

بررسی میزان تأثیر لایه اسمیر بر نفوذپذیری توبول‌های عاجی دندان انسان با روش نفوذ رنگ

دکتر مهدی تبریزی‌زاده*، دکتر سیدمحمد ابریشم**، دکتر مهدی دانشی***

چکیده

سابقه و هدف: اثر لایه اسمیر بر روی توبول‌های عاجی از مسائلی قابل توجه در درمان‌های اندودانتیک می‌باشد. هدف از این مطالعه اندازه‌گیری میزان نفوذ رنگ در توبول‌های عاجی در حضور لایه اسمیر و پس از حذف آن بود.

مواد و روشها: در این مطالعه تجربی از ۳۰ دندان سالم انسان استفاده گردید. ابتدا از ریشه هر یک از دندان‌ها، بلوکی به طول و قطر ۵ میلی‌متر تهیه شد. سپس، کانال آنها با فرزی به قطر ۱/۴ میلی‌متر گشاد گردید تا لایه اسمیر تشکیل شود. سطوح طرفی، فوقانی و تحتانی بلوک‌ها، به غیر از مدخل کانال‌ها، توسط لایه لاک ناخن پوشانده شدند. بلوک‌ها به ۲ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. نمونه‌های گروه اول برای ۲ دقیقه در ۱۷٪ EDTA و سپس برای ۲۰ دقیقه در هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵٪ قرار داده شدند تا لایه اسمیر حذف شود. در گروه دوم لایه اسمیر برداشته نشد. پس از آن، نمونه‌های هر دو گروه به مدت ۲۴ ساعت در رنگ فوشین بازی ۲٪ قرار داده شدند. پس از خروج از رنگ و شستشو زیر آب، کلیه نمونه‌ها توسط یک برش افقی به دو نیم تقسیم و از سطح فوقانی هر یک از نمونه‌ها عکس گرفته شد. پس از انتقال تصاویر به کامپیوتر با نرم‌افزار Photoshop، نفوذ رنگ در هر یک از نمونه‌ها محاسبه گردید. نتایج به دست آمده توسط آزمون آماری Mann-Whitney مورد تحلیل قرار گرفتند.

یافته‌ها: میزان نفوذ رنگ در توبول‌های عاجی دندان‌های دارای لایه اسمیر و بدون لایه اسمیر تفاوت معنی‌داری آماری نداشت ($P=0/120$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده از این مطالعه برداشتن لایه اسمیر تاثیری بر نفوذپذیری عاج نسبت به رنگ ندارد و اسکروز عاجی نقش مهمی در این مسئله ایفا می‌نماید. انجام مطالعاتی با روش‌های دیگر مانند نفوذ میکروبی بر روی دندان‌های با سن مشخص توصیه می‌شود.

کلید واژگان: لایه اسمیر، EDTA، نفوذ رنگ

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۸/۶/۳۱ تاریخ اصلاح نهایی: ۱۳۸۸/۹/۲۱ تاریخ تأیید مقاله: ۱۳۸۸/۱۰/۸

مجله دانشکده دندانپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، دوره ۲۸، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ۲۷-۲۲

مقدمه

کلسیم جهت پاک‌سازی شیمیایی مطرح می‌شود. عوامل متعددی از قبیل تعداد و قطر توبول‌های عاجی، وجود عاج اسکروتیک و همچنین لایه اسمیر می‌توانند بر نفوذپذیری عاج تأثیر گذاشته، مانع از نفوذ مناسب مواد ضد میکروبی داخل توبول‌های عاجی شوند (۱).

هنگام آماده سازی کانال با وسایل مکانیکی لایه‌ای آمورف، گرانولار و نامنظم شامل مواد معدنی عاج دندان و مواد آلی از قبیل بقایای پالپی، زوائد ادونتوبلاستیک، بزاق، سلول‌های

پاک‌سازی، مهمترین و اساسی‌ترین جزء درمان می‌باشد و هر گونه خطایی در انجام آن به شکست درمان منجر خواهد شد. پاک‌سازی به دو طریق شیمیایی و مکانیکی صورت می‌گیرد. پاک‌سازی مکانیکی با عمل filing انجام می‌گیرد. از آنجا که تمامی سطوح سیستم کانال ریشه، همچنین فضاهای داخل توبول‌های عاجی با فایل در تماس نیستند و با توجه به توانایی نفوذ میکروارگانیزم‌ها و مواد آلوده به داخل توبول‌های عاجی لزوم استفاده از مواردی مانند هیدروکسید

* نویسنده مسئول: دانشیار گروه اندودانتیکس، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد

e-mail: tabrizizadeh@ssu.ac.ir

** دستیار تخصصی گروه پروتزهای دندانی، دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

** دندانپزشک

زدوده شد، سپس ریشه دندان‌ها در ناحیه CEJ از تاج جدا شده، قسمت‌های کروالی و اپیکالی ریشه‌ها توسط دیسک الماسی (تیزکاوان، ایران) به نحوی قطع گردید که در نهایت سیلندری به طول ۵ میلی‌متر از قسمت میانی هر ریشه باقی بماند.

در مرحله بعد کانال ریشه‌ها توسط فرز الماسی استوانه‌ای مخروطی (تیزکاوان، ایران) به قطر ۱/۴ میلی‌متر گشاد شدند تا لایه اسمیر تشکیل شود. سطوح طرفی، فوقانی و تحتانی ریشه‌ها، به غیر از مدخل کانال‌ها، توسط دو لایه لاک ناخن پوشانده شد تا محلول رنگی مورد استفاده در مرحله بعد از این سطوح وارد توبول‌های عاجی نشود.

دندان‌های آماده شده به صورت تصادفی به ۲ گروه ۱۵ تایی تقسیم شدند. دندان‌های گروه اول به منظور حذف لایه اسمیر برای مدت ۲ دقیقه در EDTA ۱۷٪ و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه دیگر در NaOCl ۵/۲۵٪ گذارده شدند (۱۰). لایه اسمیر در گروه دوم دست نخورده باقی ماند. سپس کلیه نمونه‌ها توسط سرم فیزیولوژی شسته و به مدت ۲۴ ساعت در محلول رنگی فوشین بازی ۲٪ قرار داده شدند.

پس از اتمام زمان مورد نظر، دندان‌ها به مدت ۳۰ دقیقه زیر آب جاری شسته شده، کانال‌هایشان توسط پوآر هوا خشک گردید. در نهایت هر ریشه توسط دیسک الماسی (تیزکاوان، ایران) از وسط به صورت افقی دو نیم شد. از سطوح بریده شده توسط دوربین عکاسی دیجیتال (Olympus S550 ساخت کشور اندونزی) عکس‌برداری گردید (شکل ۱).



شکل ۱- عمق‌های مختلف نفوذ رنگ در توبول‌های عاجی

خونی و باکتری‌ها روی سطح عاج کانال را می‌پوشانند که تحت عنوان لایه اسمیر شناخته می‌شوند (۲).

اهمیت وجود لایه اسمیر در معالجات ریشه دندان به علت تأثیر آن روی نفوذ سیلرها و مواد پرکننده کانال، همچنین نفوذ مواد شستشو دهنده و ضدعفونی کننده به داخل توبول‌های عاجی می‌باشد. علاوه بر این میکروب‌های موجود در خود لایه اسمیر نیز می‌توانند عاملی برای شروع عفونت باشند. طی سالیان گذشته این مسئله مورد توجه محققین بوده، مطالعات متعددی در مورد لزوم برداشتن لایه اسمیر و نقش آن در موفقیت معالجه ریشه انجام شده است. متآنالیز انجام شده توسط Shahravan و همکاران (۲۰۰۷) نشان داد که برداشتن لایه اسمیر باعث بهبود سیل پرکردگی کانال می‌شود (۳). مطالعات آزمایشگاهی انجام شده توسط Foster (۱۹۹۳)، Guignes (۱۹۹۶)، Berutti (۱۹۹۷)، Calt و Kokkas (۱۹۹۹) و Yildirim (۲۰۰۸) افزایش نفوذپذیری عاج و نفوذ بیشتر مواد شستشو دهنده، سیلرها و هیدروکسید کلسیم درون توبول‌های عاجی متعاقب حذف لایه اسمیر را نشان می‌دهند (۹-۴). از طرف دیگر برخی محققین از جمله Paque (۲۰۰۶) و Engle (۲۰۰۵) این مسئله را تایید نمی‌کنند (۱۱، ۱۰).

جهت حذف لایه اسمیر روش‌های مختلفی به صورت شیمیایی، مکانیکی، لیزر و کمک گرفتن از دستگاه اولتراسونیک معرفی شده است (۱۴-۱۲). مطالعات Baumgartner (۱۹۸۷)، Yamada (۱۹۸۳)، Satio (۲۰۰۸) و Xie (۲۰۰۸) نشان دادند که کاربرد متوالی EDTA، NaOCl، روش موثری در حذف لایه مذکور است (۱۸-۱۵). استفاده از مواد دیگری مانند MTAD و اسید مالئیک نیز در مطالعات اخیر مطرح شده است (۲۰-۱۹).

با توجه به وجود اختلاف نظر در مورد نقش لایه اسمیر در نفوذپذیری عاج و ضرورت حذف آن، این مطالعه با هدف تعیین اثر برداشتن لایه اسمیر بر نفوذپذیری توبول‌های عاجی با روش نفوذ رنگ صورت پذیرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه تجربی ۳۰ دندان تک ریشه و تک کانال سالم و بدون شکستگی انسان انتخاب گردید. هیچ اطلاعاتی اعم از سن، جنس و علت کشیدن ثبت نشد. همه دندان‌ها تا شروع مطالعه در محلول اتیل الکل ۱۰٪ نگهداری شدند (۸). سطوح خارجی ریشه دندان‌ها توسط Scaler از الیاف پریودنتال

مطالعه حاضر هماهنگی دارد. تفاوت در نتایج بدست آمده از مطالعات انجام شده در مورد تاثیر وجود لایه اسمیر بر نفوذپذیری عاج، از تفاوت روش انجام مطالعات در مورد نوع ماده مورد بررسی و روش اندازه‌گیری نفوذپذیری ناشی می‌باشد.

در این‌گونه مطالعات غالباً نفوذ سیلر (۸،۱۱،۲۱) یا مواد ضدعفونی کننده (۱۰،۱۳،۱۴) به داخل توبول‌های عاجی سنجیده می‌شوند. همانطور که مشخص است تفاوت در اندازه مولکولی این مواد، خواص فیزیکی و شیمیایی آنها، نحوه و مدت زمان قرار گرفتن در کانال، نیروهای هیدرولیک ایجاد شده در حین پرکردن کانال و فعالیت کاپیلاری از عواملی هستند که در نتایج مطالعات تأثیرگذار خواهند بود. با توجه به اهمیت یکسان‌سازی متغیرها و همچنین به منظور اطمینان یافتن از نفوذ کافی EDTA و NAOCL به داخل کانال‌ها، فضای کانال با فرز گشاد شد که حالتی شبیه استفاده از گیتس گلیدن‌های درشت در کانال است.

از لحاظ روش اندازه‌گیری نفوذپذیری نیز روش‌های مختلفی مانند تزریق مواد رادیواکتیو، انتقال هیدرولیک و میکروسکوپ الکترونی وجود دارند، ولی نفوذ رنگ همچنان به عنوان یک روش ساده و قابل اطمینان برای بررسی چگونگی انتشار مولکول‌ها به داخل عاج مطرح می‌باشد. هرچند که باید توجه داشت که با این روش نمی‌توان نفوذ رنگ به داخل یک توبول عاجی خاص را دنبال کرد و نتیجه به دست آمده نشان دهنده نفوذپذیری کل عاج است نه یک توبول عاجی خاص. در صورت نیاز به بررسی دقیق‌تر و مشاهده جزئیات می‌توان از میکروسکوپ الکترونی استفاده نمود که علاوه بر نشان دادن جزئیات توبول‌های عاجی می‌تواند خصوصیات سطح مواد را نیز مشخص سازد. از معایب میکروسکوپ الکترونی این است که بر خلاف روش نفوذ رنگ، محقق را از داشتن یک نمای کلی با بزرگنمایی کم از سطح مورد بررسی محروم می‌کند. علاوه بر این در حین مراحل آماده‌سازی کار برای SEM احتمال ایجاد Artifact نیز وجود دارد.

در مورد روش نفوذ رنگ هر چند که از لحاظ تئوری به نظر می‌رسد که نفوذ رنگ مشاهده شده، به مسیر و زاویه توبول‌های عاجی در مقطع مورد بررسی بستگی دارد اما چون عاج تا حدودی ترانسپرنسنت است رنگ مشاهده شده لایه‌های عمقی‌تر را نیز شامل می‌شود بنابراین مسیر توبول‌های عاجی در مقطع، تأثیری در اندازه‌گیری‌ها نخواهد

تصویر هر دندان پس از انتقال به کامپیوتر توسط نرم‌افزار فتوشاپ به میزان ۱۸ برابر بزرگنمایی و در صفحه‌ای شطرنجی قرار داده شد. سپس نسبت نفوذ رنگ به کل سطح مقطع دندان‌ها اندازه‌گیری گردید. برای انجام این کار تعداد خانه‌های رنگ گرفته بر کل خانه‌های رنگ شده و نشده تقسیم گردید و نتایج به صورت درصد بیان گردید. در نهایت نتایج به دست آمده توسط نرم‌افزار SPSS و آزمون آماری Mann-Whitney مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. خطای نوع اول در حد $0/05 <$ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

طبق نتایج بدست آمده میانگین درصد سطح رنگ شده به رنگ نشده در گروه‌های ۱ (همراه با لایه اسمیر) و ۲ (عدم وجود لایه اسمیر) به ترتیب $28/30\%$ و $24/39\%$ (انحراف معیار به ترتیب $29/33$ و $26/89$) بود. کمترین میزان نفوذ رنگ در گروه ۱، $2/96\%$ و بیشترین آن $73/14\%$ و در گروه ۲ به ترتیب $5/62\%$ و $80/91\%$ بود.

تجزیه و تحلیل نتایج توسط آزمون Mann-Whitney نشان داد که تفاوت میزان نفوذ رنگ در دو گروه معنی‌دار نمی‌باشد ($P\text{-value}=0/120$).

بحث

لایه اسمیر ترکیبی از مواد آلی و معدنی است که هنگام آماده‌سازی کانال با وسایل مکانیکی ایجاد شده، روی سطح عاج را می‌پوشاند. مطالعات متعدد وجود باکتری‌ها در توبول‌های عاجی را نشان داده‌اند (۲۰-۱۹). میزان نفوذ باکتری‌ها به داخل توبول‌های عاجی به عواملی از قبیل تعداد و نوع باکتری‌ها، مدت زمان در معرض بودن، تراکم و قطر توبول‌های عاجی بستگی دارد. در این میان نقش لایه اسمیر در نفوذپذیری توبول‌های عاجی و در نتیجه ورود میکروب‌ها و مواد ضدعفونی کننده به داخل توبول‌های عاجی طی سالیان گذشته مورد بحث بوده است.

بیشتر تحقیقات انجام شده از جمله Kokkas (۲۰۰۴)، Guignes (۱۹۹۶)، Calt (۱۹۹۹) و Berutti (۱۹۹۷) کاهش نفوذپذیری عاج را در صورت وجود لایه اسمیر گزارش نموده‌اند (۵-۸). از طرف دیگر برخی مطالعات مانند مطالعات Paque (۲۰۰۶) و Engel (۲۰۰۵) (۱۱، ۱۰) نشان دادند که حذف لایه اسمیر تأثیر کمی بر نفوذ یونها پس از پر کردن کانال با هیدروکسید کلسیم دارد که این یافته با نتایج با

شده است. Weis (۲۰۰۴) (۲۲) و Mamootil (۲۰۰۷) (۲۵) نیز نفوذ بهتر سیلر در سطوح باکال و لینگوال ریشه را گزارش کردند.

با توجه به اینکه عاج اسکروتیک، انباشته شدن فیزیولوژیک مقادیر بیش از حد عاج دور توبولی است که از دهه سوم زندگی از نواحی اپیکالی ریشه شروع می‌شود و با افزایش سن به سمت کروئال گسترش می‌یابد، باید در مطالعاتی که بر روی نفوذپذیری عاج انجام می‌شود مسئله سن بیماران را مد نظر قرار داد. اهمیت کلینیکی مسئله از این لحاظ است که چون دندان‌های مورد استفاده در مطالعات، اغلب از بیماران با مشکلات پرپودنتال پیشرفته یا دندان‌های معالجه ریشه شده ناموفق تامین می‌شوند، طبیعتاً بیماران در محدوده سنی بالای ۳۰ سال قرار دارند که احتمال وجود عاج اسکروزه و گسترش آن در دندان‌هایشان زیاد است. Major (۲۰۰۱) (۲۱) نشان داد که عاج یک سوم اپیکالی اغلب دندان‌های مورد معالجه قرار گرفته، نسبت به مواد ضدعفونی کننده و باکتری‌ها نفوذناپذیر می‌باشد. Nair (۲۰۰۵) (۲۶) نیز نشان داد که در دندان‌های دارای پرپودنتیت حاد، بیشتر باکتری‌ها در محل سوراخ اپیکالی ریشه، جایی که به مایعات بافتی دسترسی وجود دارد، دیده می‌شوند. بنابراین کاهش احتمال نفوذ میکروب به درون توبول‌های عاجی با افزایش سن و همچنین محبوس شدن آنها توسط لایه اسمیر در توبول‌های عاجی نتایج انجام مطالعات با توبول‌های عاجی آلوده در لابراتوار را زیر سوال می‌برد، هرچند که از این مسئله نمی‌توان قطعاً چنین استنتاج کرد که لایه اسمیر نباید برداشته شود.

نتیجه‌گیری

هرچند که نتایج بدست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که برداشتن لایه اسمیر تاثیری روی نفوذپذیری عاج نسبت به رنگ ندارد و اسکروز عاجی نقش مهمی را در این مسئله ایفا می‌کند ولی به علت اینکه روش‌های مختلف انجام اینگونه مطالعات می‌تواند نتایج متفاوتی ایجاد کند، پیشنهاد می‌شود تحقیقات دیگری بر روی دندان‌های با سن مشخص و با روش‌های دیگر مثل بررسی نفوذ میکروبی انجام پذیرد.

داشت. یکی از مشکلات استفاده از روش نفوذ رنگ، کاهش شدت رنگ در مناطق دورتر عاج (به سمت سمینتوم) است که ناشی از کاهش قطر و تراکم توبول‌های عاجی در این نواحی می‌باشد. استفاده از بزرگنمایی می‌تواند تا حدودی این مشکل را حل نماید.

برای دیدن و اندازه‌گیری میزان نفوذ رنگ معمولاً از استرئومیکروسکوپ استفاده می‌شود ولی در تحقیق حاضر پس از تهیه تصویر دیجیتالی از سطح نمونه‌ها و انتقال آن به کامپیوتر، توسط نرم‌افزار فتو شاپ درصد سطح رنگی شده اندازه‌گیری گردید. بزرگنمایی تصویر در این حالت می‌تواند در اعداد بدست آمده در مطالعات مربوط به اندازه‌گیری نفوذ خطی رنگ ایجاد اشکال نماید ولی در این مطالعه چون هدف اندازه‌گیری درصد سطح رنگ گرفته ریشه نسبت به کل سطح آن بوده، بزرگنمایی مشکلی ایجاد نکرد.

جهت برداشتن لایه اسمیر در مطالعه حاضر همانند بسیاری از مطالعات قبلی از EDTA و NaOCl استفاده شد (۲۲، ۲۳). در مورد تاثیر زمان کاربرد EDTA و اثر آن بر نفوذپذیری عاج اطلاعات زیادی در دست نیست ولی معمولاً در مطالعات مشابه همانند تحقیق موجود نمونه‌ها به مدت چند دقیقه در EDTA قرار می‌گرفتند. استفاده از EDTA به مدت بیش از ۲۰ دقیقه می‌تواند به دمیترالیزه شدن بیش از حد و انقطاع توبول‌های عاجی منجر شود (۱۰).

مدت زمان قرار گرفتن در رنگ نیز در مطالعات قبلی متفاوت می‌باشد. در مطالعه حاضر زمان ۲۴ ساعت انتخاب شد تا رنگ فرصت کافی برای نفوذ به توبول‌های عاجی و رسیدن به حداکثر امکان گسترش خود را داشته باشد. نکته قابل توجه در این مطالعه گسترش کمتر رنگ در سطوح مزیال و دیستال دندان نسبت به سمت باکال و لینگوال بود که با نتایج مطالعه Paque (۲۰۰۶) سازگاری دارد (۱۰). علت این مسئله اسکروتیک بودن عاج در این نواحی می‌باشد. تأثیر این پدیده بر نفوذپذیری عاج از قدیم شناخته شده بود ولی اهمیت آن در اندودانتیک اولین بار توسط Weis (۲۰۰۴) مطرح شد (۲۲). نمای پروانه‌ای شکل نفوذ رنگ ناشی از مناطق عاج اسکروزه و رنگ نگرفته می‌باشد که نمای تیپیک اسکروز عاجی است. این مسئله در مطالعاتی مانند مطالعات Peters (۲۰۰۱) (۲۳) و Shovelton (۱۹۶۴) (۲۴) نشان داده

References

1. Walton RE, Torabinejad M: Principles and practice of endodontics.3rd Ed. Philadelphia: WB. Saunders Co. 2002;Chap1:4-8.
2. Cohn S, Hargreaves KM: Pathways of the pulp. 9th Ed. St Louis: The C.V. Mosby Co. 2006;Chap9:318- 323.
3. Shahravan A, Haghdoost AA, Adl A, Rahime H, Shadifar F: Effect of smear layer on sealing ability of canal obturation: a systematic review and meta-analysis. J Endod 2007;33:96-105.
4. Foster KH, Kulild JC, Weller RN: Effect of smear layer removal on the diffusion of calcium hydroxide through radicular dentin. J Endod 1993;19:136-140.
5. Guignes P, Faure J, Mauretti A: Relationship between endodontic preparation and human dentin permeability measured insitu. J Endod 1996;11:177-181.
6. Berutti E, Marini R, Angeretti A: Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. J Endod 1997;23: 725-727.
7. Calt S, Serper A: Dentinal tubule penetration of root canal sealers after root canal dressing with calcium hydroxide. J Endod 1999;25:431-433.
8. Kokkas AB, Boutsoukis ACh, Vassiliadis LP, Stavrianos CK: The influence of the smear layer on dentinal tubule penetration depth by three different root canal sealers: an in vitro study. J Endod 2004;30:100-102.
9. Yildirim T, Oruçoğlu H, Cobankara FK: Long-term evaluation of the influence of smear layer on the apical sealing ability of MTA. J Endod 2008 ;34:1537-1540.
10. Paqué F, Luder HU, Sener B, Zehnder M: Tubular sclerosis rather than the smear layer impedes dye penetration into the dentine of endodontically instrumented root canals. Int Endod J 2006;39:18-25.
11. Engel GT, Goodell GG, McClanahan SB: Sealer penetration and apical microleakage in smear-free dentin after a final rinse with either 70% isopropyl alcohol or Peridex. J Endod 2005;31:620-623.
12. Kuah HG, Lui JN: The effect of EDTA with and without ultrasonics on removal of smear layer.JOE 2008;35:393- 396.
13. Da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA: Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. J Endod 2008;34:1541-1545.
14. Tinaz AC, Karadag LS, Alaçam T, Mihçioğlu T: Evaluation of the smear layer removal effectiveness of EDTA using two techniques: an SEM study.J Contemp Dent Pract 2006;15:9-16.
15. Baumgartner JC, Mader CL: A scanning electron microscopic evaluation four root canal irrigation regimens. J Endod 1987;13:147-157.
16. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Peck S-L: A scanning electron microscopic of a high volume final flush with several irrigating solutions: part 3. J Endod 1983;9:137-142.
17. Satio K, Webb T, Imamura G: Effect of shortened irrigation times with 17% EDTA on smear layer removal after rotary canal instrumentation. J Endod 2008;34:1011-1014.
18. Xie XL, Chen MM, Liu LH, Yin LY, Jiang Y: The effect of smear layer on apical microleakage. Shanghai Kou Qiang Yi Xue 2008;17:616-620.
19. Ballal N, Kandian S, Mala K, Bhat K: Comparison of the efficacy of Malaic Acid and EDTA in smear layer removal from instrumented human root canal. J Endod 2009;35:1573-1576.

20. Mancini M, Armellin E, Casaglia A, Cerroni L: A comparative study of smear layer removal and erosion in apical intraradicular dentin with three irrigation solutions. *J Endod* 2009;35:900-903.
21. Mjor IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F: The structure of dentin in the apical region of human teeth. *Int Endod J* 2001;34:346-353.
22. Weis MW, Parashos P, Messer HH: Effect of obturation technique on sealer cement thickness and dental tubule penetration. *Int Endod J* 2004;37:653-663.
23. Peters LB, Wesselink PR, Bujis JF, van Winkelhoff AJ: Viable bacteria in root dentinal tubules of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2001;27:76-81.
24. Shovelton DS: The presence and distribution of micro organisms within non-vital teeth. *British Dent J* 1964; 117: 101-107.
25. Mamootil K, Messer HH: Penetration of dentinal tubules by endodontic sealer cements in extracted teeth and in vivo. *Int Endod J* 2007;40:873-881.
26. Nair PNJ, Henry S, Cano V, Vera J: Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after one visit endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 2005;99: 231.