

Antibakterijsko djelovanje Halotana, Eukaliptola i narančina ulja

Zoran Karlović¹
Ivica Anić¹
Ivana Miletić¹
Goranka Prpić-Mehićić¹
Sonja Pezelj-Ribarić²
Teuta Maršan¹

¹Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
²Katedra za dentalnu patologiju
i stomatološku protetiku
Studij stomatologije
Medicinski fakultet
Sveučilišta u Rijeci

Sažetak

Za pokus su rabljeni sojevi *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*. Bakterijski inokulum od 0,5 Mc Farlanda razrijeđen je fiziološkom otopinom u omjerima 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ i 1:10⁶. Otapalo količine 0,2 ml pomiješano je s istom količinom bakterijske suspenzije. Za svaku bakterijsku vrstu učinjeno je 60 uzoraka tj. po 10 uzoraka za pojedino razrjeđenje. Uzorci su hermetički zatvoreni i ostavljeni 10 i 30 minuta. Količina od 0,1 ml pojedinog uzorka nasadena je na krvnu ploču i pohranjena u termostat 24 h na temperaturi od 37°C. Postupak je ponovljen dva puta. Halotan je pokazao najveću antibakterijsku aktivnost. Uništio je sve koncentracije sojeva *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis*. Eukaliptol je djelovao na sojeve *Staphylococcus aureus*, a narančino ulje nije pokazalo antibakterijski učinak na ispitivane sojeve.

Ključne riječi: revizija, halotan, eukaliptol, narančino ulje, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*.

Acta Stomat Croat
2000; 303-306

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Primljeno: 22. listopada 2000.

Adresa za dopisivanje:

Mr. sc. Zoran Karlović
Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Sveučilišta u Zagrebu
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

Endodontska revizija indicirana je kod neuspjeha endodontskog liječenja. Svrha ponovnoga postupka jest ukloniti mikroorganizme iz korijenskoga kanala i onemogućiti komunikaciju između parodonta i usne šupljine. Ako je ispun nehomogen i uz to postendodontska opskrba krune nije dobro provedena, mikroorganizmi mogu prodirati iz koronarnog ili apikalnog smjera. Posljedica prodora bakterija je

trajna bol nakon zahvata, nastanak ili perzistencija periapikalnih lezija uz mogućnost akutne egzacerbacije ili potpunog uništenja pričvrsnog aparata zuba (1). Kod kratkoga kanalnog ispuna najčešće se javljaju neuspjesi zbog zaostajanja mikroorganizama u apikalnom dijelu ispunjenog korijenskoga kanala. Broj izoliranih sojeva mikroorganizama manji je kod liječenih zuba nego kod neliječenih (2-7). Mikrobiološka flora kod liječenih zuba predominantna je gram-pozitivna s podjednakim udje-

lom fakultativnih i obligatih anaeroba za razliku od endodontski neliječenih zuba kod kojih postoji polimikrobna flora s jednakim udjelom gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. To je posljedica sposobnosti nekih mikroorganizama da mogu preživjeti u novonastalim uvjetima ili postati otporni na dezinficijense rabljene tijekom endodontskog liječenja. Takvu sposobnost ima samo nekoliko vrsta mikroorganizama. Među njima se u literaturi najviše navodi *Enterococcus faecalis* (8). Studije *in vitro* pokazale su da je otporan i na djelovanje kalcijeva hidroksida (9,10,11). Dokazano je da enterokoki imaju sposobnost preživljavanja i bez drugih mikroorganizama. Bakterije *Actinomyces israelii* i *Propionibacterium propionicum* mogu spriječiti zacjeljenje periapikalnog procesa ako postoje u korijenskome kanalu nakon zahvata (12,13,14). Zbog toga sredstva koja se rabe pri reviziji trebaju djelovati i antibakterijski. Otopine koje se najčešće rabe nakon što se je napustio kloroform jesu eukaliptol i halotan, iako se ispituju i druga sredstva, pogotovo iz skupine eteričnih ulja.

Zato je svrha ovoga rada bila ispitati antibakterijsko djelovanje eukaliptola, halotana i narančina ulja *in vitro* na kolonijama *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) i *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212).

Materijali i postupci

Za pokus su rabljeni standardni sojevi bakterija *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 i *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, te krvna ploča kao hranjiva podloga. Za pozitivnu kontrolu rabljen je kloroform, a za negativnu kontrolu 0,9%-tna fiziološka otopina.

Za pripremu početnog inokuluma rabila se je 24-satna kultura standardnih sojeva bakterija na krvnim pločama tako da se ezom taknulo 4-5 kolonija i napravila suspenzija soja u 5 ml 0,9% fiziološke otopine (NaCl). Gustoća suspenzije bila je 0,5 Mc Farlanda (108 CFU/ml). Standardni inokulum dalje se razrjeđivao s fiziološkom otopinom u omjerima 1:10, 1:10², 1:10³, 1:10⁴, 1:10⁵ i 1:10⁶. Svako od šest prije navedenih razrjeđenja rasporedilo se je u 10 kiveta, tako da je u svaku kivetu mikropipetom

dobrano 0,2 ml razrjeđenja. Isti je postupak napravljen za svaku pojedinu bakterijsku vrstu. Zatim se razrjeđenjima suspenzija (0,2 ml) dodalo 0,2 ml svakog od pet ispitivanih otapala, uključujući i kontrole. Time se dobilo 60 uzoraka za pojedinu bakterijsku vrstu.

Uzorci su podijeljeni u dvije podskupine (30 uzoraka za svaku bakterijsku vrstu) i ostavljeni u staklenim kivetama hermetički zatvorenima s izoliranim gumenim čepom na sobnoj temperaturi 10 minuta za jednu i 30 minuta za drugu podskupinu. Pripremljeni uzorci za razdoblja od 10 i 30 minuta, uključujući i kontrole, nasađeni su na krvne ploče i inkubirali na 37°C. Postupak nasađivanja izvodio se tako da se 0,1 ml pojedinog razrjeđenja staklenim štapićem nanio na krvnu ploču i razmazao u obliku slova "L". Pošto je tekućina osušena, ploče su pohranjene u termostat, a nakon 24 sata brojene su kolonije. Čitav je postupak još jedanput ponovljen.

Rezultati

Rezultati ove studije pokazuju da halotan ima najveću sveukupnu antibakterijsku učinkovitost, poput pozitivne kontrole (kloroform). On je uništio sve koncentracije sojeva *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* u oba razdoblja (10 minutni i 30 minutni dodir s bakterijskim sojevima).

Eukaliptol je u oba razdoblja pokazao antibakterijski učinak za *Staphylococcus aureus*, ali ne i za *Enterococcus faecalis* kojega su kolonije rasle nakon tretmana za oba razdoblja ovisno o razrjeđenju standardnog inokuluma od 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² do 10¹ kolonija kao i kod negativne kontrole.

Narančino ulje nije pokazalo antibakterijsku učinkovitost niti u jednome razdoblju. *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* rasli su na svim krvnim pločama ovisno o razrjeđenju standardnog inokuluma od 10⁶, 10⁵, 10⁴, 10³, 10² do 10¹ kolonija kao i kod negativne kontrole. Rezultati antibakterijske učinkovitosti otapala vidljivi su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 1. Antibakterijski učinak ispitivanih otapala. Vidljiv je rast kolonija *Staphylococcus aureus* nakon djelovanja otapala u razdoblju od 10 i 30 minutaTable 1. Antibacterial activity of the examined solvents. *Staphylococcus aureus* colony growth observed after 10 and 30 minutes of dilutant activity.

	Razrjeđenje standardnog inokuluma soja <i>Staphylococcus aureus</i> / Dilutions of the standard inoculum of <i>Staphylococcus aureus</i>					
	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶
Pozitivna kontrola / Positive control	R	R	R	R	R	R
Halothane	R	R	R	R	R	R
Eucalyptol	R	R	R	R	R	R
Narančino ulje / Orange oil	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
Negativna kontrola / Negative control	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10

Tablica 2. Antibakterijski učinak ispitivanih otapala. Vidljiv je rast kolonija *Enterococcus faecalis* nakon djelovanja otapala u razdoblju od 10 i 30 minutaTable 2. Antibacterial activity of the examined solvents. *Enterococcus faecalis* colony growth observed after 10 and 30 minutes of dilutant activity.

	Razrjeđenje standardnog inokuluma soja <i>Enterococcus faecalis</i> / Dilutions of the standard inoculum of <i>Enterococcus faecalis</i>					
	1:10	1:10 ²	1:10 ³	1:10 ⁴	1:10 ⁵	1:10 ⁶
Pozitivna kontrola / Positive control	R	R	R	R	R	R
Halothane	R	R	R	R	R	R
Eucalyptol	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
Narančino ulje / Orange oil	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10
Negativna kontrola / Negative control	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10

Rasprava

Rezultati ove studije pokazali su da halotan ima najveću sveukupnu antibakterijsku učinkovitost, poput kloroforma. Uništio je sve koncentracije sojeva *Enterococcus faecalis* i *Staphylococcus aureus* u oba razdoblja. Ti su rezultati očekivani s obzirom na prije provedena istraživanja kojima je dokazano da halotan ima sposobnost otapanja proteina (15) te da je njegova citotoksičnost prema Barbosi i sur. (16) podjednaka kloroformu. Oni su na L929 mišjim stanicama fibroblasta ispitivali citotoksičnost najčešće rabljenih otapala gutaperke: terpentina, kloroforma i halotana. Terpentini je bio najtoksičniji, a halotan i kloroform imali su podjednak broj staničnih oštećenja.

Ulje eukaliptusa je u oba razdoblja pokazalo polovičan antibakterijski učinak. Eukaliptol je djelovao baktericidno na *Staphylococcus aureus*, ali ne i na *Enterococcus faecalis* čije su kolonije rasle kao

i kod negativne kontrole. To se slaže s navodima Pattnaika i sur. (17) koji su ispitivali antibakterijsko djelovanje pet esencijalnih ulja (eukaliptol, limunovo ulje, geraniol, linalool i mentol) na 19 bakterija (uključujući gram-pozitivne koke i bacile te gram-negativne bacile) i 12 gljivica. Rezultati su pokazali da sva otapala imaju jače ili slabije antibakterijsko djelovanje s tim da je eukaliptol inhibirao 16 bakterijskih i 7 gljivičnih vrsta.

Narančino ulje nije pokazalo antibakterijsku učinkovitost ni u jednome razdoblju. *Staphylococcus aureus* i *Enterococcus faecalis* rasli su na svim krvnim pločama. Sva otapala djelovala su na bakterije po mikrobiološkom načelu "sve ili ništa".

Od otapala koja su do danas rabljena za reviziju, najbolju antibakterijsku aktivnost ima kloroform. Zbog toga je izabran za pozitivnu kontrolu. Molander i sur. (18) su u 21 slučaju kod kojeg se rabio kloroform kao otapalo utvrdili znatno smanjen rast bakterija. To su objasnili činjenicom da je

kloroform toksičan i zbog te karakteristike ometa mikroorganizme u njihovu razmnožavanju. Međutim, u našoj usporednoj studiji primijećeno je zamjetno protiskivanje intrakanalnoga razmekšanog materijala pri uporabi kloroforma, a posebice halotana tijekom revizije. Chutich i sur. (19) mjerili su ostatni volumen kloroformom, halotanom i xylenom razmekšane gutaperke protisnute kroz apeks. Rezultate su dobili uspoređujući težine samog otapala (prije i nakon zahvata) koje su skupljali u tubice hermetički pričvršćene na apeks. Zaključili su da su dobivene doze vjerojatno toksične. Opisana je i hepatotoksičnost navedenih spojeva (20), a mogu izazvati morfološke promjene spermatozoe miševa (21) te genotoksične aktivnosti na bubrege štakora (22).

Unatoč slabijem antibakterijskom učinku na ove dvije bakterijske vrste eterična ulja trebala bi biti prvi izbor kod revizije kanalnoga punjenja. To se osobito odnosi na eukaliptusovo ulje kojim se postižu zadovoljavajući eksperimentalni i klinički rezultati u vremenu i kakvoći provedene revizije.

Literatura

- HAAPASALO M. Black-pigmented gram-negative anaerobes in endodontic infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1993;6:213-8.
- WASFY MO, Mc MAHON KT, MINAH GE, FALKLER WA. Microbial evaluation of periapical infections in Egypt. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:100-5.
- SUNDQVIST G. Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiol Immunol* 1992; 7:257-62.
- BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res* 1981; 89:321-8.
- BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. Bacteriological evaluation of the effect of 0.5 per cent sodium hypochlorite in endodontic therapy. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983; 55:307-12.
- BYSTRÖM A, SUNDQVIST G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18:35-40.
- MATUSOW RJ. Endodontic cellulitis "flare-up". Case report. *Aust Dent J* 1995; 40:36-8.
- SUNDQVIST G, FIGDOR D, PERSSON S, SJÖGREN U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998; 85:86-93.
- HAAPASALO M, ORSTAVIK D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66: 1375-9.
- ORSTAVIK D, HAAPASALO M. Disinfection by endodontic irrigants and dressing of experimentally infected dentinal tubules. *Endod Dent Traumatol* 1990; 6:142-9.
- SAFAVI KE, SPANGBERG LSW, LANGELAND K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endodon* 1990; 16:207-10.
- SJÖGREN U, HAPPONEN RP, KAHNBERG KE, SUNDQVIST G. Survival of *Arachnia propionica* in peripical tissue. *Int Endod J* 1988; 21:277-82.
- SUNDQVIST G, REUTERWING C-O. Isolation of *Actinomyces israelii* from periapical lesion. *J Endodon* 1980; 6:602-6.
- NAIR PNR, SCHROEDER HE. Periapical actinomycosis. *J Endodon* 1984; 10:567-70.
- ECKENHOFF RG, SHUMAN H. Halothane binding to soluble proteins determined by photoaffinity labeling. *Anesthesiology* 1993; 79:96-106.
- BARBOSA SV, BURKARD DH, SPANGBERG LS. Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. *J Endodon* 1994; 20:6-8.
- PATTNAIK S, SUBRAMANYAM VR, BAPAJI M, KOLE CR. Antibacterial and antifungal activity of aromatic constituents of essential oils. *Microbios* 1997; 89:39-46.
- MOLANDER A, REIT C, DAHLEN G, KVIST T. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998; 31:1-7.
- CHUTICH MJ, KAMINSKI EJ, MILLER DA, LAUTENSCHLAGER EP. Risk assessment of the toxicity of solvents of gutta-percha used in endodontic retreatment. *J Endodon* 1998; 24:213-6.
- HARRISON GG. The effect of exposure to halogenated anaesthetic on liver glutathione levels in rats. An index of hepatotoxicity. *S Afr Med J* 1979; 55:555-7.
- LAND PC. Morphologic changes in mouse spermatozoa after exposure to inhalational anesthetics during early spermatogenesis. *Anesthesiology* 1981; 54:53-6.
- ROBBIANO L, MERETO E, MIGLIAZZI MA, PASTORE P, BRAMBILLA G. Increased frequency of micronucleated kidney cells in rats exposed to halogenated anaesthetics. *Mutat Res* 1998; 413:1-6.