

Antimikrobni učinak Calasepta, Superlux calcium hydroxid liner a i gutaperka štapića presvučenih kalcijevim hidroksidom

Danijela Vrček¹
Goranka Prpić-Mehićić²
Arjana Tambić-Andrašević³
Renata Poljak-Guberina⁴
Nada Galić²
Marina Katunarić²

¹Privatna stomatološka ordinacija, Varaždin
²Zavod za dentalnu patologiju Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu
³Klinika za infektivne bolesti "Dr Fran Mihaljević", Zagreb
⁴Privatna stomatološka ordinacija, Zagreb

Sažetak

Mikroorganizmi i učinci njihova metabolizma glavni su uzročnici patoloških promjena u zubnoj pulpi i u periradikularnom tkivu. Svrha našega istraživanja bila je in vitro odrediti bakterijsku učinkovitost Calasepta (Speico, Darmstadt, Njemačka), Superlux calcium hydroxide-linera (Dental Material Gesellschaft, Hamburg, Njemačka) i Calcium hydroxide cones (ROEKO Langenau, Njemačka) u izravnom doticaju s mikroorganizmima. Uporabljene su mikroorganizmi Enterococcus faecalis (ATCC 29212) i Candida albicans (NCTC 3123). Pripravljena je prekonocna miješana kultura mikroorganizama (10^8 CFU/ml). U tu suspenziju na 5 je minuta uronjeno ukupno 36 absorbirajućih sterilnih papirnih konusa N 50 (ROEKO Langenau, Njemačka) i 18 gutaperka konusa presvučenih kalcijevim hidroksidom (ROEKO Langenau, Germany). Konusi su nakon toga smješteni u petrijevke (7). Papirni štapići tada su pažljivo prekriveni s Calaseptom ili Superlux calcium hydroxide linerom. U razmacima od 0, 6, 12, 24, 48 i 72 sata tri "pointa" od svake ispitne skupine su uklonjena iz doticaja s pastom kalcijeva hidroksida i uronjeni u soja triptoza bujon. Inkubirani su 72 h na 37°C, aerobno. Antimikrobni učinak Calasepta i Superlux Calcium hydroxid liner pokazao se nakon 6 h za Enterococcus faecalis i nakon 12 h za Candidu albicans. Antimikrobno djelovanje gutaperka štapića prekrivenih kalcijevim hidroksidom nije primijećeno nit za jedan ispitan mikroorganizam u 72 h.

Ključne riječi: Candida albicans, Enterococcus faecalis, Calasept, Superlux calcium hydroxid liner, gutaperka štapići presvučeni kalcijevim hidroksidom.

Acta Stomat Croat
2002; 203-207

IZVORNI ZNANSTVENI
RAD
Prilježeno: 18. siječnja 2002.

Adresa za dopisivanje:

Goranka Prpić-Mehićić
Zavod za bolesti zuba
Stomatološki fakultet
Gundulićeva 5, 10000 Zagreb

Uvod

Mikroorganizmi i učinci njihova metabolizma glavni su uzročnici patoloških promjena u zubnoj pulpi i u periradikularnome tkivu. Uspjeh endodontske terapije ovisi o eliminaciji bakterija i njihovih toksina iz korijenskoga kanala (1). To uobičajeno postižemo mehaničkom instrumentacijom pomognutom raznim otopinama za ispiranje i antibakterijskim uloškom u korijenskome kanalu između dva posjeta (2, 3).

Ipak, pojedini slučajevi rezistentni su na rutinsku terapiju i infekcija može persistirati mjesecima ili čak godinama unatoč liječenju (4).

Fakultativno anaerobne bakterije i gljive identificirane su kod persistirajućih endodontskih infekcija (5).

Materijale na bazi kalcijeva hidroksida često upotrebljavamo u endodontskoj terapiji za stimulaciju apeksifikacije, pri zatvaranju perforacija, da pospješuju zaraštavanje vodoravnih fraktura korijena i da nadziru eksternu i internu upalnu resorpciju. Kalcijev hidroksid također je glavna sastavnica pojedinih pasta koje služe kao intrakanalni ulošci u terapiji periapikalnih lezija (6, 7). Njegova izvrsna antibakterijska djelotvornost i poticanje mineralizacije rezultat je visokih pH vrijednosti (lužina) i disocijacije na OH^- i Ca^{2+} ione (8). Razne komercijalne raspoložive paste na bazi kalcijeva hidroksida imaju različit kemijski sastav, zbog čega alkalični potencijal pojedine smjese može biti različit (5, 9)

U usnoj šupljini nalazi se više od 300 različitih vrsta mikroorganizama. Neke imaju važnu ulogu u razvoju oralnih i dentalnih bolesti (10, 11). *Candida albicans* je najčešći kvasac izoliran iz usne šupljine zdrave ili liječene odrasle osobe. *Candida albicans* izolirana je iz inficirane zubne pulpe, zubnoga karijesa, subgingivalne flore i iz korijenskoga kanala. Može uzrokovati bolesti uz predisponirajuće čimbenike kao što su loša higijena, diabetes, malignitet, HIV infekcija, imunosupresivna terapija i ostali (12).

Studije govore da je *Enterococcus faecalis*, kao najčešći izolat inficiranoga korijenskoga kanala u slučajevima terapije rezistentnih apikalnih lezija, često je raobljen u raznim proučavanjima antibakterijskih svojstava materijala zbog svoje razmjerne

rezistentnosti na terapiju (13). Svrha našeg istraživanja bila je *in vitro* odrediti antibakterijsku aktivnost triju materijala koji sadrže kalcijev hidroksid, a koji se obično upotrebljavaju kao intrakanalni uložak. Antimikrobna učinkovitost ispitivanoga materijala ispitala se u izravnom doticaju s mikroorganizmima. Raobljeni su sljedeći materijali koji sadrže kalcijev hidroksid: Calasept (SPEIKO - Dr. Speir GmbH, Darmstadt, Njemačka), Superlux calciumhydroxide - Liner (DMG - Dental - Material Gesellschaft, Hamburg, Njemačka) i Calcium hydroxide cones (Roeko, Langenau, Njemačka; to su gutaperka štapići presvučeni kalcijevim hidroksidom.).

Materijali i metode

Ispitivana su *in vitro* tri različita materijala koji sadrže kalcijev hidroksid kako bi se odredila njihova antibakterijska učinkovitost. Calasept (Speico, Darmstadt, Njemačka), Superlux calcium hydroxide-Liner (Dental Material Gesellschaft, Hamburg, Njemačka) i Calcium hydroxide cones (ROEKO, Langenau, Njemačka) raobljeni su u izravnom doticaju s mikroorganizmima. Ta su tri materijala izabrana za ovo istraživanje jer su u naših kliničara u širokoj uporabi kao intrakanalni ulošci između dva posjeta.

Upotrijebljeni mikroorganizmi jesu: *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) i *Candida albicans* (NCTC 3123).

Pripravljena je prekonocna miješana kultura mikroorganizama (10^8 CFU/ml). U tu suspenziju uroanjeno je na 5 minuta ukupno 36 absorbirajućih sterilnih papirnih konusa N 50 (ROEKO Langenau, Njemačka) i 18 gutaperka konusa presvučenih kalcijevim hidroksidom (ROEKO Langenau, Njemačka). Konusi su nakon toga smješteni u petrijevke (7). Papirni štapići tada su pažljivo prekriveni s Calaseptom ili Superlux calcium hydroxide linerom. U razmacima od 0, 6, 12, 24, 48 i 72 sata tri su "pointa" od svake ispitne skupine uklonjena iz doticaja s pastom kalcijeva hidroksida i urojnjeni u soja triptoza bujon. Inkubirani su 72 h na 37°C , aerobno. Nakon toga očitani su rezultati antimikrobne učinkovitosti (stereomikroskopski).

Uzorci su podijeljeni u 6 skupina ovisno o vremenu uzimanja na 0, 6, 12, 24, 48 ili 72 sata (po

devet uzoraka u svakoj skupini). Kontrolna skupina bili su uzorci uzeti u 0 h (papirni konusi kao i gutaperka konusi inficirani su mikroorganizmima), po dva konusa za svaki ispitivani mikroorganizam.

Rezultati

Antimikrobni efekt Calasept i Superlux calcium hydroxide linera u izravnom doticaju s mikroorganizmima pokazao se nakon 6 h za *Enterococcus faecalis* i nakon 12 h za *Candida albicans*. Nasuprot tomu, antimikrobno djelovanje gutaperka štapića prekrivenih kalcijevim hidroksidom nije primijećeno ni za *Enterococcus faecalis* niti za *Candida albicans* u razdoblju od 72 h (Tablica 1).

dijama koje su *in vitro* i *in vivo* pokazale antimikrobno djelovanje kalcijeva hidroksida (4).

Uočeno je da većina bakterija u nekrotičnom pulpnom tkivu bude uništena unutar 6 minuta u prisutnosti saturirane otopine kalcijeva hidroksida *in vitro* (14). No kada je kalcijev hidroksid bio apliciran *in vivo* u korijenski kanal na 10 minuta, nakon kemomehaničke obradbe nije se pokazao djelotvoran u eliminaciji bakterija. To se objašnjava nemogućnošću difuzije hidroksilnih iona kroz dentin u tako kratkom razdoblju zbog puferskoga kapaciteta hidroksiapatita (2, 15). Destrukcija bakterija *in vitro* olakšana je velikom površinom pristupačnom za djelovanje hidroksilnih iona, što nije moguće postići u kliničkome radu (14).

Tablica 1. Antibakterijska učinkovitost Calasepta, Superlux kalcijum hidroksid linera i gutaperka štapića presvučenih kalcijevim hidroksidom

Table 1. Antibacterial effect of Calasept, Superlux calcium hydroxide liner and calcium hydroxide cones

Vrijeme (h) / Time (h)	Mikroorganizam / Microorganism	Calasept	Superlux calciumhidroksid-Liner	Calcium hidroksid cones
0	<i>Enterococcus faecalis</i>	+++	+++	+++
	<i>Candida albicans</i>	+++	+++	+++
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+++
	<i>Candida albicans</i>	--+	+++	+++
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+++
	<i>Candida albicans</i>	---	---	+++
24	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+++
	<i>Candida albicans</i>	---	---	+++
48	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+++
	<i>Candida albicans</i>	---	---	+++
72	<i>Enterococcus faecalis</i>	---	---	+++
	<i>Candida albicans</i>	---	---	+++

Rasprava

Cilj je uspješne endodontske terapije eliminirati mikroorganizme iz korijenskih kanala i spriječiti reinfekciju. To postizemo čišćenjem i ispiranjem korijenskih kanala. Nakon instrumentacije sustava korijenskih kanala, mikroorganizmi i dalje postoje u smanjenom broju, a pojačano se razmnožavaju u praznim kanalima između dva posjeta (13). Zato je upotreba intrakanalnih medikamenata pomoćna terapija čišćenju i širenju preporučena u mnogim stu-

Sjögren i sur. (16) su proučavajući antimikrobno djelovanje kalcijeva hidroksida pokazali da bakterije koje su preostale nakon kemomehaničke preparacije budu eliminirane za 7 dana, ali je proces neučinkovit nakon 10 minuta.

Kalcijev hidroksid ima sposobnost hidrolize lipida iz bakterijskih lipopolisaharida, uzrokujući njihovo raspadanje, a također može promijeniti biološka svojstva endotoksina (17). Kontakiotis i sur. (18) su *in vitro* pokazali da kalcijev hidroksid, absorbirajući ugljični dioksid, može posredno pomoći

djelovanje antimikrobnih sredstava na striktno i fakultativno anaerobne bakterije. Esterela i sur. (19) postavili su hipotezu da kalcijev hidroksid stvara reverzibilnu i ireverzibilnu inaktivaciju bakterijskih enzima. To se može primijetiti u ekstremnim uvjetima pH vrijednosti u dužem razdoblju, kada nastaje potpun gubitak biološke aktivnosti citoplazmatske membrane. Kada se postigne idealan pH, primjećuje se reverzibilnost enzimske funkcije. Lehniger (20) izvješćuje da ekstremne pH vrijednosti uzrokuju odmotavanje mnogih proteina s posljedičnim gubitkom bioloških aktivnosti. Mnogo se godina smatralo da je proces denaturacije ireverzibilan. No ako se pH vrati na normalne vrijednosti, vraća se i prirodna struktura i izgubljene biološke aktivnosti.

Polimorfonuklearni leukociti i osteoklasti u kiselome mediju dovode do dezintegracije tvrdih zubnih tkiva, a to pak do vanjske resorpcije korijena (2). Alkalni pH u području tvrdih zubnih tkiva tijekom endodontskoga tretmana je poželjan i govori u prilog uporabe kalcijeva hidroksida.

Razni ulošci kalcijeva hidroksida različita su kemijskog sastava i važno je znati da se alkalni potencijal svake smjese može razlikovati. U našem istraživanju ispitana je antimikrobna djelotvornost triju različitih materijala koji sadrže kalcijev hidroksid.

Enterococcus faecalis izoliran je u većem broju iz korijenskoga kanala nakon kemomehaničke obradbe nego pri uzimanju ubriska prije same terapije (16). To potvrđuje da sama obradba nije dovoljna za eliminaciju te bakterije. Nalaz da ta bakterija postoji u uzorcima vitalnih zuba i zuba s velikim koronarnim destrukcijama sugerira da ulazi u korijenski kanal kroz karioznu leziju i gingivni sulkus koji se čini normalnim staništem za *Enterococcus faecalis* (2, 13).

Candida albicans je pleomorfan mikroorganizam koji se javlja u različitim razvojnim oblicima kao kvasci, pseudo i prave hife, i klamidospore. Svaki razvojni oblik ovisi o uvjetima okoline, kao što su pH, temperatura i nutritivni izvori (10). Pojava kvasaca u persistirajućoj infekciji može biti rezultat kontaminacije za vrijeme tretmana. Razlika osjetljivosti gljiva i bakterija na uložak u korijenskome kanalu može se objasniti infekcijom korijenskoga kanala kvascima. Antifungalni učinak medikamentata koji se rutinski rabe u tretmanu liječenja korijenskoga kanala nije poznat (2).

Waltimo i sur. (21) su proučavajući antimikrobni učinak različitih otopina za ispiranje korijenskoga kanala pokazali da su stanice *Candida albicans* visoko rezistentne na kalcijev hidroksid u vremenu od 24 h, ali kombinacija kalcijeva hidroksida s hipokloritom ili klorheksidinom daje pripravak sa širokim spektrom djelovanja i dugotrajnim učinkom.

U našem istraživanju stanice *Candida albicans* bile su osjetljive nakon 12 h na testirane materijale.

Razlog takvim rezultatima mogu biti eksperimenti rađeni *in vitro*, jer postoje studije koje upozoravaju na različito djelovanje kalcijeva hidroksida u *in vitro* i *in vivo* uvjetima. Kod *in vitro* ispitivanja imamo izravan doticaj između mikroorganizma i kalcijeva hidroksida, a u *in vivo* uvjetima različiti čimbenici utječu na aktivnost hidroksilnih iona.

Zaključci

Rezultati našeg istraživanja pokazali su djelotvornost Calasepta i Superlux calcium hydroxide liner na *Enterococcus faecalis* u vremenu od 6 h i na *Candida albicans* u vremenu od 12 h. Gutaperka s kalcijevim hidroksidom pokazala se je neučinkovitom za oba ispitana mikroorganizma u razdoblju od 72 h.

Calasept i Superlux calcium hydroxide liner možemo preporučiti kao intrakanalni uložak između dva posjeta prigodom endodontske terapije. Buduća istraživanja *in vivo* nužna su da bi se bolje razumjela antibakterijska učinkovitost materijala koji sadržavaju kalcijev hidroksid kao intrakanalni uložak.

Literatura

1. KONTAKIOTIS E, NAKOU M, GEORGOPOULOU M. *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J* 1995; 28: 285-9.
2. SJÖGREN U, FIGDOR D, SPANGEBERG L, SUNDQUIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
3. SIQUEIRA JF, PEREIRA DA SILVA CHF, CERQUEIRA MDO, LOPES HP, UZEDA M. Effectiveness of four chemical solutions in eliminating *Bacillus subtilis* spores on gutta-percha cones. *Endod Dent Traumatol* 1998; 14: 124-6.

4. WALTIMO TMT, SIRÉN EK, TORKKO HLK, OLSEN I, HAAPASALO MPP. Fungi in therapy - resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997; 30: 96-101.
5. ESTERELA C, PIMENTA FC, ITO LY, BAMMAN LL. *In vitro* determination of direct antimicrobial effect of calcium hydroxide. *J Endodon* 1998; 24: 15-7.
6. BEITES PG, PISSIOTIS E, KOULAOUZIDOU E, KORTSARIS AH. *In vitro* release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. *J Endodon* 1997; 23: 413-5.
7. GUIGAND M, VULCAIN JM, DANTEI - MORAZIN A, BONNAURE - MALLET M. *In vitro* study of intradental calcium diffusion induced by two endodontic biomaterials. *J Endodon* 1997; 23: 387-90.
8. BEZERRA DA SILVA LA, LEONARDO MR, DA SILVA RS, ASSED S, GUIMARÁES LFL. Calcium hydroxide root canal sealers: evaluation of pH, calcium ion concentration and conductivity. *Int Endod J* 1997; 30: 205-9.
9. MURRAY PE, LUMLEY PJ, SMITH AJ, ROSS HF. The influence of sample dimensions on hydroxyl ion release from Calcium Hydroxide products. *Endod Dent Traumatol* 1999; 15: 251-7.
10. SEN BH, SAFAVI KE, SPANGBERG LSW. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol*, 1997; 42: 513-20.
11. SUNDQUIST G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78: 522-30.
12. SEN BH, KAMRAN ES, SPANGBERG LSW. Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997; 84: 68-73.
13. FUSS Z, WEIS EL, SHALAU M. Antibacterial activity of calcium hydroxide - containing endodontic sealers on *Enterococcus faecalis in vitro*. *Int Endod J* 1997; 30: 397-402.
14. WANG JD, HUMME WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J* 1988; 21: 17-26.
15. HAAPASOLO HK, SIREN EK, WALTIMO TMT, ORSTAVIK D, HAAPASOLO MPP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an *in vitro* study. *Int Endod J* 2000; 33: 126-31.
16. SJÖGREN U, FIDGOR D, SPANGBERG L, SUNDQUIST G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24: 119-25.
17. BARTHEL CR, LEVIN LG, REISNER HM, TROPE M. TNF - alpha release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *E. coli* lipopolysaccharide. *Int Endod J* 1996; 29: 195-210.
18. KONTAKIOTIS E, NAKAU M, GEORGOPOULOU M. *In vitro* study of the indirect action of calcium hydroxide on the anaerobic flora of the root canal. *Int Endod J* 1995; 28: 285-9.
19. ESTERELA C, SYDNEY GB, BAMMMANN LL, FELIPPE O Jr. Estudo do efeito biológico do pH na atividade enzimática de bacterias anaerobias. *Rev Fac Odontol Baurn* 1994; 2: 31-8.
20. LEHNINGER AL. *Principios de Bioquímica*. 2nd ed São Paulo, Brasil: Sarvier, 1986; 127-8.
21. WALTIMO TMT, ORSTAVIK D, SIREN EK, HAAPASALO MPP. *In vitro* susceptibility of *Candida albicans* to four disinfectants and their combinations. *Int Endod J* 1999; 32: 421-9.