

Antibakterijski učinak Er:YAG lasera u korijenskom kanalu

Silvana Jukić¹
Darija Vidučić²
Ivana Miletić¹
Želimir Božić³
Smiljana Kalenić⁴
Ivica Anić¹

¹Zavod za dentalnu patologiju
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu
²Department of Microbiology
School of Dentistry
University of Tokushima
Tokushima, Japan
³Privatna ordinacija Prestranek
Slovenija
⁴Zavod za mikrobiologiju
Stomatološkog fakulteta
Sveučilišta u Zagrebu

Sažetak

Svrha je rada ispitati antibakterijski učinak Er:YAG lasera u korijenskome kanalu služeći se bakterijama roda *Enterococcus* i *Staphylococcus*.

Jedanaest jednokorijenskih zuba instrumentirano je, sterilizirano te ih deset inokulirano bakterijskom suspenzijom koncentracije 10^6 CFU/ml u srčano-moždanom bujonu. Devet je uzoraka obasjavano Er:YAG laserom (220 mJ/40 Hz/10 s) u dva ciklusa sa stankom od 15 s. Uzorak s bakterijskom suspenzijom bez laserskog obasjavanja bio je pozitivna kontrola, a jedan sterilni uzorak negativna kontrola. Nakon obasjavanja uzorci su uronjeni u bočice s bujonom te je bakteriološkom raščlambom utvrđen broj naraslih koloniformnih bakterija (CFU/ml) nakon jednog i dva tjedna. Ni jedan uzorak nije steriliziran Er:YAG laserom, ali je u tri slučaja potpuno uništen *Staphylococcus aureus*, što upućuje da bi se usavršavanjem sustava za prenošenje energije mogli postići mnogo bolji antibakterijski učinci.

Ključne riječi: Er:YAG laser, *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*, antibakterijski učinak.

Acta Stomat Croat
2001; 195-199

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 25. siječnja 2001.

Adresa za dopisivanje:

Silvana Jukić
Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

Čest uzrok neuspjeha endodontskoga liječenja jest zaostajanje bakterija u korijenskom kanalu (1, 2). Broj bakterija mehanički se može smanjiti strojnom i/ili ručnom instrumentacijom i ispiranjem, pri

čemu irigacijsko sredstvo i kemijski djeluje na mikroorganizme. Većina otopina koja se rabi u endodonciji ima snažan antibakterijski učinak. Jedna od najučinkovitijih je vodena otopina natrij hipoklorita koja razlaže proteine tvoreći kloramine s preostalim djelovima peptida te tako ne samo da

pomaže uklanjanje ostataka tkiva već i pridonosi antibakterijskom učinku slobodnoga klora. Osim toga ona inaktivira sulfhidrilnu skupinu bakterijskih enzima stvaranjem hipoklorne kiseline (3). Nedostatak irigacijskih otopina je ograničen prodor u dentinske tubuluse što umanjuje antibakterijski učinak (4) i vrijeme potrebno da oni djeluju. Prodiranje čak i malih količina natrij hipoklorita u periapeksno tkivo izaziva alergijski i toksični učinak i potiče reaktivnu upalu (5). Preporučljiva koncentracija natrija hipoklorita, koja je u ravnoteži između toksičnosti i antibakterijskog učinka, je 0,5-1 %-tna otopina (6,7).

Osim toga su neke gram pozitivne (+) bakterije, kao što su streptokoki i aerokoki, otporne na djelovanje natrij hipoklorita (8).

Antibakterijsko djelovanje laserske zrake temelji se na termičkom učinku na tkivo (9). Smanjenje broja bakterija ili njihov potpuni nestanak postignut je uporabom nekoliko vrsta lasera (6, 9, 10). Er:YAG je laserski sustav koji obećava zato što se valna duljina laserske zrake (2,94 μm) podudara s apsorpcijskim pikom vode, a to rezultira dobrom apsorpcijom u gotovo svim biološkim tkivima, uključujući caklinu i dentin (11). Taj se laser preporučuje za osteotomiju, uklanjanje cista i za apikotomiju zbog izvrsnog cijeljenja kosti. Do danas je to jedini laser odobren od FDA (Food and Drug Administration) za preparaciju kaviteta (12).

Uporaba lasera u endodonciji moguća je ako se energija prenosi odgovarajućim optičkim vlaknom (13). No zbog velikoga gubitka energije malo je uređaja Er:YAG lasera opremljeno sustavom prijenosa energije optičkim vlaknima. Zbog toga je uporaba toga lasera u endodonciji još uvijek ograničena.

Svrha rada bila je ispitati antibakterijski učinak Er:YAG lasera u korijenskome kanalu rabeći *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus*.

Materijal i postupci

Laserski uređaj

U istraživanju je rabljen Twinlight Dental Laser (Fotona, Slovenija) koji je sastavljen od Er:YAG i Nd:YAG laserskih podjedinica.

Er:YAG laser, valne duljine 2,94 μm , radi pulsnim načinom. Frakvencija pulsa kreće se od 2 - 10, raspon je energije od 0,12 - 5 W, a trajanje pulsa je od 45 - 250 μs ovisno o energiji pulsa. Laserska energija provodi se do cilja optičkim nastavkom zaobljena vrha promjera 900 μm .

Priprema uzoraka

Za istraživanje je rabljeno 11 izvađenih jednokorijenskih zuba koji su se čuvali u 10 %-tnom formalinu. Krune zuba uklonjene su do razine cementno-caklinske granice dijamntnim diskom uz stalno vodeno hlađenje. Ulaz u korijenske kanale proširen je Gates-Glidden svrdlom #2, #3 i #4. Korijenski su kanali prošireni proširivačima (Mail-efer, Bellaigues, Švicarska) "step-back" tehnikom do ISO broja #50. Tijekom instrumentacije kanali su ispirani s 5 ml 2,5 % vodene otopine natrij hipoklorita. Zubi su zatim ostavljeni na zraku tijekom noći, a apikalni je otvor zabrtvljen s tri sloja bezbojnoga laka za nokte. Zubi su sterilizirani etilen oksidom tijekom 24 sata nakon čega su sedam dana ostavljeni da plin ispari.

Inokulacija

Jednake količine bakterijske suspenzije *Staphylococcus aureus* ATCC 29 213 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29 212 uzgojene su u srčano-moždanom bujonu (SMB) u koncentraciji od 106 CFU/ml (Colony Forming Units/ml). Prethodno je koncentracija ispitana prekonocnom kulturom na krvnome agaru (bio-Mérieux, Mercy l'Etoile, France) (14).

Neposredno prije iradijacije laserom u kanal je sterilnom iglom na mikropipetoru uneseno 10 μl bakterijske suspenzije u hranjivoj podlozi. Negativna kontrola nije inokulirana.

Obasjavanje

Korijenski kanali obasjavani su Er:YAG laserskom zrakom pulsnim načinom (220 mJ/10 Hz/10 s) bez pomicanja optičkoga nastavka. Kanali su obasjavani dva puta u razmaku od 15 s kako bi se hladili između obasjavanja. Trajanje pojedinačnoga pulsa bilo je 330 μs . Jedan uzorak, bez bakterija, bio je negativna kontrola, a drugi, s bakterijskom suspenzijom ali bez ozračivanja laserom, bio je pozitivna kontrola.

Tijekom obasjavanja zubi su pridržavani u celuloidnim vrećicama u kojima su se čuvali nakon sterilizacije. Na taj se je način pokušalo umanjiti moguće onečišćenje iz okoline. Negativna kontrola je također obasjana, a pozitivna je kontrola tretirana optičkim vlaknom istim pokretima kao i uzorci ali bez uključenoga prijenosa laserske zrake.

Nakon obasjavanja laserom zubi su uronjeni u bočice s 2 ml hranjive podloge (SMB).

Bakterijska analiza

Bočice s uzorcima inkubirane su 15 dana na 35°C. Nakon 24-satne inkubacije, 0,25 ml SMB svakoga uzorka inokulirano je u slani moždanom-srčani bujon (BBL, Becton Dickinson Microbiology System Cockeysville MD 21030, USA) za selektivnu izolaciju stafilokoka. Za selektivnu izolaciju enterokoka 0,25 ml SMB dodano je u enterokokosel bujon (BBL, Becton Dickinson Microbiology System Cockeysville MD 21030, USA). Nasađeni uzorci inkubirani su sljedećih 15 dana. Bočice sa zubima i uzorci nasađeni u slanom moždanom-srčanom bujonu provjeravali su se svaka 24 sata i ako bi bilo zamućenja nasađeni su na krvni agar. Krvni su agari inkubirani na 35°C na zraku tijekom 24 sata, a narasle kolonije utvrđene su standardnim postupcima. Inokulirani enterokokosel bujoni su također provjeravani svaka 24 sata, a ako bi potamnjeli nasađeni su na enterokokosel agar. Narasle kolonije utvrđene su standardnim postupcima (14).

Rezultati

Rezultati bakteriološke raščlambe prikazani su u tablici 1. Er:YAG laserom, uz primjenjene parametre, nije se uspjelo sterilizirati ni jedan uzorak. U trima je uzorcima inhibirao rast *Staphylococcus aureus* u prvom i drugom tjednu inkubacije.

Rasprava

Staphylococcus aureus i *Enterococcus faecalis* smatraju se učestalim mikroorganizmima inficiranog endodontskog prostora (15). Važno svojstvo bakterija koje se rabe u ispitivanjima antibakterijskog učinka lasera jest njihova termorezistencija.

Tablica 1. Broj CFU/ml

Table 1. Number of CFU/ml

Br. / No	Er:YAG laser	
	8 dana / 8 days	15 dana / 15 days
1	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
2	SA 10 ³ + ENT > 10 ⁶	SA 10 ³ + ENT > 10 ⁶
3	ENT > 10 ⁶	ENT > 10 ⁶
4	ENT > 10 ⁶	ENT > 10 ⁶
5	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
6	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
7	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
8	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
9	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
Poz. kontrola / Positive control	SA + ENT > 10 ⁶	SA + ENT > 10 ⁶
Neg. kontrola / Negative control	sterilno	sterilno

Enterococcus faecalis, premda nesporogena vegetativna bakterija, otporan je na razmjerno visoke temperature (16). *Staphylococcus aureus* je nešto više osjetljiv na visoke temperature nego streptokoki (10). To je u skladu s našim rezultatima jer je u trima uzorcima uništena ona vrsta bakterija koja je osjetljivija na visoke temperature.

Smanjenje broja bakterija koje tvore kolonije u korijenskome kanalu od 2,3 x 10⁶ do 0,6 x 10⁶ postigao je Hardee sa sur. (6) obasjavajući kanale tijekom jedne minute Nd:YAG laserom snage 3,5 W. To je 98%-tno smanjenje broja bakterija. Mikroorganizam koji su ispitivali bio je *Bacillus stearothermophilus* koji stvara spore otporne na toplinu. Premda su postigli vrlo velik pad broja mikroorganizama, autori opisuju kako je temperatura na površini korijena toliko porasla da je to onemogućavalo držati uzorak prstima. To upućuje na mogućnost da se parodontno tkivo ošteti, a to je potvrđeno u istraživanju Bachalla i sur. (17) na psima. Obasjavanje kanala laserskim zrakama snage 3 W tijekom 30 s uzrokovalo je ankilozu, resorpciju cementa te preoblikovanje kosti, što je bilo uočljivo na histološkim preparatima 30 dana nakon postupka (18).

U istraživanju Moritza i sur. (19), u kojem je rabljen Nd:YAG laser *in vivo*, dobiveni su ohrabrujući rezultati u smanjenju broja bakterija u korijenskome kanalu. Ponavljajući pet ciklusa obasja-

vanja u trajanju od 10 s i stankom od 20 s, snagom 1,5 W i frekvencijom 15 Hz, uspjeli su smanjiti broj bakterija za 50% u prvome pokušaju. Uzorak za bakteriološku raščlambu nakon obasjanja skupljen je irigacijom kanala fiziološkom otopinom i ume-tanjem sterilnoga papirnoga štapića. Takav postupak omogućuje da se bakterije prijanaju na stijenku korijenskoga kanala i skrivaju u dentinskim tubulusima te zato postoji mogućnost da ih ne bude u ispitivanom materijalu. To je u skladu s niskom stopom oporavka spora (oko 25%) koju je dobio Hardee sa sur. (6) ispiranjem inokuliranih kanala u kontrolnom uzorku. Zato su u ovome istraživanju uzorci uronjeni u bočice sa srčano-moždanim bujonom neposredno nakon obasjavanja laserom kako bi u uzorku bile uključene i bakterije zaostale u dentinskim tubulusima i one adherirane na stijenki kanala te kako bi se spriječilo isušivanje zuba. Unatoč tomu trajanje ispitivanja (15 dana) omogućilo je oporavak bakterija, a to se može dogoditi i u kliničkim uvjetima.

Premda Er:YAG laser nije sterilizirao ni jedan uzorak, uklanjanje *Staphylococcus aureus* opaženo je u tri uzorka. To se može objasniti time što je laserska naprava rabljena u ovom istraživanju opremljena optičkim vrhom koji može doprijeti do cervikalne trećine korijenskoga kanala. Temeljem dobivenih rezultata pretpostavljamo da bi se Er:YAG laserom opremljenim optičkim vlaknom manjeg promjera i veće duljine, koji bi dosegao dublje dijelove kanala moglo postići veće smanjenje broja bakterija, pogotovo zbog toga što se zrake erbij lasera ($\lambda=2,94\mu\text{m}$) snažno apsorbiraju u vodi koja je glavna sastavnica bakterijske stanice (11).

Značajan antibakterijski učinak Er:YAG lasera s niskim energetske vrijednostima dobiven je *in vitro* na bakterijama koje se često nalaze u parodontnim džepovima. Uporaba niskih energetske vrijednosti od 7,1 do 10,6 J/cm² znatno je smanjila broj preživjelih *Porphyromonas gingivalis* (18). Također su i novija istraživanja uporabe toga lasera u korijenskome kanalu potvrdila njegov antibakterijski učinak (19,20).

Premda Er:YAG laser nije znatno smanjio broj bakterija, činjenica da je, unatoč neprikladnom sustavu prijenosa energije u korijenski kanal, uspio u tri uzorka potpuno ukloniti *Staphylococcus aureus* upućuje na njegovu moguću uporabu u endodonciji.

Ta se mogućnost otvara uvođenjem optičkoga vlakna (13) koje se već upotrebljava u istraživačke svrhe.

Zaključak

Er:YAG laserskim zrakama nije steriliziran ni jedan uzorak. Antibakterijska neučinkovitost toga laserskog sustava može se objasniti neprikladnim načinom prijenosa energije u endodontski sustav. Ipak, potpuno uklanjanje *Staphylococcus aureus* u trima uzorcima upućuju na njegovu moguću uporabu u endodonciji uvođenjem optičkoga vlakna.

Literatura

1. YOSHIDA M, FUKUSHIMA J, YAMAMOTO K. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals of teeth with periapical pathosis. *J Endodon* 1987; 13: 24-8.
2. BAUMGARTNER JC, FALKER WA. Bacteria in the apical 5 mm of infected root canals. *J Endodon* 1991; 17: 380-3.
3. ANDERSEN M, LUND A, ANDREASEN JA. *In vitro* solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traum* 1992; 8: 104-8.
4. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endodon* 1997; 23: 725-7.
5. ÇALISKAN MK, TRKN M, ALPER S. Allergy to sodium hypochlorite during root canal therapy: a case report. *Int Endodon J* 1994; 27: 163-7.
6. HARDEE MW, MISERENDINO LJ, KOS W, WALIA H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanal Nd:YAG laser irradiation. *J Endodon* 1994; 20: 377-80.
7. MILETIĆ I, KNEŽEVIĆ A, ANIĆ I, OSMAK M, ŠUTALO J, BLAŽIĆ-POTOČKI Z. Citotoksičnost natrij-hipoklorita na kulturama stanica. *Acta Stomatol Croat* 1999; 33: 25-9.
8. CAVALLERI G, CUCCOLIN L, URBANI G, BENONI G. Root canal microflora: qualitative changes after endodontic instrumentation. *J Chemother* 1989; 1: 101-2.
9. ROONEY J, MIDDIA M, LEEMING J. A laboratory investigation of the bactericidal effect of a Nd:YAG laser. *Br Dent J* 1994; 176: 61-4.
10. ZAKARIASEN KL, DEDERICH DN, TULIP J, DECOSTE S, JENSEN SE, PICKARD MA. Bactericidal action of carbon dioxide laser radiation in experimental dental root canals. *Can J Microbiol* 1986; 32: 942-6.
11. HIBST R, KELLER U. Experimental studies of the application of the Er:YAG laser on dental hard substances: I. Measurement of the ablation rate. *Laser Surg Med* 1989; 9: 338-44.

12. WIDGOR HA, WALLSH JT, FEATHERSTONE JDB, VISURI SR, FRIED D, WALDVOGEL JL. Lasers in dentistry. *Laser Surg Med* 1995; 16: 103-33.
13. TAKEDA FH, HARASHIMA T, ETO JN, KIMURA Y, MATSUMOTO K. Effect of Er:YAG laser treatment on the root canal walls of human teeth: a SEM study. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 270-3.
14. MURRAY PR, BARON EJ, PFALLER MA, TENOVER FC, YOLKEN RH. *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. Washington DC, USA: American Society for Microbiology Press, 1999.
15. MOSHONOV J, ORSTAVIK D, YAMAUCHI S, PATTIETTE M, TROPE M. Nd:YAG laser irradiation in root canal disinfection. *Endodon Dent Traumatol* 1995; 11: 220-4.
16. MORITZ A, DOERTBUDAK O, GUTKNECHT N, GOHARKHAY K, SCHOOP U, SPERR W. Nd:YAG laser irradiation of infected root canals in combination with microbiological examinations. *J Amer Dent Assoc* 1997; 128: 1525-30.
17. BACHALL J, HOWARD P, MISERENDINO LJ, WALIA H. Preliminary investigation of the histological effects of laser endodontic treatment on the periradicular tissues in dogs. *J Endodon* 1992; 18: 47-51.
18. ANDO Y, AOKI A, WATANBE H, ISHIKAWA I. Bactericidal effect of Erbium YAG lasers on periodontopathic bacteria. *Laser Surg Med* 1996; 19: 190-200.
19. MORITZ A, SCHOOP U, GOHAKHAY K, JAKOLITSCH S, KLUGER W, WERNISCH J, SPERR W. The bactericidal effect of Nd:YAG, Ho:YAG, and Er:YAG laser irradiation in the root canal: An *in vitro* comparison. *J Clin Laser Surg Med* 1999; 17: 161-4.
20. MEHL A, FOLWACZNY M, HAFFNER C, HICKL R. Bactericidal effects of 2.94 (m Er:YAG-laser radiation in dental root canals. *J Endodon* 1999; 25: 490-3.