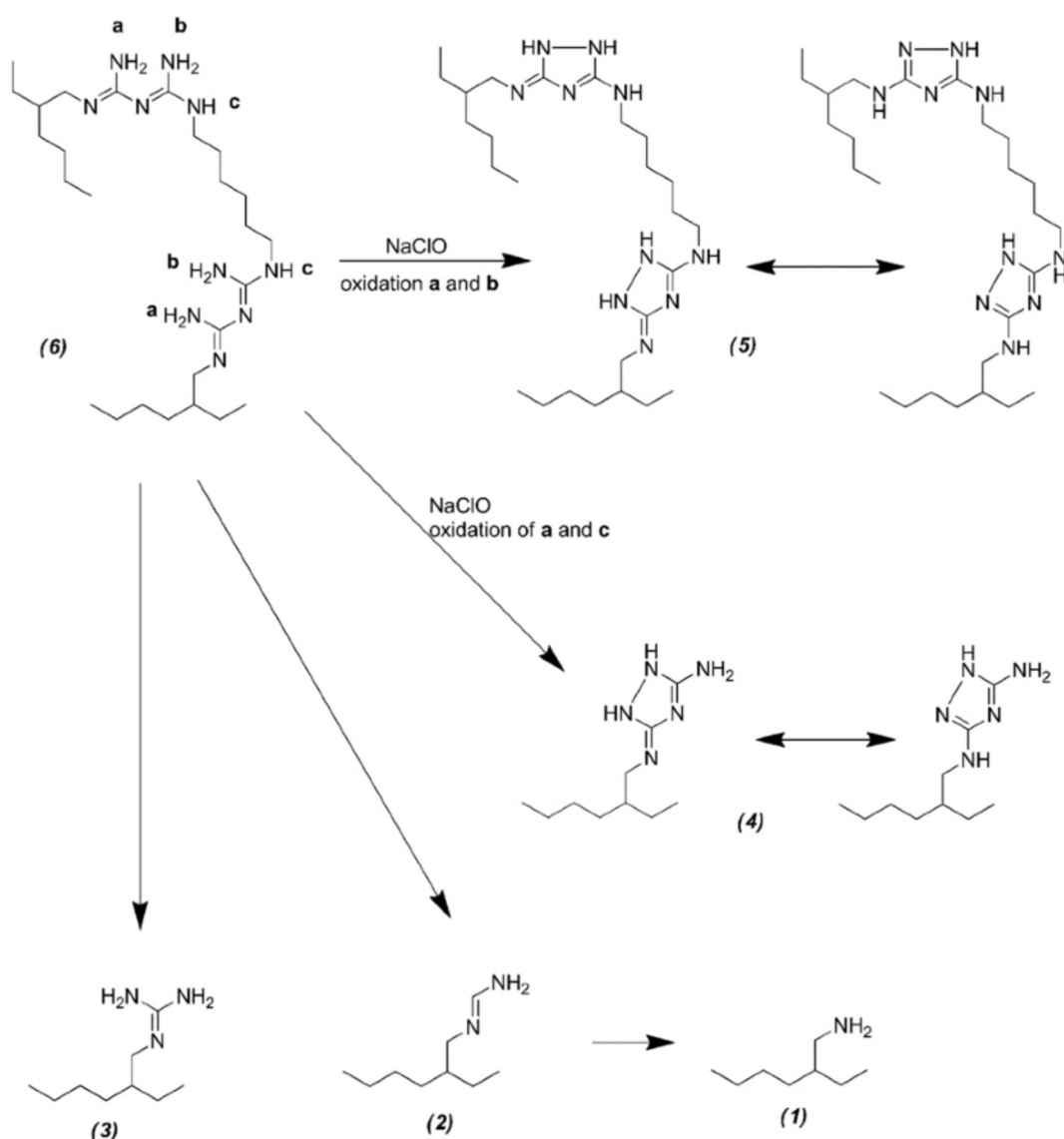
chromatogramach (Ryc. 10) i odpowiednich widmach MS, wykorzystywanych do przewidywania wzoru cząsteczkowego za pomocą dedykowanego oprogramowania (Ryc. 10) (realizacja celu głównego nr 1, szczegółowego nr 1).



Ryc. 10 Chromatogram otrzymany dla mieszaniny ALX i 5,25% NaOCl-H₂O 1:49 (v/v). Liczby w nawiasach odpowiadają liczbom w Tabeli 1

Postulowane struktury chemiczne zidentyfikowanych związków przedstawiono w Tabeli 1. W niektórych przypadkach możliwe są dwa produkty, ponieważ produkty 2a i 2b, a także 3a i 3b wykazują formy tautomeryczne, które łatwo ulegają wzajemnej konwersji. Produkt 4 to odwodorniona forma N-(diaminometylideno)-N''-(2-etyloheksylo)guanidyny. Miejsce odwodornienia pozostaje jednak nieznane: zależy od warunków reakcji i nie można go określić stosowaną metodą. Produkt 5 jest odwodornioną formą ALX; w produkcie 5 jest o cztery atomy wodoru mniej niż w ALX. Podobnie jak w sytuacji opisanej powyżej, dokładne miejsce odwodornienia pozostaje nieznane. Możliwe sytuacje to np. utworzenie podwójnych wiązań lub pierścienia alifatycznego. Ponadto pik ALX zaobserwowano również na wszystkich chromatogramach mieszaniny ALX – NaOCl.

Schemat przewidywanych reakcji ALX z NaOCl (Ryc. 11) zaproponowano na podstawie wyników niniejszego eksperymentu oraz pracy Lüttringhaus i wsp. [41].



Ryc. 11 Schemat możliwych reakcji pomiędzy ALX i NaOCl (liczby w nawiasach odpowiadają liczbom z tabeli 1). Litery a, b, c i oznaczają atomy azotu w grupach aminowych ugrupowań guanidyny w cząsteczce ALX

Zbadano także względne wydajności reakcji produktów w zależności od stężenia odczynnika NaOCl i wyznaczając je jako procent powierzchni konkretnego piku wśród badanych związków wyrażanej jako łączne pole powierzchni pików (ALX pominięto ze względu na znacznie wyższe wartości pól powierzchni).

VI. 2. Eksperyment 2

VI. 2. 1. Zmiany temperatury podczas aktywacji CHX

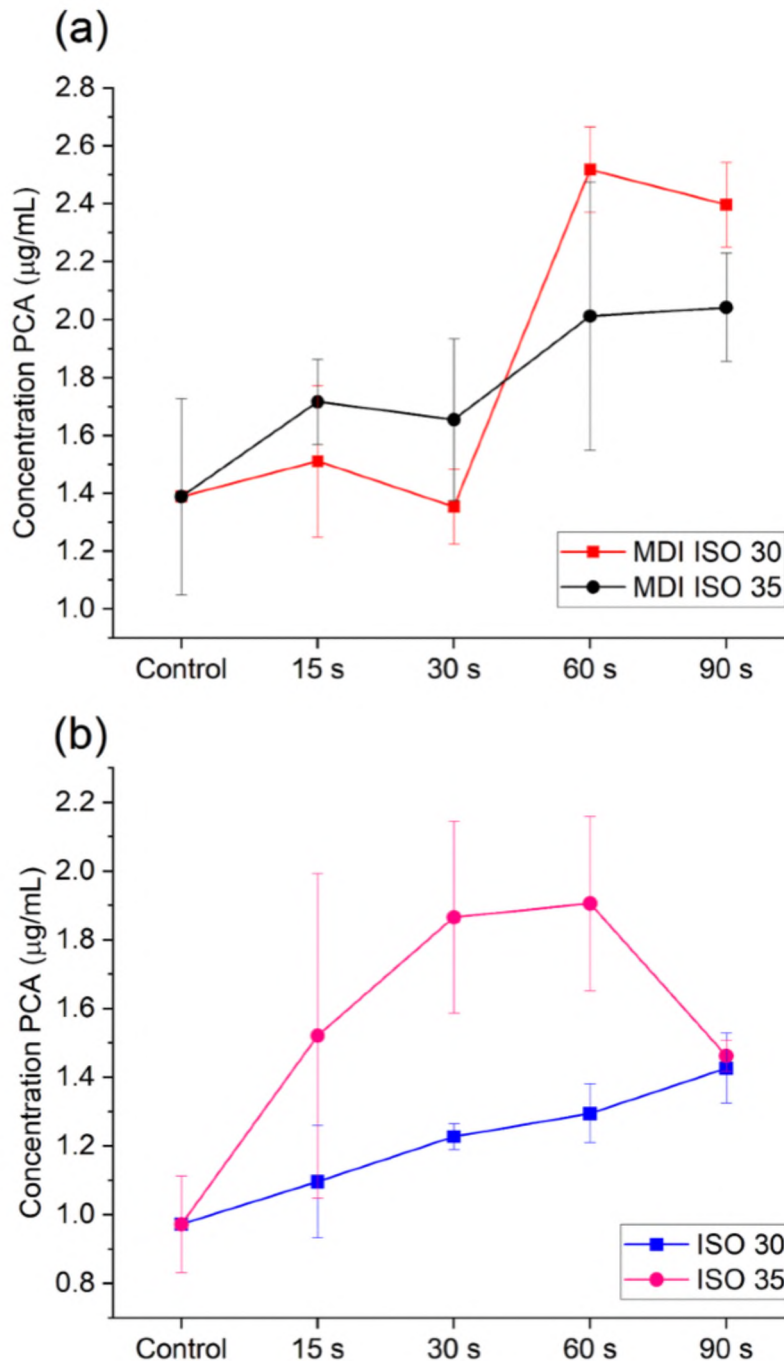
Activation Type	Activation Time [s]	Temperature Change ΔT , [°C]	
		ISO 30	ISO 35
US	15	+3	+4
	30	+3	+3
	60	+3	+3
	90	+4	+4
MDI		ISO 30	ISO 35
	15	0	0
	30	0	0
	60	0	0
	90	0	0

Tabela 2. Zmiany temperatury 2% roztworu CHX przed i po aktywacji metodami US i MDI

Zmiany temperatury 2% roztworu CHX przed i po aktywacji metodami US i MDI przedstawiono w tabeli 2. Temperaturę monitorowano za pomocą skalibrowanej termopary o rozdzielczości temperatury 1°C. Aktywacja US spowodowała zauważalny wzrost temperatury, natomiast w przypadku MDI nie wykryto zmiany temperatury (realizacja celu szczegółowego nr 4).

VI. 2.2. Produkcja PCA podczas aktywacji 2% CHX metodami US i MDI

Analiza chromatograficzna aktywowanego 2% CHX umożliwiła określenie ilości uwolnionej PCA podczas aktywacji US (ryc. 12) (realizacja celu szczegółowego nr 1). W przypadku pilnika o rozmiarze ISO 30 ilość uwolnionej PCA zwiększała się wraz z czasem aktywacji. Gdy aktywowano 2% CHX grubszym pilnikiem (ISO 35), zaobserwowano również tworzenie się PCA, ale nie zmieniało się to istotnie w czasie (ryc. 12b). Niemniej jednak analiza ANOVA wykazała, że



Ryc. 12 Tworzenie PCA w momencie aktywacji 2% CHX za pomocą
(a) metody MDI i (b) metody US

istnieje statystyczna różnica pomiędzy średnim stężeniem PCA w przypadku metody aktywacji ultradźwiękowej z ISO 30 ($p = 0,02$; $MS_{\text{between}} = 0,116$, $MS_{\text{error}} = 0,014$). W szczególności test *post-hoc* Tukeya wykazał, że zastosowanie pilnika US o rozmiarze ISO 30 generuje statystycznie istotnie wyższe ilości PCA niż te stwierdzone w grupie kontrolnej, jeśli czas aktywacji wyniósł 60 s ($q_{\text{control-60s}} = 0,041$, $p < 0,05$) lub 90 s ($q_{\text{control-90s}} = 0,004$, $p < 0,05$). Wzrost stężenia PCA istotnie różni się dla 60 i 90 s

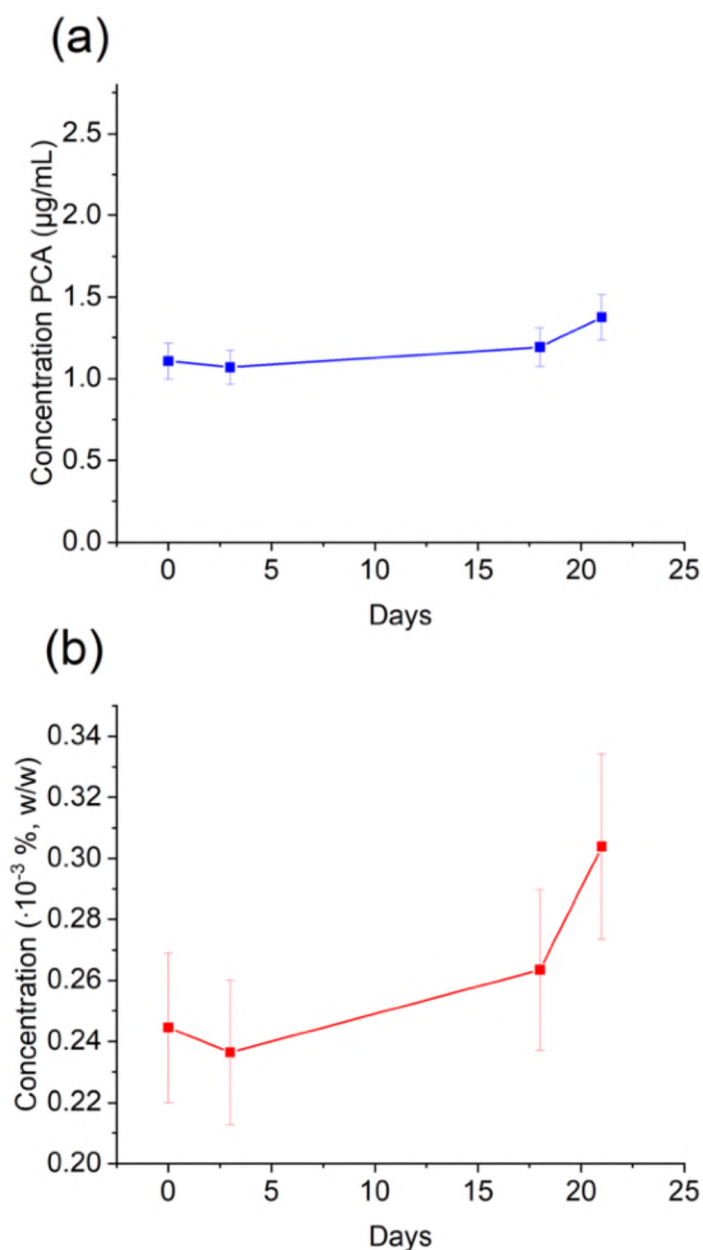
($q_{\text{control-90s}} = 0,036$, $p < 0,05$), co potwierdza obserwację pozytywnego wpływu czasu na generację PCA. W przypadku pilnika US ISO 35 nie zostało spełnione założenie o równości wariancji; zastosowano zatem test Kruskala – Wallisa. Z analizy wynika, że istnieje różnica pomiędzy grupą kontrolną a grupami eksperymentalnymi ($H_{4,n=17} = 12,340$, $p = 0,015$); jednak istotną statystycznie różnicę można stwierdzić tylko dla czasu aktywacji 60 s, biorąc pod uwagę wyniki testu Dunna *post-hoc* ($p = 0,021$) (realizacja celu szczegółowego nr 5 i 7).

PCA uwalniała się także w 2% roztworze CHX po aktywacji metodą MDI (realizacja celu szczegółowego nr 2). Gdy CHX mieszano ćwiekiem gutaperkowym o rozmiarze ISO 30.06, zaobserwowano wzrost tworzenia się PCA dla czasu aktywacji 60 i 90 s. W przypadku stosowania ćwieka ISO 35.06 wydzielał się także PCA, którego ilość zmniejszała się w początkowej fazie aktywacji, po czym następował wzrost jego stężenia 60 i 90 s. W tym przypadku analiza ANOVA wykazała, że istnieje statystyczna różnica pomiędzy średnim stężeniem PCA uwolnionym w 60 i 90 s podczas aktywacji metodą MDI dla grupy ISO 30.06 ($p = 0,0002$; $MS_{\text{between}} = 0,928$, $MS_{\text{error}} = 0,049$), na co wskazują wyniki test *post-hoc* Tuckeya ($q_{\text{control-60s}} = 0,003$; $q_{\text{control-90s}} = 0,003$, $q_{15-60s} = 0,003$, $q_{15-90s} = 0,006$, $q_{30-60s} = 0,002$, $q_{30-90s} = 0,002$, $p < 0,05$). W przypadku rozmiaru ćwieka ISO 35.06 można zaobserwować podobną tendencję (patrz Ryc. 12a). Analiza ANOVA nie potwierdziła jednak różnicy w średnim stężeniu PCA pomiędzy badanymi procedurami aktywacji na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Co więcej, analiza za pomocą testu t wykazała, że nie ma istotnej statystycznie różnicy pomiędzy ilością uwalnianego PCA w grupie ISO 30.06 i ISO 35.06 zarówno dla 60 s ($p = 0,146$; $t_{n=3} = 1,803$), jak i 90 s ($p = 0,06$; $t_{n=3} = 2,593$) (realizacja celu szczegółowego nr 6 i 8).

VI. 2.3. Uwalnianie PCA z roztworu 2% CHX przechowywanej na półce

PCA wykryto także w kontroli negatywnej w próbkach 2% CHX pobranych z przechowywanego na półce, nieaktywowanego roztworu 2% CHX, a stężenie PCA wzrastało wraz z czasem przechowywania. Stężenia PCA oceniano po 0, 3, 18 i 21 dniach przechowywania dla każdej grupy doświadczalnej w objętości butelki

roztworu Gluco-CHeX (400 g) (Ryc. 13) (realizacja celu szczegółowego nr 9). Ilość uwolnionego PCA zarówno dla grup eksperymentalnych, jak i dla 2% CHX



Ryc. 13 Zmiany stężenia PCA stwierdzone w CHX 2% przechowywanym w warunkach otoczenia. a) — dane w wartościach bezwzględnych; (b) — stężenie w procentach

nieaktywowanej i przechowywanej w warunkach pokojowych była porównywalna i

mieściła się w zakresie wartości od 0,9 $\mu\text{g/mL}$ do 2,5 $\mu\text{g/mL}$ (realizacja celu szczegółowego nr 10), a wartości nie przewyższały dopuszczalnych norm [42] (realizacja celu głównego nr 2).

VII. Dyskusja

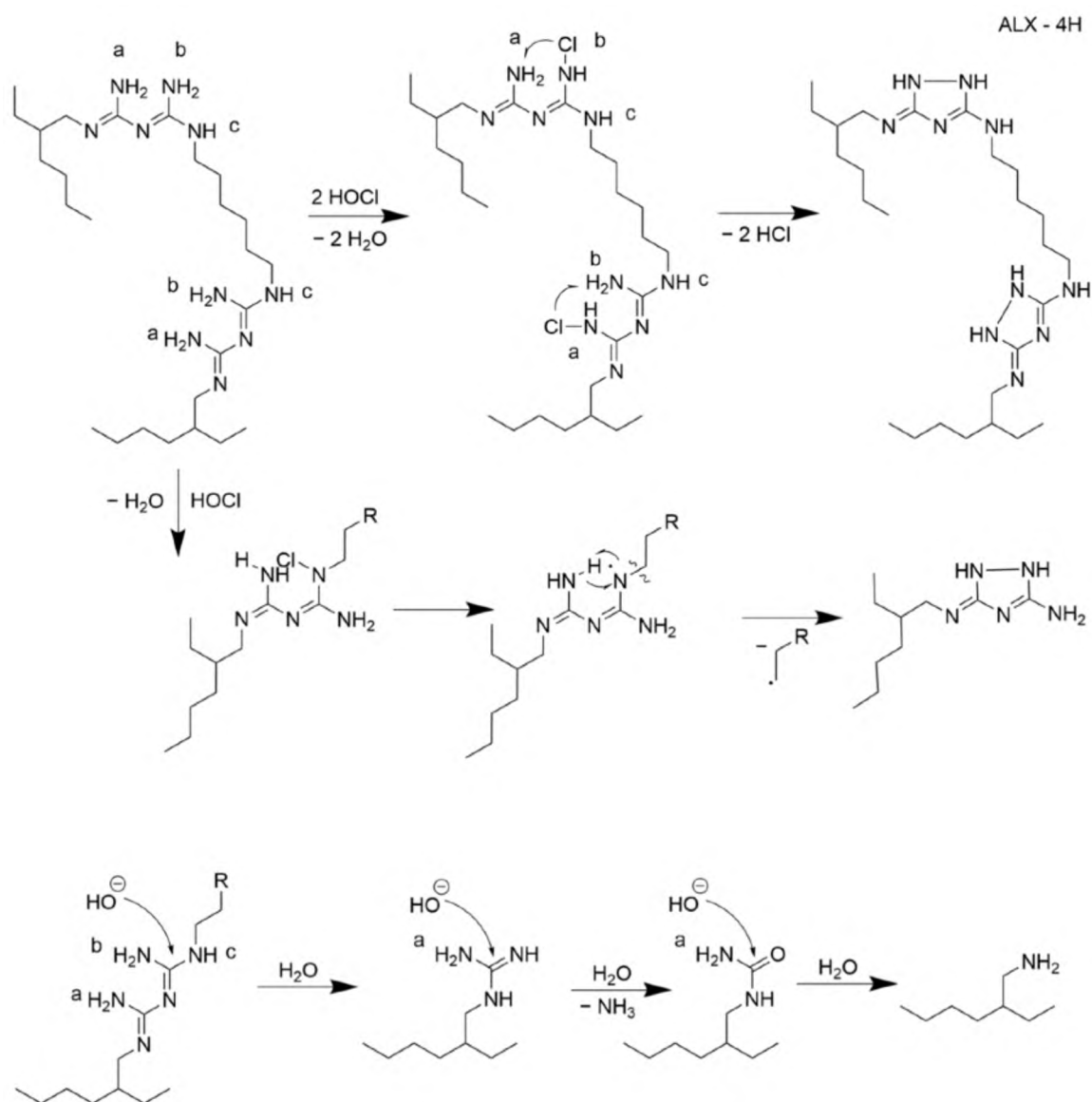
VII.1 Eksperyment nr 1

Kim i wsp. [23] oraz Jain i wsp. [43] zasugerowali, że ALX może być potencjalną alternatywą dla roztworu CHX w leczeniu kanałowym, a sama interakcja pomiędzy ALX i NaOCl została opisana i omówiona w przeszłości [23,43,44]. Doniesiono, że ALX ma podobną strukturę chemiczną i właściwości, a nawet posiada większy potencjał dezaktywacji czynników zjadliwości bakterii niż CHX. Autorzy tych badań nie zidentyfikowali jednak żadnego produktu powstającego w mieszaninie ALX i NaOCl [23,43]. Co więcej, badania dotyczące interakcji ALX–NaOCl zaprzeczyły tworzeniu się osadu w tej reakcji [23,43].

Poprzednie badania oceniające osad powstały w mieszaninie CHX i NaOCl albo potwierdziły [15,16,23], albo zaprzeczyły [17,45] obecności PCA w mieszaninie. W niniejszej pracy, w eksperymencie nr 1 potwierdzono, że w każdej badanej mieszaninie CHX i NaOCl faktycznie powstała PCA, a ponieważ faktem jest, że PCA indukuje hemato-, spleno-, hepato- i nefrotoksyczność [42,46], niewłaściwe postępowanie podczas dezynfekcji kanałów korzeniowych zęba może mieć szkodliwe skutki dla całego organizmu.

W eksperymencie nr 1 w niniejszej pracy potwierdzono, że w reakcji ALX i NaOCl powstaje osad, oraz uwalniają się aminy alifatyczne. Aminy te powstają w wyniku zerwania wiązań w łańcuchu ALX lub odwodornienia spowodowanego przez NaOCl. Ponadto w przeszłości udowodniono cytotoksyczność postulowanych produktów reakcji ALX i NaOCl [47], a związki o podobnej do zidentyfikowanych przez nas budowie mają również potencjał neurotoksyczny [48].

Reakcję pomiędzy ALX i NaOCl należy scharakteryzować jako układ złożony, niemniej jednak na podstawie literatury można zaproponować mechanizm tego procesu (Ryc. 14). Podążając za pracą Hawkinsa i wsp. [49] mechanizm reakcji przedstawiony na rysunku 14 sugeruje powstanie 2-etyloheksyloaminy (2), N-(diaminometylideno)-N''-(2-etyloheksylo)guanidyny (4) i ALX-4H występujących w osadzie. Należy również zauważyć, że nie ma istotnej tendencji w tworzeniu się



Ryc. 14 Postulowany schemat mechanizmu reakcji pomiędzy ALX i NaOCl (liczby w nawiasach odpowiadają liczbom z tabeli 1). Litery a, b i c oznaczają atomy azotu w grupach aminowych ugrupowań guanidyny w cząsteczce ALX.

produktów w osadzie; jednakże w silnie rozcieńczonym NaOCl wydaje się, że dominuje produkcja związku 5, podczas gdy jednocześnie zmniejszają się ilości związków 1 i 2. Może to wskazywać, że utlenianie w pozycjach a i b (rys. 11) wymaga niższego stężenia środka utleniającego niż w pozycjach a i c.

VII.2. Eksperyment nr 2

System kanałów korzeniowych można uznać za system zamknięty, w którym należy zmienić przepływ roztworów płuczących z laminarnego na turbulentny, aby zwiększyć skuteczność czyszczenia środków do płukania kanałów za pomocą sił wygenerowanych ultradźwiękowo, dźwiękowo lub ręcznie. Ponieważ lekarze dentyści coraz częściej stosują IAT [25] i zaproponowane mieszanie tymi technikami 2% CHX [31], istotna jest ocena bezpieczeństwa tej techniki aktywacji w aspekcie tworzenia PCA. PCA jest toksyczna [42], rakotwórcza [37] i może powodować methemoglobinemię [50]. Chociaż uwalnianie PCA w wyniku interakcji pomiędzy CHX a innymi endodontycznymi środkami antyseptycznymi, takimi jak podchloryn sodu [15] i wodorotlenek wapnia [51], jest potwierdzonym naukowo faktem, jego powstawanie podczas aktywacji CHX za pomocą US było jedynie hipotezą. Ponadto przyjęto, że MDI jest metodą z wyboru do mieszania CHX, ponieważ nie podgrzewa roztworu i dlatego postulowano, że podczas tej aktywacji nie dojdzie do uwolnienia PCA. Brak było jednak w piśmiennictwie bezpośrednich dowodów naukowych potwierdzających, czy aktywacja 2% CHX za pomocą MDI nie powoduje powstawania PCA.

Basrani i wsp. [35] ogrzewali 2% roztwór CHX w łaźni wodnej przez 45 minut i wykryli uwalnianie PCA w temperaturze 45°C, ale nie w 37°C. Po tym eksperymencie wysunięto hipotezę, że ultradźwiękowa aktywacja 2% CHX jest niebezpieczna, ponieważ PUI zwiększa temperaturę roztworów irygacyjnych. Jednak nie przedstawiono bezpośredniego dowodu na tworzenie się PCA z 2% CHX aktywowanej za pomocą US. Ponadto nie przeprowadzono dotychczas analizy ilościowej uwalniania PCA z 2% CHX aktywowanej metodą ultradźwiękową.

W przeprowadzonym w naszym badaniu eksperymencie potwierdzono, że z 2% CHX aktywowanej metodą US uwalnia się PCA. W przypadku końcówek US o rozmiarze ISO 30 zaobserwowano wzrost stężenia PCA w czasie dla wszystkich czasów aktywacji, podczas gdy w grupie ISO 35 ilość PCA wzrosła przy czasie mieszania 15, 30 i 60 sekund.

Ponadto po raz kolejny potwierdzono wynik z poprzednich badań, w których wykazano, że metoda PUI zwiększa temperaturę roztworów CHX. Jednakże w naszym badaniu wzrost temperatury nie korelował z czasem mieszania ani rozmiarem końcówek ultradźwiękowych, w przeciwieństwie do wcześniejszych eksperymentów [34,52]. Różnice te można wytłumaczyć faktem, że eksperymentalny model *in vitro* zastosowany w niniejszym badaniu był bliższy klinicznej metodologii leczenia, zarówno pod względem objętości roztworu i czasu aktywacji, jak i zastosowanego sprzętu endodontycznego. Rozmiary końcówek ultradźwiękowych (ISO 30 i ISO 35) zostały wybrane jako najczęściej stosowane w tym celu w praktyce klinicznej. Pilniki ultradźwiękowe o mniejszych rozmiarach mają tendencję do częstszej separacji w przestrzeni endodontycznej, dlatego też wybrano do aktywacji pliki ISO 30 i 35, które wydają się być rozmiarami wybieranymi dla tego celu najczęściej, w oparciu o rozsądny konsensus. Ponadto wybrano czasy aktywacji 15 i 30 sekund jako te stosowane klinicznie podczas leczenia, a czasy 60 i 90 s sprawdzono pod kątem korelacji i obserwacji trendów.

Ponieważ metoda MDI nie powoduje wzrostu temperatury 2% CHX, postawiono hipotezę, że jest bezpieczniejszą i preferowaną metodą aktywacji CHX w leczeniu endodontycznym. Jednakże, choć w niniejszym eksperymencie potwierdzono, że metoda MDI nie spowodowała wzrostu temperatury 2% roztworu CHX, to po aktywacji MDI wykryto PCA w próbkach.

W metodzie MDI stosowano świecek gutaperkowe o większej stożkowatości (35 ISO o taperze 6% i 30 ISO o taperze 6%), gdyż są one bardziej skuteczne w tej metodzie, niż gutaperka standardowa 2% [32]. Gdy w metodzie MDI zastosowano świeczkę GP o większym rozmiarze (35.06), zaobserwowano początkowy spadek ilości PCA w porównaniu z roztworem niemieszanym, przy wzroście PCA po 60 i 90 s mieszania. Można to hipotetycznie wytłumaczyć sedymentacją PCA na świeczkach GP, a całkowita masa i objętość świeczki 35.06 jest większa niż 30.06, co może wyjaśniać, dlaczego w próbkach 30.06 w grupie MDI efektu tego nie zaobserwowano. Hipoteza ta wymaga dalszych badań.

Ponadto PCA wykryto w próbkach kontrolnych, a także w butelce z przechowywanym na półce roztworem 2% CHX, co po raz kolejny potwierdziło

samodegradację roztworów CHX w czasie [53]. Odkrycie to pokazuje, że lepiej byłoby używać w protokole irygacji dużych ilości świeżych porcji 2% CHX z mniejszych butelek, aby szybciej je opróżnić i nie przechowywać ich w nadmiernych ilościach. Ponadto uzyskane wyniki eksperymentu podkreślają znaczenie prawidłowego przechowywania roztworów do irygacji 2% CHX, a perspektywą na przyszłość jest zbadanie, jak warunki przechowywania (np. nieprawidłowe zamknięcie butelki, światło UV, temperatura przechowywania) wpływają na ilość uwalnianego PCA z 2% roztworu chlorheksydyny.

Należy podkreślić, że zębinę kanałową powinno się traktować jako substrat biologiczny, który poprzez protokół irygacji przygotowuje się do dalszego etapu leczenia endodontycznego, czyli wypełnienia gutaperką wraz z aplikacją uszczelniacza. Penetracja uszczelniacza do kanalików zębinowych jest konsekwencją skutecznego usunięcia warstwy mazistej i może zostać zakłócona przez tworzenie się PCA. Dlatego wykrywanie tworzenia się związków reaktywnych podczas chemicznego opracowywania kanałów korzeniowych jest istotne w aspekcie uzyskania właściwej siły wiązania pomiędzy różnymi rodzajami uszczelniaczy a zębiną. Problem ten wymaga dalszych badań.

VIII. Wnioski

Wniosek nr 1. W przypadku rozważania wprowadzenia 1% ALX do praktyki klinicznej konieczne jest stosowanie co najmniej takich samych procedur jak w przypadku 2% CHX, albowiem zmieszanie tego płynu do płukania kanałów korzeniowych z 5,25% pochlorynem sodu doprowadza do uwolnienia toksycznych amin alifatycznych.

Wniosek nr 2. W przypadku rozważania wprowadzenia 1% ALX do praktyki klinicznej konieczne jest stosowanie co najmniej takich samych procedur jak w przypadku 2% CHX, albowiem zmieszanie tego płynu do płukania kanałów korzeniowych z 5,25% pochlorynem sodu doprowadza do wytrącenia osadu, którego ilość wzrasta wraz ze wzrostem stężenia NaOCl.

Wniosek nr 3. Ilość uwolnionego PCA z aktywacji 2% CHX nie zależy od rodzaju metody aktywacji, temperatury roztworu, grubości pilnika ultradźwiękowego czy rozmiaru ćwieka gutaperkowego użytego do agitacji roztworu.

Wniosek nr 4. Ilość uwolnionego PCA z aktywacji 2% CHX zależy od czasu aktywacji i wzrasta wraz z czasem trwania tej agitacji dla metody PUI.

Wniosek nr 5. Aktywacja 2% CHX metodą ultradźwiękową nie niesie ze sobą zwiększonego ryzyka toksyczności w porównaniu z płukaniem przestrzeni endodontycznej nieaktywowaną 2% CHX w warunkach *in vitro*, albowiem uzyskane ilości uwolnionego PCA w tej metodzie agitacji są porównywalne z ilościami uwolnionymi z samoistnej degradacji CHX w czasie magazynowania i nie przekraczają dopuszczalnych norm.

Wniosek nr 6. Aktywacja 2% CHX metodą MDI nie niesie ze sobą zwiększonego ryzyka toksyczności w porównaniu z płukaniem przestrzeni endodontycznej nieaktywowaną 2% CHX w warunkach in vitro, albowiem uzyskane ilości uwolnionego PCA w tej metodzie aktywacji są porównywalne z ilościami uwolnionymi z samowolnej degradacji CHX w czasie magazynowania i nie przekraczają dopuszczalnych norm.

Wniosek nr 7. W protokole płukania przestrzeni endodontycznej należy używać większych ilości 2% CHX podawanego z mniejszych butelek, tak, aby nie przedłużać czasu przechowywania 2% CHX, ze względu na samoistną degradację roztworu tego płynu do płukania kanałów korzeniowych, która doprowadza do wzrostu stężenia PCA wraz z czasem przechowywania w gabinecie.

IX. Streszczenie w języku polskim

Wstęp: Celem leczenia kanałowego jest zapobieganie lub wygojenie zmian zapalnych w tkankach okołowierzchołkowych zęba. Osiągnięcie celu w znacznym stopniu zależy od efektywności chemicznej preparacji przestrzeni endodontycznej. Tak samo ważny, jak chemiczne właściwości płynów do płukania kanałów, jest sposób ich dostarczenia do przestrzeni endodontycznej. Celem jest zamiana przepływu linearnego na turbulentny na drodze ich agitacji różnymi metodami. Sprzeczne dane z piśmiennictwa nie odpowiadają jednoznacznie na pytanie, czy stosowana w protokole płukania kanałów chlorheksydyna (CHX) może być aktywowana ultradźwiękami. W procesie tym postulowano uwalnianie szkodliwej para-chloroaniliny (PCA). Niemniej brak jest na to bezpośrednich dowodów naukowych. Wiadomo natomiast, że CHX nie może być zmieszana z NaOCl w przestrzeni endodontycznej – produktem reakcji jest właśnie PCA i brunatny osad, który upośledza szczelność wypełnienia kanałów. Z tego powodu zaproponowano inny związek z grupy biguanidów: aleksydynę (ALX) jako bezpieczniejszą alternatywę dla CHX, bowiem w przeszłości udowodniono, że w reakcji NaOCl i ALX nie powstaje PCA. Nie zidentyfikowano natomiast związków powstałych w tej reakcji i nie określono ich potencjalnej toksyczności. Również dane na temat produkcji osadu z tej interakcji są niejednoznaczne, czy wręcz sprzeczne.

Cel: Celem badań była ilościowa analiza powstawania PCA podczas aktywacji 2% CHX metodami US i MDI metodą HPLC-DAD i tym samym ocena bezpieczeństwa agitacji CHX metodami PUI i MDI w leczeniu kanałowym, a także ocena bezpieczeństwa stosowania 1% aleksydyny jako alternatywy dla dotychczas stosowanej 2% chlorheksydyny w protokole płukania systemu kanałów korzeniowych, poprzez zidentyfikowanie produktów powstałych ze zmieszania NaOCl z 1 % ALX wraz z określeniem, czy w reakcji tej powstaje osad.

Material i metody: 2% CHX aktywowano US metodą PUI przy użyciu plika K-file ISO 30 i 35 oraz metodą MDI przy użyciu ćwieków gutaperkowych ISO 30.06 i 35.06 przez 15, 30, 60 i 90 sekund. Stężenie PCA oznaczano metodą HPLC-DAD. Oceniono także stężenie PCA dla nieaktywowanej 2% CHX po 0, 3, 18 i 21 dniach przechowywania w warunkach pokojowych. Roztwory ALX zmieszano z równoważną objętością 2% i 5,25% (w/v) roztworów NaOCl. Jako kontrolę zmieszano 2% (w/v) CHX z 2% i 5,25% (w/v) NaOCl. Próbkę poddano analizie UHPLC-MS.

Wyniki: PCA wykryto we wszystkich próbkach 2% CHX w każdej metodzie aktywacji. Stężenie PCA było zależne od czasu aktywacji w grupie US ISO 30 i ISO 35 ($p < 0,05$). W grupach MDI ISO 30.06 i ISO 35.06 zaobserwowano podobną tendencję, jednak bez istotności statystycznej ($p > 0,05$). PCA wykryto również w przechowywanym na półce 2% CHX, a jego stężenie wzrastało wraz z czasem przechowywania. PCA uwalnia się w trakcie aktywacji 2% CHX za pomocą US i MDI, ale średnie stężenia nie są wyższe niż te obserwowane w wyniku samodegradacji przechowywanej w temperaturze pokojowej, nieaktywowanej 2% CHX i nie przekraczają przyjętych norm. W wyniku zmieszania ALX i NaOCl wytrącił się żółtawy osad, którego ilość zależała od stężenia NaOCl. W wyniku oddziaływania ALX i NaOCl powstają aminy alifatyczne. Po raz pierwszy zidentyfikowano możliwe produkty tej interakcji. Po zmieszaniu NaOCl z ALX nie utworzyła się PCA.

Wnioski: Ilość uwolnionego PCA z aktywacji 2% CHX nie zależy od rodzaju metody aktywacji, temperatury roztworu, grubości pilnika ultradźwiękowego czy rozmiaru ćwieka gutaperkowego użytego do agitacji roztworu, natomiast zależy od czasu aktywacji i wzrasta wraz z czasem trwania tej agitacji dla metody PUI. Aktywacja 2% CHX metodami PUI i MDI nie niesie ze sobą zwiększonego ryzyka toksyczności w porównaniu z płukaniem przestrzeni endodontycznej nieaktywowaną

2% CHX w warunkach *in vitro*, albowiem uzyskane ilości uwolnionego PCA w tej metodzie agitacji są porównywalne z ilościami uwolnionymi z samoistnej degradacji CHX w czasie i nie przekraczają dopuszczalnych norm. Należy używać większych ilości 2% CHX podawanego z mniejszych butelek, by nie przedłużać czasu przechowywania 2% CHX, ze względu na samoistną degradację roztworu tego płynu, która doprowadza do wzrostu stężenia PCA wraz z czasem przechowywania w gabinecie. W przypadku rozważania wprowadzenia 1% ALX do praktyki klinicznej jako alternatywy dla 2% CHX, konieczne jest stosowanie co najmniej takich samych procedur jak w przypadku 2% CHX, albowiem zmieszanie tego płynu do płukania kanałów korzeniowych z 5,25% pochlorynem sodu doprowadza do uwolnienia toksycznych amin alifatycznych i wytrącenia osadu, którego ilość wzrasta wraz ze wzrostem stężenia NaOCl.

X. Streszczenie w języku angielskim

Introduction: The main purpose of endodontic treatment is to prevent or cure apical periodontitis (AP). Therapeutic success in endodontic treatment depends on successful infection control. The mode of irrigants application into endodontic space is as important as their chemical properties. The aim of agitation is to change the flow of root canal irrigants from laminar into turbulent, which increases the action of chemical solutions distributed throughout endodontic space. It was hypothesized, that 2% chlorhexidine (CHX) activation with US method leads to p-chloroaniline (PCA) release, but direct proof for this potential toxic effect of CHX agitation was not provided up to date. Nevertheless, it was proved, that 2% CHX cannot be mixed with sodium hypochlorite (NaOCl) in endodontic space - the product of the reaction is PCA and brown precipitate, which compromises the quality of root canal obturation. For that reason, alexidine dihydrochloride (ALX), a biguanide similar to CHX, was recently proposed as a potential alternative to 2% CHX, as it possesses similar antimicrobial properties, expresses substantivity and does not produce PCA when mixed NaOCl. However, the products released in this reaction have not been identified to date. Moreover, the data on precipitate formation from this interaction are ambiguous or even contradictory.

Aim: The aim of the study was quantitative analysis of PCA formation during 2% CHX activation with US and MDI methods in root canal-like environment with HPLC-DAD method and therefore safety assessment of US and MDI agitation of CHX in endodontic treatment, as well as to identify detected chemical compounds formed in the reaction of ALX and NaOCl with UHPLC-MS method and assess whether precipitates and PCA are formed in this reaction.

Materials and methods: 2% CHX was activated with US method using ISO 30 and 35 K-file and MDI method using ISO 30.06 and 35.06 GP cones for 15s, 30s, 60 and

90 s. PCA concentration was assessed with HPLC-DAD method. PCA concentration was also assessed for 2% CHX after 0, 3, 18 and 21 days of storage in ambient conditions. Solutions of ALX were mixed with the equivalent volume of 2% and 5.25% (w/v) NaOCl solutions. As control, 2% (w/v) CHX was mixed with 2% and 5.25% (w/v) NaOCl. Samples were subjected to the UHPLC-MS analysis.

Results: PCA was detected in all samples of 2% CHX in all methods of activation. The concentration of PCA was dependent on time of activation in US ISO 30 and ISO 35 group ($p < 0.05$). In MDI ISO 30.06 and ISO 35.06 groups similar trend was observed but without statistical significance ($p > 0.05$). PCA was detected in shelf-stored 2% CHX and concentration was related to time of storage. The mixture of ALX and NaOCl resulted in a yellowish precipitate formation, the amount of which depended on NaOCl concentration. Interaction of ALX and NaOCl resulted in the production of aliphatic amines. No PCA was formed when NaOCl was mixed with ALX. However, for the first time, we identified the possible products of the interaction.

Conclusions: PCA is released from 2% CHX activation with PUI and MDI method, but mean concentrations are not higher than those observed from self-degradation of shelf-stored 2% CHX. The amount of PCA released from 2% CHX activation does not depend on type of method, size of US file, GP cone or temperature, but it depends on time of agitation for PUI method. Activation of 2% CHX with PUI and MDI methods does not carry higher risk of toxicity in *in vitro* root canal-like conditions in comparison to non-activated 2% CHX, as the amounts of PCA released during PUI and MDI agitation are comparable to the amounts of PCA released from self-degradation of shelf-stored CHX and do not exceed accepted norms. It would be preferable to use high volume of fresh portions of 2% CHX in irrigation protocol, stored in smaller bottles, in order to finish them quicker and not to prolong shelf-storing time. If 1% ALX is used as an alternative solution to 2% CHX, it is necessary

to apply at least the same safety procedures as in case of 2% CHX, because mixing ALX with NaOCl results in release of toxic aliphatic amines and precipitate formation, which amount increases with NaOCl concentration.

XI. Piśmiennictwo

1. Liang A., Huang L., Li B., Huang Y., Zhou X., Zhang, X., Gong Q.: Micro-CT Evaluation of Different Root Canal Irrigation Protocols on the Removal of Accumulated Hard Tissue Debris: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J. Clin. Med.* 2022, 11, 6053.
2. Vashisht R., Kumar U., Jhamb S., Singla R.: Comparative evaluation of cleaning efficiency of single file NiTi rotary system during root canal treatment procedure —A scanning electron microscope study. *J. Conserv. Dent.* 2023, 26, 316–320.
3. Peters O.A., Schönenberger K., Laib A.: Effects of four Ni-Ti preparation techniques on root canal geometry assessed by micro computed tomography. *Int. Endod. J.* 2001, 34, 221-230.
4. Weng X.L., Yu S.B., Zhao S.L., Wang H.G., Mu T., Tang R.Y., Zhou X.D.: Root canal morphology of permanent maxillary teeth in the Han nationality in Chinese Guanzhong area: a new modified root canal staining technique. *J. Endod.* 2009, 35,651-656.
5. Kakehashi S., Stanley H., Fitzgerald R.: The effect of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.* 1965, 20, 340-349.
6. Sundqvist G.: Bacteriological studies of necrotic dental pulps. *Umeå University Odontological Disertation no 7, Umea, 1976.*
7. Zehnder M.: Root canal irrigants. *J. Endod.* 2006, 32, 389-398.
8. Haapasalo M., Shen Y., Wang, Z., Gao Y.: Irrigation in endodontics. *Br. Dent. J.* 2014, 216, 299–303.
9. Cai C., Chen X., Li Y., Jiang Q.: Advances in the Role of Sodium Hypochlorite Irrigant in Chemical Preparation of Root Canal Treatment. *BioMed. Res. Int.* 2023, 13, 8858283.
10. Hülsmann M., Heckendorff M., Lennon, Á.: Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use. *Int. Endod. J.* 2003, 36, 810–830.

11. Machado R., Garcia L.D., da Silva Neto U.X., Cruz Filho A.M., Silva R.G., Vansan L.P.: Evaluation of 17% EDTA and 10% citric acid in smear layer removal and tubular dentin sealer penetration. *Microsc. Res. Tech.* 2018, 81, 275–282.
12. Gómez-Delgado M., Camps-Font O., Luz L., Sanz D., Mercade M.: Update on citric acid use in endodontic treatment: A systematic review. *Odontology* 2023, 111, 1–19.
13. Souza M., Cecchin D., Farina A.P., Leite C.E., Cruz F.F., Pereira C., Ferraz C.C., Figueiredo J.A.: Evaluation of Chlorhexidine Substantivity on Human Dentin: A Chemical Analysis. *J. Endod.* 2012, 38, 1249–1252.
14. Berutti E., Marini R., Angeretti A.: Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J. Endod.* 1997, 23, 725–727.
15. Basrani B.R., Manek S., Sodhi R.N., Fillery E., Manzur A.: Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J. Endod.* 2007, 8, 966–969.
16. Basrani B.R., Manek S., Mathers D., Fillery E., Sodhi R.N.: Determination of 4-chloroaniline and its derivatives formed in the interaction of sodium hypochlorite and chlorhexidine by using gas chromatography. *J. Endod.* 2010, 36, 312–314.
17. Thomas J., Sem D.: An in vitro spectroscopic analysis to determine whether para-chloroaniline is produced from mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J. Endod.* 2010, 36, 315–317.
18. Akisue E., Tomita V.S., Gavini G., de Figueiredo J.A.: Effect of the Combination of Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine on Dentinal Permeability and Scanning Electron Microscopy Precipitate Observation. *J. Endod.* 2010, 36, 847–850.
19. Souza M., Cecchin D., Barbizam J.V., Almeida J.F., Zaia A.A., Gomes B.P., Ferraz C.C.: Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by the interaction between 2% chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust. Endod. J.* 2013, 39, 107–111.
20. Roberts W.R., Addy M.: Comparison of the bisbiguanide antiseptics alexidine and chlorhexidine: I. Effect on plaque accumulation and salivary bacteria. *J. Clin. Periodontol.* 1981, 8, 213–219.

21. Kim H.S., Chang S.W., Baek S.H., Han S.H., Lee Y., Zhu Q., Kum K.Y.: Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *Int. J. Oral Sci.* 2013, 5, 26–31.
22. Barrios R., Ferrer-Luque C.M., Arias-Moliz M.T., Ruiz-Linares M., Bravo M., Baca P.: Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J. Endod.* 2013, 39, 1413–1415.
23. Kim H.-S., Zhu Q., Baek S.-H., Jung I.-Y., Son W.-J., Chang S.-W., Lee W., Gu Y., Lee Y., Hong S.T., Bae K.S., Kim J.W., Cho K., Kum K.Y.: Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J. Endod.* 2012, 38, 112–116.
24. Siqueira F.S., Jr., Rôças I.D.N., Marceliano-Alves M.F., Pérez A.R., Ricucci D.: Unprepared root canal surface areas: Causes, clinical implications, and therapeutic strategies. *Braz. Oral Res.* 2018, 32 (Suppl. 1), e65.
25. Natanasabapathy V., Durvasulu A., Krithikadatta J., Namasivayam A., Deivanayagam K., Manali S., Sureshbabu N.M.: Current Trends in the Use of Irrigant Activation Techniques Among Endodontists & Post-Graduate Dental Students in India—A Knowledge, Attitude and Practice Based Survey. *Eur. Endod. J.* 2020, 5, 73–80.
26. Adcock J.M., Sidow S.J., Looney S.W., Liu Y., McNally K., Lindsey K., Tay F.R.: Histologic Evaluation of Canal and Isthmus Debridement Efficacies of Two Different Irrigant Delivery Techniques in a Closed System. *J. Endod.* 2011, 37, 544–548.
27. Jiang L.-M., Verhaagen B., Versluis M., Langedijk J., Wesselink P., van der Sluis L.W.: The Influence of the Ultrasonic Intensity on the Cleaning Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation. *J. Endod.* 2011, 37, 688–692.
28. Jiang L.-M., Lak B., Eijssvogels L.M., Wesselink P., van der Sluis L.W.: Comparison of the Cleaning Efficacy of Different Final Irrigation Techniques. *J. Endod.* 2012, 38, 838–841.
29. Jain S., Patni P.M., Jain P., Raghuwanshi S., Pandey S.H., Tripathi S., Soni A.: Comparison of Dentinal Tubular Penetration of Intracanal Heated and Preheated Sodium Hypochlorite Through Different Agitation Techniques. *J. Endod.* 2023, 49, 686–691.

30. Rico-Romano C., Zubizarreta-Macho Á., Baquero-Artigao M.-R., Mena-Alvarez J.: An analysis in vivo of intracanal bacterial load before and after chemo-mechanical preparation: A comparative analysis of two irrigants and two activation techniques. *J. Clin. Exp. Dent.* 2016, 8, e9–e13.
31. Salas H., Castrejon A., Fuentes D., Luque A., Luque E.: Evaluation of the penetration of CHX 2% on dentinal tubules using Conventional Irrigation, Sonic Irrigation (EDDY) and Passive Ultrasonic Irrigation (PUI) techniques: An in vitro study. *J. Clin. Exp. Dent.* 2021, 13, e37–e42.
32. Machtou P.: Manual Dynamic Activation (MDA) Technique. In: *Endodontic Irrigation*. Basrani B.(ed.), Springer: Cham, Switzerland, 2015, Volume 1, pp. 149–155.
33. Gonzalez C., Forner L., Llena C., Lozano A.: Temperature changes in 2% chlorhexidine gluconate using two activation methods with different intensity levels. *J. Clin. Exp. Dent.* 2018, 10, e458–e461.
34. Zeltner M., Peters O.A., Paqué F.: Temperature Changes During Ultrasonic Irrigation with Different Inserts and Modes of Activation. *J. Endod.* 2009, 35, 573–577.
35. Basrani B.R., Manek S., Fillery E.: Using Diazotization to Characterize the Effect of Heat or Sodium Hypochlorite on 2.0% Chlorhexidine. *J. Endod.* 2009, 35, 1296–1299.
36. Jeong J.W., Sarmast N.D., Terlier T., van der Hoeven R., Holland J.N., Parikh N.: Assessment of the cytotoxic effects and chemical composition of the insoluble precipitate formed from sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *Int. Endod. J.* 2021, 54, 1892–1901.
37. Chhabra R., Huff J., Haseman J., Elwell M., Peters A.: Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem. Toxicol.* 1991, 29, 119–124.
38. Bui T.B., Baumgartner J.C., Mitchell J.C.: Evaluation of the Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate and its Effect on Root Dentin. *J. Endod.* 2008, 34, 181–185.
39. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; 2004-. PubChem Compound

- Summary for CID 7812, 4-Chloroaniline. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4-Chloroaniline>. Accessed Mar. 14, 2024.
40. PubChem [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 9552079, Chlorhexidine. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Chlorhexidine>. Accessed Mar. 14, 2024.
41. Lüttringhaus A., Jander J., Schneider R.: Cyclische Hydrazine aus α,ω -Diaminen. *Chem. Ber.* 1959, 92, 1756–1765.
42. Boehncke A. Kielhorn J. Konnecker G., Pohlenz-Michel C., Mangelsdorf I.: 4-Chloroaniline (CICADS 37, 2002). World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2003.
43. Jain K., Agarwal P., Jain S., Seal M., Adlakha T.: Alexidine versus chlorhexidine for endodontic irrigation with sodium hypochlorite. *Eur. J. Dent.* 2018, 12, 398–402.
44. Wright P.P., Kahler B., Walsh L. J.: Alkaline Sodium Hypochlorite Irrigant and Its Chemical Interactions. *Materials* 2017, 10, 1147.
45. Nowicki J.B., Sem D.S.: An in vivo spectroscopic analysis to determine the chemical composition of the precipitate formed by mixing sodium hypochlorite and chlorhexidine. *J. Endod.* 2011, 37, 983–988.
46. Dial L.D., Anestis D.K., Kennedy S.R., Rankin G.O.: Tissue distribution, subcellular localization and covalent binding of 2-chloroaniline and 4-chloroaniline in Fischer 344 rats. *Toxicology* 1998, 131, 109–119.
47. 2-Ethylhexylamine | C₈H₁₉N—PubChem (nih.gov). Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2-Ethylhexylamine>. Accessed on Jan.22, 2021.
48. Greim H., Bury D., Klimisch H.J., Oeben-Negele M., Ziegler-Skylakakis K.: Toxicity of aliphatic amines: Structure-activity relationship. *Chemosphere* 1998, 36, 271–295.
49. Hawkins C.L., Pattison D.I., Davies M.J.: Hypochlorite-induced oxidation of amino acids, peptides and proteins. *Amino Acids* 2003, 25, 259–274.
50. van der Vorst M.M.J., Tamminga P., et al. Severe methaemoglobinaemia due to para-chloraniline intoxication in premature neonates. *Eur J Pediatr* 1990, 1, 73.

51. Barbin L.E., Saquy P.C., et al. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. *J Endod* 2008, 34, 1508-14.
52. Macedo R.G., Verhaagen B., et al. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J* 2014, 47, 147-54.
53. Câmara De Bem, S.H., Estrela C., et al. Determination of chemical components derived from 2% chlorhexidine gel degradation using gas chromatography-mass spectrometry. *Acta Odontol Scand* 2014, 72, 630-8.

XII. Oświadczenia współautorów

Miejscowość, dnia 15.11.2023 r.

Prof. dr n. med. Joanna Zarzecka

UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI COCI FIZJOMIATR
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)
Katedra Stomatologii Zachowawczej
z Endodoncją
31-155 Kraków, ul. Montelupich 4
tel./fax 12 424-54-25

OŚWIADCZENIE

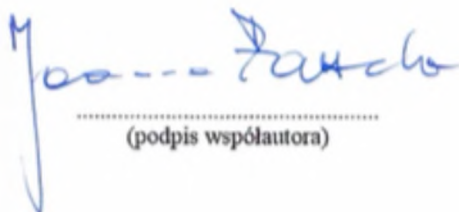
Jako współautor pracy: Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. Molecules, 2021; 26(6):1623 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- pozyskaniu finansowania
- poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- sprawowaniu nadzoru nad projektem

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań
- opracowaniu metodologii badań
- opracowaniu i interpretacji wyników
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu



.....
(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Miejscowość, dnia 15.11.2023 r.

Prof. dr n. med. Joanna Zarzecka

(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)
Katedra Stomatologii Zachowawczej
z Endodonta
31-155 Kraków, ul. Montelupich 4
tel./fax 12 424-54-25

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. Molecules, 2023; 28(16):6159 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na sprawowaniu nadzoru merytorycznego nad projektem.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań
- przeprowadzeniu eksperymentu
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu


.....
(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Oświadczenie

Jako współautor pracy pt. **Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. Molecules, 2021; 26(6):1623** oświadczam, iż mój wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji to: opracowanie metodologii badań, wykonanie części eksperymentalnej, zbieranie i analiza danych, przygotowanie roboczej wersji manuskryptu, przygotowanie i poprawę ostatecznej wersji manuskryptu.

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie w/w pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako części rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część w/w pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik w: opracowaniu koncepcji badania, opracowaniu metodologii badania, analizie i interpretacji wyników, przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu, przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu, pozyskaniu finansowania i administracji całości projektu.



.....
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. Molecules, 2023; 28(16):6159 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu koncepcji i metodologii badań
- opracowaniu i walidacji metody
- przeprowadzeniu eksperymentu
- zbieraniu i opracowaniu danych
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu
- sprawowaniu nadzoru merytorycznego nad projektem

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badań
- przeprowadzeniu eksperymentu
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu

.....

(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

.....
(stopień, tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. Molecules, 2021; 26(6):1623 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań
- wykonaniu części eksperymentalnej
- zbieraniu i analizie danych
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badania
- opracowaniu metodologii badania
- przygotowaniu i interpretacji wyników
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu

.....

(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

.....
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. Molecules, 2023; 28(16):6159 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań
- opracowaniu walidacji metody
- przeprowadzeniu eksperymentu
- zbieraniu i opracowaniu danych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowym.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badania
- przeprowadzeniu eksperymentu
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu

Aneta Woźniakiewicz

.....
(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

Dr Maciej Góra

Kraków, dn. 15.11.2023 r.

.....
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Insight into the Reaction of Alexidine with Sodium Hypochlorite: A Potential Error in Endodontic Treatment. Molecules, 2021; 26(6):1623 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań
- wykonaniu części eksperymentalnej
- zbieraniu i analizie danych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopismach naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badania
- opracowaniu metodologii badania
- przygotowaniu i interpretacji wyników
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu


.....
(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.

.....
(stopień/tytuł, imię i nazwisko, afiliacja)

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy: Quantitative Insight into PCA Formation following Different Chlorhexidine Activation Methods in Endodontic Treatment. Molecules, 2023; 28(16):6159 oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji polegał na:

- opracowaniu metodologii badań
- przeprowadzeniu eksperymentu
- zbieraniu i opracowaniu danych

Jednocześnie wyrażam zgodę na przedłożenie ww. pracy przez lek. dent. Barbarę Czopik jako część rozprawy doktorskiej w formie spójnego tematycznie zbioru artykułów opublikowanych w czasopiśmie naukowych.

Oświadczam, iż samodzielna i możliwa do wyodrębnienia część ww. pracy wykazuje indywidualny wkład lek. dent. Barbary Czopik polegający na:

- opracowaniu koncepcji badania
- przeprowadzeniu eksperymentu
- przygotowaniu roboczej wersji manuskryptu
- przygotowaniu i poprawie ostatecznej wersji manuskryptu
- pozyskaniu finansowania
- administracji całości projektu


(podpis współautora)

*należy podać tytuł, nazwę czasopisma, wolumen, rok, strony

**np. opracowywaniu pomysłu badań, stworzeniu hipotezy badawczej, opracowaniu koncepcji badań, wykonywaniu określonych eksperymentów i/lub pomiarów (najlepiej wskazać których), opracowaniu i interpretacji wyników tej pracy, przygotowaniu manuskryptu pracy.