

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Petra BARANAŠIČ

**PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA LASERJA,  
KLOORHEKSIDINA IN KALCIJEVEGA HIDROKSIDA NA  
BAKTERIJO *Enterococcus faecalis* IN GLIVO *Candida albicans***

DIPLOMSKO DELO  
Univerzitetni študij

**COMPARISON OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF LASER,  
CHLORHEXIDINE AND CALCIUM HYDROXIDE AGAINST  
BACTERIA *Enterococcus faecalis* AND YEAST *Candida albicans***

GRADUATION THESIS  
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek dodiplomskega univerzitetnega študija mikrobiologije. Opravljeno je bilo v Laboratoriju za bakteriološko diagnostiko respiratornih okužb Inštituta za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorico diplomskega dela imenovala prof. dr. Katjo Seme, dr. med. in za recenzentko doc. dr. Evo Ružič-Sabljić, dr. med.

Mentorica: prof. dr. Katja Seme, dr. med.

Recenzentka: doc. dr. Eva Ružič-Sabljić, dr. med.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednica: prof. dr. Darja ŽGUR BERTOK, univ. dipl. biol.

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za biologijo

Članica: prof. dr. Katja SEME, dr. med.

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Članica: doc. dr. Eva RUŽIĆ-SABLJIĆ, dr. med

Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Podpisana se strinjam z objavo svoje naloge v polnem tekstu na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je naloga, ki sem jo oddala v elektronski obliki, identična tiskani verziji.

Petra Baranašič

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 611.314:616-002:579.61:615.31:615.831(043)=863
- KG koreninski kanali zoba/protimikrobni učinek/klorheksidin/kalcijev hidroksid/fotodinamsko zdravljenje/*Enterococcus faecalis*/*Candida albicans*
- AV BARANAŠIČ, Petra
- SA SEME, Katja (mentorica)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (recenzentka)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA LASERJA, KLOORHEKSIDINA IN KALCIJEVEGA HIDROKSIDA NA BAKTERIJO *Enterococcus faecalis* IN GLIVO *Candida albicans*
- TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
- OP XI, 64 str., 6 pregl., 10 sl., 56 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Endodontske okužbe povzročajo obvezno in fakultativno anaerobni mikroorganizmi, ki so del normalne mikrobne flore ustne votline. Cilj zdravljenja tovrstnih okužb je odstranitev bakterij in njihovih produktov iz koreninskega sistema zoba. Zdravljenje temelji predvsem na mehanskem odstranjevanju nekrotičnega tkiva in bakterij pritrjenih na steno koreninskega kanala. Za učinkovito sterilizacijo kanala se uporabljajo še endodontski iriganti. Kalcijev hidroksid velja za skoraj idealni endodontski irigant, njegova pomanjkljivost je le spremenljiv pH. Iriganta izbora sta tudi natrijev hipoklorid in klorheksidin. Ugotovili so, da sta za neuspešno endodontsko zdravljenje največkrat odgovorna *Enterococcus faecalis* in *Candida albicans*, ki sta zaradi tolerance za bazičen pH najodpornější mikrobní vrsti v ustni votlini. Z razvojem t. i. fotodinamskega zdravljenja želijo skrajšati čas, potreben za sterilizacijo koreninskega kanala in s tem pospešiti zdravljenje. Tovrstno zdravljenje temelji na obsevanju z laserjem ob dodatku fotosenzoričnega barvila (toluidinsko modrilo). V diplomski nalogi smo primerjali protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata, paste kalcijevega hidroksida ter t. i. fotodinamskega zdravljenja, obsevanja z diodnim laserjem HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) ob dodatku toluidinskega modrila HELBO® Blue Photosensitizer. Najboljši protimikrobni učinek smo *in vitro* dosegli z uporabo 0,5 % klorheksidin diglukonata. Popolno zmanjšanje rasti *E. faecalis* (6,2 log) in *C. albicans* (7,2 log) smo zaznali že po 1 minuti delovanja, pri povišani koncentraciji *E. faecalis*, 10<sup>9</sup> CFU/ml, pa po 1 uri (8,9 log). Protimikrobni učinek laserja v kombinaciji s HELBO® Blue Photosensitizer proti *E. faecalis* je bil primerljiv z učinkom 0,5 % klorheksidin diglukonata. Popolno zmanjšanje mikrobne rasti (6,6 log) smo dosegli po 2 minutnem obsevanju ne glede na mikrobno koncentracijo. Protimikrobni učinek laserja na *C. albicans* (1,4 log) pa je bil značilno slabši v primerjavi z kalcijevim hidroksidom in klorheksidin diglukonom. Najpočasnejši protimikrobni učinek smo dosegli z uporabo kalcijevega hidroksida, saj smo popolno inhibicijo rasti *E. faecalis* (6,4 log) in *C. albicans* (5,1 log) zaznali 1 uro po nanosu.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
- DC UDC 611.314:616-002:579.61:615.31:615.831(043)=863
- CX tooth root canals/antimicrobial efficacy/chlorhexidine/calcium hydroxide/photodynamic therapy/*Enterococcus faecalis*/*Candida albicans*
- AU BARANAŠIČ, Petra
- AA SEME, Katja (supervisor)/RUŽIČ-SABLJIČ, Eva (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI COMPARISON OF ANTIMICROBIAL EFFICACY OF LASER, CHLORHEXIDINE AND CALCIUM HYDROXIDE AGAINST BACTERIA *Enterococcus faecalis* AND YEAST *Candida albicans*
- DT Graduation Thesis (University studies)
- NO XI, 64 p., 6 tab., 10 fig., 56 ref.
- LA sl
- AL sl/en
- AB Endodontic infections are caused by strict and facultative anaerobic microorganisms, the part of normal microflora in oral cavity. Treatment is based on mechanical removal of necrotic tissue and bacteria left in root canal system. For chemical disinfection, endodontic irrigants as calcium hydroxide, sodium hypochlorite and chlorhexidine are used. The main cause of endodontic treatment failure are bacteria *Enterococcus faecalis* and yeast *Candida albicans*, because of its tolerance for high pH. Development of photodynamic therapy (PDT) as an adjunctive procedure to eliminate residual bacteria in root canals, can save time and accelerate treatment process. PDT is based on irradiation with low-power laser and use of photosensitizing agent. In present study the *in vitro* antimicrobial efficacy of diode laser HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) with HELBO® Blue Photosensitizer, 0.5 % chlorhexidine digluconate and calcium hydroxide paste was investigated and compared. The best *in vitro* antimicrobial efficacy was achieved by 0.5 % chlorhexidine digluconate. A complete reduction of *E. faecalis* (6.2 logs) and *C. albicans* (7.2 logs) growth was achieved in 1 minute. Higher concentration of *E. faecalis* (10<sup>9</sup> CFU/ml) required 1 hour to be inactivated (8.9 logs). *In vitro* antimicrobial efficacy of HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) and HELBO® Blue Photosensitizer against *E. faecalis* was comparable to that of 0.5% chlorhexidine digluconate. A complete reduction (6.6 logs) of *E. faecalis* growth was achieved after 2 minutes lasing. In contrast, *in vitro* antimicrobial efficacy of HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) and HELBO® Blue Photosensitizer against *C. albicans* was significantly lower (1.4 logs) in comparison with chlorhexidine digluconate and calcium hydroxide. The slowest antimicrobial efficacy was achieved by calcium hydroxide. A complete reduction of *E. faecalis* (6.4 logs) and *C. albicans* (5.1 logs) was detected 1 hour after application of paste.

## KAZALO VSEBINE

	str.
<b>KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA</b>	III
<b>KEY WORDS DOCUMENTATION</b>	IV
<b>KAZALO VSEBINE</b>	V
<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	VIII
<b>KAZALO SLIK</b>	IX
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b>	XI
<b>1 UVOD</b>	1
1.1 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA	1
<b>2 PREGLED OBJAV</b>	2
2.1 NORMALNA MIKROBNA FLORA V USTIH	2
2.2 ZOBNA GNILOBA	3
2.3 ZGRADBA IN VLOGA ZOBNE PULPE	5
2.4 OKUŽBE ZOBNE PULPE IN PERIAPIKALNEGA TKIVA	7
2.5 ENDODONTIJA	10
<b>2.5.1 Prva seja endodontskega zdravljenja</b>	10
<b>2.5.2 Druga seja endodontskega zdravljenja</b>	12
<b>2.5.3 Tretja seja endodontskega zdravljenja</b>	13
2.6 ENDODONTSKI INTRAKANALNI IRIGANTI	13
<b>2.6.1 Kalcijev hidroksid</b>	14
<b>2.6.2 Klorheksidin</b>	17
<b>2.6.3 Protimikrobni učinek hkratne uporabe kalcijevega hidroksida in klorheksidina</b>	20
<b>2.6.4 <i>In vitro</i> testiranje protimikrobnega spektra delovanja endodontskih irigantov</b>	21
2.7 VZROKI ZA NEUSPEŠNO ENDODONTSKO ZDRAVLJENJE	22
<b>2.7.1 Vzroki za neuspešne koreninske polnitve</b>	23
<b>2.7.2 Odpornost mikroorganizmov proti endodontskim irigantom</b>	24
2.8 UPORABA LASERJA V ZOBOZDRAVSTVU	27

<b>2.8.1</b>	<b>Fotodinamsko zdravljenje v endodontiji</b>	28
<b>3</b>	<b>MATERIAL IN METODE</b>	31
3.1	MATERIAL	31
3.2	METODE	31
<b>3.2.1</b>	<b>Določanje koncentracije mikrobne suspenzije</b>	31
<b>3.2.2</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser)</b>	32
<b>3.2.3</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata</b>	33
<b>3.2.4</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida</b>	34
<b>4</b>	<b>REZULTATI</b>	36
4.1	PROTIMIKROBNI UČINEK LASERJA	36
<b>4.1.1</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na <i>E. faecalis</i></b>	36
<b>4.1.2</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na <i>C. albicans</i></b>	36
4.2	PROTIMIKROBNI UČINEK KLOORHEKSIDINA	40
<b>4.2.1</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata na <i>E. faecalis</i></b>	40
<b>4.2.2</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata na <i>C. albicans</i></b>	41
4.3	PROTIMIKROBNI UČINEK KALCIJEVEGA HIDROKSIDA	44
<b>4.3.1</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida na <i>E. faecalis</i></b>	44
<b>4.3.2</b>	<b><i>In vitro</i> protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida na <i>C. albicans</i></b>	45
4.4	KONTROLA USTREZNOSTI NEVTRALIZACIJSKIH MEDIJEV ZA KLOORHEKSIDIN IN KALCIJEV HIDROKSID	48
4.5	PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA LASERJA, KLOORHEKSIDINA IN KALCIJEVEGA HIDROKSIDA	48
<b>5</b>	<b>RAZPRAVA IN SKLEPI</b>	52
5.1	RAZPRAVA	52
5.2	SKLEPI	56

<b>6</b>	<b>POVZETEK</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>VIRI</b>	<b>58</b>
	<b>ZAHVALA</b>	

## KAZALO PREGLEDNIC

<b>Preglednica 1:</b> Protimikrobni učinek laserja HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) na <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	38
<b>Preglednica 2:</b> Protimikrobni učinek laserja HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) na <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	39
<b>Preglednica 3:</b> Protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata (CHX) na <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	42
<b>Preglednica 4:</b> Protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata (CHX) na <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	43
<b>Preglednica 5:</b> Protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida [Ca(OH) <sub>2</sub> ] na <i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	46
<b>Preglednica 6:</b> Protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida [Ca(OH) <sub>2</sub> ] na <i>Candida albicans</i> ATCC 90028	47



## KAZALO SLIK

<b>Slika 1:</b> Obsevanje 10 µl kapljic mikrobnih suspenzij z laserjem HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) ob dodatku HELBO <sup>®</sup> Blue Photosensitizer	33
<b>Slika 2:</b> Primeri popolnega zmanjšanja rasti <i>E. faecalis</i> po 2 minutnem obsevanju z laserjem HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) ob dodatku HELBO <sup>®</sup> Blue Photosensitizer	37
<b>Slika 3:</b> Primeri popolnega zmanjšanja rasti <i>C. albicans</i> po 2 minutnem obsevanju z laserjem HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) ob dodatku HELBO <sup>®</sup> Blue Photosensitizer	40
<b>Slika 4:</b> Primer popolnega zmanjšanja rasti <i>E. faecalis</i> po 1 minuti delovanja 0,5 % klorheksidin diglukonata	41
<b>Slika 5:</b> Primer popolnega zmanjšanja rasti <i>C. albicans</i> po 1 minuti delovanja 0,5 % klorheksidin diglukonata	44
<b>Slika 6:</b> Primer popolnega zmanjšanja rasti <i>E. faecalis</i> po 1 uri delovanja kalcijevega hidroksida	45
<b>Slika 7:</b> Primer popolnega zmanjšanja rasti <i>C. albicans</i> po 1 uri delovanja kalcijevega hidroksida	48
<b>Slika 8:</b> Povprečno zmanjšanje mikrobnega bremena ob uporabi laserja HELBO <sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO <sup>®</sup> TheraLite Laser) in HELBO <sup>®</sup> Blue Photosensitizer v odvisnosti od gostote mikrobne suspenzije	49

- Slika 9:** Povprečno zmanjšanje mikrobne bremena ob uporabi 0,5 % klorheksidin diglukonata v odvisnosti od časa delovanja 50
- Slika 10:** Povprečno zmanjšanje mikrobne bremena ob uporabi kalcijevega hidroksida v odvisnosti od časa delovanja 51

## SEZNAM OKRAJŠAV

ADT	metoda difuzije v agarju (angl. agar diffusion test)
ATCC	angl. American Type Culture Collection
ATP	adenozin trifosfat
BHI	angl. brain heart infusion
CFU	angl. colony forming units
CHX	klorheksidin (angl. chlorhexidine)
CMCP	kamforirani monoklorofenol (angl. camphorated monochlorophenol)
DET	metoda neposredne izpostavitve (angl. direct exposure test)
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DOR	test razvoja odpornosti (angl. development of resistance)
FDA	angl. Food and Drug Administration
FS	fotosenzorično sredstvo
FTF	fruktozil-transferaza
GTF	glukožil-transferaza
KA	krvni agar
KAP	kronični apikalni parodontitis
LPS	lipopolisaharid
McF	McFarland
MHB	Mueller-Hinton bujon
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija (angl. minimum inhibitory concentration)
MM	metilensko modrilo
PDT	fotodinamsko zdravljenje (angl. photodynamic therapy)
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
TK	test časovne mikrobne inhibicije (angl. time kill test)
TM	toluidinsko modrilo
YAG	itrij aluminijev kristal ( $Y_3Al_5O_{12}$ ) (angl. Yttrium Aluminium Garnet)

## 1 UVOD

Endodontske okužbe povzročajo obvezno in fakultativno anaerobni mikroorganizmi, ki so del normalne mikrobne flore ustne votline. Cilj zdravljenja tovrstnih okužb je odstranitev bakterij in njihovih produktov iz koreninskega sistema zoba. Zdravljenje temelji predvsem na mehanskem odstranjevanju nekrotičnega tkiva in bakterij pritrjenih na steno koreninskega kanala. Za učinkovito sterilizacijo kanala se uporabljajo še endodontski iriganti. Več kot 80 let je v uporabi kalcijev hidroksid  $[Ca(OH)_2]$ , ki deluje protimikrobno ter kot fizična prepreka preprečuje dostop hranil in ponovno okužbo koreninskega kanala (Vianna in sod., 2005).  $Ca(OH)_2$  velja za skoraj idealni endodontski irigant, njegova pomanjkljivost je le spremenljiv pH. Odpornejše bakterijske vrste, kot *Enterococcus faecalis*, lahko ob znižanju pH preživijo (Podbielski in sod., 2000). Uporabljajo se tudi alternativni endodontski iriganti, kot so natrijev hipoklorit, klorheksidin diglukonat idr. Slednji se je izkazal kot ustrezen zaradi protimikrobnega delovanja in sposobnosti adsorpcije na trdna zobna tkiva (Dametto in sod., 2005). Ugotovili so, da sta za neuspešno endodontsko zdravljenje največkrat odgovorna *E. faecalis* in *Candida albicans*.

Z razvojem t. i. fotodinamskega zdravljenja želijo skrajšati čas, potreben za sterilizacijo koreninskega kanala in s tem pospešiti zdravljenje. Tovrstno zdravljenje temelji na obsevanju z laserjem ob dodatku fotosenzoričnega barvila (toluidinsko modrilo) (Wainwright, 1998).

### 1.1 NAMEN IN DELOVNA HIPOTEZA

V diplomski nalogi smo *in vitro* primerjali protimikrobni učinek laserja HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser (HELBO Photodynamic Systems, Grieskirchen, Avstrija), 0,5 % klorheksidin diglukonata in kalcijevega hidroksida na bakterijo *E. faecalis* ATCC 29212 in glivo *C. albicans* ATCC 90028.

Pričakovali smo, da bo protimikrobni učinek laserja primerljiv z učinkom klorheksidina in kalcijevega hidroksida. Predvidevali smo tudi, da bo protimikrobni učinek laserja na *C. albicans* slabši kot na *E. faecalis*.

## 2 PREGLED OBJAV

### 2.1 NORMALNA MIKROBNA FLORA V USTIH

Ustna votlina otroka je ob porodu sterilna. Mikroorganizmi se v ustih novorojenčka naselijo pri prehodu skozi porodni kanal matere, kasneje pa jih dobi z mlekom, vodo, hrano in slino. Nekaj ur po rojstvu so v ustih že prisotne bakterije *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Corynebacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Neisseria* spp., *Streptococcus salivarius*, in glive *Candida* spp.. V prvem letu življenja prevladujejo v ustih streptokoki, predvsem *S. salivarius*, manj številčni pa so *S. epidermidis*, *Neisseria* spp. in *Veillonella* spp. Ob izrastu prvih zob se naselita na trdih površinah *Streptococcus sanguis* in *Streptococcus mutans* ter *Actinomyces* spp., *Lactobacillus* spp., *Rothia dentocariosa* in *Capnocytophaga* spp., medtem ko je striktnih anaerobov malo, ker ni globokih paradontalnih žepov. Med odraščanjem, ko zrastejo stalni zobje in se gingivalni sulkusi poglobijo, je anaerobnih bakterijskih vrst več, vendar manj kot 1 % celokupnega števila mikroorganizmov. To so *Peptostreptococcus* spp., *Porphyromonas* spp., *Fusobacterium* spp., *Prevotella* spp., *Treponema* spp., in *Campylobacter* spp. in druge. V starosti, pri brezzobih ustih, ustna flora postane podobna dojenčkovi, razen v primeru zobne proteze, ko sta prisotna *S. mutans* in *S. sanguis* (Dragaš, 1996).

V ustih zdravega odraslega je vsaj 300 vrst mikroorganizmov, ki predstavljajo stalno ustno floro in so v stabilnem odnosu z gostiteljem. S hrano, vodo in dotikom vstopajo v usta mikroorganizmi, ki se tam zadržijo le začasno ali prehodno (začasna ali prehodna flora), največ nekaj ur, dokler jih ne uničijo antagonisti v ustih ali jih pogoltne s slino.

Nadomestna flora je pojav, ko bakterije ali glive, ki so v ustih v količini manj kot 1 %, naselijo skoraj vsa področja. To se zgodi zaradi uničenja antagonistov normalne flore pri imunokompromitiranih ljudeh ali pri bolnikih, ki prejemajo velike količine širokospektralnih antibiotikov. Največkrat se razrasejo *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* in glive rodu *Candida*.

## 2.2 ZOBNA GNILOBA

V ustni votlini s stalno temperaturo med 35°C in 36°C, visoko vlažnostjo in obilico različnih hranil so idealni pogoji za rast in razmnoževanje mikroorganizmov. Okolje je v ustih zelo raznovrstno. Prisotne so mehke (mukozne membrane) in trde površine (površina zob), področja bogata s kisikom in brez njega, področja z velikim pretokom sline in tista kjer pretoka skoraj ni ter področja, kjer je prisotno neprestano trenje (Nolte, 1982). Mikroorganizmi v tem raznovrstnem ekosistemu, pod vplivom selekcije, naselijo sebi najustreznejšo ekološko nišo (stalna mikroflora ust). Na površini zob se bakterije nahajajo v zobnih oblogah, ki predstavljajo nemineralizirano lepljivo želatinasto substanco. Zobne obloge v 90 % predstavljajo mikroorganizmi, ostalo je organski matriks sestavljen iz beljakovin sline in zunajceličnih polisaharidov mikrobnega izvora (Nolte, 1982).

Nastanek zobnih oblog je večstopenjski, pri čemer vsaka zaporedna stopnja pogojuje naslednjo (Pavlič, 1998). Na čisti zobni površini se najprej tvori pridobljena skleninska kožica, sestavljena iz slinskih glikoproteinov, ki se vežejo na kalcij v sklenini. Pridobljeno skleninsko kožico sestavljata dva sloja. Tanek redkejši sloj (kutikula) pokriva neposredno površino zoba, debelejši in gostejši sloj nad njim, pa tvori pelikulo. Pelikula je naravna pregrada, debeline 1 do 15 µm, odporna proti mehanskim silam, ki kislinam preprečuje dostop do površine zob. Pridobljena skleninska kožica je brez mikroorganizmov.

Bakterije se redko adsorbirajo na čisto sklenino, določene pa imajo sposobnost vezave na pelikulo. Med temi prevladujejo streptokoki, v začetku *S. sanguis*, kasneje *S. mutans*. Ti se namnožijo in tvorijo na zobni površini stolpiče bakterijskih slojev. Vežejo se tudi nekateri po Gramu pozitivni bacili (*Actinomyces* spp.) ter v manjši količini po Gramu negativni koki (*Veillonella* spp. in *Neisseria* spp.) in nitaste bakterije (*Leptotrichia buccalis*) (Dragaš, 1996).

V mladi zobni oblogi še prevladujejo streptokoki, kasneje je več nitastih oblik, ki se v stari oblogi namnožijo. Nitasto razvejani bacili *Actinomyces* spp. se z enim koncem pričvrstijo na površino zoba, drugi pa je prost. Nanj se vežejo koki, predvsem streptokoki, kasneje

tudi *Veillonella spp.* in tvorijo strukturo podobno koruznemu storžu (Dragaš, 1996; Pavlič, 1998). Streptokoki in aktinomicete izkoriščajo kisik in zmanjšujejo redoks potencial, kar omogoča naselitev anaerobnih bakterijskih vrst. Razmnožijo se sekundarne bakterijske vrste, ki se prehranjujejo z metabolnimi produkti primarnih bakterij. Streptokoki na primer, omogočijo s presnovo glukoze v mlečno kislino naselitev po Gramu negativnim anaerobnim kokom *Veillonella spp.*, ki so sposobne presnove mlečne kisline, ne pa glukoze (Dragaš, 1996; Pavlič, 1998).

V zrelih zobnih oblogah je kvantitativna in kvalitativna uravnoteženost. Število bakterijskih celic v zobnih oblogah narašča predvsem zaradi deljenja celic, manj zaradi nalaganja. Avtorji primerjajo tako izgrajene zobne obloge z ekološko nišo ali s tkivom – s celicami, zunajceličnim matriksom in lastno tekočino (Pavlič, 1998). Strukturni material, potreben za rast, dobijo bakterije z lizo odmrlih celic. Aerobi se v starejših zobnih oblogah nahajajo v površinskih plasteh, prevladujejo še vedno streptokoki. Anaerobi pa so skladno s porabo kisika v globljih plasteh, predvsem anaerobna *Peptostreptococcus intermedius* in *Peptostreptococcus anaerobius* (Nolte, 1982). Namnožijo se na kisline odporne in kisline proizvajajoče bakterije: *Actinomyces spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Neisseria spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *Veillonella spp.*, *Eubacterium spp.*, *Propionibacterium spp.* Predvsem *S. mutans* in *Lactobacillus spp.* so sposobne močno znižati pH vrednost v zobnih oblogah (Pavlič, 1998).

Kadar se bakterije v zobnih oblogah namnožijo v taki količini, da pride do spremembe odnosov in se organizem ni več sposoben braniti, se razvije zobna gniloba. Gre torej za endogeno kronično bakterijsko bolezen, kjer sodelujejo oportunistične bakterije normalne ustne flore. Pri nastanku zobne gnilobe sodelujejo gostitelj (človek, s svojim imunskim odzivom in prehranjevalnimi navadami), mikroorganizmi (ustne bakterije) in substrat (sladkor-saharoza) (Dragaš, 1996). Skupni vpliv vseh treh dejavnikov povzroči demineralizacijo zobne sklenine in zobovine.

Lastnosti kariogenih bakterij so sposobnost tvoriti kisline, toleranca na kisline in nizek pH ter tvorjenje netopnih polisaharidov. Večina ustnih bakterij dobiva energijo z razgradnjo sladkorjev (Dragaš, 1996). Polisaharidne polimere (npr. škrob) razgradijo z encimom

amilazo, bakterijsko ali iz sline, do osnovnih enot. Disaharidi in monosaharidi, ki se prenesejo v bakterijsko celico, so substrat za glikolizo, največkrat anaerobno fermentacijo do mlečne kisline. Z uživanjem enostavnih sladkorjev, kot je saharoza, je razgradnja do mlečne kisline veliko hitrejša in ugodnejša. Kisline znižujejo pH (5,5 – 4,0), acidotolerantne bakterije (ustni streptokoki in laktobacili) se namnožijo. Vse skupaj pa omogoča izstopanje kalcija in demineralizacijo sklenine in dentina, s tem pa okvaro zobne površine, ki varuje zob pred vdorom bakterij.

Ustni streptokoki so homofermentativni, mlečna kislina je glavni končni produkt presnove. Z encimi glukozil-transferazo (GTF) in fruktozil-transferazo (FTF) izgrajujejo polisaharidne polimere-glukan (dekstran) in fruktan (levan) (Dragaš, 1996). Glukani so osnova za zlepljanje bakterij v zobni oblogi. Njihova vezava na pridobljeno skleninsko kožico omogoči vezavo določenih bakterij. Razlikujemo vodotopni glukan-dekstran, ki ga razgradijo dekstranaza in ustne bakterije ter v vodi netopni glukan-mutan, ki ga tvori *S. mutans*. Mutan je nerazgradljiv.

### 2.3 ZGRADBA IN VLOGA ZOBNE PULPE

Zobna pulpa je specializirano rahlo vezivno tkivo, ki izpolnjuje pulpno votlino in je obdana z dentinom. Zobna pulpa ima oblikovno, prehranjevalno, čutilno in obrambno nalogo zobnega organa (Gašperšič in Jan, 2003). Najpomembnejše celice zobne pulpe so odontoblasti, ki izdelajo skoraj vse organske sestavine za dentin. Glavni izdelek je kolagen I, ki se oblikuje v vlakna in mreže v predentinu. Odontoblasti so oblikovno in dejavno polarizirane celice, razvrščene v vrste, med seboj povezane s številnimi tesnimi medceličnimi stiki. Na ta način delujejo kot morfološka in funkcionalna celota. Odontoblastna vrsta se nahaja na periferiji pulpe. Vsak odontoblast ima Tomesov podaljšek v svojem dentinskem kanalu, po katerem potujejo v smeri dentinske površine surovine za pretubularni dentin, v smeri zobne pulpe pa tkivni presnovki. Dentinska limfa je vzporedna pot. O pomenu prehranjevalne vloge zobne pulpe za sklenino sklepamo posredno po velikih spremembah sklenine, ko zobna pulpa propade (Gašperšič in Jan, 2003).



Dentin in zobna pulpa sta endodoncij. Pulpno votlino sestavljata pulpni prekat in koreninski kanal, ki sta skozi apikalni foramen povezana s pozobnico in organizmom. Vsaka korenina ima poleg glavnega kanala še manjše dodatne in stranske medkoreninske kanale, ki jih imenujemo tudi pulpoperiodontalne komunikacije. Glavni koreninski kanal se pogosto deli v dva manjša, prisotne pa so še drobnejše in tudi slepe cevke z vmesnimi povezovalnimi kanalčki, ki tvorijo kanalski sistem korenine. Morfologija kanalskega sistema se z leti spreminja (sekundarni dentin, mineralizirane tvorbe v pulpi, razjede dentinske stene).

Odontoblastne plasti se dotika s celicami revna plast ali necelična plast (Weilova cona), proti pulpni sredini sledi s celicami bogata plast (Höhlova cona). Ti dve plasti sta prisotni le v kronskem delu zobne pulpe. Četrta plast je najobsežnejša- srednji del pulpe, rahlo vezivo, kjer prevladujejo zvezdasti fibroblasti. Fibroblasti so poleg strukturne funkcije odgovorni za tvorbo in preoblikovanje kolagena. V pulpni sredini najdemo še inaktivne multipotentne mezenhimske celice (matične celice odontoblastov) ter fibrocite, ki najverjetneje vzdržujejo kolagenska vlakna.

Zobna pulpa je dobro prekrvavljena. Skozi apikalno odprtino korenine vstopata ena ali dve arteriji in izstopa navadno več ven. Velike arterije in vene so v sredini zobne pulpe, kapilare najdemo predvsem v površinskih plasteh. Kapilare segajo med odontoblaste do predentina. V zobni pulpi so prisotne tudi limfne žile, ki se začenjajo kot slepe odprtine. Intersticijska tekočina se z limfo vrača v krvni obtok, kar je pomembno za uravnavanje pulpnega tlaka in odvajanje strupenih snovi (Gašperšič in Jan, 2003).

Zobna pulpa je tudi zelo oživčena. V vsako korenino vstopa zobni živec, ki se močno razveja v pulpni prekatu, predvsem ob odontoblastih- pododontoblastni živčni pletež. Prosti živčni končiči imajo vlogo receptorjev, s katerimi zaznamo bolečino ne glede na vrsto dražljaja.

## 2.4 OKUŽBE ZOBNE PULPE IN PERIAPIKALNEGA TKIVA

Sklenina in dentin, kot trdna fiziološka pregrada, varujeta zobno pulpo pred škodljivimi zunanji iritanti- raztopinami, hitrimi temperaturnimi spremembami in mikroorganizmi. Vitalno tkivo dentina je odporno proti bakterijski okužbi, tako da v pulpi in periapikalnem tkivu normalno ni bakterij, vse do poznega stadija zobne gnilobe. Šele spremembe v dentinskih tubulih, zaradi demineralizacije dentina, omogočajo rast mikroorganizmov v dentinu in vdor skozi tubule v zobno pulpo. Najpogostejša je torej okužba zobne pulpe z bakterijami, ki se širijo skozi sklenino in dentin iz karioznih sprememb. Bakterije in njihovi izločki pa lahko v zobno pulpo vstopajo tudi skozi odprtine povezane s parodontalnimi žepi (pulpoperiodontalne komunikacije). Ostali etiološki dejavniki kontaminacije zobne pulpe so še travmatične poškodbe zoba, zobozdravstveni in operativni posegi na zobu ter hematogena okužba pri bakteriemiji in sepsi (Dragaš, 1996).

Domnevajo, da kljub prisotnosti bakterij v dentinskih tubulih ob karioznih lezijah pulpa, če je vitalna, ne bo postala okužena (Tronstad, 2003). Vnetje pulpe najprej sprožijo bakterijski produkti, neposredno citotoksično ali posredno preko antigenov. Bakterije vstopajo v pulpno votlino šele, ko je le-ta že močno poškodovana, lokalno nekrotična. Mikroorganizmi, ki povzročijo vnetje zobne pulpe so največkrat nizkovirulentni, vendar imajo različne virulence faktorje, kot so endotoksin, teihoična kislina, peptidoglikani, kolagenaza, fibrinolizin, proteaza, hialuronidaza, ki sodelujejo pri uničevanju tkiva pulpe (Dragaš, 1996). Invazivnost bakterij je torej pomemben faktor virulence. Toksični za pulpo so tudi produkti bakterijske presnove, kot so amoniak, žveplovodik, organske kisline in toksični amini.

Vezivno tkivo zobne pulpe odreagira na iritante z lokalnim vnetjem- pulpitis. Začetek vnetja je lahko akuten, z bolečinami na toplotne spremembe in dotik. Pri akutnem vnetju prevladujejo v gnoju nevtrofilni levkociti (nevtrofilci), vezivo, fibroblasti in fibrinske niti. Začetek vnetja je pogosto primarno kroničen, v zobni pulpi prevladujejo limfociti in plazmatke (Dragaš, 1996).

Začetni fazi vnetja sledi lokalno povišanje tlaka v vnetnem področju pulpe, povišana kapilarna permeabilnost ter povišan pretok krvi in limfe, tudi v vitalnih neprizadetih delih pulpe. Nevtrofilci vstopajo v vneto področje s kemotakso, kjer delujejo kot fagociti. Pravočasna oskrba zobne pulpe in odstranitev bakterij, omogoča vrnitev pulpe v prvotno stanje. Če na tej stopnji ne ukrepamo, pride do kroničnega vnetja in nepovratne nekroze tkiva. Pri kroničnem vnetju pride do agregacije limfocitov T in limfocitov B, makrofagov in plazmatskih celic. Nastale imunske komplekse (antigen-protitelo) fagocitirajo predvsem makrofagi. Limfociti in makrofagi imajo s produkcijo citokinov in citotoksično aktivnostjo, dodaten destruktiven učinek na pulpno tkivo. Temu sledi kamotaksa nevtrofilcev (Tronstad, 2003).

Ko je pulpna votlina še zaprta in je zob vitalen, prodrejo skozi dentin predvsem ustni streptokoki, kot najznačilnejši povzročitelji kariesa, ter laktobacili, aktinomicete, kožni stafilokoki, korinebakterije in enterokoki. V nekrotični pulpi nevitalega zoba se pojavijo anaerobi, ki predstavljajo 60 % vseh bakterij, predvsem *Porphyromonas endodontalis*, *Prevotella oralis*, *Fusobacterium* spp., *Eubacterium* spp., *Peptostreptococcus* spp. ter fakultativni anaerobi kot so *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., enterobakterije in glive *Candida* spp.. Kot posledica globokih okvar parodontalnega tkiva, prodrejo tudi bakterije iz parodontalnih žepov, npr. *Campylobacter* spp. in *Treponema* spp. Skupno število živih mikroorganizmov v vneti zobni pulpi je  $10^6$  do  $10^8$  CFU/g (ang. colony forming units) (Dragaš, 1996).

Kot rečeno lahko pulpitis nastopi tudi ob odsotnosti bakterij v zobni pulpi, na drugi strani pa lahko opazimo pojav napredovanega kariesa dentina, brez vnetja pulpe (Tronstad, 2003). Eden od razlogov navideznega paradoksa je, da produkti iz karioznih lezij stimulirajo pulpno tkivo k produkciji intratubularnega dentina, kar povzroči sklerozo dentinskih tubulov na periferiji med pulpo in poškodovanim primarnim dentinom. Intratubularne obloge sestavljajo manjši hidroksiapatitni kristali, identični tistim, ki jih opazimo pri starostnih spremembah dentina. Na periferiji pa se pojavljajo še dodatne mineralizirane obloge, ki so posledica pasivne precipitacije mineralov. Sklerotična področja dentina predstavljajo začasno bariero pred vdorom iritantov iz karioznih dentinskih lezij v pulpo. Zdravljenje je še vedno potrebno.

Brez ustreznega zdravljenja, se vnetje iz koreninskih kanalov širi v periapikalno tkivo, kjer nastane akutno ali kronično periapikalno vnetje, ki je lahko lokalno (lokalizirani apikalni parodontitis) ali pa se širi. Te oblike vnetja se razvijejo kot posledica gostiteljeve zaščite. V imunskem odzivu sodelujejo dejavniki humoralne in celične imunosti ter reakcije takojšnje in pozne preobčutljivosti.

V kroničnem apikalnem parodontitisu (KAP) potekata razkroj in obnova sočasno, o prevladi odločajo škodljivi vplivi in obrambna sposobnost organizma (Gašperšič in sod., 2000). Vnetni mediatorji imajo obrambno vlogo, a imajo tudi nezaželene stranske učinke, zlasti razgradnjo kosti in korenine. Vnetno tkivo nadomešča resorbirano kost in korenino, nastajajo nove žile, fibroblasti in vezivna vlakna, kar je znak obnove.

Znanih je pet različic KAP (Gašperšič in sod., 2000): 1- **granulom** je najpogostejša oblika, najdemo limfocite, plazmatke, monocite, granulocite, mastocite ter imunoglobuline IgG, IgM, IgA in IgE. 2- **kronični apikalni absces s fistulacijo** navzven (skozi periost, gingivo, periodoncij ali koreninski kanal). 3- **radikalna cista** nastane, če se epiteljske celice začno razmnoževati in obdajo vnetni predel. Nastanek ciste spodbujajo različni rastni dejavniki, npr. keratinocitni rastni dejavnik, ki ga izdelujejo fibroblasti ter endotoksin *Bacteroides* spp., ki deluje bolj citotoksično na mezenhimske celice kot na epiteljske in tudi gutta-percha, polimer poliizoprena, ki se uporablja kot polnilo pri zaprtju koreninskega kanala. 4- **kondenzirajoči osteitis** je čezmerno nastajanje apikalne kosti zaradi povečane osteoplastične dejavnosti, kar se kaže v veliki gostoti kosti. 5- **apikalna brazgotina** je izid nepopolnega celjenja apikalnega vnetja, sestavljena iz veliko gostih kolagenskih vlaken in fibroblastov, ki nadomestijo prvotno tkivo. Ta oblika ne zahteva posega.

Pri periapikalnih infekcijah so ugotovili več kot 150 različnih vrst bakterij (Jevnikar in Klemenc, 1999). Najpogosteje se pojavljajo fakultativni anaerobi (*Streptococcus viridans* skupina in *Streptococcus oralis* skupina) in anaerobni streptokoki (*Peptostreptococcus* spp.), sledijo enterokoki, propionibakterije, *Veillonella* spp., stafilokoki, korinebakterije, pa tudi *Escherichia coli*, *Candida* spp. in različne anaerobne bakterije (Dragaš, 1996).

Če pulpalna ali periapikalna vnetja nepravilno zdravimo ali jih sploh ne zdravimo, se vnetje razširi v mehka in trdna tkiva. Nastanejo submandibularni ali sublingvalni, submaksilarni ali parafaringealni abscesi, gnojni maksilarni sinusitis ter abscesi in celulitis glave in vratu. Posledično se lahko razvije osteomielitis spodnje čeljusti in gnojni meningitis ter možganski absces (Dragaš, 1996).

## 2.5 ENDODONTIJA

Endodontija je del zobozdravstva, ki se ukvarja s profilakso, diagnostiko in zdravljenjem bolezni zobne pulpe in pulpogenih parodontopatij (Vrbošek, 1995). Načela endodontskega zdravljenja so navidezno nespremenjena že vrsto let, vendar se endodontska doktrina neprestano razvija. Endodontsko zdravljenje zahteva urejeno in načrtno delo, zato že majhne novosti bistveno pripomorejo k boljšim rezultatom.

Endodontsko zdravljenje je danes trosejni poseg, pri katerem odmrlo in okuženo pulpo odstranijo iz pulpnega prekata in koreninskih kanalov, pulpno votlino mehansko in kemično razkužijo ter v tretji seji neprepustno zaprejo. Število sej se lahko poveča ali zmanjša le izjemoma (Klemenc, 2005).

### 2.5.1 Prva seja endodontskega zdravljenja

Endodontsko zdravljenje se začne s splošno anamnezo, kjer se določi splošno zdravstveno stanje bolnika in oceni rizičnost endodontskega posega za bolnika (bolniki s sistemskimi boleznimi, imunokompromitirani bolniki itd.) in zobozdravstveno osebje (bolniki s prenosljivimi infekcijskimi boleznimi). Sledi lokalna anamneza in lokalni oralni pregled, pri kateri se oceni obstoječi zobozdravstveni problem. Z uporabo diagnostičnih postopkov se ugotovi anatomske posebnosti zob, občutljivost, majavost, vitaliteto. Obvezen je tudi rentgenski posnetek prizadetega zoba, s pomočjo katerega se določi anatomske posebnosti, obsežnost obolenja in delovno dolžino. Na podlagi naštetega se postavi diagnozo obolenja zoba, ki določa potek zdravljenja in prognozo.

Osrednji del prve seje endodontskega zdravljenja predstavlja poseg, imenovan **endodontski trias**. Faze endodontskega triasa so (Klemenc, 2002a):

- izdelava dostopne kavitete
- mehansko-kemična obdelava koreninskega kanala
- začasna neprepustna zapora pulpnega prostora

Black je že pred sto leti postavil klasična načela o klasifikaciji in preparaciji kavitet, ki so se deloma obdržala do danes. Strokovnjaki so nekatera pravila spreminjali, da bi ohranili čimveč zdrave zobne substance (Vrbič, 1990). Kaviteta mora biti vseeno dovolj široka in lijakasta, da omogoči dostop do pulpne komore in direkten pogled v vhode koreninskih kanalov ter neovirano obdelavo (Klemenc, 2005). Sledi osušitev pulpne komore.

V drugi fazi se z mehansko-kemično obdelavo odstrani ostanke pulpe in mrtvine iz koreninskih kanalov. Mehansko čiščenje in širjenje kanalov je lahko ročno, strojno ali ultrazvočno (Klemenc, 2005; Jevnikar in Klemenc, 1999). V zadnjem desetletju se je najbolj uveljavila ročna stopenjska tehnika (step-back tehnika). Step-back tehnika je klasična tehnika, pri kateri se koreninski kanal širi od apeksa proti kroni, stopničasto. Primerjava Hulsmann-a in sod. (1997), med posameznimi tehnikami širjenja koreninskih kanalov, ni pokazala pomembnih razlik v učinkovitosti širjenja. Lev (1987, cit. po Jevnikar in Klemenc, 1999) priporoča kot najbolj uporabno tehniko, po kateri so koreninski kanali najbolj očiščeni, stopenjsko tehniko, ki ji sledi tri minutna ultrazvočna obdelava in izpiranje z natrijevim hipokloritom (NaOCl).

Razvoj strojnih sistemov za širjenje koreninskih kanalov je močno olajšal in skrajšal naporno ter dolgotrajno ročno obdelavo, vendar ima tudi določene pomanjkljivosti. Poleg visoke nabavne cene imajo kratko funkcijsko življenjsko dobo (2 minuti), hitro korozijo in mehansko obrabo ostrine rezil. Vsaj dvakrat večja kot pri ročnem delu, pa je tudi nevarnost zloma. Konkurenčen razvoj strojnih sistemov je omogočil šele razvoj nikelj-titanovih (Ni-Ti) zlitin v osemdesetih letih (Klemenc, 2002a). Prednost pred jeklenimi instrumenti jim daje elastičnost, strukturne kristalografske spremembe dopuščajo obdelavo tudi pravokotno

ukrivljenega koreninskega kanala, značilna topa konica preprečuje perforacijo korenine. Novejši modeli imajo tudi računalniško podporo in vgrajen sistem izpiranja z NaOCl.

Izpiranje koreninskih kanalov je sestavni del endodontskega triasa. Irigant izbora je 2,5 % NaOCl, ki razkuži koreninski kanal in topi organske snovi (Klemenc, 2003). Ker se v stiku z organsko snovjo hitro inaktivira, mora biti izpiranje večkratno in čim daljše (Klemenc, 2005). Možni zapleti uporabe NaOCl so: draženje ustne sluznice, preobčutljivostna reakcija bolnika, nenamerna kanitev hipoklorita v oko, razbarvanje bolnikove obleke (Klemenc, 2003). Za izpiranje so v uporabi tudi druge raztopine. Fiziološka raztopina ima le mehanskosplakovalni učinek, uporablja se pri imunokompromitiranih in preobčutljivih bolnikih. Etilendiamintetraocetna kislina (EDTA), ob stiku z dentinom veže kalcijeve ione in mehča dentinsko tkivo. Razkuževalni in mehanskosplakovalni učinek ima tudi 3 % vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ), ki ob stiku s tkivom sprošča atomarni kisik (Klemenc, 2003).

Izpiranju sledi vnos iriganta, s katerim se napolni koreninski kanal, vendar ne sme segati preko apikalne odprtine, da ne povzroči sterilnega vnetja ali nekrozo. Irigant izbora je pasta kalcijevega hidroksida, hidroksilni ioni delujejo razkuževalno.

Po vnosu iriganta sledi tretja faza endodontskega triasa, to je začasna neprepustna zapora zoba. Najprej se s pinceto ali sterilno vatno kroglico odstrani višek zdravila, nato se pulpni prostor neprepustno zapre s sulfatnim cementom (Cavit, Fermit idr.), fosfatnim cementom ali steklastim cementom. Zdravljen zob se pusti odprt le v izjemnih primerih, ko je v okolici zoba gnoj, ki ga ni bilo mogoče odstraniti.

### **2.5.2 Druga seja endodontskega zdravljenja**

Druga seja nastopi čez 7-14 dni po končani prvi seji. Po opravljenem kliničnem pregledu, če ni posebnosti, se ponovijo postopki iz prve seje in zob se ponovno neprepustno zapre. Tretja seja sledi čez 7-14 dni.

### 2.5.3 Tretja seja endodontskega zdravljenja

V tretji seji se ponovi celotni postopek iz prvih dveh sej, tokrat se v koreninskem kanalu naredi dokončna neprepustna zapora. Dokončna koreninska polnitev je lahko hladna ali termoplastična. Lastnosti dobrega polnilnega sredstva so (Klemenc, 2002b):

- preprosto vnašanje v kanal v poltrdem stanju in se nato strdi
- pečati naj kanalski sistem v lateralni in vertikalni smeri
- ne sme se krčiti in vpijati vlage
- ne sme razbarvati zoba in dražiti periapikalna tkiva
- sposobnost za lahkotno odstranjevanje
- netoksičnost, biološka nevtralnost in baktericidnost
- možnost sterilizacije in rentgenska kontrastnost

Klasično, skoraj idealno polnilo predstavlja gutta-percha, ki je polimer poliizoprena, ekstrahiranega iz tropskega drevesa v Maleziji, je viskoelastična, obenem pa ima lastnost viskozne tekočine, ob segretju se zmehča in postane tekoča. Danes je sestavljena iz 19-22 % naravne gutta-perche, 60-70 % cinkovega oksida (ZnO), z dodatki voskov, barvil, antioksidantov in kovinskih soli (sulfatov) (Klemenc, 2002b).

Po dokončani polnitvi se s pomočjo rentgenskega posnetka oceni uspešnost polnitve. Uspešnost endodontskega zdravljenja pa se lahko oceni šele po šestih mesecih ali več po dokončani polnitvi (Vrbošek, 1995). Da se prepreči sekundarno okužbo, se čimprej oskrbi tudi zobna krona v obliki plombe ali protetične rehabilitacije.

## 2.6 ENDODONTSKI INTRAKANALNI IRIGANTI

Uspešnost endodontskega zdravljenja je v največji meri odvisna od sterilizacije koreninskih kanalov zoba. Za inaktivacijo vnetnega odziva ter vzpostavitve procesa zdravljenja in rekonstrukcije prizadetega dentina, je potrebna popolna odstranitev bakterij in njihovih produktov iz koreninskega sistema. Poleg natančnega in sterilnega dela



predpisanih postopkov je pomembna tudi izbira ustrezne metode (Golob in Leskovec, 1995).

Na uspešnost zdravljenja koreninskih kanalov poleg mehansko-kemične obdelave vpliva tudi zdravljenje med sejami. Kombinacija mehanske obdelave in izpiranje z intrakanalnimi iriganti kratkotrajnega delovanja, učinkuje zgolj na glavni koreninski kanal (razkuži ga v 50-60 %), medtem ko stranski kanali in dentinski tubuli ostajajo kontaminirani. Za razkuženje celotnega koreninskega sistema je potrebno zdravljenje z intrakanalnimi iriganti med dvema endodontskima posegoma, do končnega zaprtja zoba (Sakamoto in sod., 2007; Podbielski in sod., 2003). V nasprotnem primeru se mikroorganizmi v nekaj dneh namnožijo do začetnega števila (Vianna in sod., 2005).

V uporabi so različni intrakanalni iriganti, kot so natrijev hipoklorit, kamforirane fenolne spojine (npr. CMCP-kamforirani monoklorofenol), kalcijev hidroksid in klorheksidin. Vsi delujejo protibakterijsko, prednost  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pred ostalimi pa je njegova sposobnost nevtralizacije vnetnih bakterijskih produktov, stimulacije lokalnih popravljalnih mehanizmov in manjši toksičnosti za humane celice (Podbielski in sod., 2003).

### **2.6.1 Kalcijev hidroksid**

Kalcijev hidroksid je močna baza, ki v vodnem okolju disociira v kalcijev divalentni kation in hidroksilne anione. Hidroksilni ioni vzdržujejo visok pH. Baktericidno in biokompatibilno delovanje kalcijevega hidroksida je leta 1936 spoznal Hermann, ki ga je kot Calxyl uvedel v zobozdravniško prakso (Golob in Leskovec, 1995).  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ima lastnosti idealnega intrakanalnega iriganta, saj deluje kot fizična bariera, ki preprečuje ponovno okužbo koreninskega kanala in dostop hranil. Mehanizmi protimikrobnega delovanja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  niso podrobno raziskani, glavne zasluge za njegovo učinkovitost pa ima nedvomno visok pH (Vianna in sod., 2005). Sproščeni hidroksilni ioni v vodnem okolju, poškodujejo citoplazemsko membrano bakterij ter denaturirajo beljakovine in nukleinske kisline (DNK). Sposobnost vezave z ogljikovim dioksidom ( $\text{CO}_2$ ), pa deluje baktericidno na nekatere od  $\text{CO}_2$  odvisne bakterije v koreninskem kanalu. Kalcijev

hidroksid ni škodljiv za periapikalno tkivo, pač pa ozmotsko učinkuje tudi v okuženih dentinskih kanalčkih. Dolgotrajno delovanje je pripisati alkalnemu kalciju, sterilnost koreninskega kanala se doseže v visokem odstotku že po enem tednu delovanja (Golob in Leskovec, 1995).

Visok pH inhibira esencialne bakterijske encime, odgovorne za metabolizem, rast in celično delitev. Z denaturacijo organskih komponent citoplazemske membrane (beljakovine, fosfolipidi), vpliva na integriteto membrane in transport hranil. Prednost  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  pred drugimi iriganti pa je tudi, da aktivira tkivne encime, kot je alkalna fosfataza, kar sproži mineralizacijo in s tem obnovo tkiva.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ima tudi sposobnost hidrolize bakterijskih lipopolisaharidov (LPS), razgradi namreč lipid A, in s tem nevtralizira toksične bakterijske ostanke po lizi celice (Estrela in sod., 2001).

Z namenom izboljšati protimikrobno delovanje, biokompatibilnost, ionsko disociacijo in difuzijo, so  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  dodali različne substance, t. i. nosilce. Poznamo tri skupine nosilcev, vodni, viskozni in oljni. Vodni nosilci, kot sta sterilna destilirana voda in fiziološka raztopina, omogočajo hitro disociacijo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na ione, visoko topnost v tekočinah ter lahko reabsorbicijo z makrofagi. Viskozni nosilci, kot sta glicerin in polietilenglikol, so prav tako topni v vodi, vendar je disociacija  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  počasnejša, verjetno zaradi molekulske teže. Oljni nosilci, kot CMCP, so v vodi netopni, kar močno zniža topnost in difuzijo  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  v zobnem tkivu (Vianna in sod., 2005).

Številne *in vitro* raziskave so pokazale, da imajo paste  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  z dodatkom CMCP nosilcem, najučinkovitejše protimikrobno delovanje. CMCP namreč prispeva dodatne baktericidne lastnosti, saj je kamfor slabo vodotopen, kar omogoča počasno sproščanje kalcijevih in hidroksilnih ionov iz paste in podaljša protimikrobno delovanje (Vianna in sod., 2005). Tudi Siqueira in Uzeda (1998; 1997) sta z dvema različnima metodama prišla do enakega rezultata. Kombinacija  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s CMCP, je z metodo difuzije v agarju ustvarila največje cone inhibicije proti vsem testiranim bakterijskim sevom (Siqueira in Uzeda, 1997). Kombinacija  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  s sterilno vodo je bila časovno nekoliko manj učinkovita, največ časa za popoln protimikrobni učinek, pa je bilo potrebnega pri kombinacijah  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  z viskozni nosilcema, glicerinom ali polietilenglikolom (Vianna

in sod., 2005). Viskoznost medija upočasni disociacijo hidroksilnih ionov in s tem zmanjša protimikrobni učinek  $\text{Ca(OH)}_2$ . Gomes in sod. (2002), so z enako metodo, difuzija v agarju, dobili podobne rezultate.

CMCP se je individualno izkazal za potencialno najučinkovitejše protimikrobno sredstvo, za popolno inhibicijo vseh testiranih mikroorganizmov, je bila potrebna manj kot 1 minuta (Vianna in sod., 2005). Kot omenjeno pa fenoli delujejo citotoksično na periapikalno tkivo in se zato močno odsvetuje njihova uporaba, tudi v kombinaciji s  $\text{Ca(OH)}_2$ . Poleg tega CMCP v zobnem kanalu izgubi aktivnost že po 24-48 urah in ne deluje kot fizična bariera, saj se ga navadno nanese na sterilna papirnata šilca in vstavi v zobni kanal.

V nasprotju z do sedaj navedenimi odkritji, pa nekatere raziskave poročajo o drugačnih rezultatih.  $\text{Ca(OH)}_2$  se je v raziskavi Bystrom in sod. (1985) izkazal za učinkovitejše protimikrobno sredstvo kot CMCP.

$\text{Ca(OH)}_2$  s fiziološko raztopino je učinkovit intrakanalni irigant tudi *in vivo*. Izbira vodotopnega prenosnika spodbudi disociacijo in difuzijo hidroksilnih ionov ter interferira z bakterijskimi encimi in tkivnim sistemom (Estrela in Pesce, 1996). Estrela in sod. (1995) opisujejo, da je delovanje  $\text{Ca(OH)}_2$ , zaradi tarčne aktivnosti hidroksilnih ionov na encime citoplazemske membrane, širokospektralno, kar pomeni da inaktivira številne mikroorganizme. Citoplazemska membrana bakterij je namreč podobne sestave, ne glede na morfologijo, barvanje po Gramu, vrsto metabolizma, idr.  $\text{Ca(OH)}_2$  ima torej podoben učinek na aerobne, anaerobne, po Gramu pozitivne kot po Gramu negativne bakterije.

Inaktivacija encimov citoplazemske membrane je lahko ireverzibilna ali reverzibilna. Estrela in sod. (1998) so *in vitro* prišli do ugotovitve, da ima neposreden stik  $\text{Ca(OH)}_2$ , ireverzibilen učinek na encime različnih bakterijskih vrst, že po 72 urah. Reverzibilno encimsko inaktivacijo pa so Estrela in sod. (1999) zaznali ob posrednem delovanju  $\text{Ca(OH)}_2$  v dentinskih tubulih, okuženih z različnimi mikroorganizmi.  $\text{Ca(OH)}_2$  se je po 7-ih dneh delovanja na daljavo, izkazal za neučinkovitega proti *E. faecalis*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* in *Bacillus subtilis*.

Za protimikrobni učinek intrakanalnega iriganta je potreben tudi ustrezen čas njegovega delovanja. Aerobni in fakultativno anaerobni mikroorganizmi so manj občutljivi za delovanje  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , zato je za njihovo odstranitev iz koreninskega kanala zoba, potrebno večurno (6-24 ur) učinkovanje. Obvezni anaerobi so inaktivirani v veliko krajšem času, že v 5-ih minutah ali manj. V raziskavi Vianna in sod. (2005), je mikrobna občutljivost za  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , od najmanj občutljivega mikroorganizma do najbolj občutljivega, rangirana sledeče: *E. faecalis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* in *Prevotella intermedia*.

### 2.6.2 Klorheksidin

Klorheksidin (CHX) je bil prvič sintetiziran leta 1950, v laboratoriju v Angliji. Odkrili so da je visoko protimikrobno aktiven, nizko toksičen in sposoben vezave na kožo in mukozne membrane (Denton, 2001). Zaradi naštetih lastnosti se ga že več kot 50 let uporablja kot protibakterijsko sredstvo v ginekologiji, urologiji, okulistiki, pri zdravljenju opeklin in za dezinfekcijo kože. V stomatologiji je klorheksidin poleg fluoridov najbolj pogosto in temeljito raziskovano ter uporabljano preventivno sredstvo (Skalerič, 1995). CHX zavira nastanek zobnih oblog in kariesa. Absorbira se na hidroksiapatitne kristale sklenine in slinski mucin, od koder se postopoma sprošča ter zavira bakterijsko produkcijo kislin (Pavlič, 1998). Preventivni ukrep je predvsem dobrodošel pri imunokompromitiranih bolnikih, ki so močno dovzetni za zobno gnilobo, ter pri fizično oziroma mentalno prizadetih.

Uporaba klorheksidina se je izkazala za učinkovito tudi pri omejevanju vnetja obzobnih tkiv in subgingivalnega plaka ter pred in po parodontalnih operacijah (Skalerič, 1995). Na zaviranje razmnoževanja mikroorganizmov vpliva tako koncentracija CHX kakor tudi frekvenca aplikacije. Klinične študije dokazujejo, da je za optimalno redukcijo oralne mikroflore in zmanjšano pojavnost postoperativne bakteriemije, zadostna 2-krat dnevna uporaba CHX (Hermesch in sod., 1998; Metin in sod., 2006).

Klorheksidin je simetrična kationska molekula, sestavljena iz dveh 4-klorofenilnih obročev in dveh biguanidinskih skupin, povezanih z osrednjo heksametilensko verigo. CHX je močna baza, praktično netopna v vodi, ki ob reakciji s kislino tvori sol (Denton, 2001). Vodotopnost različnih soli se razlikuje. Najpogosteje se uporabljajo pripravki s soljo diglukonata, kar močno poveča vodotopnost (Skalerič, 1995). CHX diglukonat je v obliki 0,1-2 % vodne raztopine. Vodne raztopine CHX so najbolj stabilne v območju med pH 5 in 8. Nad pH 8 pride do obarjanja CHX, v kislem območju (pod pH 5), pa se zaradi manjše stabilnosti zniža njegova aktivnost. Soli CHX so bolj kot v vodi topne v alkoholu. Prisotnost anorganskih soli, kot sta sulfat in karbonat, pa lahko povzroči obarjanje diglukonata.

Raztopine CHX so brezbarvne in ponavadi brez vonja, imajo grenak okus, ki ga je v pripravkih za oralno uporabo potrebno nevtralizirati. Klorheksidin se v ustno votlino vnaša v obliki ustne vode, gela, premaza, laka, razpršilca, z uporabo zobne paste in zobne nitke s CHX. Vodna raztopina CHX ima zaradi neposrednega stika hitrejši protimikrobni učinek. Uporaba CHX v gelu pa ima podaljšano protimikrobno delovanje ter določene klinične prednosti. Zaradi večje viskoznosti olajša mehansko odstranjevanje organskih substanc, ki so netopne v CHX (Vianna in sod., 2004).

Klorheksidin se veže na hidroksiapatitne kristale sklenine, skleninsko kožico, beljakovine v slini, na bakterijske zunajcelične polisaharide in na ustno sluznico ter zaradi počasnega (do 24 ur) sproščanja povzroči zmanjšano kolonizacijo bakterij na zobnih površinah.

V endodontiji se je klorheksidin izkazal kot učinkovit intrakanalni irigant. Med endodontskim zdravljenjem, so ob trikratnem izpiranju koreninskih kanalov z 0,5 % vodno raztopino CHX, dosegli sterilizacijo kanalov v 77 % in znižali verjetnost nastanka periapikalnih lezij v 66 % primerov (Skalerič, 1995).

Zaradi počasnega sproščanja CHX so ugotovili znatno redukcijo bakterij *E. faecalis*, tudi 7 dni po končanem endodontskem zdravljenju, medtem ko je v istem času po uporabi 5,25 % NaOCl, bakterijsko breme naraslo na začetno vrednost (Dametto in sod., 2005).

Nizke koncentracije CHX delujejo bakteriostatično. Iz bakterijskih celic se sproščajo snovi z nizko molekularno težo, kot sta fosfor in kalij. Ob višjih koncentracijah pa je CHX baktericiden, saj povzroči obarjanje in koagulacijo citoplazme. Baktericidni učinek je posledica številnih citoloških in fizioloških sprememb v bakterijski celici. Kationske molekule CHX se zaradi elektrostatskega privlaka hitro vežejo na negativno nabito površino bakterijske celice, predvsem na fosfat vsebujoče predele. Vezavi sledi trenutna nevtralizacija in nato sprememba površinskega naboja celice. Molekule CHX tekmujejo s kovinskimi kationi za vezavo na negativno nabite predele peptidoglikana. Porušena je integriteta zunanje membrane po Gramu negativnih bakterijskih celic, sledi izločanje divalentnih kationov, predvsem kalcijevih.

Za letalni učinek CHX je odločilna okvara citoplazemske membrane. Povečana je prepustnost membrane, izločanje intracelularnih sestavin, inhibirani so tudi določeni membransko vezani encimi, kot adenzil trifosfataza. Ob bakteriostatičnih koncentracijah CHX si bakterije, kljub 50 % izgubljenih fosfornih in kalijevih ionov, opomorejo. Ob povišani koncentraciji CHX pa se začno izločati molekule z visoko molekularno težo, kot so nukleotidi. Proces je ireverzibilen ob izgubi več kot 15 % nukleotidov. Zelo visoke koncentracije CHX (100-500 mg/L) pa povzročijo obarjanje citoplazme, kot posledica interakcije CHX in fosfatnih ostankov, predvsem adenzin trifosfata (ATP) in nukleinskih kislin (Denton, 2001). CHX ne inaktivira LPS, strukturnih komponent zunanje membrane po Gramu negativnih bakterij, ki se sprostijo ob celični smrti oziroma so izločeni z vezikli vitalnih bakterij (Vianna in sod., 2004).

CHX učinkuje protimikrobno proti vegetativnim po Gramu pozitivnim in po Gramu negativnim bakterijam. Na bakterijske spore deluje le ob povišani temperaturi, inaktivira tudi nekatere lipofilne viruse (npr. virus influence, herpesvirus, HIV). Občutljive pa so tudi kvasovke in dermatofiti. Fungicidno delovanje variira med vrstami gliv (Denton, 2001). CHX se je izkazal za uspešno sredstvo za zdravljenje kandidiaze, saj je v *in vivo* in *in vitro* pogojih, značilno zmanjšal lepljenje *C. albicans* na epiteljske celice lične sluznice. Vpliva tudi na hitrejšo odstranitev vnetja sluznice pod protezo in hitrejšo celjenje aftoznih ulceracij (Skalerič, 1995).

CHX ima poleg ugodnih učinkov za preprečevanje in zdravljenje različnih bolezni v ustni votlini tudi nezaželene stranske učinke, ki jih razdelimo na nezaželene stranske učinke na celice, sistemske stranske učinke in stranske učinke po uporabi v ustni votlini. (Skalerič, 1995). Med nezaželene učinke na celice sodi citotoksičnost za eritrocite in levkocite ter fibroblaste, pri koncentraciji višji od 0,01 %. Taka koncentracije sproži tudi povečano izločanje lizosomalnih encimov iz makrofagov, nižje koncentracije pa zavrejo sproščanje reaktivnih vrst kisika iz stimuliranih nevtrofilcev in tako zmanjšajo njihovo baktericidno sposobnost.

Med sistemske stranske učinke sodi pojav kontaktnega dermatitisa, urtikarije in celo pojav anafilaktičnega šoka po aplikaciji 0,02-1 % koncentracije CHX na kožo, sluznice in rane pred kirurškim posegom.

Najpogostejši nezaželeni učinek uporabe CHX v ustni votlini pa je rumeno rjavo zabarvanje zob, plomb, prevlek in jezika. Drugi stranski učinki so še motnje v okušanju, predvsem za slano in sladko, luščenje ustne sluznice ter moten proces celjenja ran.

### **2.6.3 Protimikrobni učinek hkratne uporabe kalcijevega hidroksida in klorheksidina**

Malo je znanega o protimikrobnem delovanju hkratne uporabe različnih kombinacij intrakanalnih irigantov.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in CHX sta najučinkovitejša protimikrobna agensa, zato so preučili potencialni aditivni učinek njune kombinacije na običajne endodontske patogene. Občutljivost obveznih anaerobov, kot sta *P. gingivalis* in *Fusobacterium nucleatum*, je za posamezen irigant zelo visoka, zato pri kombiniranju obeh ni zaznati aditivnega učinka. Sinergistični protimikrobni učinek pa je razviden proti nekaterim po Gramu pozitivnim bakterijam, kot so *P. micros*, *S. intermedius* in *E. faecalis* (Podbielski in sod., 2003). Kombinacija  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in CHX je pokazala dolgotrajnejše delovanje proti *E. faecalis* kot le  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , medtem ko je bil CHX enako učinkovit (Almyroudi in sod., 2002).

V raziskavi Schafer in Bossmann (2005) se je CHX izkazal za značilno učinkovitejši irigant od  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  in tudi od kombinacije obeh. Haenni in sod. (2003) so dokazali zmanjšano protimikrobno delovanje CHX ob dodatku  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , proti *E. faecalis* in *C. albicans*. Topnost CHX je namreč odvisna od pH, zato lahko dodatek močne baze zniža potencialni aditivni učinek takšne kombinacije (Podbielski in sod., 2000).

#### **2.6.4 *In vitro* testiranje protimikrobnega spektra delovanja endodontskih irigantov**

Za uspešen nadzor nad patogenimi mikroorganizmi v ustni votlini je potrebno oceniti protimikrobni učinek in spekter delovanja endodontskih irigantov ter možnost razvoja bakterijske odpornosti. *In vitro* testi dajejo osnovne podatke za razvoj in validacijo *in vivo* testiranja. Leta 1979 je FDA (ang. Food and Drug Administration) predlagala nekatere *in vitro* teste, ki bi zagotovili podatke o protimikrobni aktivnosti produkta: test minimalne inhibitorne koncentracije (MIC), test razvoja odpornosti (DOR- ang. development of resistance) in test časovne mikrobne inhibicije (TK- ang. time kill). Ker protokoli niso standardizirani, primerjava rezultatov dobljenih v različnih laboratorijskih raziskavah ni možna (Hobson in Bolsen, 2001). Pri vrednotenju podatkov moramo biti pozorni na uporabljeno metodo. Pri izbiri ustreznega *in vitro* protokola je potrebno upoštevati številne parametre, ki v čim večji meri simulirajo *in vivo* razmere. Najpomembnejši parametri so: (i) izbira najbolj primernih bakterijskih vrst (ii) realno in točno določeno število bakterij (iii) faza bakterijske rasti podobna *in situ* razmeram (npr. tvorba biofilma) (iv) ustrezni rastni pogoji (pH, atmosfera, različne bakterijske vrste) (v) vrsta in volumen testnega medija (vi) ponovljivost in primerljivost testnih razmer.

Pred in ob različnih časovnih intervalih med testiranjem endodontskih irigantov, je mikrobno breme potrebno kvantificirati, saj je cilj endodontskega zdravljenja sterilizacija koloniziranih predelov koreninskega kanala. Kvantifikacija ob različnih časovnih intervalih pa omogoča določitev optimalnega časa učinkovanja iriganta. Za različne mikroorganizme se ta čas razlikuje (Podbielski in sod., 2000).



Za vrednotenje protimikrobnega delovanja endodontskih irigantov so v splošnem v uporabi tri *in vitro* metode. **Dilucijska metoda** poda kvantitativne rezultate za določeno količino protimikrobnega sredstva, **metoda difuzije v agarju** (ADT- ang. agar diffusion test) ustvari inhibicijske cone okoli odprtin z irigantom in **metoda neposredne izpostavitve** (DET- ang. direct exposure test) daje kvalitativne informacije o učinkovini. Vse omenjene metode imajo tako prednosti kot slabosti.

Dilucijska metoda je uporabna le za protimikrobna sredstva, ki so topna v gojitvenem mediju. ADT ne razlikuje med bakteriostatičnim in bakteriocidnim delovanjem iriganta ter ne daje informacije o preživetju testnih mikroorganizmov. Poleg tega je velikost inhibicijskih con odvisna od topnosti in difuzije protimikrobnega agensa v agarju, kar ne poda realnega protimikrobnega učinka. Agar je trdni medij, kar oteži difuzijo hidroksilnih ioniv iz paste  $\text{Ca(OH)}_2$  in je zato potrebna preinkubacija (Estrela in sod., 2001). Koncentracijski gradient se pri ADT ustvari v 24-48 urah, medtem ko je potreben inkubacijski čas za intrakanalni irigant od 1 do več tednov (Podbielski in sod., 2000).

Uporaba metod, ki se izvajajo v tekočem gojitvenem mediju je natančnejša in učinkovitejša, saj dopušča različnim formulacijam protimikrobnega iriganta podobne pogoje za difuzijo. DET temelji na neposrednem in tesnem kontaktu testnih mikroorganizmov in iriganta ter je neodvisna od drugih variabilnih dejavnikov, kar jo uvršča med najuporabnejše laboratorijske metode testiranja protimikrobnega spektra delovanja (Vianna in sod., 2005).

## 2.7 VZROKI ZA NEUSPEŠNO ENDODONTSKO ZDRAVLJENJE

Ključnega pomena za uspeh endodontskega zdravljenja je temeljito mehanično širjenje in obdelava koreninskega kanala. Z vstavitvijo protimikrobnega iriganta se le odstrani morebitne ostanke bakterij v nedosegljivih predelih in akcesornih kanalih. Glavni vzroki za zaplete so nezadostna mehanska odstranitev nekrotičnega pulpinega tkiva in bakterij iz koreninskega kanala, neustrezna koreninska polnitev in odporni bakterijski sevi v periapeksu (Potočnik, 1995; Gašperšič in sod., 2000).

Pri zobeh, ki po dveh ali treh menjavah protimikrobnega iriganta še vedno kažejo znake vnetja, se dodatno kemično in mehansko širi koreninski kanal, v kanal se vstavi  $\text{Ca(OH)}_2$  pasto. Običajno zadostuje t. i. kratka obravnava s pasto za 2-3 tedne. Če po tem času še niso ustvarjeni pogoji za dokončno polnitev koreninskega kanala, se nadaljuje s t. i. dolgo obravnavo za 2-3 mesece. Če opisani postopek ne odpravi vnetja, pomeni, da določene bakterije še naprej vzdržujejo vnetje. Priporoča se odvzem vzorca iz koreninskega kanala za osamitev povzročiteljev okužbe in antibiogram. Z ustreznim antibiotikom, ki se daje sistemsko, se nadaljuje zdravljenje (Potočnik, 1995). Ponovno koreninsko zdravljenje ni redkost pri zdravih ljudeh. Ocenjuje se, da dobra četrtina endodontsko obdelanih in polnjenih kanalov potrebuje ponovno zdravljenje (Gašperšič in sod., 2000). Povsem neuspešna endodontska zdravljenja zahtevajo kirurško obravnavo. Problem neučinkovitega endodontskega zdravljenja se pojavlja tudi pri nadpovprečno velikih periapikalnih procesih, kot sta kronični parodontitis in radikularna cista. S primerno modifikacijo klasičnih endodontskih metod, predvsem s povečanim številom sej, izdatnim mehanskim čiščenjem in izpiranjem kanalov ter večkratno menjavo irigantov, se da še tako velike kostne defekte uspešno zdraviti ali vsaj toliko zmanjšati, da je potem smiselno kirurško zdravljenje (Klemenc, 1997).

### **2.7.1 Vzroki za neuspešne koreninske polnitve**

Koreninska polnitev je poseg, s katerim se prostor tkiva zobne pulpe po fizikalni, kemični ali farmakološki obdelavi napolni z umetno snovjo, ob predpostavki, da je pulpin prostor prazen in steril. Koreninske polnitve ni uspešna takrat, če v eni ali več zahtevah odstopa od definicije koreninske polnitve. Takšna polnitev je lahko netesna ali porozna ter nepopolna ali čezmerna. Vzroki za neuspešno koreninsko polnitev so lahko objektivni ali subjektivni ali pa kombinacija obeh. Pomembno jih je prepoznati in izključiti vsaj vpliv subjektivnih vzrokov (Klemenc, 1999).

**Objektivni vzroki** so lahko:

- **anatomske razmere**, kot so nepravilnosti v poteku korenin, številne pulpoperiodontalne komunikacije, ki otežijo instrumentiranje koreninskega kanala.
- »**stopničke**« nastanejo zaradi neustreznega instrumentiranja koreninskega kanala in posledične nepopolne koreninske polnitve
- **lega zoba ali zobnega krna** lahko otežuje dostop do koreninskih kanalov
- **bakterijska odpornost** na uporabljen irigant lahko zdravljenje zoba močno podaljša ali celo onemogoči uspešno koreninsko polnitev
- **psihofizični status pacienta**, ki je nemiren ali čezmerno občutljiv lahko tudi onemogoča natančno polnitev

**Subjektivni vzroki** so lahko: napačna ali neustrezna diagnoza, nečisto delo, delo brez rentgenskega posnetka, premajhna dostopna kaviteta, prehitro ali nestrokovno delo.

### 2.7.2 Odpornost mikroorganizmov proti endodontskim irigantom

Poglavitni vzrok neuspešnega endodontskega zdravljenja je perzistentna ali sekundarna intraradikularna okužba, ki je posledica preživetje mikroorganizmov v apikalnem predelu koreninsko polnjenega zoba. Ekstraradikularne bakterijske okužbe so manj pogost vzrok (Stuart in sod., 2006; Siqueira, 2001).

Primarne okužbe koreninskega kanala povzročajo številni in raznovrstni mikroorganizmi, medtem ko v sekundarno okuženih kanalih prevladujeta 1 do 2 mikrobnih vrsti. V nezdravljenem koreninskem kanalu navadno najdemo od 3 do 10 različnih mikrobnih vrst, predvsem anaerobne po Gramu negativne ter po Gramu pozitivne bakterije. Z neuspešnim endodontskim zdravljenjem pa povezujejo fakultativne anaerobe, predvsem po Gramu pozitivne, in nekatere glive (Gomes in sod., 2004; Haenni in sod., 2003). Fakultativni mikroorganizmi kot so *E. faecalis*, *S. aureus* in gliva *C. albicans* so najodpornейše mikrobnе vrste v ustni votlini, proti katerim je endodontsko zdravljenje največkrat neuspešno.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se je kot intrakanalni irigant izkazal za neučinkovitega *in vivo*. Vrste

rodu *Enterococcus* in *Candida* so namreč visoko tolerantne za bazičen pH, zato je priporočljivejša uporaba kombiniranih endodontskih irigantov, npr.  $\text{Ca(OH)}_2$  in CHX ali  $\text{Ca(OH)}_2$  in NaOCl v pasti.

Rod *Enterococcus* so po Gramu pozitivni koki, kokobacilarne oblike, ki se pojavljajo posamezno, v parih ali v kratkih verižicah. So fakultativni anaerobi, optimalno rastejo pri  $35^\circ\text{C}$ , razmnožujejo pa se tudi pri 10 in  $65^\circ\text{C}$ . So homofermentativni, iz glukoze tvorijo mlečno kislino. Poznamo več vrst enterokokov. Pri človeku najpogosteje osamimo *E. faecalis* in *Enterococcus faecium*, ki sta pri zdravih osebah prisotna na sluznicah prebavil ter v majhnem številu na sluznici ust in rodil pri ženski. Pri vstopu v tkiva, primarno sterilne votline ali kri nastanejo različna vnetja, kot so okužbe sečil, sepsa, abscesi, endokarditis. Enterokoki so tudi pomembni povzročitelji bolnišničnih okužb. Enterokoki so sposobni preživetja v ekstremnih pogojih, kot so visoka T, alkalni pH in visoke koncentracije soli. Odporni so tudi na delovanje raznih detergentov, težkih kovin, alkoholov (Stuart in sod., 2006; Dragaš, 1996).

Med enterokoki, okužbe ustne votline najpogosteje povzroča *E. faecalis*. Povezujejo ga z okužbami koreninskih kanalov, apikalnim periodontitisom in periradikularnimi abscesi. Različne raziskave dokazujejo, da je prevalenca *E. faecalis* pri perzistentnih ali sekundarnih endodontskih okužbah kar devetkrat višja kot pri primarnih. Prav tako je *E. faecalis* večkrat zaznati pri asimptomatskih kroničnih procesih kot pri simptomatskih in akutnih (Stuart in sod., 2006; Roças in sod., 2004).

*E. faecalis* ima številne virulenčne dejavnike, ki omogočajo pritrnitev na celice gostitelja, kompeticijo z drugimi bakterijami ter vmešavanje v gostiteljev imunski odziv. Citolizin povzroči lizo humanih celic, litična encima sta še gelatinaza in hialuronidaza, ki prav tako povzročata tkivne poškodbe. Agregacijske substance so odgovorne za vezavo *E. faecalis* na levkocite in ekstracelularni matriks ter koagracijo z drugimi bakterijskimi vrstami, kot je npr. *F. nucleatum*. Sposobnost koagracije prispeva tudi k tvorbi biofilma in zmanjšani občutljivosti za endodontske irigante (Johnson in sod., 2006). Fenotipske lastnosti *E. faecalis* so v strukturi biofilma drugačne od planktonskih. Mehanizem odpornosti biofilmov še ni popolnoma raziskan, obstajajo pa številne hipoteze.

Ekstracelularni polisaharidni matriks inaktivira protimikrobni agens in preprečuje njegovo prodiranje v biofilm. Zaradi zmanjšane količine hranil in stresnega odziva, vstopijo bakterije v stacionarno fazo rasti, spremenjena pa je tudi zgradba notranje membrane, proteinov idr., kar dodatno zmanjša protimikrobni učinek (Abdullah in sod., 2005). Ostali virulenčni dejavniki so še produkcija feromonov, kratkih linearnih peptidov, ki delujejo kot kemoatraktanti za nevtrofilce in so vpleteni v konjugativni prenos plazmidov, ter lipoteihoična kislina, ki omogoča pritrditev na površino gostiteljskih celic in produkcijo citokinov (Roças in sod., 2004).

*E. faecalis* v splošnem ni visoko virulenten mikroorganizem, temveč je oportunistični patogen. Tesna povezanost *E. faecalis* z neuspešnim endodontskim zdravljenjem, je zato v večji meri posledica odpornosti proti intrakanalnemu irigantom. *E. faecalis* ima sposobnost globokega prodiranja v dentinske tubule in se tako izogne mehansko-kemičnemu čiščenju koreninskih kanalov. V nekaterih primerih neuspešnega zdravljenja so *E. faecalis* izolirali kot monokulturo, zaradi prehranske neodvisnosti od drugih bakterij in sposobnosti prevzemanja hranil iz seruma. Poleg tega ima *E. faecalis* sposobnost daljšega obdobja stradanja.  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  se je izkazal kot neuspešen intrakanalni irigant pri odstranitvi *E. faecalis*, saj ima le-ta pasivno pH homeostazo, preko protonske črpalke pa dodatno črpa protone v celico in s tem znižuje pH citoplazme. *E. faecalis* je sposoben preživetja tudi pri pH višjem od 11,5. Poleg tega določene komponente dentina dodatno inhibirajo delovanje  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , saj delujejo kot pufer, kar znižuje pH (Stuart in sod., 2006).

Za uspešno odstranitev *E. faecalis* iz dentinskih tubulov je po novejših raziskavah (Stuart in sod., 2006) optimalen sledeči protokol: razkuževanje ustne votline s CHX, obsežna preparacije dostopne kavitete, aseptična mehanska obdelava koreninskega kanala, kemična obdelava z intrakanalnimi iriganti (6 % NaOCl, 17 % EDTA, 2 % raztopina CHX) ter medsejnimi iriganti (2 % CHX v gelu oziroma 2 % CHX gel v kombinaciji s  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) ter tesna koreninska polnitev.

Ustna kandidioza ja najpogostejša glivična okužba v ustih. Glive rodu *Candida* so del normalne flore ustne votline, žrela, prebavnih poti in kože. Ob motenem ravnovesju z drugimi mikroorganizmi normalne človeške flore in ob zmanjšani imunski sposobnosti se

čezmerno namnožijo in povzročijo znake površinske kandidioze ali se hematogeno širijo in povzročijo sistemsko okužbo. Najpogostejša in najpomembnejša je okužba s *C. albicans*. Ustna kandidioza se kaže v obliki belih ali rumenobelih oblog na nebu, lični sluznici ali jeziku. Dejavniki, ki dodatno pripomorejo k nastanku ustne kandidioze so slaba ustna higiena, velika koncentracija glukoze pri diabetikih, premajhna koncentracija serumskega železa in folne kisline (Ihan Hren, 2002).

Malo je znanega o mehanizmih odpornosti *C. albicans* proti endodontskim irigantom, razen tega da so sposobne preživetja v visoko bazičnem okolju.

## 2.8 UPORABA LASERJA V ZOBOZDRAVSTVU

V medicini in zobozdravstvu so v uporabi laserji različnih vrst, ki se med seboj ločijo po uporabljenem aktivnem materialu ter valovni dolžini in barvi svetlobe, ki jo oddajajo. Poznamo torej plinske, tekočinske, trdne in polprevodne laserje, ki lahko oddajajo svetlobo X-žarkov (od  $< 100$  nm), UV, vidno (385-760 nm), infrardečo in mikrovalovno svetlobo ( $> 10^6$  nm). Med najbolj uporabnimi in najvarnejšimi laserji v zobozdravstvu sta CO<sub>2</sub> in helij-neon (He-Ne) plinska laserja ter skupina laserjev zasnovanih na kristalih itrija in aluminija YAG (ang. Yttrium Aluminium Garnet), kombiniranih z različnimi atomi ali ioni, neodimij (Nd:YAG), erbij (Er:YAG), holmij (Ho:YAG) idr. Laserje lahko klasificiramo tudi po moči svetlobe, ki jo oddajajo. Laserji z nizko močjo sevanja od 1 do 5 mW so t. i. šibki laserji. Srednje močni laserji so moči od 6 do 50 mW, tisti z močjo nad 500 mW pa so t. i. močni laserji. Še pomembnejša od valovne dolžine in moči svetlobe pa je gostota moči (W/cm<sup>2</sup>) oziroma gostota energije (J/cm<sup>2</sup>) laserja, ki v praksi poda globino prodiranja laserskega žarka v tkivo (J/cm<sup>3</sup> oz. W/cm<sup>3</sup>). Ker je biološko tkivo nehomogene strukture, je prodiranje svetlobe vanj zelo kompleksno. V višjih plasteh tkiv prihaja do absorpcije, odboja, razpršitve in prepuščanja svetlobe v tkivo, v odvisnosti od tkivne strukture, valovne dolžine, moči in gostote svetlobe ter od časa obsevanja. Absorbirana energija se pretvori v druge oblike energije. Fotoni, ki vstopajo v tkivo, sprožijo verižno reakcijo in s tem biološki učinek tudi v globljih plasteh in okolici. Znane so tri vrste bioloških učinkov obsevanja z laserjem: fotobiokemični, fototermalni in fotoionizirajoči učinek.

- (a) Fotobiokemični učinek temelji na specifičnih kemičnih in metabolnih reakcijah znotraj celice (fotoindukcija, fotorezonanca in fotoaktivacija) združenih v t. i. biostimulacijske reakcije, ki jih sproži obsevanje s šibkimi in srednje močnimi laserji. Biostimulacija je učinek t. i. fotodinamskega zdravljenja, ki se že dalj časa uporablja v medicini in je v razmahu tudi v zobozdravstvu.
- (b) Fototermalni učinek nastane zaradi transformacije svetlobne energije v toplotno. V odvisnosti od temperature nastopi tkivna koagulacija (60-100°C), oglenitev in izhlapevanje vode (100-300°C) in izhlapevanje ostalih celičnih sestavin (>300°C). Toplotni učinek povzročajo močnejši laserji, npr. CO<sub>2</sub> laser, Nd:YAG laser in močni diodni laserji, ki se uporabljajo predvsem za kirurško odstranitev tkiva, slednja pa sta učinkovita tudi v endodontiji.
- (c) Fotoionizirajoči učinek nastopi ob obsevanju z laserjem močnejše gostote od 10<sup>7</sup> W/cm<sup>2</sup>, v kratkih pulznih intervalih. Svetlobna energija je transformirana v kinetično, prekinejo se kemijske vezi med atomi, kar povzroči disociacijo tkiva do ionov. Kljub lokalnem segrevanju ni toplotnega učinka na okoliško tkivo, fotoionizirajoči učinek nastopi pred možnostjo toplotnega učinka. Še močnejši laserji (10<sup>9</sup> W/cm<sup>2</sup>) povzročijo ob kratkotrajnem obsevanju mehanske poškodbe tkiv, trdna tkiva se zlomijo.

Vse naštetu vpliva na izbiro laserja in uspešnost zdravljenja v zobozdravstvu. Laserji so uporabni v vseh vejah zobozdravstva. Natančni kirurški rezi zahtevajo kratko obsevanje z močnimi laserji, v endodontiji pa je učinkovitejše časovno daljše obsevanje z šibkimi laserji, kar sproži proces biostimulacije (Pokora, 2001).

### **2.8.1 Fotodinamsko zdravljenje v endodontiji**

Namen endodontskega zdravljenja je sterilizacija zobne pulpe in koreninskih kanalov. Ker je visok odstotek zdravljenj s klasičnimi endodontskimi metodami neuspešnih, bodisi zaradi perzistence bakterij v anatomske nedostopnih predelih, mikrobne odpornosti proti

endodontskim irigantom ali rekontaminacije, prihaja v zadnjem desetletju vse bolj v veljavo nov pristop k endodontskemu zdravljenju, to je uporaba laserja.

Za razkuževanje zobnih kanalov se uporabljajo tako močnejši kot tudi šibkejši laserji. Prednost obsevanja s šibkimi laserji je, da ne povzročajo toplotnega učinka in s tem povezanih kolateralnih okvar tkiva (Wainwright, 1998). Fotodinamsko zdravljenje (PDT-ang. photodynamic therapy) temelji na aktivaciji netoksičnega fotosenzoričnega sredstva (FS) s svetlobo ustrezne valovne dolžine. Aktivirano FS v triplet stanju, reagira z molekularnim kisikom, nastanejo visoko reaktivne oblike kisika, singlet kisik, in prosti radikali, kar poškoduje celične komponente tarčnega tkiva. PDT se uporablja pri zdravljenju različnih malignih in nemalignih bolezni, v zadnjih letih pa se je izkazalo tudi kot uspešna protimikrobna strategija, predvsem proti lokaliziranim okužbam s patogenimi mikroorganizmi, kot so okužbe ustne votline (Soukos in sod., 2006).

Fotosenzorična sredstva so navadno aromatske molekule različnih struktur in zmožnosti absorpcije različnih valovnih dolžin svetlobe. Uporaba kationskih FS, kot sta toluidinsko modrilo (TM) in metilensko modrilo (MM), deluje selektivno saj pospeši vezavo in vdor FS v mikrobnne celice in ne v humane. TM in MM nista toksična za humane celice, aktivira ju že šibek infrardeči laserski žarek. TM in MM sta sorodni FS iz fenotiazinske skupine, tarčni mesti njunega delovanja sta celična membrana in nukleinske kisline (Garcez in sod., 2007).

Znani sta dve vrsti fotodinamskega učinka. V reakciji vrste I nastajajo reaktivni prosti radikali, ki ob reakciji s kisikom tvorijo vodikove perokside membranskih fosfolipidov. Lipidna peroksidacija poruši membransko integriteto, kar rezultira v povečani prepustnosti. Tarčna mesta hidroksilnih radikalov so tudi aminolipidi, peptidi, membranski encimi in receptorji ter nukleinske kisline.

Glavna pot fotooksidacije (reakcija vrste II) mikrobnih celic je oksidacija s singlet kisikom, katere tarčna mesta so prav tako membranski fosfolipidi, peptidi, steroli (glive), gvaninske in metioninske baze nukleinskih kislin ter aminokisline, triptofan idr. (Wainwright, 1998).



PDT je učinkovito proti številnim bakterijam, glivam in virusom. V splošnem so po Gramu pozitivne bakterije bolj občutljive za PDT, saj imajo enojni lipidni dvosloj in relativno prepustno zunanjo steno. Struktura po Gramu negativnih bakterij je kompleksnejša, z dvojnimi lipidnimi dvoslojem. *C. albicans* se je izkazala ob uporabi TM in PDT za najbolj odporno, jedrna membrana namreč predstavlja dodatno oviro za prodiranje FS. Zmanjšana občutljivost *C. albicans* za PDT je tudi posledica velikosti celice in odpornosti vakuol proti TM in PDT (Deminova in Hamblin, 2005; Lambrechts in sod., 2005). Tudi *E. faecalis*, glavni povzročitelj neuspešnega endodontskega zdravljenja, je v nekaterih raziskavah pokazal zmanjšano občutljivost za PDT (Soukos in sod., 2006).

Kombinacija PDT in klasičnega endodontskega zdravljenja se je izkazala za najbolj uspešno. Zmanjšanje mikrobnega bremena je >98 %, kar je značilno več kot ob zdravljenju zgolj z eno od metod. Še pomembneje pa je, da je kombinirano zdravljenje učinkovito tudi po 24h (Garcez in sod., 2007). PDT poleg uspešnega protimikrobnega delovanja, stimulira obnovo okoliškega tkiva, pospešuje celjenje ran in zmanjšuje bolečino. PDT ne povzroča sistemskih stranskih učinkov, saj je njegovo delovanje lokalizirano. Zaradi mikrobne inaktivacije po oksidativni poti, odpornost mikrobov proti PDT ni znana.

### 3 MATERIAL IN METODE

#### 3.1 MATERIAL

Za ugotavljanje protimikrobnega učinka smo uporabili standardna seva *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Candida albicans* ATCC 90028 ter tri protimikrobna sredstva:

- HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe in HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser (HELBO<sup>®</sup> MINILASER 2075 F dent) v kombinaciji s HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer, (HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, Grieskirchen, Avstrija).
- 0,5 % vodna raztopina klorheksidin diglukonata
- CALXYL<sup>®</sup> kalcijev hidroksid v pasti (OCO Präparate GmbH, Dirmstein, Nemčija).  
Sestava: 2.3g kalcijevega hidroksida in 2,7 g barijevega sulfata na 10 g paste.

Za ugotavljanje protimikrobnega učinka klorheksidin diglukonata in kalcijevega hidroksida smo uporabili naslednja tekoča gojišča:

- kationsko prilagojen Mueller-Hinton bujon (MHB) (20 do 25 mg Ca<sup>2+</sup>/L in 10 do 12,5 mg Mg<sup>2+</sup>/L) (Ferraro M.J. in sod., 2003)
- RPMI 1640 medij (Roswell Park Memorial Institute 1640 medium) (10,4 g RPMI 1640/L, 34,53 g MOPS/L, 1,8 g dekstroze/L, 0,3 g glutamin/L in destilirana voda do 1L), pH=7
- nevtralizator klorheksidin diglukonata s fiziološko raztopino (Tween 80, 0,07 % lecitin in 0,9 % NaCl s histidinom)
- Brain-Heart Infusion (BHI) z 0,5 % citronske kisline (37 g BHI, 5 g citronska kislina in destilirana voda do 1L)

#### 3.2 METODE

##### 3.2.1 Določanje koncentracije mikrobne suspenzije

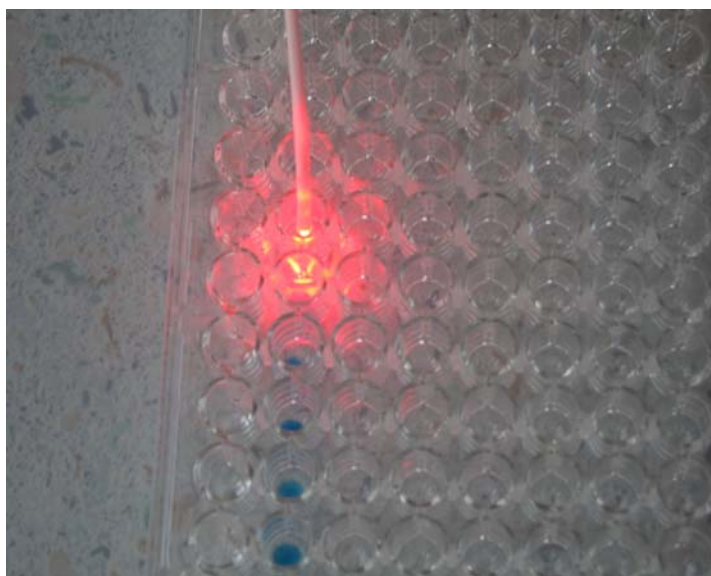
Iz kulture standardnih sevov *E. faecalis* ATCC 29212 in *C. albicans* ATCC 90028 smo ločeno pripravili 10-kratne serijske razredčine v fiziološki raztopini. V epruveto z 2 ml

0,85 % raztopine NaCl (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija) smo z 10 µl bakteriološko zanko dodali 24 urno kulturo standardnega seva *E. faecalis* oziroma *C. albicans*, da smo dosegli gostoto 0,5 McFarland (McF). Gostoto smo izmerili z nefelometrom (bioMerieux, Marcy l'Etoile, Francija). Vsebino epruvete smo dobro premešali in s pipeto odpipetirali 200 µl suspenzije v epruveto z 1,8 ml fiziološke raztopine. Novo suspenzijo smo ponovno dobro premešali, zgoraj opisani postopek smo ponavljali, dokler nismo dosegli zelenih razredčitev. Nato smo iz vsake epruvete z razredčinami  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  in  $10^{-5}$  odpipetirali 200 µl in jih inokulirali na plošče z gojiščem krvni agar (KA). Inokulum smo s sterilno hokejko razmazali enakomerno po površini gojišča in plošče inkubirali 24 ur (*E. faecalis*) oziroma 48 ur (*C. albicans*) pri 37°C. Po končani inkubaciji smo prešteli porasle kolonije na števnih ploščah (plošče, na katerih je zraslo 30 – 300 kolonij). Vsaka porasla kolonija na KA je predstavljala 1 CFU (ang. colony forming units). Razredčinam smo določili koncentracijo bakterij oziroma gliv v CFU/ml.

### **3.2.2 *In vitro* protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser)**

Kulturo standardnega seva *E. faecalis* in *C. albicans* smo individualno inokulirali v epruvete z 2 ml sterilne fiziološke raztopine. Tako smo pripravili več serij suspenzij, da smo dosegli gostoto 0,5 do >3 McF. Iz posamezne mikrobne suspenzije smo nato pripravili 10-kratne serijske razredčine v 900 µl fiziološke raztopine, od  $10^{-1}$  do  $10^{-8}$ . V vsako koncentrirano suspenzijo in vsako razredčino smo dodali kapljico fotosenzoričnega toluidinskega modrila HELBO® Blue Photosensitizer. Kapljico (10 µl) posameznih obarvanih suspenzij smo nato prenesli v mikrotitrsko ploščo s 96 vdolbinicami. Vsako kapljico smo takoj obsevali z laserjem HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) za 2 minuti (Slika 1). Takoj po obsevanju smo 10 µl kapljico inokulirali na gojišče KA in plošče inkubirali 24-48 ur pri 37°C. Po končani inkubaciji smo prešteli bakterijske oziroma glivne kolonije. Določili smo CFU/ml suspenzije.

Kot negativne kontrole smo uporabili 10 µl kapljice obarvanih koncentriranih suspenzij in posameznih razredčin, ki jih nismo obsevali. Po 2 minutah smo kapljice negativnih kontrol inokulirali na plošče s KA in nadaljevali po enakem postopku kot z obsevanimi suspenzijami.



Slika 1: Obsevanje 10 µl kapljic mikrobnih suspenzij z laserjem HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) ob dodatku HELBO® Blue Photosensitizer

### 3.2.3 *In vitro* protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata

Kulturo standardnega seva *E. faecalis* in *C. albicans* smo individualno inokulirali v epruvete z 2 ml sterilnega MHB (*E. faecalis*) oziroma RPMI 1640 medija (*C. albicans*), da smo dosegli gostoto 0,5 do >3 McF. Iz posamezne mikrobne suspenzije smo pripravili 10-kratne serijske razredčine v fiziološki raztopini (od  $10^{-1}$  do  $10^{-7}$ ) in s predhodno opisanim postopkom (3.2.1) določili izhodno koncentracijo mikrobne suspenzije (CFU/ml). Nato smo v epruveti pripravili 6 ml mikrobne suspenzije, destilirane vode in klorheksidin diglukonata, v razmerju 1:1:8, dobro premešali in pustili delovati različne časovne intervale: 1 min, 5 min, 1 h, 24 h in 7 dni. Po vsakem časovnem intervalu smo 100 µl mešanice prenesli v epruvetke z 900 µl nevtralizacijskega medija (Tween 80, 0,07 % lecitin in 0,9 % NaCl s histidinom), da bi ustavili protimikrobno delovanje klorheksidina,

vsebino smo dobro premešali. Po 5-ih minutah smo suspenzijo redčili v fiziološki raztopini ter 100  $\mu$ l iz vsake razredčine inokulirali na plošče s KA in inkubirali 24-48 ur pri 37°C. Po končani inkubaciji smo prešteli porasle bakterijske oziroma glivne kolonije ter določili CFU/ml suspenzije.

Kot negativne kontrole smo pripravili 6 ml mešanice izhodne mikrobne suspenzije in fiziološke raztopine v razmerju 1:9, dobro premešali in inkubirali različne časovne intervale: 1 min, 5 min, 1 h, 24 h in 7 dni. Po vsakem časovnem intervalu smo z negativnimi kontrolami postopali enako kot z eksperimentalnimi suspenzijami.

Ustreznost nevtralizatorja smo preverili tako, da smo v bistre epruvetke s klorheksidinom in nevtralizatorjem, brez mikrobne rasti, dodali 100  $\mu$ l izhodne mikrobne suspenzije ustrezne gostote (0,5 do >3 McF) in inkubirali 24 ur. Po končani inkubaciji smo 100  $\mu$ l nove suspenzije inokulirali na plošče s KA in ponovno inkubirali 24 ur. Nato smo preverili mikrobno rast na ploščah.

### **3.2.4 *In vitro* protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida**

Kulturo standardnega seva *E. faecalis* in *C. albicans* smo individualno inokulirali v epruvete z 2 ml sterilnega MHB oziroma RPMI 1640 medija, da smo dosegli gostoto 1 do >3 McF. Določili smo izhodno mikrobno koncentracijo vsake od suspenzij. V suspenzije smo za 5 minut pomočili sterilna papirnata šilca, jih nato prenesli v petrijevke in prekrili s pasto kalcijevega hidroksida CALXYL<sup>®</sup> (OCO Präparate GmbH, Dirmstein, Nemčija). Po časovnih intervalih 1 min, 5 min, 1h, 24h in 7 dni, smo papirnata šilca vzeli iz paste in jih namočili v 1 ml svežega BHI z nevtralizatorjem 0,5 % citrsko kislino. Vsebino smo dobro premešali ter po 5-ih minutah suspenzijo redčili v fiziološki raztopini ter 100  $\mu$ l iz vsake razredčine inokulirali na plošče s KA in inkubirali 24-48 ur pri 37°C. Z metodo viabilnega štetja na ploščah, smo določili CFU/ml suspenzije.

Kot negativne kontrole smo uporabili sterilna papirnata šilca, pomočena v mikrobno suspenzijo ustrezne gostote (1 do >3 McF) za 5 minut, ki jih nismo prekrili s pasto

Ca(OH)<sub>2</sub> in smo ji v petrijevkah inkubirali enake časovne intervale kot eksperimentalna šilca. Po končani inkubaciji smo z negativnimi kontrolami postopali enako kot z eksperimentalnimi šilci.

Ustreznost nevtralizatorja smo preverili tako, da smo v bistre epruvete BHI z 0,5 % citronsko kislino in papirnatimi šilci, brez mikrobne rasti, dodali 100 µl izhodne mikrobne suspenzije ustrezne gostote (1 do >3 McF) in inkubirali 24 ur. Po končani inkubaciji smo 100 µl nove suspenzije inokulirali na plošče s KA in ponovno inkubirali 24 ur. Nato smo preverili mikrobno rast na ploščah.

## 4 REZULTATI

### 4.1 PROTIMIKROBNI UČINEK LASERJA

#### 4.1.1 *In vitro* protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na *E. faecalis*

Pripravili smo devet različnih suspenzij standardnega seva *E. faecalis* ATCC 29212 s koncentracijo  $4,7 \times 10^7$ ;  $3,7 \times 10^8$ ;  $4,2 \times 10^8$ ;  $4,5 \times 10^8$ ;  $4,6 \times 10^8$ ;  $5,4 \times 10^8$ ;  $6,5 \times 10^8$ ;  $7,4 \times 10^8$ ;  $1,3 \times 10^9$  CFU/ml. V 10  $\mu$ l kapljicah, ki smo jih obsevali je bilo število bakterij sledeče:  $4,7 \times 10^5$ ;  $3,7 \times 10^6$ ;  $4,2 \times 10^6$ ;  $4,5 \times 10^6$ ;  $4,6 \times 10^6$ ;  $5,4 \times 10^6$ ;  $6,5 \times 10^6$ ;  $7,4 \times 10^6$ ;  $1,3 \times 10^7$  CFU. Po 2 minutnem obsevanju z laserjem, z gostoto moči vsaj 100 mW/cm<sup>2</sup> (HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG, 2003), ob dodatku fotosenzoričnega toluidinskega modrila (TM) HELBO® Blue Photosensitizer, smo v sedmih poskusih dosegli popolno zmanjšanje bakterijske rasti, ne glede na bakterijsko koncentracijo (Slika 2). V dveh poskusih inhibicija ni bila popolna. Po natančni analizi pogojev pri katerih je potekal poskus smo ugotovili, da je prišlo do pojecanja moči laserja zaradi izpraznjenja baterij, zato rezultata teh dveh meritev nismo upoštevali. Dobljeni rezultati so prikazani v Preglednici 1.

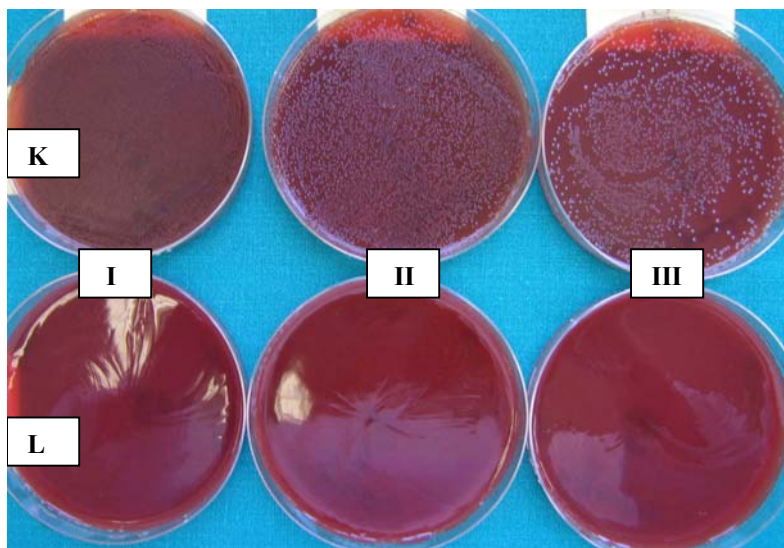
*In vitro* smo z uporabo HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) in HELBO® Blue Photosensitizer po dveh minutah dosegli zmanjšanje koncentracije *E. faecalis* za povprečno 6.6 logaritmov.

#### 4.1.2 *In vitro* protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na *C. albicans*

Pripravili smo sedem različnih suspenzij standardnega seva *C. albicans* ATCC 90028, ki so vsebovale  $2,4 \times 10^6$ ;  $2,4 \times 10^6$ ;  $2,4 \times 10^6$ ;  $3,6 \times 10^6$ ;  $4,8 \times 10^6$ ;  $5,1 \times 10^6$ ;  $5,8 \times 10^6$  CFU/ml. Po 2 minutnem obsevanju z laserjem ob dodatku TM smo dosegli zmanjšanje

glivne rasti za 0,8; 1,0; 2,1; 2,3; 2,1; 1,6 in 0,1 logaritmov (Slika 3). Dobljeni rezultati so prikazani v Preglednici 2.

*In vitro* smo z uporabo HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) in HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer po dveh minutah dosegli zmanjšanje *C. albicans* za povprečno 1,4 logaritma.



Slika 2: Primeri popolnega zmanjšanja rasti *E. faecalis* po 2 minutnem obsevanju z laserjem HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) ob dodatku HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer. Vrsta K – negativne kontrole (inokulirane 10  $\mu$ l kapljice suspenzije *E. faecalis* brez obsevanja). Količina *E. faecalis* v 10  $\mu$ l kapljici: I  $1,3 \times 10^7$  CFU; II  $4,5 \times 10^6$  CFU; III  $4,7 \times 10^5$  CFU. Vrsta L – inokulirane 10  $\mu$ l kapljice suspenzije *E. faecalis* po obsevanju.



Preglednica 1: Protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

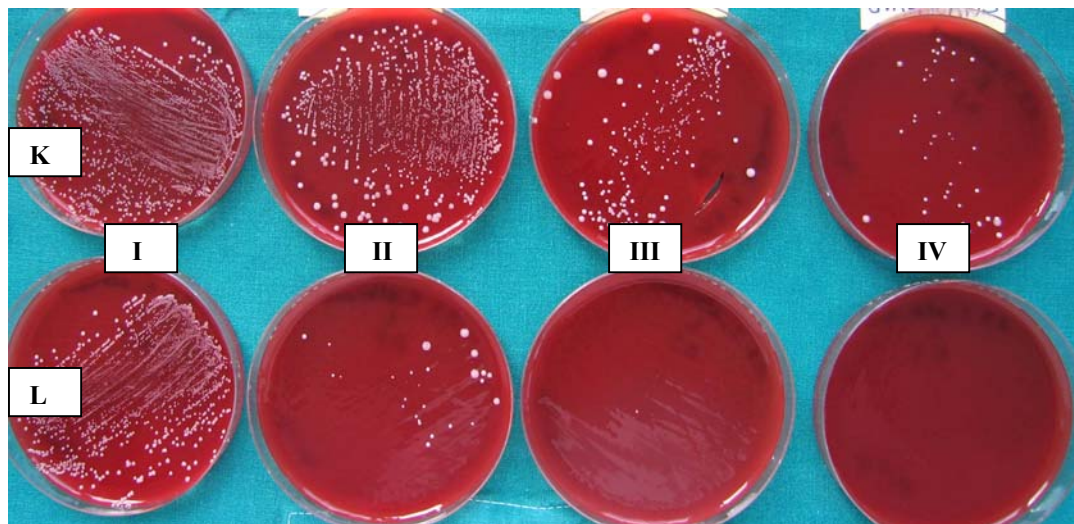
Gostota izhodne suspenzije <i>E. faecalis</i> [McF]		Izh. susp. [CFU]	Redčitev							Konc. končne suspenzije <i>E. faecalis</i> [CFU/10µl]	Zmanjšanje mikrobnega bremena [log]
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
0,5	Kontrola [CFU]	E	E	E	499	45	/	/	/	$4,7 \times 10^5$	5,7
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	/	/	/	0	
1	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	139	16	2	1	$3,7 \times 10^6$	6,6
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	650	27	0	0	$4,6 \times 10^6$	6,7
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	331	44	6	0	$4,5 \times 10^6$	6,6
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	487	37	4	0	$4,2 \times 10^6$	4,3
	Laser [CFU]	415	2	0	0	0	0	0	0	$2,1 \times 10^2$	
3	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	495	61	5	/	$5,4 \times 10^6$	6,7
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	0	0	/	0	
3	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	593	67	7	/	$6,5 \times 10^6$	3,4
	Laser [CFU]	0	0	44	1	4	/	/	/	$2,7 \times 10^3$	
>3	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	E	89	9	2	$1,3 \times 10^7$	7,1
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	/	/	/	0	
>3	Kontrola [CFU]	E	E	E	E	E	98	5	0	$7,4 \times 10^6$	6,9
	Laser [CFU]	0	0	0	0	0	/	/	/	0	

Legenda: E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve

Preglednica 2: Protimikrobni učinek laserja HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) na *Candida albicans* ATCC 90028

Gostota izhodne suspenzije <i>C. albicans</i> [McF]		Izh. susp. [CFU]	Redčitev						Konc. končne suspenzije <i>C. albicans</i> [CFU/10 $\mu$ l]	Zmanjšanje mikrobnega bremena [log]
			10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		
0,5	Kontrola [CFU]	E	E	227	26	/	/	/	$2,4 \times 10^4$	0,8
	Laser [CFU]	E	117	26	0	/	/	/	$3,8 \times 10^3$	
0,5	Kontrola [CFU]	E	E	267	21	/	/	/	$2,4 \times 10^4$	1,0
	Laser [CFU]	E	325	3	3	/	/	/	$2,2 \times 10^3$	
0,5	Kontrola [CFU]	E	E	267	21	/	/	/	$2,4 \times 10^4$	2,1
	Laser [CFU]	162	28	1	0	/	/	/	$1,8 \times 10^2$	
0,5	Kontrola [CFU]	E	E	300	41	/	/	/	$3,6 \times 10^4$	2,3
	Laser [CFU]	E	26	1	0	/	/	/	$1,8 \times 10^2$	
1	Kontrola [CFU]	E	E	355	39	7	0	0	$4,8 \times 10^4$	2,1
	Laser [CFU]	271	72	1	0	0	0	0	$3,6 \times 10^2$	
1	Kontrola [CFU]	E	E	456	47	6	0	0	$5,1 \times 10^4$	1,6
	Laser [CFU]	E	129	12	1	0	0	0	$1,2 \times 10^3$	
1	Kontrola [CFU]	E	E	506	62	6	kon.	0	$5,8 \times 10^4$	0,1
	Laser [CFU]	E	E	398	56	4	0	0	$4,5 \times 10^4$	

**Legenda:** E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve; kon. ... kontaminacija



Slika 3: Primeri popolnega zmanjšanja rasti *C. albicans* po 2 minutnem obsevanju z laserjem HELBO® 2D Spot Probe (HELBO® TheraLite Laser) ob dodatku HELBO® Blue Photosensitizer. Vrsta K – negativne kontrole (inokulirane 10  $\mu$ l kapljice suspenzije *C. albicans* brez obsevanja; količina *C. albicans* v 10  $\mu$ l kapljici: I  $3,6 \times 10^4$  CFU; II  $3,6 \times 10^3$  CFU; III  $3,0 \times 10^2$  CFU; IV  $4,1 \times 10$  CFU). Vrsta L – inokulirane 10  $\mu$ l kapljice suspenzije *C. albicans* po obsevanju; količina *C. albicans* v 10  $\mu$ l kapljici: I  $1,8 \times 10^2$  CFU; II  $2,6 \times 10$  CFU; III 1,0 CFU; IV ni rasti.

## 4.2 PROTIMIKROBNI UČINEK KLOORHEKSIDINA

### 4.2.1 *In vitro* protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata na *E. faecalis*

Pripravili smo tri suspenzije *E. faecalis* različnih koncentracij, ki so vsebovale  $1,4 \times 10^8$ ;  $6,0 \times 10^8$  in  $8,9 \times 10^8$  CFU/ml. Po dodatku CHX smo eksperimentalne mešanice inkubirali različne časovne intervale. Rezultati so prikazani v Preglednici 3.

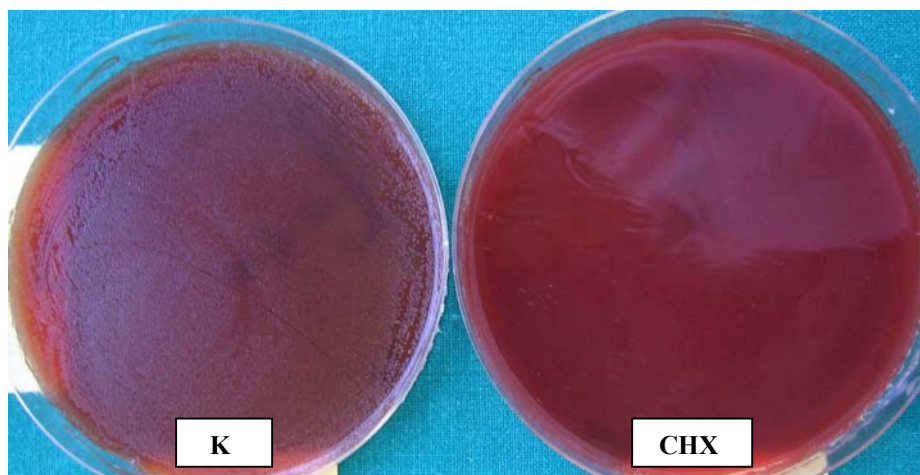
Kot je razvidno iz Preglednice 3, je prišlo do popolne inhibicije bakterijske rasti že po 1 minuti delovanja CHX (Slika 4), razen v primeru povečane bakterijske koncentracije ( $>3$  McF), kjer je bilo popolno zmanjšanje bakterijske rasti doseženo po 1 uri inkubacije.

Z uporabo 0,5 % CHX diglukonata smo v 1 minuti dosegli zmanjšanje rasti *E. faecalis* za povprečno 6,2 logaritmov, v 5-ih minutah za 7,4 logaritmov in v 1 uri za 8,9 logaritmov. Bakterijske rasti tudi po 24-ih urah in 7-ih dneh inkubacije s CHX nismo zaznali.

#### 4.2.2 *In vitro* protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata na *C. albicans*

Pripravili smo tudi tri izhodne suspenzije *C. albicans* koncentracij  $3,5 \times 10^6$ ;  $1,6 \times 10^7$  in  $4,2 \times 10^7$  CFU/ml. Popolno zmanjšanje glivne rasti smo dosegli že po 1 minuti inkubacije z CHX, neodvisni od mikrobne koncentracije (Slika 5). Dobljeni rezultati so prikazani v Preglednici 4.

Kot je razvidno iz Preglednice 4, 1 minutno delovanje 0,5 % CHX diglukonata rezultira v zmanjšanju koncentracije *C. albicans* za povprečno 7,2 logaritmov. Glivne rasti nismo zaznali tudi po 24-ih urah in 7-ih dneh inkubacije s CHX.



Slika 4: Primer popolnega zmanjšanja rasti *E. faecalis* po 1 minuti delovanja 0,5 % klorheksidin diglukonata. Plošča K – negativna kontrola (inokulirana suspenzija *E. faecalis* koncentracije  $5,9 \times 10^8$  CFU/ml, ki ni bila izpostavljena klorheksidin diglukonatu. Plošča CHX - inokulirana suspenzija *E. faecalis* koncentracije  $5,9 \times 10^8$  CFU/ml, po 1 minutni izpostavitvi klorheksidin diglukonatu.

Preglednica 3: Protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata (CHX) na *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

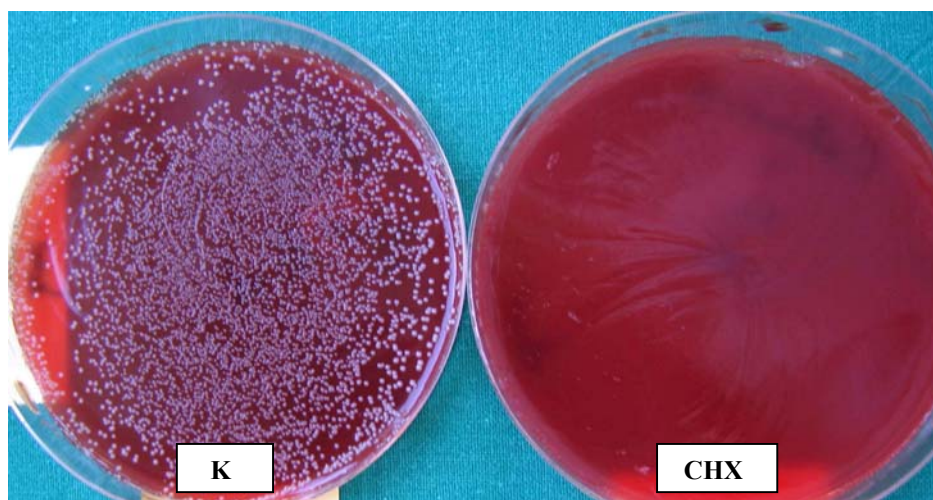
Gostota izhodne suspenzije <i>E. faecalis</i> [McF]	Čas Inkubacije		Redčitev								Konc. končne suspenzije <i>E. faecalis</i> [CFU/ml]	Zmanjšanje mikrobnega bremena [log]
			konc.	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>		
1		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	170	10	0	1,4 × 10 <sup>8</sup>	
	5 min	CHX -	E	E	E	187	16	3	0	/	2,1 × 10 <sup>8</sup>	8,3
		CHX +	0	0	0	0	0	0	0	/	0	
	1 h	CHX -	E	E	E	303	kon.	2	0	/	2,5 × 10 <sup>8</sup>	8,4
		CHX +	0	0	0	0	0	0	0	/	0	
	6 h	CHX -	E	E	E	374	45	3	0	/	3,7 × 10 <sup>8</sup>	8,6
		CHX +	0	0	0	0	0	0	0	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	E	211	26	0	0	/	2,4 × 10 <sup>8</sup>	8,4
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	/	0	
	7 dni	CHX -	E	E	E	84	12	/	/	/	1,0 × 10 <sup>8</sup>	7,0
CHX +		0	0	0	0	/	/	/	/	0		
3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	625	46	7	6,0 × 10 <sup>8</sup>	
	1 min	CHX -	E	E	E	E	66	1	1	0	5,9 × 10 <sup>8</sup>	8,8
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	/	0	
	5 min	CHX -	E	E	E	E	68	6	kon.	0	6,4 × 10 <sup>8</sup>	8,8
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	/	0	
	1 h	CHX -	E	E	E	E	97	4	0	0	6,9 × 10 <sup>8</sup>	8,8
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	E	E	109	6	0	0	8,5 × 10 <sup>8</sup>	8,9
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	/	0	
	7 dni	CHX -	E	E	E	347	55	3	/	/	4,0 × 10 <sup>8</sup>	7,6
CHX +		0	0	0	0	/	/	/	/	0		
>3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	E	97	8	8,9 × 10 <sup>8</sup>	
	1 min	CHX -	E	E	E	E	198	20	1	/	1,7 × 10 <sup>9</sup>	3,7
		CHX +	255	31	5	/	/	/	/	/	3,6 × 10 <sup>5</sup>	
	5 min	CHX -	E	E	E	E	180	19	0	/	1,9 × 10 <sup>9</sup>	5,2
		CHX +	11	0	0	/	/	/	/	/	1,1 × 10 <sup>4</sup>	
	1 h	CHX -	E	E	E	E	80	18	3	/	4,3 × 10 <sup>9</sup>	9,6
		CHX +	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	E	E	149	13	0	/	1,4 × 10 <sup>9</sup>	9,1
		CHX +	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	7 dni	CHX -	E	E	E	E	80	8	0	/	8,0 × 10 <sup>8</sup>	7,9
CHX +		0	0	0	/	/	/	/	/	0		

**Legenda:** CHX - ... brez klorheksidin diglukonata, negativna kontrola; CHX + ... s klorheksidin diglukonatom; E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve; kon. ... kontaminacija

Preglednica 4: Protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata (CHX) na *Candida albicans* ATCC 90028

Gostota izhodne suspenzije <i>C. albicans</i> [McF]	Čas Inkubacije		Redčitev							Konc. končne suspenzije <i>C. albicans</i> [CFU/ml]	Zmanjšanje mikrobnega bremena [log]
			konc.	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		
1		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	365	33	/	/	3,5 × 10 <sup>6</sup>	/
	1 min	CHX -	E	400	52	2	0	/	/	3,7 × 10 <sup>6</sup>	6,6
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	5 min	CHX -	E	373	31	4	0	/	/	3,6 × 10 <sup>6</sup>	6,6
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	1 h	CHX -	E	485	42	5	0	/	/	4,7 × 10 <sup>6</sup>	6,7
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	294	35	4	/	/	3,5 × 10 <sup>7</sup>	7,5
CHX +		0	0	0	0	0	/	/	0		
7 dni	CHX -	E	E	93	14	1	/	/	1,1 × 10 <sup>7</sup>	7,0	
	CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0		
3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	192	13	0	1,6 × 10 <sup>7</sup>	/
	1 min	CHX -	E	E	171	16	2	0	0	1,8 × 10 <sup>7</sup>	7,3
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	5 min	CHX -	E	E	206	37	1	0	0	2,3 × 10 <sup>7</sup>	7,4
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	1 h	CHX -	E	E	161	21	0	0	0	1,9 × 10 <sup>7</sup>	7,3
		CHX +	0	0	0	0	0	/	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	370	40	3	0	/	3,6 × 10 <sup>7</sup>	7,6
CHX +		0	0	0	/	/	/	/	0		
7 dni	CHX -	E	E	155	9	2	/	/	1,5 × 10 <sup>7</sup>	7,2	
	CHX +	0	0	0	/	/	/	/	0		
>3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	425	44	4	4,3 × 10 <sup>7</sup>	/
	1 min	CHX -	E	E	469	46	5	0	/	4,8 × 10 <sup>7</sup>	7,7
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	5 min	CHX -	E	E	476	61	7	0	/	6,0 × 10 <sup>7</sup>	7,8
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	1 h	CHX -	E	E	412	42	6	0	/	4,8 × 10 <sup>7</sup>	7,7
		CHX +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	24 h	CHX -	E	E	494	53	7	0	/	5,7 × 10 <sup>7</sup>	7,7
CHX +		0	0	0	/	/	/	/	0		
7 dni	CHX -	E	E	226	20	0	0	/	2,1 × 10 <sup>7</sup>	7,3	
	CHX +	0	0	0	/	/	/	/	0		

**Legenda:** CHX - ... brez klorheksidin diglukonata, negativna kontrola; CHX + ... s klorheksidin diglukonatom; E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve



Slika 5: Primer popolnega zmanjšanja rasti *C. albicans* po 1 minuti delovanja 0,5 % klorheksidin diglukonata. Plošča K – negativna kontrola (inokulirana suspenzija *C. albicans* koncentracije  $1,8 \times 10^7$  CFU/ml, ki ni bila izpostavljena klorheksidin diglukonatu. Plošča CHX - inokulirana suspenzija *C. albicans* koncentracije  $1,8 \times 10^7$  CFU/ml, po 1 minutni izpostavitvi klorheksidin diglukonatu.

#### 4.3 PROTIMIKROBNI UČINEK KALCIJEVEGA HIDROKSIDA

##### 4.3.1 *In vitro* protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida na *E. faecalis*

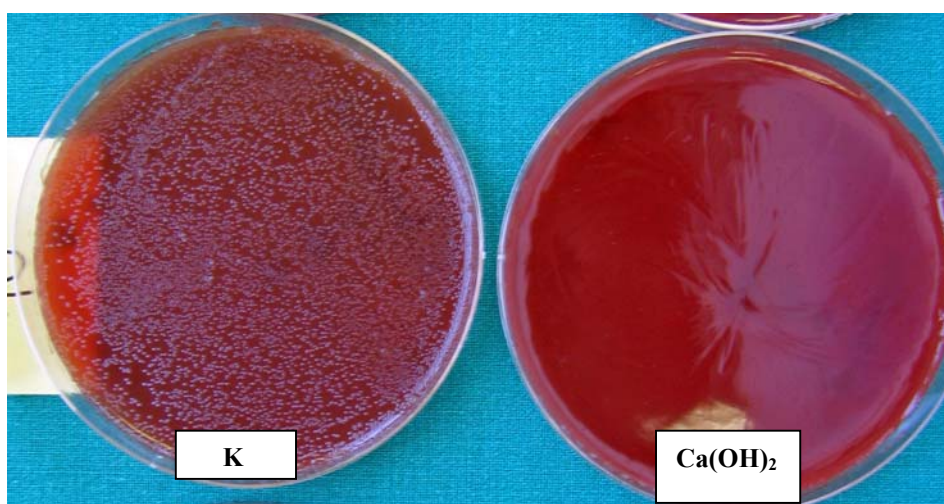
Pripravili smo tri suspenzije *E. faecalis* s koncentracijo  $1,3 \times 10^8$ ;  $5,9 \times 10^8$  in  $6,8 \times 10^8$  CFU/ml. Papirnata šilca pomočena v izhodne suspenzije *E. faecalis* so absorbirala  $2,3 \times 10^6$ ;  $4,1 \times 10^6$ ;  $1,4 \times 10^6$  CFU/ml suspenzije. Popolno zmanjšanje bakterijske rasti smo dosegli 1 uro po premazu šilc s pasto  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Slika 6). Tudi po 24-ih urah in 7-ih dneh inkubacije rasti *E. faecalis* nismo zaznali. Rezultati so prikazani v Preglednici 5.

Iz rezultatov je razvidno, da 1 urni stik *E. faecalis* s pasto  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  rezultira v zmanjšanju bakterijske koncentracije za povprečno 6,4 logaritmov.

#### 4.3.2 *In vitro* protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida na *C. albicans*

Pripravljene izhodne suspenzije *C. albicans* so vsebovale  $8,0 \times 10^6$ ;  $2,5 \times 10^7$  in  $3,7 \times 10^7$  CFU/ml. Papirnata šilca pomočena v izhodne suspenzije *C. albicans* so absorbirala  $4,0 \times 10^4$ ;  $1,4 \times 10^5$  in  $2,4 \times 10^5$  CFU/ml suspenzije. Popolno zmanjšanje glivne rasti smo dosegli 1 uro po premazu šilc s pasto  $\text{Ca(OH)}_2$  (Slika 7). Tudi po 24-ih urah in 7-ih dneh inkubacije rasti *C. albicans* nismo zaznali. Rezultati so prikazani v Preglednici 6.

Iz rezultatov je razvidno, da 1 urni stik *C. albicans* s pasto  $\text{Ca(OH)}_2$  rezultira v zmanjšanju koncentracije gliv za povprečno 5,1 logaritmov.



Slika 6: Primer popolnega zmanjšanja rasti *E. faecalis* po 1 uri delovanja kalcijevega hidroksida. Plošča K – negativna kontrola, inokulirana suspenzija *E. faecalis* koncentracije  $2,3 \times 10^6$  CFU/ml, ki ni bila izpostavljena kalcijevemu hidroksidu. Plošča  $\text{Ca(OH)}_2$  - inokulirana suspenzija *E. faecalis* koncentracije  $2,3 \times 10^6$  CFU/ml, po 1 urni izpostavitvi kalcijevemu hidroksidu.



Preglednica 5: Protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida [Ca(OH)<sub>2</sub>] na *Enterococcus faecalis* ATCC 29212

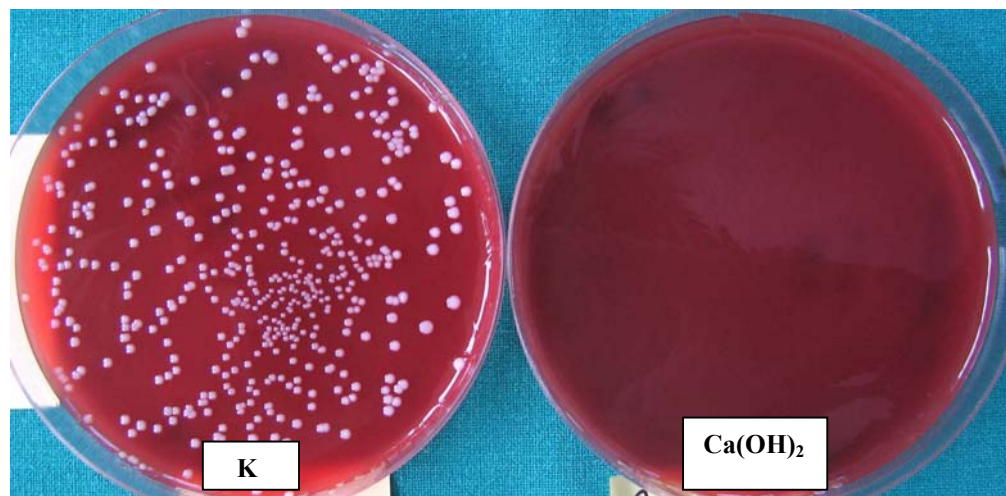
Gostota izhodne suspenzije <i>E. faecalis</i> [McF]	Čas Inkubacije		Redčitev								Konc. končne suspenzije <i>E. faecalis</i> [CFU/ml]	Zmanjšanje mikrobne bremena [log]	
			konc.	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>			
1		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	132	13	0	1,3 × 10 <sup>8</sup>		
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	276	19	0	/	/	/	2,3 × 10 <sup>6</sup>	6,4
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	0	0	/	/	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	E	52	4	0	/	/	4,6 × 10 <sup>6</sup>	6,7
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	72 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	456	27	4	2	/	/	/	7,8 × 10 <sup>5</sup>	5,9
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	109	7	1	0	0	/	/	/	9,3 × 10 <sup>3</sup>	3,9
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	0	/	/	/	/	/	0		
3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	405	35	10	5,9 × 10 <sup>8</sup>		
	1 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	442	49	3	/	/	/	4,1 × 10 <sup>6</sup>	0,9
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	E	E	525	57	4	0	/	/	/	5,0 × 10 <sup>5</sup>	
	5 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	343	38	4	/	/	/	3,7 × 10 <sup>6</sup>	2,0
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	E	286	32	4	0	0	/	/	/	3,4 × 10 <sup>4</sup>	
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	192	18	1	/	/	/	1,6 × 10 <sup>6</sup>	6,2
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	207	30	4	/	/	/	3,0 × 10 <sup>6</sup>	6,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	194	24	0	0	0	/	/	/	/	2,2 × 10 <sup>3</sup>	3,3
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	/	/	/	/	/	/	0		
>3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	E	E	95	4	6,8 × 10 <sup>8</sup>		
	1 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	183	15	1	/	/	/	1,4 × 10 <sup>6</sup>	2,3
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	E	58	5	1	0	0	/	/	/	6,9 × 10 <sup>3</sup>	
	5 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	96	19	2	/	/	/	1,6 × 10 <sup>6</sup>	3,6
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	5	1	1	0	0	0	/	/	/	3,8 × 10 <sup>2</sup>	
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	385	47	2	/	/	/	3,5 × 10 <sup>6</sup>	6,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	/	/	/	/	/	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	284	32	2	0	0	0	/	/	2,7 × 10 <sup>4</sup>	4,4
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	/	/	/	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	0	0	0	0	0	0	0	/	/	0	0
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	/	/	/	/	/	/	0		

**Legenda:** Ca(OH)<sub>2</sub> - ... brez kalcijevega hidroksida, negativna kontrola; Ca(OH)<sub>2</sub> + ... s kalcijevim hidroksidom; E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve

Preglednica 6: Protimikrobni učinek kalcijevega hidroksida [Ca(OH)<sub>2</sub>] na *Candida albicans* ATCC 90028

Gostota izhodne suspenzije <i>C. albicans</i> [McF]	Čas Inkubacije		Redčitev							Konc. končne suspenzije <i>C. albicans</i> [CFU/ml]	Zmanjšanje mikrobnega bremena [log]
			konc.	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>		
1		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	70	9	/	8,0 × 10 <sup>6</sup>	/
	5 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	420	47	3	0	0	/	4,0 × 10 <sup>4</sup>	1,8
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	61	6	0	0	0	0	/	6,1 × 10 <sup>2</sup>	
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	570	56	3	0	0	/	4,8 × 10 <sup>4</sup>	4,7
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	0	0	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	271	16	5	0	0	0	/	3,1 × 10 <sup>3</sup>	3,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	0	0	0	0	0	0	/	0	0
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	0	/	/	/	0		
3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	234	26	0	2,5 × 10 <sup>7</sup>	/
	1 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	104	12	2	0	/	1,4 × 10 <sup>5</sup>	2,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	6	4	1	0	0	0	/	4,8 × 10 <sup>2</sup>	
	5 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	127	10	1	0	/	1,1 × 10 <sup>5</sup>	1,7
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	221	20	3	0	0	0	/	2,4 × 10 <sup>3</sup>	
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	185	19	0	0	/	1,9 × 10 <sup>5</sup>	5,3
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	92	7	1	0	0	/	8,7 × 10 <sup>3</sup>	3,9
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	0	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	2	0	0	/	/	/	/	2,0 × 10 <sup>1</sup>	1,3
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	/	/	/	/	0		
>3		Izh. susp. [CFU]	E	E	E	E	346	45	3	3,7 × 10 <sup>7</sup>	/
	1 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	259	35	1	0	/	2,4 × 10 <sup>5</sup>	0,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	E	675	70	9	0	/	/	7,6 × 10 <sup>4</sup>	
	5 min	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	325	25	2	0	/	2,6 × 10 <sup>5</sup>	2,5
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	66	11	0	0	0	/	/	8,8 × 10 <sup>2</sup>	
	1 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	117	4	4	0	/	1,9 × 10 <sup>5</sup>	5,3
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	/	/	/	/	0	
	24 h	Ca(OH) <sub>2</sub> -	E	E	E	96	5	/	/	7,3 × 10 <sup>5</sup>	5,9
		Ca(OH) <sub>2</sub> +	0	0	0	/	/	/	/	0	
	7 dni	Ca(OH) <sub>2</sub> -	157	17	0	/	/	/	/	1,6 × 10 <sup>3</sup>	3,2
Ca(OH) <sub>2</sub> +		0	0	0	/	/	/	/	0		

**Legenda:** Ca(OH)<sub>2</sub> - ... brez kalcijevega hidroksida, negativna kontrola; Ca(OH)<sub>2</sub> + ... s kalcijevim hidroksidom; E ... neštevno število kolonij; /... brez meritve



Slika 7: Primer popolnega zmanjšanja rasti *C. albicans* po 1 uri delovanja kalcijevega hidroksida. Plošča K – negativna kontrola, inokulirana suspenzija *C. albicans* koncentracije  $1,4 \times 10^5$  CFU/ml, ki ni bila izpostavljena kalcijevemu hidroksidu. Plošča  $\text{Ca(OH)}_2$  - inokulirana suspenzija *C. albicans* koncentracije  $1,4 \times 10^5$  CFU/ml, po 1 urni izpostavitvi kalcijevemu hidroksidu.

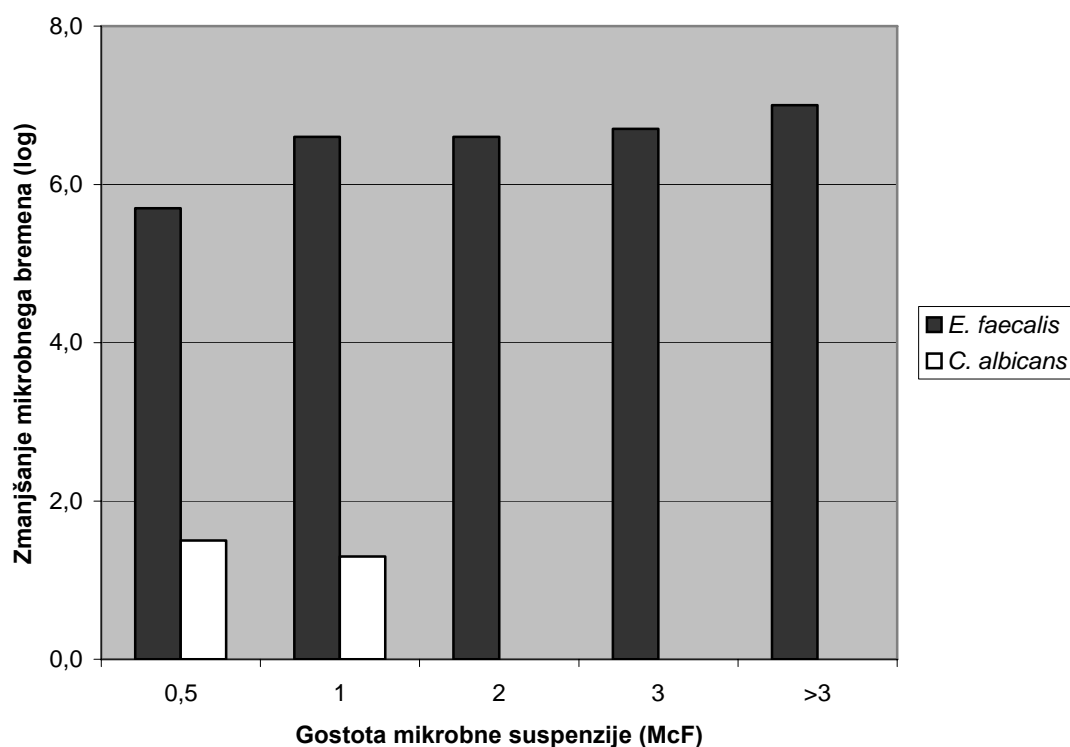
#### 4.4 KONTROLA USTREZNOSTI NEVTRALIZACIJSKIH MEDIJEV ZA KLOORHEKSIDIN IN KALCIJEV HIDROKSID

Nevtralizacijska medija (Tween 80, 0,07 % lecitin in 0,9 % NaCl s histidinom) in BHI z 0,5 % citronsko kislino sta se izkazala kot ustrezna nevtralizatorja za CHX oziroma  $\text{Ca(OH)}_2$ , saj je po dodatku mikrobne suspenzije v bistre epruvetke s CHX in nevtralizatorjem oziroma s  $\text{Ca(OH)}_2$  in nevtralizatorjem, na ploščah po 24-ih urah inkubacije porasla mikrobna kultura odgovarjajočega seva. V kolikor rasti ne bi bilo, nevtralizacija CHX oziroma  $\text{Ca(OH)}_2$  ne bi bila popolna in bi bilo potrebno uporabiti drugi nevtralizator.

#### 4.5 PRIMERJAVA PROTIMIKROBNEGA UČINKA LASERJA, KLOORHEKSIDINA IN KALCIJEVEGA HIDROKSIDA

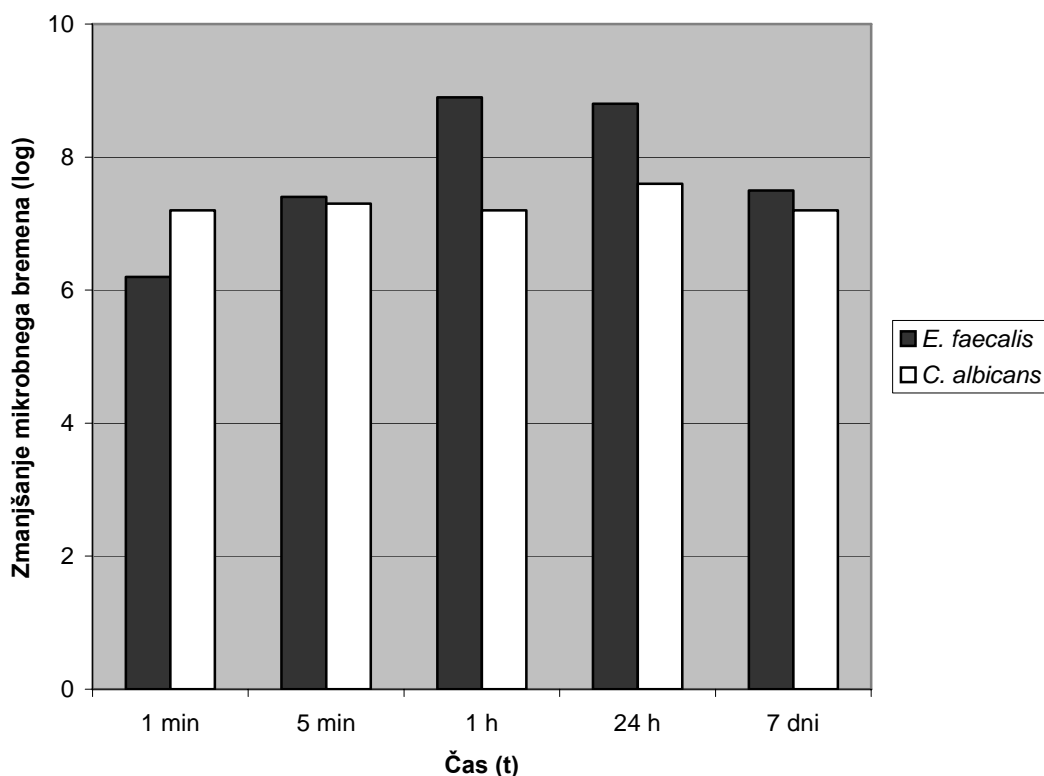
Iz Slike 8 je razvidno, da je protimikrobno delovanje laserja HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) in HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer učinkovitejše proti *E.*

*faecalis* kot proti *C. albicans*. Pri obsevanju suspenzije *C. albicans*, popolnega zmanjšanja mikrobnega bremena nismo dosegli v nobenem poskusu, že pri nižjih mikrobnih koncentracijah. Opazimo tudi, da se protimikrobni učinek laserja z naraščanjem mikrobnih koncentracije bistveno ne spreminja.



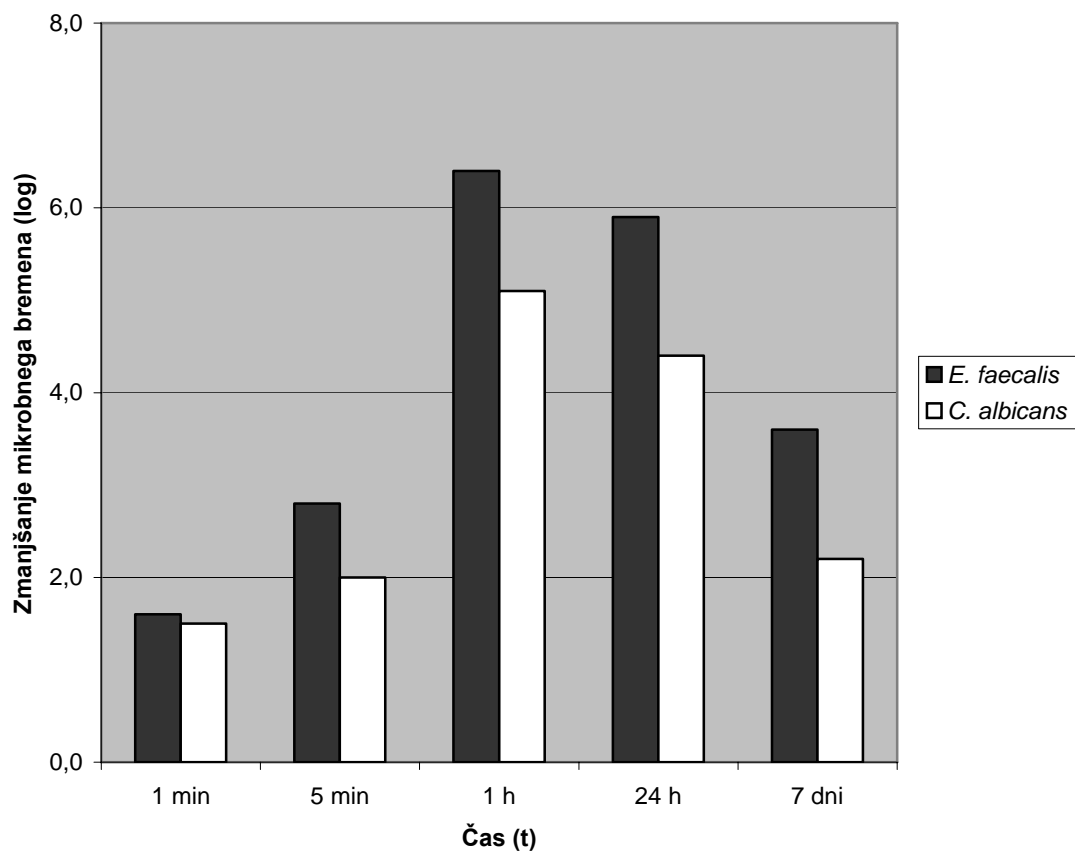
Slika 8: Povprečno zmanjšanje mikrobnega bremena ob uporabi laserja HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup>TheraLite Laser) in HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer v odvisnosti od gostote mikrobnih suspenzij

Slika 9 prikazuje visoko stopnjo zmanjšanja mikrobnega bremena (>6 log) že po 1 minuti delovanja CHX tako za *E. faecalis* kot za *C. albicans*. Popolno zmanjšanje rasti *C. albicans* nastopi že po 1 minuti (7,2 log) in ostaja relativno nespremenjeno tudi 7 dni po dodatku CHX. Inhibicija *E. faecalis* s CHX s časom narašča in pri višji gostoti mikrobnih suspenzij (>3 McF) doseže popolno zmanjšanje mikrobnih rasti (8,9 log) po 1 uri delovanja. Protimikrobni učinek CHX ostaja relativno nespremenjen tudi po 7 dneh.



Slika 9: Povprečno zmanjšanje mikrobne bremena ob uporabi 0,5 % klorheksidin diglukonata v odvisnosti od časa delovanja

Slika 10 prikazuje protimikrobni učinek  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  na *E. faecalis* in *C. albicans*. Opazimo značilno nižjo stopnjo zmanjšanja mikrobne bremena po 1 in 5 minutah delovanja  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (1,5-2,8 log). Popolno inhibicijo mikrobne rasti smo pri obeh mikroorganizmih dosegli po 1 uri (6,4 log in 5,1 log). Padeč mikrobne bremena po 24 urah in 7 dneh po nanosu  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ni posledica nepopolne inhibicije rasti, pač pa nižje mikrobne koncentracije negativnih kontrol (izsušitev papirnatih šilc).



Slika 10: Povprečno zmanjšanje mikrobnega bremena ob uporabi kalcijevega hidroksida v odvisnosti od časa delovanja

## 5 RAZPRAVA IN SKLEPI

### 5.1 RAZPRAVA

V ustih zdravega odraslega človeka je več kot 300 vrst mikroorganizmov, ki predstavljajo stalno ustno floro in so v stabilnem odnosu z gostiteljem. Na površini zob se mikrobi nahajajo v zobnih oblogah. Kadar se bakterije v zobnih oblogah namnožijo v taki količini, da pride do spremembe odnosov in se organizem ni več sposoben braniti, se razvije zobna gniloba. Pri nastanku zobne gnilobe sodelujejo gostitelj, mikroorganizem in substrat, skupni vpliv vseh treh dejavnikov povzroči demineralizacijo zobne sklenine in dentina. Okvara zobne površine omogoči vdor mikroorganizmov in njihovih produktov v zobno pulpo. Mikroorganizmi, ki povzročajo vnetje zobne pulpe so največkrat nizkovirulentni, vendar imajo različne virulenčne faktorje, ki omogočajo vdor v zobni organ. Pravočasna oskrba zobne pulpe in odstranitev bakterij, omogoča vrnitev pulpe v prvotno stanje. Če pulpalna ali periapikalna vnetja nepravilno zdravimo ali jih sploh ne zdravimo, se vnetje razširi v mehka in trdna tkiva (Dragaš, 1996).

Endodontija je del zobozdravstva, ki se ukvarja s profilakso, diagnostiko in zdravljenjem zobne pulpe in pulpogenih parodontopatij (Vrbošek, 1995). Endodontsko zdravljenje poteka v treh sejah, pri katerih odmrlo in okuženo pulpo mehansko in kemično odstranijo, pulpno votlino razkužijo z različnimi iriganti ter v tretji seji neprepustno zaprejo (Klemenc, 2005). Uspešnost endodontskega zdravljenja je v največji meri odvisna od sterilizacije koreninskega sistema zoba, zato je izbira ustreznega intrakanalnega iriganta, predvsem med dvema endodontskima sejama, ključnega pomena. V nasprotnem primeru se mikroorganizmi v nekaj dneh namnožijo do začetnega števila.

V diplomski nalogi smo primerjali protimikrobni učinek dveh najpogosteje uporabljenih endodontskih irigantov, 0,5 % klorheksidin diglukonat in kalcijev hidroksid ter učinkovitost novejšega pristopa k endodontskemu zdravljenju, t. i. fotodinamsko zdravljenje. V raziskavo smo vključili standardna seva bakterije *E. faecalis* ATCC 29212 in glive *C. albicans* ATCC 90028. *E. faecalis* in *C. albicans* sta najpogostejša vzroka

neuspešnega endodontskega zdravljenja, visoka toleranca za bazičen pH ju uvršča med najodpornejše mikrobnе vrste v ustni votlini.

Za vrednotenje protimikrobnega učinka endodontskih irigantov smo uporabili metodo neposredne izpostavitve (DET), s pomočjo katere smo določili čas potreben za popolno inhibicijo mikrobnе rasti. Metoda DET je natančna in učinkovita saj temelji na neposrednem in tesnem stiku mikroorganizma in iriganta, različnim formulacijam protimikrobnega agensa dopušča podobne pogoje za difuzijo in je neodvisna od drugih variabilnih dejavnikov (Vianna in sod., 2005). Kot *in vitro* metoda pa ima tudi določene omejitve, ki ne odražajo *in situ* razmer. *In vitro* težko dosežemo ustrezno mikrobnо strukturo in naravo endodontskih okužb. Prisotnost biofilmov namreč zahteva daljše in izdatnejše delovanje protimikrobnih irigantov. Pomembna sta tudi vrsta in prostornina rastnega medija. V diplomski nalogi smo za testiranje protimikrobnega učinka CHX in  $\text{Ca(OH)}_2$  uporabili značilno večjo prostornino rastnega medija (1 ml in 6 ml) kot je prostornina koreninskih kanalov (cca. 10  $\mu\text{l}$ ). Posledično je bila koncentracija protimikrobnega iriganta nižja kot v *in situ* razmerah, iz česar bi lahko sklepali o še boljši učinkovitosti testiranega iriganta *in situ*. Navkljub temu pa v koreninskem sistemu zoba prihaja do izmenjave tekočine, kar prav tako rezultira v zmanjšani koncentraciji iriganta. Poleg tega puferski učinek določenih komponent dentina prispeva k dodatnemu zmanjšanju protimikrobnega učinka.

Kvantifikacija mikrobnega bremena ob različnih časovnih intervalih med testiranjem je omogočila določitev optimalnega časa delovanja endodontskega iriganta za dosego maksimalnega protimikrobnega učinka. Najboljši protimikrobni učinek smo *in vitro* dosegli z uporabo 0,5 % klorheksidin diglukonata. Popolno zmanjšanje rasti *E. faecalis* in *C. albicans* smo pri mikrobni koncentraciji  $10^7$  in  $10^8$  CFU/ml zaznali že po 1 minuti delovanja, pri povišani koncentraciji *E. faecalis*,  $10^9$  CFU/ml pa po 1 uri. Protimikrobni učinek CHX je med drugim odvisen tudi od koncentracije mikrobnega bremena. V primerjavi s  $\text{Ca(OH)}_2$  se je, v raziskavi Schafer in Bossman (2005), CHX prav tako izkazal za učinkovitejši irigant proti *E. faecalis*.



Popolno zmanjšanje rasti *C. albicans* smo dosegli po 1 minuti delovanja CHX. Tudi Skalarič (1995) poroča o *in vitro* in *in vivo* učinkovitosti CHX proti *C. albicans*.

*In vitro* protimikrobni učinek HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) v kombinaciji s HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer na *E. faecalis* je bil primerljiv z učinkom 0,5 % CHX. Popolno zmanjšanje mikrobne rasti smo dosegli po 2 minutnem obsevanju ne glede na mikrobno koncentracijo. Poskusa z nižjo stopnjo zmanjšanja mikrobnega bremena pa dokazujeta, da je protimikrobni učinek laserja odvisen od moči žarka.

V nasprotju z *E. faecalis*, je bil protimikrobni učinek laserja na *C. albicans* značilno nižji, 1,4 log po 2 minutnem obsevanju, kar je tudi veliko nižje v primerjavi z učinkom CHX (7,2 log) in Ca(OH)<sub>2</sub> (5,1 log) na *C. albicans*. Zmanjšana občutljivost *C. albicans* za PDT je najverjetneje posledica celične velikosti in strukture. Jedrna membrana in vakuole naj bi predstavljale oviro za prodiranje toluidinskega modrila (Demidova in Hamblin, 2005; Lambechts in sod., 2005). O mehanizmu odpornosti *C. albicans* proti PDT in endodontskim irigantom je malo znanega.

Najpočasnejši protimikrobni učinek smo dosegli z uporabo Ca(OH)<sub>2</sub>, popolno inhibicijo rasti *E. faecalis* in *C. albicans* smo zaznali 1 uro po nanosu. Tudi v raziskavi Vianna in sod. (2005), sta se *E. faecalis* in *C. albicans* izkazala kot manj občutljiva za delovanje Ca(OH)<sub>2</sub>. Za popolno inhibicijo mikrobne rasti so *in vitro*, z uporabo metode neposredne izpostavitve, potrebovali kar 24 ur.

Stopnjo zmanjšanja mikrobnega bremena ob delovanju CHX (Slika 9) in Ca(OH)<sub>2</sub> (Slika 10), ne moremo neposredno primerjati. Za 2 log nižja stopnja inhibicije Ca(OH)<sub>2</sub> je posledica nižje izhodne mikrobne koncentracije, zaradi omejene absorbcije papirnatih šilc. V obeh primerih smo dosegli popolno zmanjšanje mikrobnega bremena. Prav tako ne smemo znižanje mikrobne inhibicije 24 ur in 7 dni po nanosu Ca(OH)<sub>2</sub> tolmačiti kot padec protimikrobnega učinka, saj so eksperimentalni pogoji zmanjšali preživetje mikrobov negativnih kontrol (izsušitev papirnatih šilc).

Ker 7 dni po uporabi CHX in  $\text{Ca(OH)}_2$  nismo zaznali mikrobne rasti, bi lahko sklepali o podaljšanem *in vitro* protimikrobnem učinku. S spremljanjem protimikrobnega učinka vsaj 14 dni, kolikor traja medsejno obdobje, bi sklep lahko dodatno potrdili.

Pri izvedbi diplomske naloge smo bili časovno omejeni pri uporabi laserja, saj smo ga dobili na izposajo za 14 dni. Protimikrobni učinek laserja na *C. albicans* bi s podaljšanim obsevanjem ali zamenjavo fotosenzoričnega sredstva lahko izboljšali.

*In situ* razmeram bi se lahko bolj približali z uporabo ustreznjšega ravnega medija, npr. redčeni humani serum ter manjšo prostornino le-tega.

S spremljanjem mikrobne rasti vsaj 48 ur po ustavitvi delovanja iriganta, bi lahko ugotovili ali je bil protimikrobni učinek reverzibilen ali ireverzibilen.

## 5.2 SKLEPI

- *In vitro* smo z uporabo HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) in HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer po dveh minutah dosegli popolno inhibicijo rasti bakterije *E. faecalis*. V povprečju smo dosegli zmanjšanje mikrobnega bremena za 6,6 log.
- Po 2 minutnem obsevanju z laserjem HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) in HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer nismo dosegli popolne inhibicije rasti glive *C. albicans*. V povprečju je bilo zmanjšanje mikrobnega bremena po obsevanju 1,4 log.
- Z uporabo 0,5 % klorheksidin diglukonata smo v 1 uri dosegli popolno inhibicijo rasti *E. faecalis*. Zmanjšanje mikrobnega bremena je v povprečju znašalo 8,9 log.
- Z uporabo 0,5 % klorheksidin diglukonata smo popolno inhibicijo rasti *C. albicans* dosegli že po 1 minuti. Zmanjšanje mikrobnega bremena je v povprečju znašalo 7,2 log.
- Ca(OH)<sub>2</sub> se je izkazal za irigant s počasnejšim protimikrobnim učinkom. Popolno inhibicijo rasti *E. faecalis* smo dosegli 1 uro po premazu šilc s pasto Ca(OH)<sub>2</sub>. Zmanjšanje mikrobnega bremena je v povprečju znašalo 6,4 log.
- Popolno inhibicijo rasti *C. albicans* smo dosegli 1 uro po dodatku paste Ca(OH)<sub>2</sub>. Zmanjšanje mikrobnega bremena je v povprečju znašalo 5,1 log.

## 6 POVZETEK

Endodontske okužbe povzročajo obvezno in fakultativno anaerobni mikroorganizmi, ki so del normalne mikrobne flore ustne votline. Okvara zobne površine omogoči vdor mikroorganizmov in njihovih produktov v zobno pulpo. Pravočasna oskrba zobne pulpe in odstranitev bakterij, omogoča vrnitev pulpe v prvotno stanje. Zdravljenje temelji predvsem na mehanskem odstranjevanju nekrotičnega tkiva in bakterij pritrjenih na steno koreninskega kanala. Za učinkovito sterilizacijo kanala se uporabljajo še endodontski iriganti. Ugotovili so, da sta za neuspešno endodontsko zdravljenje največkrat odgovorna *E. faecalis* in *C. albicans*, ki sta zaradi tolerance za bazičen pH najodpornejši mikrobni vrsti v ustni votlini.

V diplomski nalogi smo primerjali protimikrobni učinek 0,5 % klorheksidin diglukonata, paste kalcijevega hidroksida ter t. i. fotodinamskega zdravljenja, obsevanja z diodnim laserjem HELBO<sup>®</sup> 2D Spot Probe (HELBO<sup>®</sup> TheraLite Laser) ob dodatku toluidinskega modrila HELBO<sup>®</sup> Blue Photosensitizer.

Dokazali smo primerljiv protimikrobni učinek vseh treh irigantov na *E. faecalis* pri mikrobni koncentraciji do 10<sup>8</sup> CFU/ml. Nekoliko počasnejši učinek CHX se pojavi pri 10-krat višji koncentraciji *E. faecalis* ter pri uporabi paste Ca(OH)<sub>2</sub>. Prav tako je protimikrobni učinek CHX in Ca(OH)<sub>2</sub> primerljiv za *C. albicans*, medtem ko je učinek laserja na *C. albicans* slabši.

*In vitro* protimikrobni učinek endodontskega iriganta je odvisen od njegove vrste, koncentracije in časa delovanja ter od vrste in koncentracije mikroorganizmov.

## 7 VIRI

Abdullah M., Ng J., Gulabivala K., Moles D.R., Spratt D.A. 2005. Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *Journal of Endodontics*, 31, 1: 30-36

Almyroudi A., Mackenzie D., McHugh S., Saunders W.P. 2002. The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: an in vitro study. *Journal of Endodontics*, 28, 3: 163-167

Bystrom A., Claesson R., Sundqvist G. 1985. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Dental Traumatology*, 1: 170-175

Dametto F.R., Ferraz C.C.R., Gomes B.P.F., Zaia A.A., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. 2005. In vitro assessment of the immediate and prolonged antimicrobial action of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant against *Enterococcus faecalis*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 99: 768-772

Demidova T.N., Hamblin M.R. 2005. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 6: 2329-2335

Denton G.W. 2001. Chlorhexidine. V: Disinfection, sterilization, and preservation. 5<sup>th</sup> ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 321-335

Dragaš A.Z. 1996. Oralna bakteriologija. Ljubljana, DZS: 7-81

Estrela C., Estrela C.R., Bammann L.L., Pecora J.D. 2001. Two methods to evaluate the antimicrobial action of calcium hydroxide paste. *Journal of Endodontics*, 27, 12: 720-723

Estrela C., Pesce H.F. 1996. Chemical analysis of the liberation of calcium and hydroxyl ions from calcium hydroxide pastes in connective tissue in dog. Part I. *Brazilian Dental Journal*, 7: 41-46

Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.I., Bammann L.L. 1998. In vitro denetrmination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, 24: 15-17

Estrela C., Pimenta F.C., Ito I.I., Bammann L.L. 1999. Antimicrobial evaluation of calcium hydroxide in infected dentinal tubules. *Journal of Endodontics*, 25: 416-418

Estrela C., Sydney G.B., Bammann L.L., Felipe O. Jr. 1995. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Brazilian Dental Journal*, 6: 85-90

Ferraro M.J. in sod. 2003. Broth dilution procedures (macrodilution and microdilution). V: *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard*. 6<sup>th</sup> ed. Wayne, NCCLS- National Committee for Clinical Laboratory Standards: 14-15

Garcez A.S., Ribeiro M.S., Tegos G.P., Nunez S.C., Jorge A.O., Hamblin M.R. 2007. Antimicrobial photodynamic therapy combined with conventional endodontic treatment to eliminate root canal biofilm infection. *Lasers in Surgery and Medicine*, 39, 1: 59-66

Gašperšič D., Jan J. 2003. Zobna pulpa. V: *Histologija zobnega organa*. 3. izd. Gašperšič D., Jan J. (ur.). Ljubljana, Medicinska fakulteta: 42-58

Gašperšič D., Jevnikar N., Nemeth L., Klemenc F. 2000. Endodontsko žarišče. *Ljubljana, Zdravstveni vestnik*, 69, Supl III: 17-21

Golob J., Leskovec J. 1995. Primer endodontskega zdravljenja s kalcijevim hidroksidom. *Zobozdravstveni vestnik*, 50, 3-5: 125-126

Gomes B.P.F.A, Ferraz C.C.R., Vianna M.E., Rosalen P.L., Zaia A.A., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. 2002. *In vitro* antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes and their vehicles against selected microorganisms. *Brazilian Dental Journal*, 13: 155-161

Gomes B.P.F.A., Pinheiro E.T., Gade-Neto G.R., Sousa E.L.R., Ferraz C.C.R., Zaia A.A., Teixeira F.B., Souza Filho F.J. 2004. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiology and Immunology*, 19, 2: 71-76

Haenni S., Schmidlin P.R., Mueller B., Sener B., Zehnder M. 2003. Chemical and antimicrobial properties of calcium hydroxide mixed with irrigating solutions. *International Endodontic Journal*, 36, 2: 100-105

HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG. 2003. HELBO® 3D Pocket Probe, HELBO® 2D Spot Probe, Product information. Grieskirchen, HELBO Photodynamic Systems GmbH & Co KG: 2 str.

Hermesch C.B., Hilton T.J., Biesbrock A.R., Baker R.A., Cain-Hamlin J., McClanahan S.F., Gerlach R.W. 1998. Perioperative use of 0.12 % chlorhexidine gluconate for the prevention of alveolar osteitis: efficacy and risk factor analysis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 85, 4: 381-387

Hobson D.W., Bolsen K., 2001. Methods of testing oral and topical antiseptics and antimicrobials. V: Disinfection, sterilization, and preservation. 5<sup>th</sup> ed. Block S.S. (ed.). Philadelphia, Lippincott Williams and Wilkins: 1329-1359

Hulsmann M., Rummelin C., Schafers F. 1997. Root canal cleanliness after preparation with different endodontic handpieces and hand instruments: a comparative SEM investigation. *Journal of Endodontics*, 23, 5: 301-306

Ihan Hren N. 2002. Okužbe ustne votline. V: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo. Gubina M., Ihan A. (ur.). Ljubljana, Medicinski razgledi: 373-377

Jevnikar N., Klemenc F. 1999. Priprava koreninskega kanala po stopenjski tehniki. *Zobozdravstveni vestnik*, 54, 5: 143-146

Johnson E.M., Flannagan S.E., Sedgley C.M. 2006. Coaggregation interactions between oral and endodontic *Enterococcus faecalis* and bacterial species isolated from persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 32, 10: 946-950

Klemenc F. 1997. Problem endodontskega zdravljenja nadpovprečno velikih periapikalnih procesov. *Zobozdravstveni vestnik*, 52, 1: 31-35

Klemenc F. 1999. Vzroki za neuspešne koreninske polnitve. *Zobozdravstveni vestnik*, 54, 1: 8-11

Klemenc F. 2002a. Presoja uporabnosti endodontskih sistemov za strojno širjenje koreninskih kanalov. *Zobozdravstveni vestnik*, 57, 1: 26-30

Klemenc F. 2002b. Termoplastična polnitev koreninskih kanalov. *Zobozdravstveni vestnik*, 57, 5: 157-160

Klemenc F. 2003. Izpiranje koreninskega kanala, možni zapleti, njihovo preprečevanje in zdravljenje. *Zobozdravstveni vestnik*, 58, 3-4: 80-84

Klemenc F. 2005. Doktrinarna izhodišča endodontskega zdravljenja. *Zobozdravstveni vestnik*, 60, 3-5: 144-149

Lambrechts S.A.G., Aalders M.C.G., Van Marle J. 2005. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49, 5: 2026-2034

Metin M., Tek M., Sener I. 2006. Comparison of two chlorhexidine rinse protocols on the incidence of alveolar osteitis following the surgical removal of impacted third molars. *Journal of Contemporary Dental Practice*, 7, 2: 1-5



Nolte W.A. 1982. Oral microflora. V: Oral microbiology. 4<sup>th</sup> ed. Nolte W.A. (ed.). St.Louis, Toronto, London, The C.V. Mosby Company: 193-228

Pavlič A. 1998. Vpliv klorheksidina in fluoridov na patogeno bakterijsko floro. Magistrska naloga. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Medicinska fakulteta: 1-29

Podbielski A., Boeckh C., Haller B. 2000. Growth inhibitory activity of gutta-percha points containing root canal medications on common endodontic bacterial pathogens as determined by an optimized quantitative in vitro assay. *Journal of Endodontics*, 26, 7: 398-403

Podbielski A., Spahr A., Haller B. 2003. Additive antimicrobial activity of calcium hydroxide and chlorhexidine on common endodontic bacterial pathogens. *Journal of Endodontics*, 29, 5: 340-345

Pokora L. 2001. Lasers in dentistry. V: Lasers in surgery and dentistry. Šimunović Z. (ed.). Rijeka, Vitagraf: 701-714

Potočnik I. 1995. Smernice za endodontsko zdravljenje pri zapletih. *Zobozdravstveni vestnik*, 50, 3-5: 122-124

Roças I.N., Siqueira J.F.Jr., Santos K.R.N. 2004. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of Endodontics*, 30, 5: 315-320

Sakamoto M., Siqueira J.F. Jr, Roças I.N., Benno Y. 2007. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. *Oral Microbiology Immunology*, 22: 19-23

Schafer E., Bossmann K. 2005. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*, 31, 1: 53-56

Siqueira J.F.Jr. 2001. Aetiology of root canal treatment failure: why well-treated teeth can fail. *International Endodontic Journal*, 34, 1: 1-10

Siqueira J.F. Jr, Uzeda M. 1997. Intracanal medication evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *Journal of Endodontics*, 23: 167-169

Siqueira J.F. Jr, Uzeda M. 1998. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *Journal of Endodontics*, 24: 663-665

Skalerič U. 1995. Delovanje in uporaba chlorheksidina v stomatologiji. *Zdravstveni vestnik*, 50, 1-2: 44-46

Soukos N.S., Chen P.S., Morris J.T., Ruggiero K., Abernethy A.D., Som S., Foschi F., Doucette S., Bammann L.L., Fontana C.R., Doukas A.G., Stashenko P.P. 2006. Photodynamic therapy for endodontic disinfection. *Journal of Endodontics*, 32, 10: 979-984

Stuart C.H., Schwartz S.A., Beeson T.J., Owatz C.B. 2006. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, 32, 2: 93-98

Tronstad L. 2003. *Clinical endodontics: A textbook*. 2<sup>nd</sup> rev. ed. New York, Thieme Medical Publishers: 1-63

Vianna M.E., Gomes B.P.F.A., Bellocchio Berber V., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Souza Filho F.J. 2004. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 97, 1: 79-84

Vianna M.E., Gomes B.P.F., Sena N.T., Zaia A.A., Ferraz C.C.R., Souza Filho F.J. 2005. *In vitro* evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens of calcium hydroxide combined with different vehicles. Brazilian Dental Journal, 16, 3: 175-180

Vrbič V. 1990. Sodobna zasnova preparacije kavitet. Zobozdravstveni vestnik, 45, 4-5: 83-87

Vrbošek V. 1995. Smernice za endodontsko zdravljenje. Zobozdravstveni vestnik, 50, 1-2: 49-54

Wainwright M. 1998. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 42, 13-28

## ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici, prof. dr. Katji Seme, za strokovno vodenje, prizadevanje in koristne nasvete pri izdelavi diplomske naloge. Hvala tudi za prijaznost in potrpežljivost.

Doc. dr. Evi Ružič-Sabljić se zahvaljujem za recenzijo diplomske naloge.

Hvala Tončki, Marji, Mrjetki, Poloni in Maji, iz Laboratorija za bakteriološko diagnostiko respiratornih okužb, za pomoč pri praktičnem delu.

Hvala tudi Andreji za čas in pomoč pri biokemijskem delu naloge.

Najlepše se zahvaljujem svoji družini, predvsem mami in očetu, ker sta mi študij omogočila. Hvala vama za vso podporo v napornih študijskih dneh in veselje, ki sta ga delila z menoj ob uspehih.

Hvala tudi tebi Tomaž za vse spodbudne besede, predvsem pa za potrpežljivost.