

# Az orális patogén mikroorganizmusok redukálásának lehetőségei, a klór-dioxid fogászati alkalmazhatósága

Doktori tézisek

**Dr. Herczegh Anna**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Konzulensek: Dr. Lohinai Zsolt, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Ghidán Ágoston, tudományos munkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Márton Krisztina, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Tóth Ákos, biológus főtanácsos, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke:  
Dr. Hermann Péter, egyetemi tanár, Ph.D.

Szigorlati bizottság tagjai:  
Dr. Rózsa Noémi, egyetemi docens, Ph.D.  
Dr. Csire Márta, laborvezető, Ph.D.

Budapest

2014

## Bevezetés

A fogászat minden területén folyamatos az igény, az új, hatékony, szervezetre nem káros antiszeptikus szerek alkalmazására. Születéskor a száj sterilnek tekinthető, de pár óra múlva már aerob baktériumok és gombák is megjelennek benne. Később anaerob baktériumok, protozoonok, mycoplazmák is részét képezik a szájüreg normál flórájának. Ezen összetevők állandóan változó egyensúlya képezi a szájüreg mikroflóráját. A fogszuvasodás, az ínygyulladás és a fogágybetegség, olyan orális fertőző betegségek, amelyek a gazdaszervezet és az orális mikroflóra közötti egyensúly felborulása következtében lépnek fel.

Az orális betegségek megelőzése és kezelése fő feladata a mindennapi fogorvosi gyakorlatnak. A fogkefével történő fogmosás a legáltalánosabb és legelterjedtebb módja a szájhigiéné fenntartásának, bár a nehezen hozzáférhető helyeken az orális plakk, más néven biofilm elleni prevenció, illetve a már kialakult biofilm eliminálása, szükségessé teszi a fogkrémek használata mellett egyéb, antibakteriális hatással bíró anyagok alkalmazását is. Számos kutatás eredménye vezetett ahhoz, hogy a fogkrémek összetétele folyamatosan tökéletesedjen, hogy a megfelelő abrazív-, felületaktív-, stabilizáló-, ízesítő-, és illatosító anyagok mellett hatékony antiszeptikus gyógyszereket is tartalmazzon. Ugyanígy kutatók sokasága keresi azt az ideális antiszeptikus szájöblítő oldatot, ami hatékony a kórokozókkal szemben, ugyanakkor tartós használata nem káros a szervezet számára.

Az endodonciai kezelés sikere függ a hatékony kézi vagy gépi forgóműszerek mellett alkalmazott gyökércsatorna öblítőszer használataától, hogy a megfelelő alakú, jól tömhető csatorna a lehető legnagyobb mértékben mentes legyen a mikroorganizmusoktól. Igazolt tény, hogy a gyökértömések hosszú távú eredményességét növeli, ha a csatornák mechanikai tisztítását kémiai anyagok használatával egészítjük ki, úgynevezett kemo-mechanikai preparálást végzünk. A káros patogén mikroorganizmusok eliminálása a gyökércsatornából és a dentintubulusokból az endodonciai beavatkozás során önmagában nem biztosítja a sikeres gyökérkezelést. A gyökércsatornában elérhető legalacsonyabb csíraszám megőrzése, azaz a gyökércsatorna kívülről történő felülfertőződésének megakadályozása és a csatornában maradt alacsony csíraszámából történő visszafertőződés problémája kritikus pontjai az endodonciai kezeléseknél. Míg a mechanikai tisztítás szignifikáns mennyiségű mikroorganizmust távolít el a gyökércsatornából, addig az endodonciai kézi és gépi eszközök számára elérhetetlen helyeken maradt kórokozók a periodontális szövetek

gyulladását tarthatják fenn, illetve idézhetik elő. Ezért az antimikrobiális irrigálószeresek használatának kiemelkedő szerepe van a mikroorganizmusok olyan mértékre történő csökkentésében, amely lehetővé teszi a periapikális szövetek gyógyulását.

Az antibakteriális anyagoktól elvárjuk, hogy megakadályozzák a mikroorganizmusok adhézióját, kolonizációját, anyagcseréjét és ekképpen gátolják azok növekedését. Az antiszeptikus anyagok hatásossága függhet azok koncentrációjától, illetve a kezelés időtartalmától.

A klór-dioxidot ( $\text{ClO}_2$ ) ideális biocidnak tartják. Antimikrobiális hatása kiemelkedő az antiszeptikumok között. Sok előnyös tulajdonsága (nem alakul ki vele szemben rezisztencia, kevés anyaggal reagál, oldódik poláris és apoláris oldatokban is, nem toxikus) és az a lehetőség, hogy már szennyezőanyagoktól mentes, tiszta formában elérhető (Solumium), felvetette fogászati alkalmazhatóságának vizsgálatát.

## Célkitűzés

1. Megvizsgálni az  $\text{AmF}$ -ot és  $\text{SnF}_2$ -ot tartalmazó fogpasztának és szájvíznek a nyál egyes mikroorganizmusaira (*Streptococcus mutans*, *Lactobacillus acidophilus* *Candida albicans*) kifejtett hatását *in vivo*.
2. A tejnek, mint a fluor vivőanyagának hatását vizsgálni *S. mutans*, *L. acidophilus* és *C. albicans* szám változásában *in vitro*. A  $\text{NaF}$  és a  $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{F}$  mikroorganizmusokra kifejtett hatását vizsgálni különböző koncentrációban, tejben illetve foszfát pufferben.
3. A *S. mutans* DNS mintázata és megbetegedést okozó képessége közötti összefüggés vizsgálata.
4. D-aminosavak biofilm képződést gátló, illetve biofilm bontó képességének vizsgálata.
5. Összehasonlítani a nagytisztaságú  $\text{ClO}_2$  oldat, néhány orális patogén mikroorganizmuson kifejtett hatását, más jól ismert, széles körben alkalmazott szájöblítővel és gyökércsatorna öblítővel, fenol koefficiens módszer segítségével, *in vitro*.
6. Összehasonlítani a nagytisztaságú  $\text{ClO}_2$  orális biofilm bontó, elimináló képességét más antiszeptikumokkal *in vitro*.

7. Nagytisztaságú ClO<sub>2</sub>-dal történő egyszeri öblítés után vizsgálni a nyál összcsíraszámában és a *S. mutans* számban bekövetkező változást *in vivo*.
8. A nagytisztaságú ClO<sub>2</sub> hatását összehasonlítani standard gyökércsatorna irrigálószerrel (nátrium-hipoklorit (NaOCl), klórhexidin (CHX)) *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) biofilmmel befertőzött gyökércsatornákban. Scanning elektronmikroszkóppal a fertőződés és a visszafertőződés meglétének, ill. hiányának igazolása. Vizsgálni ugyanezen oldatok gázfázisának az *E. faecalis* szaporodására kifejtett hatását, *in vitro*.
9. A dentinpor hatásának vizsgálata a ClO<sub>2</sub> antibakteriális tulajdonságára *in vitro*.
10. ClO<sub>2</sub> szövetoldó hatásának vizsgálata szarvasmarha pulpán *in vitro*. Az eredmények összehasonlítása a NaOCl és CHX szövetoldó erejével.
11. A ClO<sub>2</sub> és a CHX, illetve a ClO<sub>2</sub> és az EDTA közötti interakció vizsgálata.

## Módszerek

1. A 20 főből álló teszt csoport AmF-ot és SnF<sub>2</sub>-ot (külön-külön 750 ppm F<sup>-</sup>, összesen 1500 ppm F<sup>-</sup>) tartalmazó teszt fogkrém és (külön-külön 125 ppm F<sup>-</sup>, összesen 250 ppm F<sup>-</sup>) szájvizet, a 24 főből álló kontroll csoport pedig NaF-ot (1500 ppm F<sup>-</sup>) tartalmazó kontroll fogkrém és (250 ppm F<sup>-</sup>) szájvizet használt. A résztvevők naponta kétszer mostak fogat, standardizált fogkefével. Egyperces öblítés szintén naponta kétszer, fogmosás után történt. Meghatároztuk a *S. mutans*, a *L. acidophilus* és a *C. albicans* csíraszámát a stimulált nyálban a teszt periódus kezdetén, három hónap múlva, és a teszt periódus (öt hónap) végén.
2. A NaF és a Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>F (MFP) hatását *S. mutans*, *L. acidophilus*, *C. albicans* törzseken 1,5 %-os UHT tej vagy foszfát puffer (PBS) pH 6,5 illetve pH 5,5 hozzáadása után vizsgáltuk. A kétféle fluoridnak az 1, 5, 10, és 50 ppm-es koncentrációit vizsgáltuk. Kontrollként PBS oldatot és tejet használtunk. A 0, a 60, és a 120 perces inkubációs idő után hígítási sort készítettünk. Megfelelő táptalajra szélesztés és inkubálás után csíraszámolást végeztünk.

A fluoridok tényleges hatásának vizsgálata céljából (kizárandó a tej esetleges befolyásoló hatását) fenol koefficiens vizsgálatot végeztünk. A fluoridok 1, 5, 10, 50, 100, és 500 mg/l koncentrációit vizsgáltuk.

Bioscreen biofotometer (Labsystem, Finland) segítségével a mikroorganizmusok növekedési görbáját is tanulmányoztuk különböző fluorid koncentráció hatása alatt (0,875 mg/l-500 mg/l NaF, MFP).

3. 28 db. *S. mutans* törzset 100, a kísérletben résztvevő gyermek plakkjából gyűjtöttünk össze. Minden gyerekből egy törzset, amit telepmorfológia alapján *S. mutans*-nak tartottunk pontos identifikálás alá vetettünk API rapid ID 32 Strep diagnostic teszt és raffinóz fermentációs teszt alkalmazásával (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France). A résztvevők kariesz mentes, (DMFT = 0, GI 0–1), kariesz aktív (DMFT  $\geq$  5, GI 0–2) és gingivitisz-es (GI  $\geq$  2 DMFT = 0) csoportba lettek sorolva. A törzsek DNS analízise Pulsed-Field Gel Electrophoresis-sel (PFGE) történt.

A DNS sávokat Bionumerics programmal (Applied Maths, Belgium) vizsgáltuk és dendogramot szerkesztettünk. A rokonsági fok megállapításánál a dendogramm megrajzolására WARD's (squared euclidean distance, variables normalized using z-scores) paramétert állítottunk be.

4. A D-aminosavak biofilm képződés gátlásának hatásosságát kevert mikroorganizmus populáción vizsgáltuk. A plakk mintákat 50%-os glicerines táplevesben -20°C-on tároltuk felhasználásáig, 1,5 ml-es Eppendorf csövekben. Felolvasztás után 37°C-os vízfürdőben 2-3 órán át szaporítottuk a baktériumokat. A plakk mintákat egy-egy 24 lyukú szövet tenyésztő platebe helyeztünk. A wellékbe steril táplevest, baktériumot és D-tirozin-t, D-metionin-t, D-triptofán-t és ezek kombinációját (Daa) adtuk megfelelő mennyiségben. A tenyésztés 37°C-on 5 napig tartott.

A biofilm eliminálási képesség méréséhez masszív, 7 napos biofilmet képeztünk 96-lyukú microtiter platekben és a D-aminosavak meghatározott mennyiségét hozzáadtuk. A biofilm bontás mérése kristályibolya festési módszerrel történt. Az oldatok abszorbanciáját 590 nm-en ELISA olvasóval mértük (Bio-Rad, PR Z100 Reader, Redmond, WA, USA). Kontrollként fiziológiás sóoldatot használtunk.

A biofilm mennyiségében bekövetkező változást a kontrollhoz képest adtuk meg %-ban.

5. Összehasonlítottuk az 5,25 % NaOCl, 0,2 % CHX, Listerine és a 0,03 % ClO<sub>2</sub> antiszeptikus hatását fenol koefficiens vizsgálattal. Az antiszeptikumok hígításánál az egyes oldatok 100% aktív hatóanyag koncentrációját vettük figyelembe. A tesztelt mikroorganizmusok: *S. mutans*, *L. acidophilus*, *E. faecalis*, *Veillonella alcalescens*, *Eikenella corrodens*, *Actinomyces odontolyticus* és *C. albicans* volt. A mikroorganizmusokkal történő 5 és 10 perces kontaktidő után az aerobokat véres agarra történő kioltás után 2 napig inkubáltuk 37°C-on. Az anaerobokat Columbia agaron 5-6 napig Gas-Pack készülékben (Becton Dickinson Microbiology system, Cockeysville, Md. USA) 37°C-on inkubáltuk.

A normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk, majd ANOVA Repeated Measures és Scheffe's post hoc teszttel végeztük a statisztikai számításokat. Az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tartottuk szignifikánsnak. A statisztikai vizsgálatához számítógépes programot használtunk (Statistica 8. 0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

6. Egészséges önkéntes felnőttek plakkjából masszív 4 napos biofilmet képeztünk. Az *in vitro* nyert biofilm, antiszeptikumokkal történő kezelése után bekövetkező mennyiségi változását kristályibolya festési módszerrel mutattuk ki. A biofilmeket 0,2% CHX vagy Listerine vagy 0,03% ClO<sub>2</sub> oldattal kezeltük 1 illetve 5 percen keresztül. Az oldatok abszorbanciáját 590 nm-en ELISA olvasóval mértük (Bio-Rad, PR Z100 Reader, Redmond, WA, USA). Kontrollként fiziológiás sóoldatot használtunk.

A normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk, majd ANOVA Repeated Measures és Bonferroni post hoc teszttel végeztük a statisztikai számításokat. Az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tartottuk szignifikánsnak. A statisztikai vizsgálatához számítógépes programot használtunk (Statistica 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

7. Önkéntes páciensektől (25-25 fő), akiknek szájhygiénéje rossz volt (10-nél magasabb DMF, legalább 5 aktív kariesz, PSR érték  $\geq 2$ ) 1 ml stimulálatlan nyál mintát gyűjtöttünk. Solumium Oral (0,03% ClO<sub>2</sub>) szájvíz 20-szoros hígításával öblögetés történt 1 percen keresztül, majd 5 perc elteltével újabb 1 ml nyál mintát gyűjtöttünk. Kontrollként Listerine Total Care-t használtunk. Hígítás és tenyésztés után meghatároztuk a kiinduló és az öblítés utáni összcsíraszámot és a *S. mutans* számot.

A normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk. A statisztikai számításokat Wilcoxon féle matched pair nonparametrikus teszttel végeztük. Az

eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tartottuk szignifikánsnak. A statisztikai vizsgálathoz számítógépes programot használtunk (Statistica 8. 0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

8. Parodontológiai okok miatt kihúzott 40 db egy gyökerű fogat dekoronáltunk, egyforma tágasságra feltártunk, majd sterilizálás után *E. faecalis*-szal befertőztük. A gyökércsatornák 40-es K-file-ig történő tágítása után 0,12%  $\text{ClO}_2$ -dal (0,5 ml 0,12%-os, 2 ml 20-szoros hígítású  $\text{ClO}_2$ ) vagy 5,25 % NaOCl-dal vagy 2% CHX oldatokkal öblögettük a csatornákat oly módon, hogy az oldatok áramlási sebessége, és a csatornában töltött ideje egyforma legyen (2,5 ml oldattal 2 percig tartó öblögetés). Steril papír poen-nal mintát vettünk, ezeket BHI oldatba helyeztük át, majd a baktériumokat centrifugában összegyűjtöttük, és véres táptalajra oltottuk. A vizsgálatot 2, illetve 5 nap múlva megismételtük a visszafertőződés vizsgálata céljából.

Scanning elektronmikroszkópos képeket készítettünk kettévágott fogakból.

Felfordított Petri csésze tetejébe helyeztük az oldatokkal átitatott szűrőpapírt, és véres táptalajra oltott *E. faecalis* növekedésének gátlását vizsgáltuk.

Normalitás vizsgálathoz Shapiro-Wilk tesztet használtunk, majd a továbbiakban két utas (kezelés x idő) Repeated Measures ANOVA-t, Bonferroni post hoc tesztel. Az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tartottuk szignifikánsnak. A statisztikai vizsgálathoz számítógépes programot használtunk (Statistica 8. 0, StatSoft Inc. Tulsa, OK, USA).

9. A dentinpor hatását vizsgáltuk a gyökércsatorna irrigálószeres antibakteriális aktivitásában bekövetkezett változáson. Ehhez egy módosított *in vitro* dentinpor modellt alkalmaztunk.

Első lépésként dentinpor nélkül vizsgáltuk a következő oldatok *E. faecalis*-on kifejtett hatását: 2% CHX, 2,5% NaOCl, 0,12%  $\text{ClO}_2$  és  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , kontroll: steril fiziológiás sóoldat. 50  $\mu\text{l}$  baktérium szuszpenziót (*E. faecalis*  $10^8$ ), 50  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldatot, 50  $\mu\text{l}$  antibakteriális szert összekevertünk. Egy, 10, és 60 perc behatás után, hígítási sort készítettünk. Az inkubálás véres agaron történt  $37^\circ \text{C}$ -on 24 órán át. Az eredmények értékelésénél a kontrollt mindig 100%-nak vettük.

Második lépésként a dentinpor nélküli vizsgálatot módosítottuk, és 50  $\mu\text{l}$  fiziológiás sóoldathoz 28 mg dentinport kevertünk. A dentinport humán, extrahált fogakból nyertük.

Harmadik lépésként dentinporral egy órán keresztül előinkubáltuk a dezinficiáló szereket, és csak ez után adtuk hozzá a baktérium szuszpenziót. A tesztelt időpontok, a

hígítás, a tenyésztés, az inkubálás és a csíraszám meghatározás az első lépésnek megfelelően történt.

Normalitás vizsgálatához Shapiro-Wilk tesztet használtunk, majd a továbbiakban két utas (kezelés x idő) Repeated Measures ANOVA-t Fisher LSD post hoc teszttel. Az eltéréseket  $p < 0,05$  esetén tartottuk szignifikánsnak. A statisztikai vizsgálatához számítógépes programot használtunk (Statistica 8.0, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA).

Következő lépésként a dentinpor mennyiségét fokozatosan csökkentettük (feleztük) 28 mg-ról 3,5 mg-ig, hogy megtudjuk mekkora az a dentinpor mennyiség, ami már nem befolyásolja a  $\text{ClO}_2$  antibakteriális hatását.

A dentinpor  $\text{ClO}_2$ -on kifejtett hatását titrációs méréssel is megvizsgáltuk.

10. Szarvasmarhák alsó metszőfogaiból nyert pulpát egyforma súlyú részre osztottunk, súlyukat lemértük. A következő oldatok pulpa szövetre kifejtett hatását vizsgáltuk; 5,25% NaOCl, 2,5% NaOCl (pH 11), 0,12%  $\text{ClO}_2$  (pH 6), 2% CHX (pH 6). Kontrollunk 0,9%-os NaCl volt. Az oldatokat 10-szer 2 percig hagytuk hatni a szövetekre az oldatok folyamatos cseréje közben. Tömegüket visszamértük. A tömegváltozást százalékban fejeztük ki, a kiindulási tömeget 100%-nak véve.

A statisztikai számításokat Kruskal-Wallis teszt alapján végeztük el, mivel az adatok eloszlása nem volt parametrikus.

11. A  $\text{ClO}_2$  és a CHX, interakciójának vizsgálata HPLC-vel (High Performance Liquid Chromatography) történt. A CHX kiinduló UV spektrumát vettük fel.

A CHX kromatogrammon kirajzolódó alacsony csúcsok azonosítása, mely várhatóan para-klóroanilin (PCA), oly módon történt, hogy 1 mg PCA-t 1000  $\mu\text{l}$  vízben oldottunk és 5  $\mu\text{l}$ -t HPLC/MS-ben futtattunk. Ezt követően 50  $\mu\text{l}$  koncentrált hígítatlan ultratiszta 0,12%  $\text{ClO}_2$  oldatot adtunk 1000  $\mu\text{l}$  1%-os CHX oldathoz egy lezárt fiolában. Szobahőmérsékleten 20 és 40 perc reakció idő után a keveréket HPLC segítségével szeparáltuk, hogy megállapítsuk keletkezik-e új termék, emelkedik-e a PCA mennyisége. Vizsgáltuk, hogy a PCA esetleg oxidálódik-e  $\text{ClO}_2$  hatására. A vizsgálatához 1 mg PCA-t vízben oldottunk és 50  $\mu\text{l}$  koncentrált ultratiszta 0,12%  $\text{ClO}_2$  oldathoz adtuk egy lezárt fiolában. A reakció ideje 4 óra volt szobahőmérsékleten.

Spektrumok felvétele Agilent 1100 series LC/MSD –vel történt.



A ClO<sub>2</sub> és EDTA közötti interakció vizsgálatát mágneses magrezonancia spektroszkópia (Nuclear Magnetic Resonance NMR) alkalmazásával végeztük. A pontos módszer <sup>1</sup>HNMR, ami a protonok kémiai változását oldatban vizsgálja. Oldatok készítésénél, a szükséges koncentrációk meghatározása az oxidációhoz szükséges mennyiségek figyelembevételével történ. Az EDTA végső koncentrációja 3 mM, a ClO<sub>2</sub>-é 16 mM volt.

<sup>1</sup>HNMR spektroszkópia: NMR vizsgálat Bruker Avance III 500 MHz spektrométerrel a H<sub>2</sub>O/D<sub>2</sub>O 9:1 arányú oldatában 1 dimenziós spektrum felvételével történt. A spektrumok kiértékeléséhez Bruker Topspin 3.0 software-t használtunk.

## Eredmények

1. A *S. mutans*, a *L. achidophilus*, és a *C. albicans* csíraszám változásában, egyik csoportban sem kaptunk szignifikáns változást. A teszt csoportban a *S. mutans* értéke 5 esetben növekedett, két esetben változatlan maradt és nyolc esetben csökkent. A *Lactobacillus* értéke 6 esetben növekedett, 5 esetben változatlan maradt, és 9 esetben csökkent. A két baktérium csíraszámának mennyiségében enyhe fokú csökkenő trendet találtunk. A *C. albicans* csíraszámja gyakorlatilag változatlanak tekinthető.
2. A NaF és MFP a tesztelt koncentrációkban, a tesztelt időtartam alatt sem a foszfát pufferben, sem a tejben nem okozott jelentős változást a *S. mutans*, a *L. achidophilus*, és a *C. albicans* csíraszámában.

A fenol koefficiens vizsgálattal kapott eredmények azt mutatták, hogy sem a NaF-nak sem a MFP-nak az 5 és 10 perces vizsgált periódus nem volt elegendő egyik koncentrációban sem arra, hogy a mikroorganizmusokat elölje. A fenol 1:100-as hígítása 5 perc után már előlte a *S. mutans*-t és a *L. achidophilus*-t. 1:80-as hígítása pedig elegendő volt a *C. albicans* elpusztításához.

A NaF hatással volt a mikroorganizmusok növekedési görbéjére. *S. mutans* exponenciális fázisa a legmagasabb fluorid koncentrációnál ellaposodott. Az 500 mg/l-es NaF koncentráció már csökkentette a növekedést. A MFP indifferensen viselkedett a mikroorganizmusok növekedési görbéjével szemben.

3. A kariesz aktív csoportban 7 *S. mutans* törzset vizsgáltunk és 3 különböző PFGE mintázatot találtunk. A kariesz mentes csoport 10 törzsében szintén 3 különböző PFGE mintázatot találtunk. A 11 gingivitiszes csoportba tartozó törzsek között 3 különböző mintázat fordult elő. Ebben a csoportban 2 ugyanolyan (identikus) törzset találtunk. Az összes törzs sávjainak vizsgálata során összesen 3 egymással megegyező, azaz identikus párt találtunk, melyből csak 1 pár származott ugyanabból a vizsgálati csoportból.
4. A vizsgált plakk flóra esetén megfigyelhető volt a biofilm képződés gátlásának csökkentése D-metionin és D-triptofán alkalmazása esetén.

A masszív biofilm eliminálásának ELISA olvasóval történő értékelése azt mutatta, hogy a vizsgált koncentrációkban és időtartam alatt a D-aminosavak szinte hatástalanok voltak a biofilm mennyiségére. D-metionin esetében átlagban 10%-os, D-triptofán kezelés után 8%-os biofilm mennyiség csökkenést tapasztaltunk a kontroll értékhez képest. Az aminosavak koncentrációjának emelése nem változtatta a hatásosságot.
5. A vizsgált antiszeptikumok hatása szignifikánsan erősebb volt a fenolnál. A nagy tisztaságú ClO<sub>2</sub> oldat aerob, fakultatív anaerob (*E. faecalis*, *S. mutans*) baktériumokon és *Candidán* kifejtett hatása szignifikánsan erősebb volt a többi dezinficiáló szerhez képest. Az anaerob módon tenyésztett fakultatív anaerob (*V. alcalescens*, *A. odontolyticus*) és anaerob (*E. corrodens*) baktérium esetében a ClO<sub>2</sub> hatása hasonló volt a CHX oldatével, de mindkét oldat szignifikánsan erősebbnek bizonyult, mint a NaOCl vagy a Listerine.
6. A tesztelt szájvizek mindegyike szignifikánsan csökkentette az *in vitro* képzett orális biofilm mennyiségét a kontrollként alkalmazott fiziológiás sóoldathoz képest a vizsgált időpontokban. Az oldatok biofilm bontó aktivitásában az 1 és 5 perces behatás után történő vizsgálatnál nem volt szignifikáns különbség. A ClO<sub>2</sub> biofilm elimináló képessége a Listerine-hez képest 1 és 5 perc után is szignifikánsan nagyobb volt, míg CHX esetében a szignifikáns különbség 5 percnél valósult meg. A Listerine és a CHX között nem volt a vizsgált időpontokban szignifikáns különbség.
7. A Solumium Oral szignifikánsan csökkentette a nyál összcsíraszámát, míg a Listerine Total Care alkalmazásakor nem történt szignifikáns változás az 1 percig tartó öblögetés

után. A *S. mutans* számát mind a két oldat szignifikánsan csökkentette. A szignifikancia szinteket figyelembe véve azonban a Solumium oldat hatása erőteljesebbnek mutatkozott.

8. A 14. nap után mindegyik gyökércsatorna fertőzött volt. A kemo-mechanikai kezelést követően csak a kontroll csoportból tudtuk az *E. faecalis*-t kimutatni. A tesztelt irrigálószer használata után nem volt detektálható baktérium mennyiség. A kontroll csoporthoz képest mindegyik irrigálószer használata után a dentintubulusokban maradt *E. faecalis* mennyisége (a visszafertőződése) szignifikánsan alacsonyabb volt a 2. és 5. nap után. A NaOCl csoportban szignifikánsan emelkedett az *E. faecalis* csíraszám a 2. és az 5. nap után is. A visszafertőződés vizsgálatának 5.-ik napján minden irrigálószer között szignifikáns különbség volt megállapítható. A kapott eredményekből megállapíthatjuk, hogy a ClO<sub>2</sub> akadályozta meg leghatékonyabban az *E. faecalis* visszaszaporodását. Ebben a csoportban a vizsgált 8 gyökérből 5 esetben egyáltalán nem tudunk baktériumot visszatenyészteni sem a 2.-ik sem az 5.-ik nap után.

A gyökércsatornák átmetszetéből készült Scanning elektronmikroszkópos képek megerősítették a kapott összcsíraszámok eredményeit.

A 0,1 % ClO<sub>2</sub>, 5,25% NaOCl és a 2% CHX gázfázisának antibakteriális hatását vizsgálva megállapítottuk, hogy a véres agarra oltott *E. faecalis* növekedését az abszorpciós papírra öntött NaOCl és ClO<sub>2</sub> megakadályozta, míg CHX hatása mellett a gázfázis hiánya miatt a véres agaron kinőttek az *E. faecalis* törzsek.

9. Dentinpor nélkül a nagytisztaságú ClO<sub>2</sub> már 1 perc után teljesen előlte az *E. faecalis*-t a Ca(OH)<sub>2</sub> pedig 60 perc után. A CHX és a NaOCl esetében mindhárom tesztelt (1, 10, 60 perc) periódusban voltak túlélő baktériumok, melyek mennyisége csökkent az idővel. A csökkenés mértéke azonban nem volt szignifikáns.

Dentinport adva a tesztelt szerekhez, a túlélő *E. faecalis* mennyisége a ClO<sub>2</sub> és a Ca(OH)<sub>2</sub> esetében szignifikánsan emelkedett 10 perc után, összehasonlítva a dentinpor nélküli kezeléssel kapott eredményekkel. Ez a növekedés 60 perc után tovább folytatódott a Ca(OH)<sub>2</sub>-nál. A dentinpor ugyanakkor nem változtatta meg a CHX és a NaOCl antibakteriális hatását szignifikánsan a vizsgált teszt periódusokban.

A dezinficiáló szerek dentinporral történő 60 perces előinkubálása szignifikánsan csökkentette az összes szer hatását.

A dentinpor mennyiségének 3,5 mg-ra történő csökkentésekor a ClO<sub>2</sub> antibakteriális hatása egyik időpontban sem változott meg.

A dentinporral történő titrálási sorozat bizonyította, hogy adott körülmények között nem fogy el az összes ClO<sub>2</sub>. A kiinduló törzsoldatban 66 ppm volt a ClO<sub>2</sub> koncentrációja. 1 percig tartó dentinpor behatás után ez 40 ppm-re változott. A titrálási sor azt is bebizonyította, hogy ha a ClO<sub>2</sub> reakcióba lép, akkor redukciója nem áll meg egy közbülső oxidációs fokon, hanem egészen kloridig történik a redukálódás.

10. A szarvasmarha pulpa szövetek gyökércsatorna irrigálószerrel történő kezelése után a következő eredményeket kaptuk. A kontroll oldat súlyvesztése 4%-os volt. A ClO<sub>2</sub>-é pedig 5%-os. Az 5,25%-os NaOCl használata átlagosan 79%-kal csökkentette a pulpa szövet súlyát. A megmaradt szövet több apró darabra esett szét. Néhány mintából nem is tudtunk mérést végezni, mert a szövet teljesen feloldódott. A 2,5%-os NaOCl esetében a súlyváltozás 35 %-os volt. A 2%-os CHX hatására 10%-os súlyvesztést mértünk.

11. A HPLC-vel kapott CHX UV spektrumában megjelenő szennyeződés PCA, melynek koncentrációja kisebb, mint 0,3%.

A CHX és a hozzáadott ClO<sub>2</sub> között semmilyen interakció nem lépett fel, mert a CHX spektruma nem változott meg a vizsgált periódus alatt. A ClO<sub>2</sub> nem oxidálta a PCA-t, mivel a PCA csúcsok sem változtak.

A <sup>1</sup>HNMR-rel kirajzolódó EDTA-t jellemző két fő csúcs, mely kémiai szerkezetéből adódik, a ClO<sub>2</sub> hatására bekövetkező kémiai változás miatt (savassá váló környezet, változik a pH) távolodott egymástól. Az oldat lassú degenerációja, oxidálódása következett be a ClO<sub>2</sub> hatására.

## Következtetések

1. Az AmF és az SnF<sub>2</sub> tartalmú fogpaszták és szájvizek rövid ideig tartó alkalmazása nem csökkenti szignifikánsan a *S. mutans*, a *L. achidophilus*, és a *C. albicans* csíraszámát.
2. A NaF és a Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>F az alkalmazott koncentrációkban és időtartam alatt nem mutat azonnali hatást a *S. mutans*, a *L. achidophilus*, és a *C. albicans* mikroorganizmusokon,

ezen a tej jelenléte nem változtat. A NaF hatással van a mikroorganizmusok növekedési görbéjére, míg a MFP indifferensen viselkedik.

3. A közeli rokonságban lévő *S. mutans*-ok különböző fogászati megbetegedést okozhatnak, ugyanakkor a normál flóra részeit is képezhetik.
4. A D-metionin és D-triptofán csökkenti a vegyes flórából képzett biofilm kialakulását, de a már kifejlett, masszív biofilm eliminálására szinte hatástalanok.
5. A nagytisztaságú ClO<sub>2</sub> oldat aerob, fakultatív anaerob baktériumokon és *Candida*-n kifejtett hatása szignifikánsan erősebb a CHX, a NaOCl és a Listerine dezinficiáló hatásánál. Az anaerob módon tenyésztett baktériumok esetében a ClO<sub>2</sub> hatása hasonló a CHX oldatéhoz, és mindkét oldat szignifikánsan erősebb, mint a NaOCl vagy a Listerine.
6. A ClO<sub>2</sub> *in vitro* biofilm elimináló képessége a Listerine-hez képest 1 és 5 perc után szignifikánsan nagyobb, 5 perc után pedig hatása a CHX-nél is szignifikánsan erősebb.
7. *In vivo* a nagytisztaságú ClO<sub>2</sub> oldat szignifikánsan csökkenti egyszeri öblítés után is a nyál *S. mutans* és összcsíraszámát.
8. A nagytisztaságú ClO<sub>2</sub> oldat és gázfázisa szignifikánsan megszünteti a kísérleti *E. faecalis* fertőzést a gyökércsatorna rendszerben. A visszafertőződéssel szemben hatékonyabb, mint a NaOCl és a CHX.
9. A gyökércsatornában lévő dentinpor mennyiségének csökkentése, feltétele a ClO<sub>2</sub> megfelelő antibakteriális hatásának biztosításához.
10. A nagytisztaságú ClO<sub>2</sub>-nak nincs szövet oldó, szövet roncsoló hatása.
11. A ClO<sub>2</sub> nem lép interakcióba a CHX-nel és nem növeli a benne lévő toxikus PCA mennyiségét, így azok együttes alkalmazása a gyökércsatornában biztonságos. A ClO<sub>2</sub> hatására az EDTA oxidálódik, az anyag stabilitása, aktivitása megszűnik.
12. Összefoglalva a nagytisztaságú klór-dioxiddal végzett kísérletek eredményeit megállapítottuk, hogy a klór-dioxid preventív és terápiás célra is alkalmas a szájhygiénés és az endodonciai kezelések során.

## Saját publikációk jegyzéke

### Értekezéssel kapcsolatos közlemények

1. **Herczegh A**, Gyurkovics M, Ghidan A, Megyesi M, Lohinai Z. (2014) Effect of dentin powder on the antimicrobial properties of hyperpure chlorine-dioxide and its comparison to conventional endodontic disinfecting agents DOI: 10.1556/AMicr.61.2014.2.10 (**IF: 0,646**)
2. **Herczegh A**, Gyurkovics M, Agababyan H, Ghidán A, Lohinai Z. (2013) Comparing the efficacy of hyper-pure chlorine-dioxide with other oral antiseptics on oral pathogen microorganisms and biofilm in vitro. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 60: 359-73. (**IF: 0,646**)
3. **Herczegh A**, Ghidan A, Friedreich D, Gyurkovics M, Bendő Z, Lohinai Z. (2013) Effectiveness of a high purity chlorine dioxide solution in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 60: 63-75. (**IF: 0,646**)
4. **Herczegh A**, Ghidán A, Deseo K, Kamotsay K, Tarján I. (2008) Comparison of *Streptococcus mutans* strains from children with caries-active, caries-free and gingivitis clinical diagnosis by pulsed-field gel electrophoresis. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 55: 419-27.
5. Kamotsay K, Herczegh A, Rozgonyi F, Nász I, Gintner Z, Bánóczy J. (2002) Effect of fluoride on cariogenic oral microorganisms (an in vitro study). *Acta Microbiol Immunol Hung*, 49: 47-58.
6. **Herczegh A**, Gombik A, Rost M, Wierzbicka M, Bánóczy J. (1991) Aminfluorid és ónfluorid tartalmú fogkrém és szájöblítő mikrobiológiai hatásosságának vizsgálata. *Fogorv Sz*, 84: 181-4.

### Értekezéssel nem kapcsolatos közlemények

1. Gyurkovics M, Barta A, Bartha K, Bíró ÁB, Döbrentey Zs, Fazekas R, Gánti B, Györfi **A**, **Herczegh A**, Jelencsics D, Kis P, Komora P, Mikó S, Nagy Zs, Pataky G, Sági B, Szabó E, Tóth Zs. (2013) A fogorvoslás fejlődése az elmúlt 20 évben *Orvostovábbképző Sz*, 20: (1. ksz.) pp. 18-28.
2. Árendás K, **Herczegh A**, Kerémi B, Tóth Zs. (2013) Caries rizikópáciens komplex ellátása: Esetismertetés *Fogorv Sz*, 106: 17-21.
3. Bánóczy J, Orsós M, Gombik A, **Herczegh A**. (1997) The development and results of oral microbiology at the Semmelweis University of Medicine. *Acta Microbiol Immunol Hung*, 44: 291-4.
4. **Herczegh A**. (1993) A gyökérfelszíni caries mikrobiológiája *Fogorv Sz*, 86: 333-337.

5. Wierzbicka M, Rost M, Strużycka I, Bánóczy J, Grzywacz R, Gombik A, **Herczegh A.** (1992) Wpływ związków fluoru stosowanych do domowej higieny jamy ustnej na drobnoustroje próchnicotwórcze u osób dorosłych [Effects of fluoride dentifrices and mouthrines on caries related bacteria in adults]Cza Stomatol, 45: 189-195.
  
6. **Herczegh A,** Gyarmati I, Nász I, Bánóczy J. (1991) Néhány fotopolimerizációs tömőanyag és üveginomer cement baktériumállóságának vizsgálata. Fogorv Sz, 84: 151-154.