Otpornost bakterijskog biofilma na djelovanje antimikrobnih sredstava

Balić, Merima

Master's thesis / Diplomski rad

2016

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Dental Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Stomatološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:127:382656

Rights / Prava: Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0 Unported/Imenovanje-Nekomercijalno-Bez prerada 3.0

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

University of Zagreb School of Dental Medicine Repository

STOMATOLOŠKI FAKULTET

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

Merima Balić

OTPORNOST BAKTERIJSKOG BIOFILMA NA DJELOVANJE ANTIMIKROBNIH SREDSTAVA I ANALIZA KONFOKALNOM LASERSKOM MIKROSKOPIJOM

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2016.

Rad je ostvaren u Zavodu za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Stomatološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Voditelj rada: prof. dr. sc. Ivica Anić

Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju

Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu

Lektor za hrvatski jezik: Tomislav Salopek

profesor hrvatskog jezika i književnosti

Lektor za engleski jezik: Iva Gugo

magistra engleskog jezika i književnosti

Rad sadržava: 39 stranica

11 slika

1 CD

SADRŽAJ:

1. UVOD 1

2. SVRHA RADA 3

3. INTERAKCIJA LASERA I TKIVA 4

4. LASERI ZA DEZINFEKCIJU ENDODONTSKOG PROSTORA 5

4.1. Nd:YAG LASER..... 7

4.2. DIODNI LASER 8

4.3. ERBIJ LASER..... 9

5. NAČINI PRIMJENE LASERA UDEZINFEKCIJI I ČIŠĆENJU KORIJENSKIH KANALA 10

5.1. Tehnika direktnoga zračenja 10

5.2. Laserski aktivirano ispiranje 12

5.3. Antimikrobna fotodinamska terapija 14

6. METODE EVALUACIJE UČINKOVITOSTI DEZINFEKCIJE..... 16

6.1. KULTIVACIJA MIKROORGANIZAMA 16

6.2. MIKROSKOPSKE METODE 19

6.2.1. SEM 19

6.2.2. Konfokalni laserski pretražni mikroskop 20

6.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM 21

7. RASPRAVA 23

8. ZAKLJUČAK 26

9. SAŽETAK 27

10. SUMMARY..... 28

11. LITERATURA 29

12. ŽIVOTOPIS 37

POPIS OZNAKA I KRATICA

NaOCl – natrijev hipoklorit

EDTA – etilendiaminotetraoctena kiselina

Nd:YAG – neodimij: itrij-aluminij-garnet (engl. Neodymium-doped Yttrium Aluminium Garnet)

Er:YAG – erbij: itrij-aluminij garnet (engl. Erbium Ytrium Aluminium Garnet)

Er,Cr:YSGG – erbij-kromij: itrij-skandij-galij garnet (engl. Erbium Chromium Yttrium Scandium Gallium Garnet)

LAI – laserski aktivirano ispiranje (engl. laser activated irrigation)

PIPS – fotonsko inicirajuće fotoakustično strujanje (engl. photon-induced photoacoustic streaming)

aPDT – antimikrobna fotodinamska terapija (engl. antimicrobial photodynamic therapy)

PAD – fotoaktivirana dezinfekcija (engl. photoactive disinfection)

PCR – lančana reakcija polimerazom (engl. polymerase chain reaction)

CLSM – konfokalni laserski mikroskop (engl. confocal laser scanninf microscope)

1. UVOD

Uspjeh endodontskog liječenja temelji se na dezinfekciji kanalnog sustava zuba i prevenciji reinfekcije (1, 2). Zbog složene anatomije endodontskog prostora, mehaničkom instrumentacijom nije moguće potpuno očistiti korijenski kanal i veliki dio dentinskog zida ostaje i dalje prekriven bakterijskim biofilmom (3, 4). Zbog toga je ispiranje korijenskog kanala antimikrobnim sredstvima neizostavan dio endodontskog liječenja.

Sredstvo za ispiranje, tradicionalno se, u korijenski kanal unosi špricom i iglom (Slika 1 i 2) a natrijev hipoklorit (NaOCl) najčešće je rabljeno sredstvo za ispiranjekorijenskih kanala (5, 6). Problem konvencionalne, pasivne tehnike ispiranja špricom jest neadekvatna raspodjela antimikrobnoga sredstva, jer je brzina strujanja tekućine najveća u području vrška igle (7). Osim toga, velika površinska napetost natrijeva hipoklorita spriječava prodor sredstva u sve intrakanalne nepravilnosti, posebno u apikalnom dijelu korijenskog kanala (8). Zbog toga mikroorganizmi često ostaju u nepristupačnim dijelovima korijenskog kanala, gdje potiču upalu i mogu spriječiti cijeljenje periapikalne lezije (9).

Primjena lasera u dezinfekciji i čišćenju korijenskih kanala relativno je nova tehnika, čiji se puni potencijal još uvijek istražuje, a i zbog cijene uređaja nije još u široj upotrebi. U endodonciji se, ovisno o indikaciji, uporabljuju gotovo sve vrste lasera koje se primjenjuju u stomatologiji.

Klinička primjena lasera u endodonciji počela je potkraj 90-ih godina prošloga stoljeća, kada su razvijeni tanki i fleksibilni fiberoptički nastavci za prijenos laserske zrake u korijenski kanal.U početku je to bilo moguće samo Nd:YAG i argon

laserskom zrakom. Početkom ovoga stoljeća laseri većih valnih duljina, erbij laseri, također su opremljeni endodontskim nastavcima veličine 200-300 µm (10). Upravo zbog toga se laseri, danas, mogu upotrijebiti za različite postupke u endodonciji kao što su pulpotomija, čišćenje i dezinfekcija korijenskog kanala, punjenje i revizija te apikalna kirurgija (11).

2. SVRHA RADA

Svrha je ovog rada bila iz literaturnih podataka opisati mogućnosti uporabe lasera za dezinfekciju korijenskih kanala te opisati načine evaluacije uspješnosti dezinfekcije.

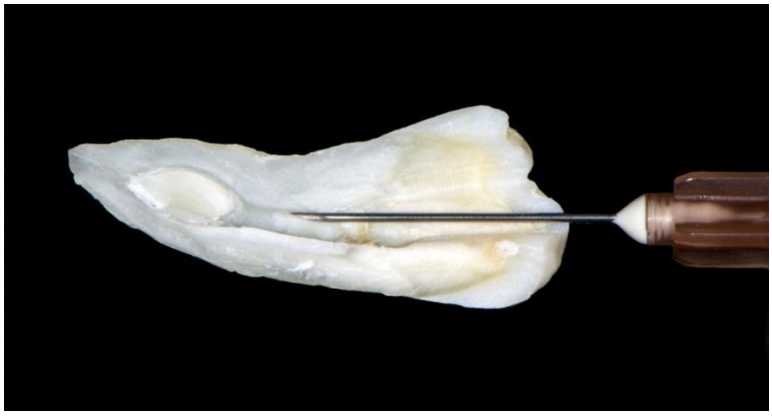
3. INTERAKCIJA LASERA I TKIVA

Laser (light amplification by stimulated emission of radiation), tj. pojačanje svjetlosti stimuliranom emisijom zračenja, naziv je za izvor svjetlosti kod kojeg se za razliku od konvencionalnih izvora svjetlosti, svjetlost generira mehanizmom stimulirane emisije. Laserski uređaj emitira elektromagnetske valove od ultraljubičastoga vidljivog do infracrvenog dijela spektra. Laserska je zraka monokromatska (jedna valna duljina), koherentna (fotoni u jednoj fazi), kolimirana (zraka s malim stupnjem divergencije), velikog intenziteta, precizna i selektivna u interakciji s biološkim tkivima (12, 13). Laserska zraka u kontaktu s površinom može se odbiti od površine (refleksija), raspršiti kroz tkivo, proći kroz njega nepromijenjena ili apsorbirati (14). Promjene u tkivu uzrokuje apsorbirani dio svjetlosne energije koja prelazi u termičku. Količina apsorbirane energije u tkivu ovisi o valnoj duljini zračenja, gustoći energije, te o optičkim i kemijskim svojstvima ciljanoga tkiva.

Ako je gustoća energije mala, djelovanje lasera na tkivo je optičko. Pri većim energijama dominira fototermički učinak, a ako se velika energija emitira tijekom kratkih pulsova, nastaje fotomehanički učinak lasera u tkivu (15). Može se zaključiti da dulje lasersko zračenje male energije razara tkivo manje od zračenja većeg intenziteta emitiranog u kratkim pulsovima (16).

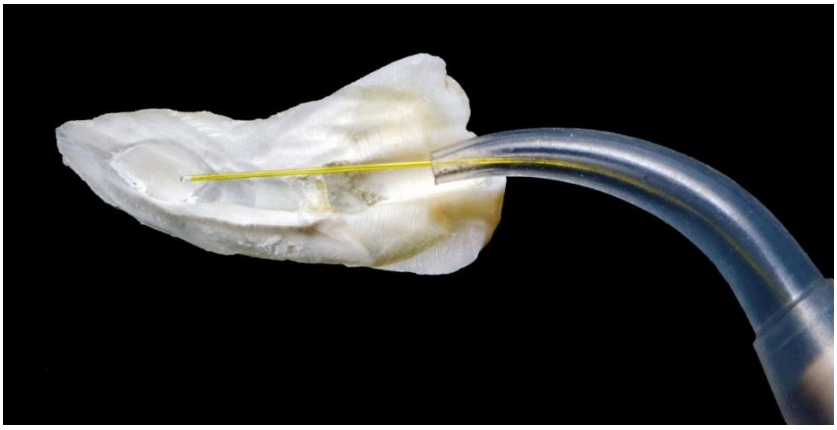
4. LASERI ZA DEZINFEKCIJU ENDODONTSKOG PROSTORA

Za dezinfekciju endodontskoga prostora mogu se rabiti Nd:YAG laser, diodni laser, argon laser, Er:YAG, Er:YSGG laser. Prednost lasera u dezinfekciji korijesnkog kanala jest prodiranje i djelovanje lasereske zrake u dubini dentina i dentinskih tubulusa. Bakterije mogu naseliti tubuluse do 1100 µm u dubinu (17). Za razliku od sredstava za ispiranje koja prodiru do 100 µm u dentinske tubuluse, zračenje Nd:YAG lasera može djelovati čak više od 1000 µm u dubinu (18). Baktericidni učinak u dubini zahtijeva uporabu onih lasera čije valne duljine zračenja prodiru kroz dentinsko tkivo, odnosno kroz hidroksiapatit i vodu. Erbij laseri, čije se zrake gotovo potpuno apsorbiraju u tvrdim zubnim tkivima stoga imaju površinski učinak i rabe se za aktivaciju sredstva za ispiranje u korijenskom kanalu.



Slika 1. Konvencionalno ispiranje iglom i špricom.

Preuzeto: prof. dr. sc. Ivica Anić



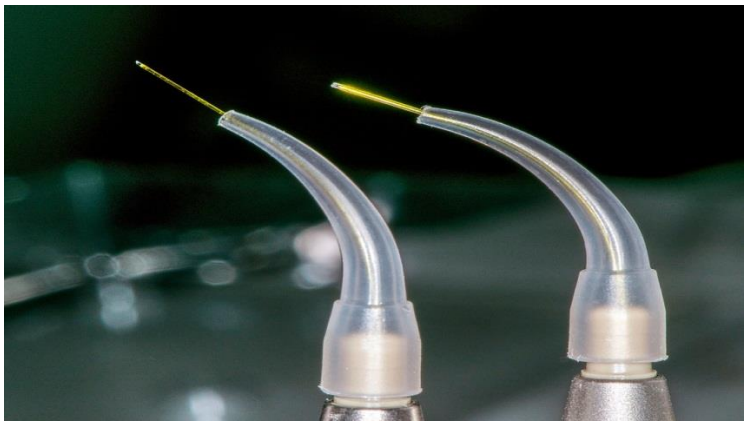
Slika 2. Fiberoptički nastavak lasera u korijenskom kanalu.

Preuzeto: prof. dr. sc. Ivica Anić

4.1. Nd:YAG (neodimij: itrij-aluminij-garnet)

Nd:YAG najistraživaniji je laser za dezinfekciju korijesnkog kanala.Toje laser s krutom jezgrom koji se sastoji od itrij-aluminijeva garnet (YAG) kristala s atomima neodimija, a emitira infracrveno zračenje valne duljine 1064 nm. Antimikrobni se učinak temelji na zagrijavanju bakterija i njihovog okoliša (19). Ostvaruje duboko baktericino djelovanje u dentinu čak do 1 mm dubine (18). Tijekom rada laserom Nd:YAG u korijenskom kanalu tanki fiberoptički nastavak treba postaviti jedan do dva milimetra od apeksa i pomicati kružnim pokretima u koronarnom smjeru (Slika 3). Time se postiže ravnomjerno zračenje svih stijenki korijenskog kanala i sprječava pretjerano zagrijavanje apeksa (20).

S obzirom na to da se valna duljina lasera Nd:YAG dobro apsorbira u pigmentiranome tkivu, a slabo u vodi, baktericidni je učinak jnešto slabiji na nepigmentiranim bakterijama (kao što je *Enterococcus faecalis*) i na bakterijskome biofilmu bogatu vodom (19, 21).



Slika 3. Nd:YAG laser

Preuzeto: prof. dr.sc. Ivica Anić

4.2. DIODNI LASER

Diodni laseri emitiraju zračenje različitih valnih dužina, najčešće vidljivi dio spektra od 660 nm te infracrveni od 810 nm i 980 nm. Upotrebljavaju se u kirurgiji mekih tkiva i za dezinfekciju jer senjihove valne duljine dobro apsorbiraju u pigmentiranim tkivima, melaninu i hemoglobinu, ali ne prodiru u dentin toliko duboko kao Nd:YAG, zbog visokog koeficijenta apsorpcije u vodi (0,68 cm - 1). Zračenje diodnog lasera prodire do 750 μm u dentinske tubuluse (22). Istraživanja su dokazala antibakterijsko djelovanje diodnog lasera u korijenskom kanalu, koje se temelji na fototermalnom učinku, čime se uklanja do 99,91% bakterija u korijenskom kanalu (23). Moritz i sur. istražili su antimikrobno djelovanje diodnog lasera valne duljine 810 nm uz djelovanje snage od 3 W tijekom 5 x 5 sekundi, pri čemu su dokazali značajan baktericidni učinak na tipove *Escherichia coli* i *Enterococcus faecalis* u korijenskim kanalima (24).

4.3. ERBIJ LASERI

U stomatologiji se danas uporabljuju dvije vrste erbij lasera različitih valnih duljina infracrvenoga spektra elektromagnetskoga zračenja. Prvi je Er:YAG laser (itrijaluminij-garnet s dodatkom erbija) valne duljine 2940 nm, a drugi Er,Cr:YSGG (itrijskandij-galij-garnet s dodatkom erbija i kromija) valne duljine 2790 nm. Valne duljine erbij lasera dobro se apsorbiraju u vodi i hidroksiapatitu, pa se primjenjuju za albaciju tvrdih i zubnih tkiva. S obzirom na to da se njihova energija gotovo potpuno apsorbira u prvih 300 do 400 µm dentinskoga tkiva, njihov je učinak površinski (25). Zbog toga su ti laseri vrlo učinkoviti u uklanjanju zaostatnoga sloja i bakterijskog biofilma (26, 27). Posljednjih se godina istražuje učinak takvih lasera u intrakanalnoj aktivaciji antimikrobnih sredstava za ispiranje. Laserski aktivirano ispiranje temelji se na stvaranju kavitacija i zvučnih strujanja tekućine u kanalu kao posljedice fototermičkog i fotomehaničkog učinka lasera.

5. NAČINI PRIMJENE LASERA U DEZINFEKCIJI I ČIŠĆENJU KORIJENSKIH KANALA

5.1. Tehnika direktnog zračenja korijenskih kanala

Tehnika direktnog zračenja korijenskih kanala podrazumijeva uporabu Nd:YAG ili diodnog lasera kao sredstva za dezinfekciju endodontskog prostora (28). Antimikrobni učinak takvih lasera temelji se na zagrijavanju bakterija preko bakterijskih kromofora koji apsorbiraju lasersko zračenje (19). Nd:YAG laser (1064 nm) ostvaruje duboko baktericidno djelovanje u dentinu (do 1 mm dubine). Tijekom rada tanki fiberoptički nastavak postavlja se jedan do dva milimetra od apeksa i pomiče kružno u koronarnome smjeru (Slika 4). Hardee i sur., te Rooney i sur.u istraživanjima provedenima sredinom 90-ih godina dokazali su veliki antibakterijski potencijal Nd:YAG lasera u korijenskom kanalu (29, 30).

Diodni laser emitira zračenje vidljivog (660 nm) i infracrvenog spektra (810, 980 nm). Zbog većeg koeficijenta apsorpcije u vodi njegove valne duljine prodiru pliće (do 750 μm) u dentinske tubuluseod lasera Nd:YAG (31). Postoje brojna mikrobiološka istraživanja koja su dokazala snažno djelovanje diodnog lasera u korijenskom kanalu (32, 33). Gutknecht i sur. postigli suviše od 99,9 postotnu redukciju bakterija nakon zračenja korijenskog kanala diodnim laserom (34).

Usprkos svemu navedenomu, u nekim istraživanjima nije dokazan bolji antimikrobni učinak takvih lasera u usporedbi sispiranjemNaOCl-om (35, 36). Prema tome, zračenje laserom ne može zamijeniti standardne protokole za dezinfekciju

NaOCl-om, te se preporučuje kao dodatna tehnika dezinfekcije na kraju kemomehaničke obrade (37).



Slika 4. Tehnika direktnog zračenja korijenskog kanala laserom

Preuzeto: prof. dr.sc. Ivica Anić

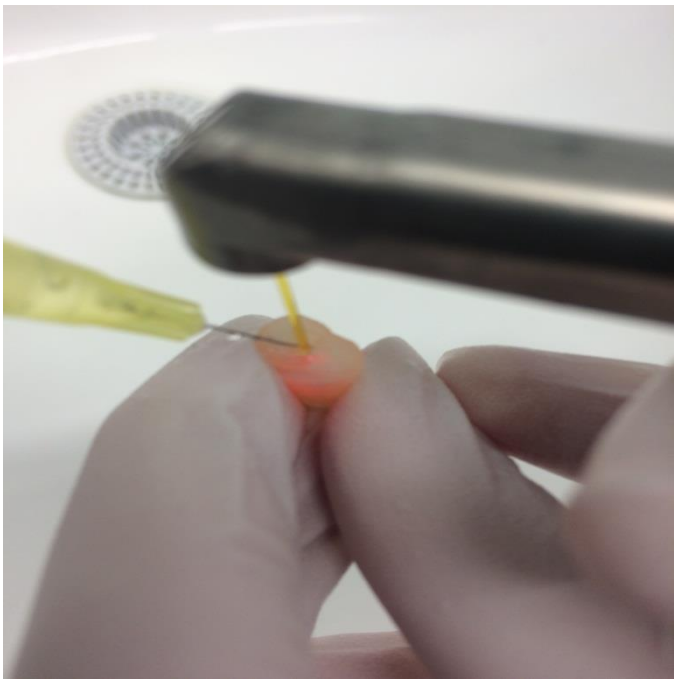
5.2. Laserski aktivirano ispiranje

Laserski aktivirano ispiranje (LAI) tehnika je fotomehaničke i fototermičke aktivacije sredstva za ispiranje koja se temelji na prijenosu pulsne energije laserskoga zračenja u sredstvo za ispiranje u korijenskom kanalu pri čemu nastaju kavitacije i udarni valovi (38). Za LAI se rabe infracrveni Er,Cr:YSGG (2790 nm) ili Er:YAG laseri (2940 nm) čije se valne duljine zračenja dobro apsorbiraju u vodi i hidroksilnim ionima hidroksiapatita.

Naime, kako se u vodi i NaOCl-u valne duljine i energija erbij lasera snažno apsorbiraju, dolazi do isparavanja vode i stvaranja mjehurića zraka, koji uzrokuju povećanje volumena sredstva za ispiranje, što izaziva veliki intrakanalni tlak koji izbacuje tekućinu iz kanala. Nakon nekoliko mikrosekundi formira se podtlak, zbog čega se tekućina vraća u kanal i uzrokuje sekundarni kavitacijski učinak (39, 40). Ovom se tehnikom uspješno uklanja zaostatni sloj i mikrobni biofilm iz korijenskog kanala (41).

Ako se laser Er:YAG rabi pri manjim energijama (20 mJ, 15 Hz) i vrlo kratkim pulsovima (50 μs), intrakanalne kavitacije i udarni valovi nastaju kao rezultat fotoakustičkog i fotomehaničkog učinka, a postupak se naziva fotonskim inicirajućim fotoakustičkim strujanjem (engl. photon-initiated photoacoustic streaming; PIPS). Tijekom PIPS-a konični se 600 μm debeli nastavak koji provodi lasersku zraku, postavlja na ulaz u korijenski kanal uz istodobno kontinuirano ispiranje (Slika 5). Prednostima PIPS-a smatraju se rad pri subablativnim energijama bez termičkog učinka, te trodimenzijsko djelovanje u cijelome endodontskom prostoru, uključujući i dentinske tubuluse (42). PIPS je pokazao najbolje rezultate u

kombinaciji s otopinom QMIX (43). Lošiji rezultati PIPS-a s NaOCl-om pripisuju se mogućemuslabljenju fotoakustičkog učinka s udaljenošću od fiber nastavka koji se aplicira u koronarnoj trećini korijenskog kanala. Slično tomu, Zhu i sur. također nisu pronašli značajnu razliku u antimikrobnoj učinkovitosti između PIPS-a i konvencionalnog ispiranja natrijevim hipokloritom (44).



Slika 5. Er:YAG laser i kontinuirano ispiranje *ex vivo* (PIPS)

5.3. Antimikrobna fotodinamska terapija

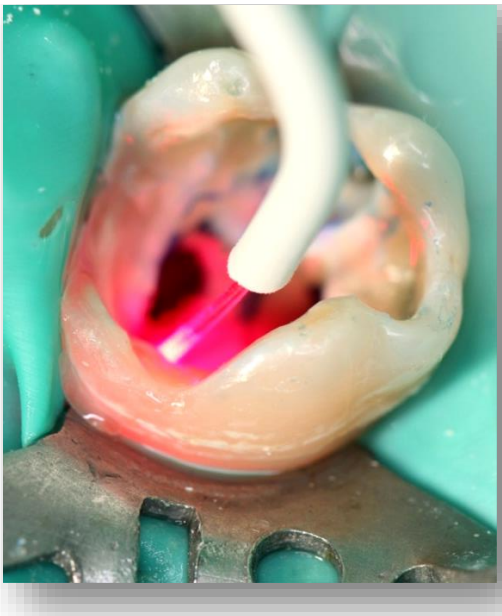
Antimikrobna fotodinamska terapija metoda je laserski izazvane fotokemijske dezinfekcije ili sterilizacije tvrdih i mekih tkiva koja se temelji na aktivaciji fotosenzitivnoga sredstva malim energijama lasera. Aktivacijom fotosenzitivnoga sredstva u prisutnosti kisika stvaraju se slobodni radikali koji oštećuju membranu bakterija i njihovu DNK (45). Fotosenzitivno sredstvo ima sposobnost vezanja za površinu bakterija i prodire u njihovu stanicu, ne oštećujući stanice domaćina (46).

Učinkovitost aPDT-a ovisi o vrsti i koncentraciji fotosenzitivnoga sredstva , vrsti bakterije, izvoru svjetlosti i parametrima zračenja (24). Najčešće se primjenjuju kombinacije diodnog lasera od 630 nm, 660 nm i 670 nm s toluidinskim ili metilenskim modrilom kao fotosenzitivnom tvari (Slika 6 i 7).



Slika 6. Fotosenzitivna tvar u korijenskom kanalu.

Preuzeto doc.dr.sc. Ivona Bago



Slika 7. Antimikrobna fotodinamska terapija diodnim laserom.

Preuzeto: doc.dr.sc. Ivona Bago

6. METODE EVALUACIJE UČINKOVITOSTI ANTIMIKROBNIH SREDSTAVA

6.1.Kultivacija mikroorganizama

Kultivacija mikroorganizama postupak je izolacije bakterije na neselektivnim i selektivnim, krutim ili tekućim umjetnim podlogama, te njihove identifikacije na temelju morfoloških i biokemijskih obilježja. Bakteriološka je podloga hranjivi medij koji svojim sastavom omogućuje rast bakterija. Njihova je osnovna namjena uzgoj bakterija u laboratorijskim uvjetima, a radi upoznavanja biokemijskih obilježja, dijagnosticiranja bolesti, izrade antigena, antibiograma i dr.

Tipovi hranjivih podloga:

1. Podjela prema podrijetlu i sastavu:

- prirodne hranjive podloge (točan sastav nije poznat; npr. krv, mlijeko)
- sintetske hranjive podloge (poznatog sastava)
- polusintetske hranjive podloge.

2. Podjela prema konzistenciji:

- tekuće hranjive podloge (bujoni)
- polutekuće (polukrute) hranjive podloge
- čvrste hranjive podloge (agari).

Krvni je agar najčešće rabljena neselektivna podloga za izolaciju bakterija. Za određivanje broja bakterija najčešće se primjenjuje Kochova metoda:

- brojenje kolonija na agarnoj podlozi u petrijevci
- služi određivanju broja živih stanica
- prebrojavaju se petrijevke na kojima je broj kolonija od 25 do 300; ovakav se raspon postigne nasađivanjem više decimalnih razrjeđenja
- brojenje se obavlja pod povećalom
- broj kolonija odgovara broju bakterijskih stanica u uzorku samo ako se svaka kolonija razvila od jedne bakterijske stanice; zbog toga se broj kolonija označuje kao broj jedinica koje tvore kolonije ili CFU (eng. colony forming units).



Slika 8. Metoda kultivacije. *E. faecalis* na krvnom agaru.

Zbog svojih karakterističnih svojstava najčešći mikroorganizam koji se rabi za ispitivanje antimikrobne učinkovitosti u endodonciji jest *Enterococcus faecalis* (Slika 8). To je gram pozitivan, fakultativni anaerob, sferičnoga ili ovoidnoga oblika. Na hranjivim podlogama tvori kremasto bijele kolonije. Dio je normalne mikrobiološke flore usne šupljine i gastrointestinalnoga trakta (47). Prevalencija bakterije *E. faecalis* u primarnome apikalnom parodontitisu manja je od 10% (48). Mnogo je veća prevalencija *E. faecalis*-a u korijenskim kanalima zuba s kroničnim apikalnim parodontitisom i kod endodontski liječenih zubi s perzistirajućom apikalnom lezijom (49).

Nekrotična pulpa i neadekvatno napunjen korijenski kanal idealni su milje za kolonizaciju *E. faecalis-a*. Zahvaljujući mnogim čimbenicima virulencije bakterija može preživjeti u vrlo različitim uvjetima okoliša. Specifičan je po tome što može uzrokovati monoinfekciju i stvarati biofilmove (50).

6.2. MIKROSKOPSKE METODE

6.2.1. SEM (engl. scanning electronic microscope)

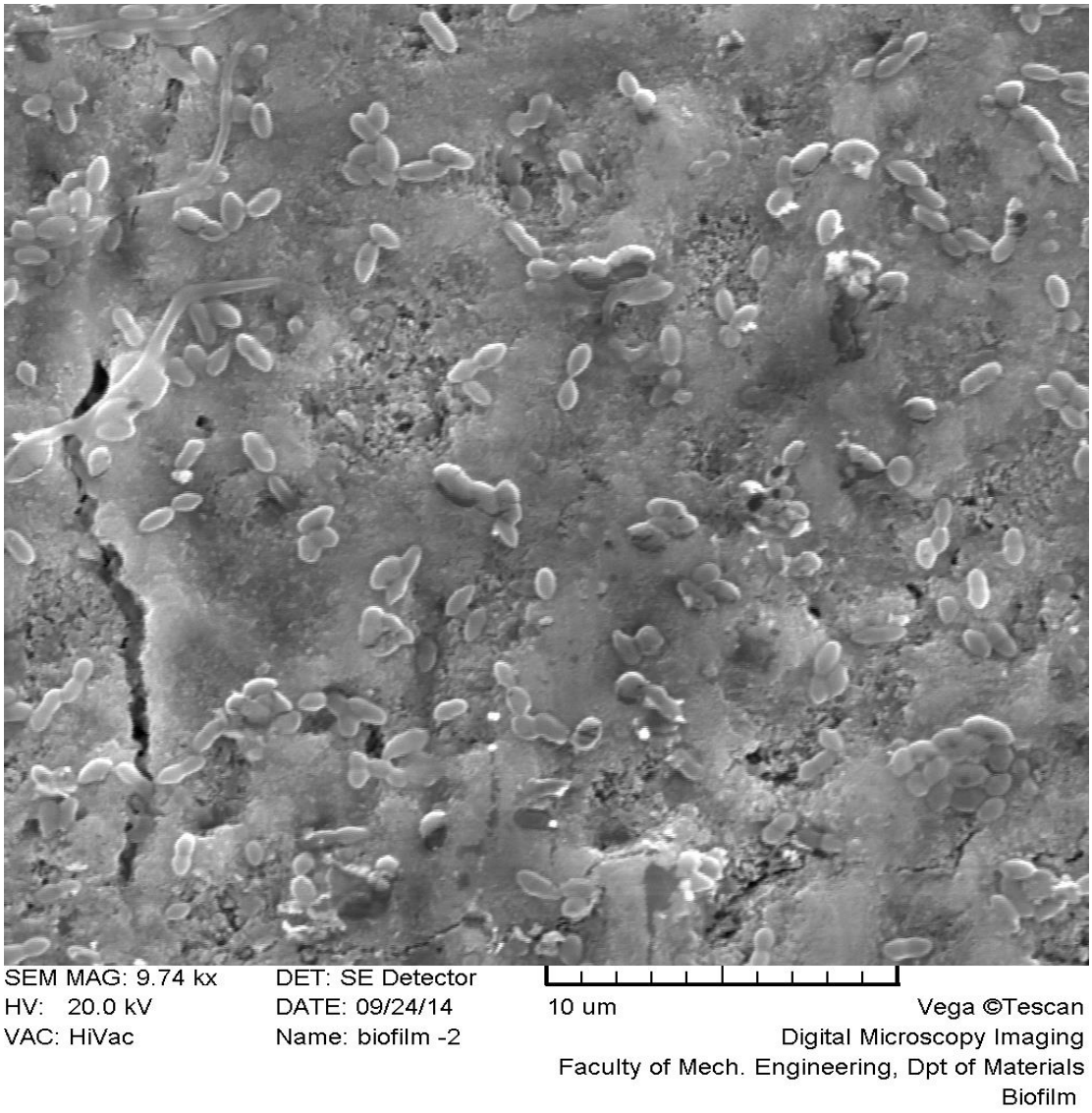
Osnovu rada skenirajućega elektronskog mikroskopa čini skeniranje površine ispitivanog uzorka vrlo precizno fokusiranim snopom elektrona. Pri udarcu elektrona o površinu uzorka, događaju se razni učinci kojima se koristimo za dobivanje slike i provođenje analize u SEM-u (Slika 9, 51).

Prednosti SEM-a jesu:

- rezolucija - sposobnost da se vide veoma mali objekti
- dubina polja - sposobnost fokusiranja objekata različite visine na površini uzorka
- mikroanaliza – sposobnost analize sastava uzorka
- generira podatke u digitalnom obliku, što je od velike važnosti za prijenospodataka i manipulaciju njima.

Nedostatci SEM-a jesu:

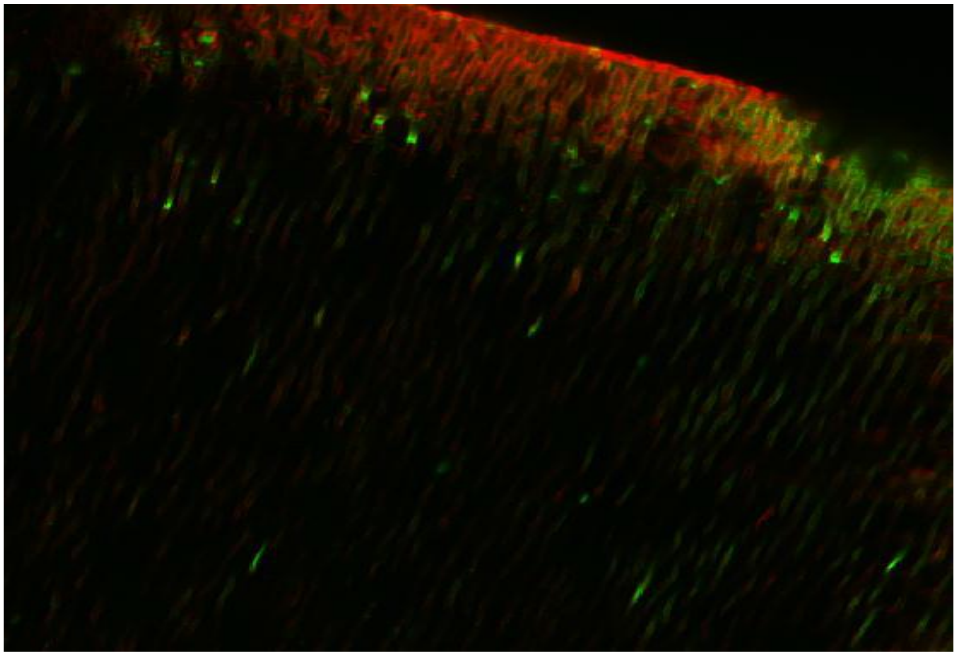
- uzorci moraju biti čvrsti i moraju stati u mikroskopsku komoru
- uzorak mora biti stabilan u vakuumu. Tekući uzorci i materijali koji sadržavajuvodu ne mogu se ispitivati u konvencionalnom SEM-u
- materijali koji nisu vodljivi moraju se montirati na vodljivi uzorak i prevući tankim vodljivim filmom kao npr. Au, Pt, Pd.



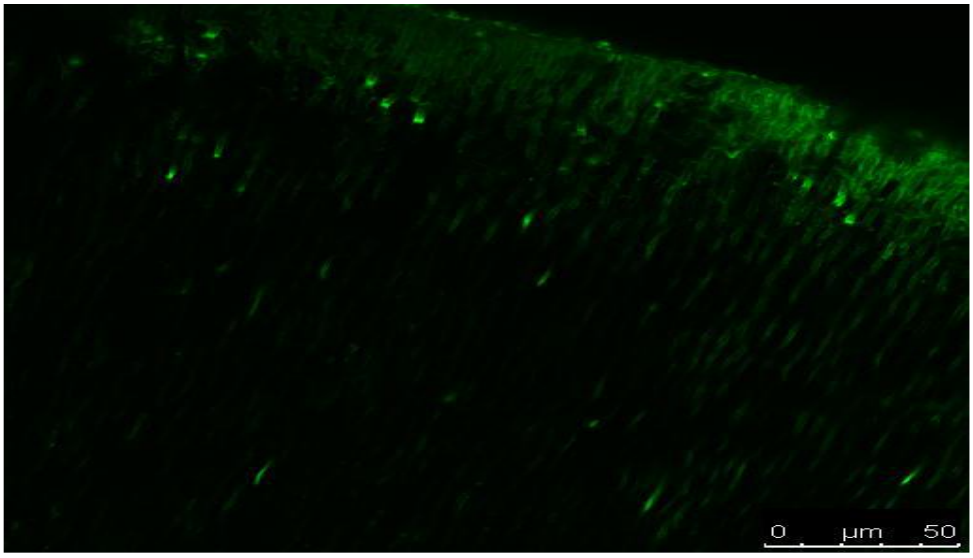
Slika 9. SEM snimka (x 9740) površine radikularnog dentina korijenskog kanala koloniziranog *E. faecalis*-om.

6.2.2. Konfokalni laserski pretražni mikroskop

Konfokalni laserski pretražni mikroskop (CLSM) svjetlosni je mikroskop koji služi promatranju i snimanju živih i neživih mikroskopskih uzoraka pomoću fluorescencije i u reflektiranome svjetlu. U ovoj tehnici, uzorak se osvjetljava točku po točku, a emitirana ili reflektirana svjetlost se detektira i tvori trodimenzionalnu sliku u memoriji digitalnog računala. Glavna prednost konfokalne mikroskopije u usporedbi s klasičnom svjetlosnom mikroskopijom jest mogućnost optičkog seciranja, tj. dobivanja oštre slike tankoga sloja pri snimanju debelog uzorka. Bitna novina konfokalne mikroskopije sastoji se u selektivnoj detekciji emitirane fluorescencije iz tankoga sloja precizno ograničenog u vertikalnom smjeru, dakle po dubini uzorka. Ubiologiji i medicini od posebno je važna fluorescencijska konfokalna mikroskopija u kojoj se detektira fluorescencija u fiksiranom i obojenom uzorku te u živim tkivima. Crveno se boje mrtve, a zeleno fluoresciraju žive bakterije, pa se u istraživanjima rabi za evaluaciju učinkovitosti antimikrobnih sredstava (Slika 10). Na trodimenzionalnoj slici moguća je i analiza dubine penetracije dezinficijenasa i mikroorganizama u dentinskim tubulusima (Slika 11).



Slika 10. Dubina penetracije bakterija u dentinske tubuluse, konfokalni laserski mikroskop.



Slika 11. Žive bakterije u uzdužno presječenim dentinskim tubulusima, konfokalni laserski mikroskop.

6.3. LANČANA REAKCIJA POLIMERAZOM

Lančana reakcija polimerazom (PCR) brzi je enzimski postupak identifikacije mikroorganizama na temelju prepoznavanja sekvencija DNK traženog mikroorganizma. Male količine DNK, izolirane iz uzorka, amplificiraju se na količinu potrebnu za analizu. Postupak se temelji na ponavljanim ciklusima triju reakcija: denaturacije DNK (grijanje), spajanje (hibridizacija) primera i ekstenzija primera s DNK polimerazom. PCR ima 10 do 100 puta veću osjetljivost u identifikaciji mikroorganizama od ostalih mikrobioloških tehnika. Jedna od prednosti jest i mogućnost izolacije mikroorganizama koji se teško kultiviraju u laboratorijskim uvjetima (52).

7. RASPRAVA

S obzirom na to da tradicionalni kemijsko-mehanički postupci čišćenja korijenskih kanala ne mogu osigurati uspješnu dezinfekciju cijeloga endodontskog prostora, u posljednje se vrijeme sve više istražuje uspješnost primjene lasera pri dezinfekciji i čišćenju korijenskih kanala. SEM *in vitro* analize pokazalesu penetraciju bakterija do 1000 µm u dentinske tubuluse, a NaOCl prodire u dubinu od 60 do 150 µm, što upućuje na nemogućnost postizanja dostatne dezinfekcije konvencionalnom tehnikom ispiranja iglom i špricom (53).

Diodni i Nd:YAG laseri djeluju baktericidno u korijenskom kanalu zagrijavanjem bakterija izravnim zračenjem laserskom zrakom koja prolazi kroz tanki fiberoptički nastavak postavljen u korijenski kanal 2 do 3 mm udaljen od apeksa (54).

Nd:YAG laseri djeluju baktericidno u dubini do 1000 µm u dentinskim tubulusima (18), a valne duljine diodnog lasera prodiru u dentin pliće, do 750 µm (55). Prema tome, zbog veće dubine djelovanja u dentinskim tubulusima, ti bi laseri trebali biti superiorniji u denzinfekciji dentina od natrijeva hipoklorita. Ipak, u nekim istraživanjima nije dokazan bolji antimikrobni učinak Nd:YAG lasera u usporedbi s ispiranjem NaOCl-om (35, 36). To je vjerojatno posljedica činjenice da je lasersko zračenje lokalizirano te je pomicanjem fiber nastavka u korijenskom kanalu teško postići jednoliko ozračivanje svih stijenki, za razliku od tekućine koja tijekom ispiranja oplakuje gotovo sve dijelove endodontskog prostora.

Antimikrobna fotodinamska terapija (aPDT) ili fotoaktivirana dezinfekcija (PAD) temelji se na primjeni diodnog lasera za aktivaciju fotosenzitivnoga sredstva na mjestu tretiranja, čime se postiže uklanjanje mikroorganizama (56). U istraživanju Bumba i sur.SEM analizom je utvrđeno da je u grupi tretiranoj PDT-om postignuta dezinfekcija u dubini od 890 do 900 μm (57). Prema Diogu, 48 % publikacija dokazuje bolju učinkovitost PDT-a premaispiranju NaOCl-om (0 – 5 – 6%), a 7 % ne dokazuje značajnu razliku (58). Suprotno tomu, u istraživanju Souza i sur. nije utvrđeno značajno antimikrobno djelovanje aPDT-a, koristeći se metilenskim ili toluidinskim modrilom sa 660 nm diodnim laserom (40 mW) u kemijsko-mehaničkoj instrumentaciji (59). Lošije antimikrobno djelovanje aPDT-a u nekim slučajevima vjerojatno je posljedica ograničene difuzije fotosensitivnoga sredstva u nepristupačnim dijelovima korijenskog kanala, dentinskih tubulusa i biofilma, te ograničenog stvaranja kisikovih radikala u uskim kanalima.

Infracrveni laseri Er:YAG i Er,CR:YSGG uporabljuju se za aktivaciju sredstva za ispiranje u korijenskom kanalu.Budući da se njihove valne duljine dobro apsorbiraju u vodi i hidroksiapatitu, njihov je baktericidni učinak površinski (60). Za razliku od fotodinamske terapije, gdje se laserom aktivira prethodno inaktivno sredstvo, erbij laseri poboljšavaju učinkovitost otopine za ispiranje s antimikrobnim učinkom kao što je NaOCl (61). U istraživanju Christo i sur. LAI 4 %-tnim natrijevim hipokloritom nije bilo učinkovitije od ispiranja iglom i špricom uz istu koncentraciju natrijeva hipoklorita (62). To je u skladu s rezultatima Pedulla i sur., koji nisu dokazali statistički značajnu razliku u redukciji broja bakterija između konvencionalnog ispiranja 5 %-tnim NaOCl-om i LAI (Er:YAG) uz istu

koncentraciju NaOCl-a (63). Peters i sur. dokazali su da je LAI 6 %-tnim NaOCl-om ostvarilo bolji antimikrobni učinak na biofilm in situ na ekstrahiranim ljudskim premolarima u odnosu u usporedbi s ispiranjem iglom i špricom (64). Razlike u rezultatima mogu se pripisati različitoj snazi lasera i vremenskom trajanju zračenja u navedenim istraživanjima. Budući da se pri uporabi erbij lasera sa tekućinama za ispiranje fiberoptički nastavak aplicira u puplnu komoru, na ulaz u korijenski kanal velika površinska napetost natrijeva hipklorita mogla bi biti uzrok slabijoj dezinfekciji apikalne trećine korijenskog kanala.Najbolji učinak ove tehnike postiže se ako se aktivno ispiranje primijeni na kraju kemijsko-mehaničke obrade korijenskog kanala u kombinaciji s nekim od sredstava za ispiranje i to tako da se prvo ukloni zaostatni sloj otopinama EDTA i NaOCl, a zatim se izvede aktivno ispiranje nekim od antimikrobnih sredstava (NaOCl ili klorheksidin) kako bi se uklonili preostali mikroorganizmi (41).

U novijim istraživanjima najbolja procjena antimikrobne učinkovitosti postiže se uporabom konfokalnoga laserskog mikroskopa zbog mogućnosti vizualizacije živih i neživih mikroorganizama te procjene dubine postignute dezinfekcije u dentinskim tubulusima.

8. ZAKLJUČAK

Usprkos značajnom napretku laserske tehnologije, još uvijek nema jasnih dokaza o superiornosti primjene laserskoga zračenja u dezinfekciji korijenskih kanala u usporedbi s tradicionalnom tehnikom dezinfekcije. Dosadašnja *in vitro i ex vivo* istraživanja o učinkovitosti lasera malo govore o kliničkom značaju njihove primjene jer se uglavnom temelje na dokazu redukcije broja mikroorganizama, pa bi istraživanja trebalo usmjeriti prema kliničkoj primjeni lasera za dezinfekciju (65).

Još uvijek je cijena laserskih uređaja, a i jednokratnih fiberoptičkih nastavaka značajan limitirajući čimbenik za njihovu širu kliničku primjenu.

.

9. SAŽETAK

Tradicionalnim kemijsko-mehaničkim postupcima čišćenja korijenskih kanala ne može se postići uspješna dezinfekcija cijeloga endodontskog prostora.Od 40 do 60 % korijenskih kanala ostaje i dalje inficirano nakon endodontske mehaničke obrade i ispiranja natrijevim hipokloritom. Zaostale bakterije u nepristupačnim dijelovima endodontskog prostora i u dentinskim tubulusima mogu spriječiti cijeljenje periapikalnoga procesa ili povećati rizik od nastanka perzistirajuće upale. Zbog specifične interakcije lasera s biološkim tkivima, posljednja dva desetljeća istražuje se njihova primjena u dezinfekciji korijenskih kanala zuba. Predstavljena je učinkovitost diodnog, Nd:YAG i erbij lasera u dezinfekciji dentina korijenskog kanala. Objašnjeni su načini primjene lasera u kombinaciji s otopinama za ispiranje te metode evaluacije njihove učinkovitosti. Na temelju dosadašnjih istraživanja dokazano je da laseri ostvaruju baktericidni učinak u korijenskom kanalu. S obzirom na to da ne mogu potpuno zamijeniti natrijev hipoklorit, preporučuju se kao dodatna tehnika dezinfekcije na kraju kemijsko-mehaničke obrade korijenskog kanala.

10. SUMMARY

Title: Antimicrobial efficacy of lasers in the disinfection and bacterial biofilm removal.

The traditional chemical-mechanical procedures for root canal treatment are not completely successful in the disinfection of the endodontic space. After mechanical instrumentation and the use of sodium hypochlorite as an irrigant, 40-60% of dentin surfaces still contain microorganisms. Persisting microorganisms in dentinal tubules and root canal irregularities may cause reinfection and prevent healing of periapical lesions. In the last two decades, many papers on laser use in endodontics have been published due to the specific interaction of lasers with biological tissues. Erbium and Nd:YAG wavelengths can be used for root canal debridement and cleaning, including for laser-activated irrigation and photon-initiated photoacoustic streaming. This paper reviews the literature on efficacy of the diode laser, Nd:YAG and the erbium laser in root canal disinfection.

Based on recent literature, it can be concluded that laser irradioation has the potential to kill microorganisms, but there is no sufficent evidence to suggest lasers are superior to the traditional endodontic treatment. Hence, the use of lasers is recommended not as alternative to NaOCl, but as an adjunct to traditional disinfection protocols.

11. LITERATURA

1. 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.
2. Rossi A, Silva LAB, Leonardo MR, Rocha LB, Rossi MA. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide 1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral pathol Oral Radiol Endod. 2005;99:628-36.
3. Peters OA, Laib A, Gohring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computer tomography. J Endod. 2001;27:1-6.
4. Paque F, Balmer M, Attin T, Peters OA. Preparation of oval-shaped root canals in mandibular molars using nickel-titanium rotary instrumentation: a micro-computed tomography study. J Endod. 2010;36:703-7.
5. Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in endodontics. Dent Clin North Am 2010;54:291-312.
6. Whitten BH, Gardiner DL, Jeansome BG, Lemon RR. Current trends in endodontic treatment: a report of a national survey. J Am Dent Assoc. 1996;127:1333-41.
7. Boutsioukis L, Lambrianidis T, Kastrinakis E, Bekiaroglou P. Measurment of pressure and flow rates during irrigation of a root canal ex vivo with three endodontic needles. Int Endod J. 2007;40:504-13.
8. Zehnder M. Root canal irrigants. J Endod. 2006;32:389-98.
9. Ng R, Singh F, Papamanou DA, Song X, Patel C, Holewa C, Patel N,Klepac-Ceraj V, Fontana CR, Kent R, Pagonis TC, Stashenko PP, Soukos NS. Endodontic photodynamic therapy ex vivo. J Endod. 2011;37:217-22.

10. Stabholz A, Sahar-Helft S, Moshonov J. Lasers in endodontics. Dent Clin North Am. 2004;48:809-32.
11. Stabholz A, Sahar-Helft S, Moshonov J. Lasers in endodontics. Dent Clin North Am. 2004 Oct;48(4):809-32.
12. Harris DM, Pick RM. Laser physics. In:Miserendino LJ and Pick RM. Lasers in dentistry. Chicago: Quintessence; 1995.
13. Coluzzi DJ. An overview of laser wavelengths used in dentistry. Dent Clin N Am. 2000 Oct;44(4):753-65.
14. Dederich DN. Laser tissue interaction. Alpha Omegan. 1991;84:33-6.
15. Cilesiz I. Laser tissue interactions. In: Drigers RG (ed.). Encyclopaedia of Optical Engineering. London: Marcel Dekker Ltd., Taylor and Francis Books, 2004 – accessed on-line 1 May 2008 10.1081/E-EOE-120009714.
16. Harris DM, Werkhaven JA. Biophysiscs and applications of medical lasers. AdvOtolaryngol Head Neck Surg. 1989;3:91-123.
17. Ando N, Hoshino E. predominant obligate anaerobs invading the deep layers of root canal dentin. Int Endod J.1990;23:20-7.
18. Klinke T, Klimm W, Gutknecht N. Antibacterial effects of Nd:YAG laser irradiation within root canal dentin. J Clin Laser Med Surg. 1997 Feb;15(1):29-31.
19. Hellingwerf KJ, Hoff WD, Crielaard W. Photobiology of microorganisms: how photosensors catch a photon to initialize signalling. Mol Microbiol. 1996 Aug;21(4):683-93.
20. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Conrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bactericidal effect in root canal wall dentin. J Clin Laser Med Surg. 2000 Apr;18(2):57-60.

21. Komori T, Yokoyama K, Matsumoto Y, Matsumoto K. Erbium:YAG and holmium:YAG laser root resection of extracted human teeth. J Clin Laser Med Surg. 1997 Feb;15(1):9-13.
22. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. Lasers Surg Med. 1997;21:221-6.
23. Gutknecht N, Moritz A, Conrads C, Lampert F. Der Dioden-laser und seine bacterizideWirkung in Wurzelkanal: Eine in vitro Studie. Endodontie. 1997;3:217-33.
24. Moritz A, Gutknecht N, Goharkhay K, Schoop U, Wernisch J, Sperr W. In vitro irradiation of infected root canals with a diode laser: results of microbiologic, infrared spectrometric, and stain penetration examinations. Quintessence Int. 1997;28:205-9.
25. Moritz A, et al. Oral laser application. Berlin: QuintessenzVerlags-GmbH; 2006.
26. De Moor RJ,MeireM,GoharkhayK,MoritzA,Vanobbergen J. Efficacy of ultrasonic versus laser-activated irrigation to remove artificially placed dentin debris plugs. J Endod. 2010;36:1590-3.
27. Kesler G, Gal R, Kesler A, Koren R. Histological and scanning electron microscope examination of root canal after preparation with Er:YAG laser microprobe: a preliminary in vitro study. J Clin laser Med Surg. 2002;20:269-77.
28. Parker S. Lasers tissue interaction and its application in clinical dentistry. Int J Lasers Dent. 2011;1:1-8
29. Hardee MW, Miserendino L, Kos W, Walia H. Evaluation of the antibacterial effects of intracanalNd:YAG laser irradiation. J Endod. 1994;20:377-80.

30. Rooney J, Midda M, Leeming J. A laboratory investigation of the bacericidal effect od a Nd:YAG laser. Br Dent J. 1994;176:61-4.
31. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K, Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canals with a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. Lasers Surg Med. 1997;21(3):221-6.
32. Beer F, Buchmair A, Wernisch J, Georgopoulos A, Moritz A. Comparison of two diode lasers on bactericidity in root canals - an in vitro study. Lasers Med Sci. 2012;27:361-4.
33. Gutknecht N, van Gogswaardt D, Condrads G, Apel C, Schubert C, Lampert F. Diode laser radiation and its bacterial effect in root canal wall dentin. J Clin Laser Med Surg. 2000;18:57-60.
34. Gutknecht N, Moritz A, Conrads C, Lampert F. Der Dioden-laser und seine bacterizideWirkungimWurzelkanal: Eine in vitro Studie. Endodontie. 1997;3:217-33
35. Piccolomini R, D´Arcangelo C, D´Ercole S, Catamo G, Schiaffino G, De Fazio P. Bacteriologic evaluation of the effect of Nd:YAG laser irradiation in experimental infected root canals. J Endod. 2002;28:276-8.
36. Moshonov J, Ørstavik D, Yamauchi S, Pettiette M, Trope M. Nd:YAG laser irradiation in root canal disinfection. Endod Dent Traumatol. 1995;11:220- 224.
37. Bergmans L, Moisiadis P, Teughels W, et al. Bactericidal effects of Nd:YAG laser irradiation on some endodontic pathogens ex vivo. Int Endod J. 2006 Jul;39(7):547-57.
38. Matsumoto H, Yoshimine Y, Akamine A. Visualization of irrigant flow and cavitation induced nyEr:YAG laser within a root canal model. J Endod. 2011;37:839-43.
39. De Groot SD, Verhaagen B, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR, van der Sluis LWM.

Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualisation. Int Endod J. 2009;42:1077-83.

40. Matsumoto H, Yoshimine Y, Akamine A. Visualization of irrigant flow and cavitation induced by Er:YAG laser within a root canal model. J Endod. 2011;37:839-43.
41. DiVito E, Lloyd A. ER:YAG laser for 3-dimensional debridement of canal systems: use of photon-induced photoacoustic streaming. Dent Today. 2012;31:124-7.
42. DiVito E, Peters OA, Olivi G. Effectivness of the erbium:YAG laser and new design radial and stripped tips in removing the smear layer after root canal instrumentation. Lasers Med Sci. 2012;27:273-80.
43. Balić M, Lucić R, K. Mehadžić K, I. Bago I, Anić I, Jakovljević S, Plečko V. The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic-activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal E. faecalis biofilm. Las Med Sci 2016;31:335-42.
44. Zhu X, Yin X, W.W Chang J, Wang Y, S.P Cheung G, Zhang C. Comparison of the antibacterial effect and smear layer removal using photon-initiated photoacoustic streaming aided irrigation versus a conventional irrigation in single rooted canals: an in vitro study. Photomed Las Surg. 2013;31:371-7.
45. Demidova TN, Hamblin MR. Photodynamic therapy targeted to pathogens. Int J Immunopathol Pharmacol. 2004 Sep-Dec;17(3):245-54.
46. Lee MT, Bird PS, Walsh LJ. Photo-activated disinfection of the root canal: a new role for lasers in endodontics. AustEndod J. 2004 Dec;30(3):93-8.
47. Foschi F, Fontana CR, Ruggiero K, et al. Photodynamic inactivation of Enterococcus faecalis in dental root canals in vitro. Lasers Surg Med. 2007 Dec;39(10):782-7.
48. Siquiera JF Jr, Rocas IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo AP. Actinomyces species,

streptococci and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. J Endod. 2002;28:168-72.

49. Sundqvist G. associations between microbial species in dental root canal infections. Oral MicrobioImmunol. 1992;7:257-62.
50. Clewell DB. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in te genus Streptococcus. Microbial Rev. 1981;45:409-36.
51. Mršić G., Žugaj S. Analiza GSR česticaupotrebomelektronskogmikroskopa (SEM/EDX). Polic. sigur. 2007;3-4:179-200.
52. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 defining the endodontic microbiota. J Endod. 2005;31:488-98.
53. George S, Kishen A, Song K P. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis.* J Endod. 2005*;* 31: 867–72.
54. Meire MA, De Prijck K, Coenye T, Nelis HJ, De Moor RJG. Effectiveness of different laser systems to kill Enterooccusfaecalis in aqueous suspension and in an infected tooth model. Int Endod J. 2009;42:351-9.
55. Moritz A, Gutknecht N, Schoop U, Goharkhay K,Doertbudak O, Sperr W. Irradiation of infected root canalswith a diode laser in vivo: results of microbiological examinations. Lasers Surg Med. 1997;21(3):221-6.
55. Komori T, Yokoyama K, Matsumoto Y, Matsumoto K. Erbium:YAG and holmium:YAG laser root resection of extracted human teeth. J Clin Laser Med Surg. 1997;15:9-13.
56. S. Bumb, D. Bhaskar, C. Agali et al. Assessment of photodynamic therapy (PDT) in disinfection of deeper dentinal tubulesin a root canal system: an in vitro study. J Clin

Diag Res. 2014; 8:67–71.

57. P. Diogo, T. Gonçalves, P. Palma, J.M. Santos. Photodynamic Antimicrobial Chemotherapy for Root Canal System Asepsis: A Narrative Literature Review. 2015;
58. Souza LC, Brito PR, de Oliveira JC, Alves FR, Moreira EJ, Sampaio-Filho HR. Photodynamic therapy with two different photosensitizers as a supplement to instrumentation/irrigation procedures in promoting intracanal reduction of Enterococcus faecalis. J Endod. 2010;36:292-6.
59. Moritz A, et al. Oral laser application. Berlin: QuintessenzVerlags-GmbH; 2006.
60. de Groot SD, Verhaagen B, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR, van der Sluis LW. Laser-activated irrigation within root canals: cleaning efficacy and flow visualization. Int Endod J. 2009;42:1077–83.
61. J. E. Christo , P. S. Zilm , T. Sullivan, P. R. Cathro. Efficacy of low concentrations of sodium hypochlorite and low-powered Er,Cr:YSGG laser activated irrigation against an Enterococcus faecalis biofilm. IntEndod J 2016; 49:279-86.
62. Pedulla E, Genovese C, Campagna E, Tempera G, Rapisarda E. Decontamination efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming (PIPS) of irrigants using lowenergy laser settings: an ex vivo study. Int Endod J. 2012; 45:865–70.
63. Peters OA, Bardsley S, Fong J, Pandher G, Divito E. Disinfection of root canals with photon-initiated photoacoustic streaming. J Endod. 2011;37:1008–12.
64. Fransson H, Larsson KM, Wolf E. Efficacy of lasers as an adjunct to chemo-mechanical disinfection of infected root canals: a systematic review. Int Endod J. 2013;46:296–307.

12. ŽIVOTOPIS

Merima Balić je rođena 23. prosinca 1991. u Tuzli, u BiH. Osnovnu školu i Opću gimnaziju završava 2010. u Tuzli s odličnim uspjehom i prosjekom ocjena 5,0. Usporedo pohađa osnovnu i srednju muzičku školu (odsjek klavir), te 2010. brani maturalni rad s odličnim uspjehom i stječe zvanje nastavnika klavira.

Nakon završene srednje škole, 2010. godine upisuje studij na Stomatološkom fakultetu u Zagrebu. Prva u generaciji posljednji ispit polaže 19. svibnja 2016. s ukupnom prosječnom ocjenom 4,9.

Dobitnica je Dekanove nagrade za najbolji uspjeh u akademskoj godini 2011./2012.

Dobitnica je stipendije Sveučilišta u Zagrebu, u kategoriji A, za izvrsnost za akademsku 2012./2013., 2013./2014., te 2014./2015. godinu.

Tijekom studija sudjeluje u dvijema razmjenama studenata, 2013.g. u Beogradu, te 2014.g. u Istanbulu u organizaciji European Dental Student Asossiation (EDSA).

Iz područja fiksne protetike piše članke pod mentorstvom prof. Amira Ćatića za studentski časopis „Sonda“.

Na temu protokola dezinkfecije i ispiranja korijenskih kanala s doc. dr. sc. Ivonom Bago objavljuje rad u časopisu „Stomatološki vjesnik“.

U akademskoj 2014./2015.g. sudjeluje u istraživačkom projektu na Zavodu za endodonciju Stomatološkog fakulteta, pod mentorstvom prof. Ivice Anića, te je znanstveni rad pod nazivom "The efficacy of photon-initiated photoacoustic streaming and sonic activated irrigation combined with QMiX solution or sodium hypochlorite against intracanal *E. faecalis* biofilm" - ove godine objavljen u časopisu „Lasers in Medical Science“.

Zainteresirana je za znanstveno-istrživački rad te daljnje obrazovanje kani nastaviti upisom Doktorskog studija na Sveučilištu u Zagrebu.