

اثر ضد قارچی هیپوکلریت سدیم در کانالهای ریشه آلوده به کاندیدا آلبیکنس

دکتر اسحق علی صابری*، دکتر عادل ابراهیم زاده**، دکتر محمد حسین قنبری فیروزآبادی***

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده دندانپزشکی، گروه اندودانتیکس
 ** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی، گروه انگل شناسی و قارچ شناسی
 *** دندانپزشک

چکیده

زمینه و هدف: هیپوکلریت سدیم شایع ترین محلول شستشو دهنده مورد استفاده در اندودانتیک می باشد. هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد قارچی این ماده در کانالهای ریشه آلوده به کاندیدا آلبیکنس است.

مواد و روش کار: در این مطالعه ۱۶۰ دندان ثنایای ماگزیلای انسان که به دلایل مختلف کشیده شده اند انتخاب و تاج دندانها را از ناحیه CEJ (Cemento-Enamel-Junction) قطع نمودیم. پس از آماده سازی، کانال ریشه ها در جهت عرضی به قطعات ۵ میلی متری تقسیم و هر قطعه دو نیمه شد تا حجم نمونه به ۳۲۰ قطعه برسد. سپس نمونه ها به طور تصادفی به دو گروه آزمایشی ۱۵۰ تایی و دو گروه شاهد هر کدام دارای ۱۰ نمونه تقسیم شد. در یک گروه آزمایش لایه اسمیر حذف و در گروه دیگر لایه اسمیر دست نخورده باقی ماند. سپس نمونه ها را ابتدا استریل و سپس به وسیله کاندیدا آلبیکنس خالص آلوده کرده و در معرض هیپوکلریت سدیم ۲/۵ و ۵/۲۵٪ قرار دادیم. سپس در فاصله های ۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه از هر گروه ۲۵ نمونه را برداشته و به محیط کشت TSB (Trypticase Soy Broth) منتقل و پس از ۲۴ ساعت لوله ها از نظر وجود کدورت مورد ملاحظه قرار گرفت.

یافته ها: هیپوکلریت سدیم ۲/۵٪ بعد از ۵ دقیقه با حضور لایه اسمیر در ۲۰٪ موارد و بدون حضور لایه اسمیر در ۳۶٪ موارد اثر ضد قارچی داشت در حالیکه در غلظت ۵/۲۵٪ با حضور لایه اسمیر در ۴۴٪ و بدون حضور لایه اسمیر در ۱۰۰٪ موارد این اثر را از خود بروز می دهد. همچنین با افزایش زمان تماس در هر دو غلظت اثر ضد قارچی هیپوکلریت سدیم به طور چشمگیری افزایش می یابد که در ضمن درمان اندودانتیک این شرایط قابل تحقق است.

نتیجه گیری: استفاده از هیپوکلریت سدیم در ضمن درمان اندودانتیک به خصوص در بیمارانی که به طور موضعی یا سیستمیک مستعد ابتلا به کاندیدایزیس دهانی هستند از اهمیت بالایی برخوردار است. (مجله طبیب شرق، سال ششم، شماره ۲، تابستان ۱۳۸۳، ص ۱۱۵ تا ۱۲۱)

کلواژه ها: هیپوکلریت سدیم، کاندیدا آلبیکنس، اندودانتیک، کانال ریشه

مقدمه

دهان در ۲۵ درصد بالغین سالم و ۵۰ درصد بیماران بیمارستانی می باشند.^(۱) این حضور معمولاً منجر به بیماری نمی شود مگر اینکه فاکتورهای مستعد کننده موضعی و سیستمیک مانند کاهش جریان بزاق، عدم رعایت بهداشت یا بهداشت ضعیف دهان، دنچه های بدون انطباق، دیابت، بدخیمی ها، شیمی درمانی و یا عفونت HIV وجود داشته باشد^(۱) از طرفی حضور قارچها در پلاک دندانی، پوسیدگیها، توبولهای عاجی، فلور زیر لثه و

تحریکات میکروبی مهمترین عامل آسیب رسان به بافت پالپ و نسوج پری اپیکال بوده و هدف اصلی از درمانهای اندودانتیک نیز حذف کامل یا به حداقل رساندن این میکروارگانیسم ها می باشد.^(۱) قارچها بخشی از فلور میکروبی نرمال حفره دهان را تشکیل داده و کلونیزاسیون آنها در بافتهای دهانی از قدیم مطرح بوده است. رده های کاندیدا به خوبی شناسائی شده که همسفره میکروارگانیسم های موجود حفره

مختلف هیپوکلریت سدیم در کانالهای ریشه آلوده به کاندیدا آلیکنس می باشد.

روش کار

در این مطالعه ۱۶۰ دندان ثنایای ماگزایلی انسان که به دلایل مختلفی کشیده شده بودند، انتخاب و سطح خارجی آنها را از هر گونه جرم، سمان و بقایای بافتی پاک نمودیم. تاج دندانها از ناحیه Cemento Enamel Junction (CEJ) قطع و کانالها را به وسیله فایل های دستی و گیتس گیلیدین دریل آماده نمودیم. ریشه ها در جهت عرضی به قطعات ۵ میلی متری تقسیم و از هر ریشه یک قطعه ۵ میلی متری توسط دیسک های الماسی و چیزل جدا گردید تا حجم نمونه به ۳۲۰ قطعه برسد.

سپس نمونه ها را به طور تصادفی به دو گروه ۱۵۰ تایی تقسیم کردیم. در یک گروه به منظور حذف لایه اسمیر از EDTA ۱۷ درصد به مدت ۳ دقیقه استفاده و پس از آن نمونه ها با جریان آب به مدت ۱۵ دقیقه شستشو و به فلاسک حاوی هیپوکلریت سدیم ۵/۲۵ درصد به مدت ۳ دقیقه انتقال یافت و بعد از طی این زمان به مدت ۲ ساعت در زیر جریان آب شستشو دادیم. در گروه باقیمانده لایه اسمیر دست نخورده باقی ماند.

نمونه های هر دو گروه را به طور جداگانه در بسته های مناسب قرار داده و به وسیله اتوکلاو در حرارت ۱۲۱ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه و فشار ۱۵ پوند استریل شدند.

۳۲۰ پلیت استریل کشت بافتی انتخاب و هر نمونه از ریشه ها را در کف یک پلیت ثابت کرده و به وسیله ۲۰ میکرولیتر از کاندیدا آلیکنس آلوده و به مدت ۴ ساعت جهت ایجاد اتصال اولیه در همین شرایط نگهداری شدند. بعد از گذشت

کانالهای ریشه به خوبی شناسایی شده اند.^(۲)

در یک بررسی کاندیدا آلیکنس از ۲۱ درصد نمونه های بدست آمده از کانالهای ریشه به کمک PCR جدا شده است^(۳) و در عفونتهای پایدار کانال ریشه نیز حضور قارچها در ۷ درصد موارد گزارش شد که در بین آنها کاندیدا آلیکنس شایع ترین نمونه قارچی جدا شده بوده و سایر نمونه های قارچی شامل: *C. Geotrichium candidum*, *inconspicua*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata* می باشد.^(۴)

هیپوکلریت سدیم شایع ترین محلول شستشو دهنده مورد استفاده در درمانهای اندودانتیک می باشد که باعث انحلال بافت پالپ نیز می گردد.^(۵ و ۶) این ماده با غلظت ۳ تا ۵ درصد در کلینیک مورد استفاده قرار می گیرد که از مزایای آن می توان به تخریب تمام میکروارگانیسم ها با تماس مستقیم و همچنین توانایی انحلال بافت پالپ در تمام قسمتهای کانال ریشه اشاره نمود.^(۷)

Sen و همکارانش وجود قارچها را در پلاک دندان، پوسیدگی، توبولهای عاجی، فلور زیر لثه ای و کانالهای ریشه عفونی شناسایی و شیوع مختلفی بین ۵ تا ۷۷ درصد را در کانالهای ریشه عفونی مطرح نمودند.^(۸) همچنین نشان دادند که کاندیدا آلیکنس می تواند روی دیواره های کانال ریشه در اشکال مختلف در یک محیط تحت فشار از نظر تغذیه رشد کرده و به درون توبولهای عاجی نفوذ کند. آنها پیشنهاد کردند که این قارچها ممکن است عاج را به عنوان منبع غذایی خود انتخاب کنند.

میکروارگانیسم های شایع کانال ریشه پس از تماس با محلولهای شستشو دهنده داخل کانال کشته می شوند. هر چند مشخص شده که مخمرها به خیلی از ضد عفونی کننده های مورد استفاده به خصوص در بخش های اندودانتیک مقاوم می باشد.^(۹ و ۱۰)

هدف از این مطالعه ارزیابی اثر ضد قارچی غلظتهای

تمام نمونه های گروه شاهد منفی تا پایان مطالعه منفی باقیمانده و صد در صد نمونه های گروه شاهد مثبت نیز از نظر کشت قارچی مثبت بودند. همچنین دیده شد که هیپو کلریت سدیم ۲/۵ درصد با حضور لایه اسمیر بعد از گذشت ۵ دقیقه در ۲۰ درصد موارد در حالیکه هیپو کلریت سدیم ۵/۲۵ درصد در ۴۴ درصد موارد باعث از بین رفتن کاندیدا آلبیکنس می شود. اما با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه در هر دو غلظت اثر ضد قارچی در ۱۰۰ درصد موارد ظاهر می شود (جدول ۱).

همچنین نتایج مطالعه نشان داد که در گروه بدون حضور لایه اسمیر هیپو کلریت سدیم با غلظت ۲/۵ در زمان ۵ دقیقه در ۳۶ درصد موارد و در غلظت ۵/۲۵ درصد در ۱۰۰ درصد موارد اثر ضد قارچی از خود بروز می دهد (جدول ۲).

جدول ۱ : اثر ضد قارچی هیپوکلریت سدیم در غلظتهای مختلف با حضور لایه اسمیر

غلظت ۵/۲۵ %		غلظت ۲/۵ %		نتیجه کشت فراوانی زمان (دقیقه)
منفی	مثبت	منفی	مثبت	
تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	
۱۱	۱۴	۵	۲۰	۵
۲۵	۰	۱۱	۱۴	۳۰
۲۵	۰	۲۵	۰	۶۰

جدول ۲ : اثر ضد قارچی هیپوکلریت سدیم در غلظتهای مختلف بدون حضور لایه اسمیر

غلظت ۵/۲۵ %		غلظت ۲/۵ %		نتیجه کشت فراوانی زمان (دقیقه)
منفی	مثبت	منفی	مثبت	
تعداد	تعداد	تعداد	تعداد	
۲۵	۰	۹	۱۶	۵
۲۵	۰	۲۵	۰	۳۰
۲۵	۰	۲۵	۰	۶۰

بحث

عفونتهای قارچی زمانی بروز می کنند که میزبان شرایطی را برای تغذیه، اتصال و رشد قارچ فراهم نماید و همچنین یک سری فاکتورهای

این زمان به هر خانه از پلیت ها ۲ میلی لیتر سرم انسانی اضافه شد. سپس پلیت ها در حرارت ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ روز انکوبه شدند. بعد از طی این زمان، نمونه ها با بافر فسفات سالیین (PBS) ۰/۱ مول ۳ بار شستشو و سپس جهت ثابت شدن، در گلو تار آلدئید ۲/۵ درصد در ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند.

بعد از طی زمان ثابت سازی، مجدداً قطعات ریشه با ۰/۱ مول PBS ۳ بار شستشو شده و به ترتیب به وسیله اتانول ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۹۰ و ۹۵ درصد به مدت ۱۰ دقیقه و با اتانول ۱۰۰ درصد به مدت ۱۵ دقیقه دهیدره شدند. مجدداً هر خانه از پلیت ها با ۳ میلی لیتر PBS ۳ بار شستشو تا سلولهای قارچی شناور و بدون اتصال خارج گردد. پس از آسپیراسیون باقی مانده های محلول PBS، ۳ میلی لیتر از هیپو کلریت سدیم ۲/۵ درصد و ۵/۲۵ درصد به هر خانه از پلیت ها اضافه و در هر یک از زمانهای ۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه ۲۵ قطعه از نمونه های ریشه موجود در پلیت ها خارج و در PBS استریل شستشو داده شدند و سپس در لوله های حاوی TSB غوطه ور ساخته و به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه نمودیم و در پایان حضور و یا عدم حضور کدورت در لوله ها مورد بررسی قرار گرفت.

نمونه های گروه شاهد مثبت شامل ۱۰ نمونه با کاندیدا آلبیکنس آلوده و با محلول سالیین استریل درمان شدند. گروه شاهد منفی نیز که شامل ۱۰ نمونه بود، آلوده نشده و ضد عفونی هم نشدند و در پایان نتایج بدست آمده بر اساس آزمون کای دو تجزیه و تحلیل آماری شدند.

یافته ها

از مجموع تعداد ۳۲۰ نمونه ریشه دندان انسان دو گروه آزمایشی ۱۵۰ تایی بدون حضور لایه اسمیر و با حضور لایه اسمیر و ۱۰ نمونه بعنوان گروه شاهد منفی و همچنین ۱۰ نمونه نیز به عنوان گروه شاهد مثبت انتخاب گردید. نتایج نشان داد که

که در گروه حاوی لایه اسمیر هیپوکلریت سدیم در ۱۰۰ درصد نمونه ها نتیجه کشت مثبت گزارش شده است.^(۸) همچنین با افزایش زمان تماس به ۶۰ دقیقه در ۱۰۰ درصد موارد در هر دو غلظت اثر ضد قارچی هیپوکلریت سدیم بروز می نماید که موافق با یافته های آن می باشد^(۸) این در حالی است که در نمونه های فاقد لایه اسمیر با زمان ۵ دقیقه و غلظت ۲/۵ درصد در ۳۶ درصد موارد و با غلظت ۵/۲۵ درصد در ۱۰۰ درصد نمونه ها نتیجه کشت منفی بوده که بر خلاف یافته های بدست آمده از مطالعه مذکور می باشد^(۸) و همچنین با یافته های مطالعه دیگری نیز تفاوت دارد که احتمالاً بدلیل اختلاف در غلظت هیپوکلریت سدیم مورد استفاده و مدت زمان در آن مطالعه می باشد.^(۱۹) دلیل مقاومت اولیه کاندیدا آلبیکنس در مقابل هیپوکلریت سدیم را می توان به ساختمان سلول کاندیدا (دیواره ضخیم کلامید و اسپور) که احتمالاً آن را در مقابل اثر دارو مقاوم می نماید، نسبت داد. این موضوع در مطالعه دیگری نیز تأیید شده است.^(۱۶)

با توجه به مطالب فوق می توان اظهار نمود که احتمالاً لایه اسمیر در کوتاه مدت و با غلظت های پایین هیپوکلریت سدیم می تواند به عنوان یک مانع در برابر اثر ضد قارچی آن عمل نماید. در حالیکه با افزایش غلظت محلول ضد عفونی کننده و افزایش زمان تماس چنین مقاومتی از خود نشان نمی دهد و با توجه به اینکه هیپو کلریت سدیم در طول مدت درمان بیش از ۵ دقیقه در کانال قرار می گیرد، لذا نقش اولیه لایه اسمیر چشمگیر نمی باشد.

مستعدکننده محیطی و عمومی نیز مورد نیاز می باشد.^(۱۱) مطالعات میکرو بیولوژیک وسیعی وجود قارچ را در کانال های ریشه عفونی به اثبات رسانده اند^(۱۲-۱۴ و ۲) و نشان داده اند که ۵ تا ۱۷ درصد کانال های عفونی حاوی مونیلیا (monilia) می باشد. بر اساس یافته های پژوهشی، کاندیدا آلبیکنس می تواند باعث پالپالژیای حاد و سلولیت آلوئولار گردد^(۱۳) همچنین بررسی میکروبیولوژیک به وسیله میکروسکوپ الکترونی (SEM) نشان داد که بین قارچ های موجود در کانال و توبول های عاجی عفونی و ضایعات پری اپیکال ارتباط وجود دارد^(۲) و از طرفی کاندیدا آلبیکنس مقاومترین ارگانیسم در مقابل محلول های ضد عفونی کننده کانال معرفی شده است.^(۱۵) نشان داده شده است که کاندیدا آلبیکنس در pH حدود ۳ تا ۸ به خوبی رشد می کند و سابورو دکستروز آگار (Sabouraud Dextrose Agar) با pH برابر ۵/۶، محیطی انتخابی برای ایزولاسیون قارچها می باشد و همچنین محیط TSB نیز با pH ۷/۲، برای کشت کاندیدا، ایزولاسیون و شناسایی اولیه محیط قابل اطمینانی را تأمین می نماید.^(۱۷) از طرفی عنوان شده که محیط TSB ریکاورتی ایده آلی را برای قارچها فراهم می آورد.^(۱۸) لذا در مطالعه حاضر جهت ایزولاسیون و ریکاورتی کاندیدا آلبیکنس از محیط های فوق استفاده شده است. مطالعه ما نشان داد که در نمونه های حاوی لایه اسمیر، هیپوکلریت سدیم با غلظت ۲/۵ درصد بعد از ۵ دقیقه در ۲۰ درصد موارد باعث نابودی کاندیدا می شود در حالیکه با غلظت ۵/۲۵ درصد در ۴۴ درصد موارد چنین اثری را از خود بروز می دهد که بر خلاف نتایج به دست آمده از مطالعه ای مشابه می باشد

سپاسگزاری

خصوصاً جناب آقای بهمن فولادی و همچنین از مسئول محترم
واحد کامپیوتر دانشکده دندانپزشکی جناب آقای عباسعلی
شهرکی تشکرمی شود.

بدینوسیله از همکاری صمیمانه حوزه معاونت پژوهشی
دانشگاه علوم پزشکی زاهدان جهت تامین بودجه مالی این طرح،
کارکنان محترم آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی

References

1. Scully CE, Kabir M, Samarana Yake LP. Candida and candidosis a review. Crit Rev Oral Biol 1994; 5: 125-57.
2. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. Endod Traumatol 1995; 11: 6-9.
3. Baumgartner JC, Watts CM, Xia T. Occurrence of candida albicans in infections of endodontic origin. J Endodon 2000; 26: 695-8.
4. Waltimo TMT, Siren EK, Torkko HLK, et al. Fungi in therapy – resistant apical periodontitis. Int Endod J 1997; 30: 96-101.
5. Grey GC. The capabilities of sodium hypochlorite to digest organic debris from root canals with emphasis on accessory canals, masters, thesis. Boston, 1990 Boston University.
6. Hasselgren G, Ollson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. J Endod 1998; 14: 125.
7. Siqueira JF, Batista M, Fraga RC, Duzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black - pigmented gram-negative anaerobes and facultative bacteria. J Endod 1998; 24: 414-6.
8. Sen BH, Safari KE, Spangberg LW. Antifungal effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine in root canal. J Endod 1999; 25:235-8.
9. Waltimo TM, Siren EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral candida species to calcium hydroxide in vitro. Int Endod J 1999; 32: 94-8.
10. Waltimo TMT, Orstavik D, Siren EK, Haapasalo MP. In vitro susceptibility of candida albicans to four disinfectants and their combinations. Int Endod J 1999; 32: 421-9.
11. Spherd MG. Basic mycology. In: Slots J, Taubman MA, et al. Contemporary Oral Microbiology and Immunology. First ed. USA: St. Louis, Missouri; 1992.PP.59-62. Mosby.
12. Goldman M, Pearson AH. Post debridement bacterial flora and antibiotic sensitivity. Oral Surg, Oral Med and Oral Pathol J 1969; 28: 897-905.
13. Matusow R. Acute pulpal – alveolar cellulites syndrome, III. Endodontic therapeutic factors and the resolution of a candida albicans infection. Oral Surg, Oral Med and Oral Pathol 1981; 52:630-4.

14. Nair PNR, Sjogren U, Krey G, et al. Intra radicular bacteria and fungi in root - filled a symptomatic human teeth with therapy resistant periapical lesions: a long term light and electron microscopic follow-up study . JOE 1990; 16: 580-7.
15. Smith JJ, Wayman BE. An evaluation of the antimicrobial effectiveness of citric acid as a root canal irrigant. J Endodon 1986; 12:54-8.
16. Johnson SAM, Guzman MG, Agurlera CT. Candida (Monilia) albicans, effect of aminoacids, glucose, pH, chlortetracycline (Aureomycin), dibasic sodium and calcium phosphate and anaerobic and aerobic conditions on growth. Archives of Dermatolog 1954; 70:49-60.
17. Koeing H, Barale T, Reboux G, et al. Multicenter study of 435 yeast strains isolated from 116000 hemocultures (French). Annals de Biologie Clinique (Paris) 1991; 49:367-72.
18. Rams TE, Babalola OO, Slots J. Sub gingival occurrence of enteric rods yeasts and staphylococci after systemic doxycycline therapy. Oral Microbiology and Immunology 1990; 5:166-80.
19. Carneiro Valera , Duliano DE, Moraes Rego, et al. Effect of sodium hypochlorite and five intra canal medications on candida albicans in root canal. J Endod 2001; 27: 401-3.

The antifungal effect of sodium hypo chloride in infected root canals with Candida albicans

Saberi EA. MD*, Ebrahimzadeh A. PhD**, Ghanbari Phiroozabadi MH.MD***

Background: Whereas sodium hypochlorite is the most commonly irrigation solution used in endodontics we set out to study its antifungal effect of sodium hypochlorite in infected root canals with candida albicans.

Methods and Materials: In this study 160 human maxillary incisor teeth extracted for different reasons were selected. The teeth were cut in the CEJ zone and then the canals were prepared by using hand files and Gattes Glidden bur no. 6. The roots were then divided across into 5- mm pieces and using diamond disks and chisel so the sample volume will become 320 pieces halved each 5- mm piece. The root samples were divided randomly into two groups of 150. In one of the groups in order to remove the smear layer with EDTA 17% and then 5.25% sodium hypochlorite. The smear layer in the other group remained intact. In addition 10 samples were selected as positive control and 10 samples as negative control. The samples were then sterilized separately by autoclave.

320 sterilized tissue culture plates were selected. Each root sample was fixed in the bottom of a plate, and contaminated with candida albicans and then exposed to 2.5% and 5.25% sodium hypochlorite. 25 samples were taken from each group in intervals of 5, 30 and 60 minutes and transferred to the T.S.B culture medium. After 24 hours, the tubes containing T.S.B were considered in presence of turbidity. The results were statistically analyzed.

Results: The results indicated that 2.5% sodium hypochlorite in the present of smear layer caused destruction of candida albicans after 5 minutes in 20% of the cases while such destruction happened with 5.25% sodium hypochlorite in 44% of the cases. However by increasing the disinfections period in both concentrations the antifungal effect appears in 100% of the cases. Moreover the results of the study indicated in the group with no smear layer, sodium hypochlorite with a concentration of 2.5% showed its antifungal effect in 5 minutes in 36% of the cases and with a concentration of 5.25% in 100% of the cases.

Conclusions: Therefore the use of specific antifungal irrigation solution in the endodontic therapy of patients having local or systemic predisposing factors to oral candidiasis extreme importance.

KEY WORDS: Sodium hypochlorite, Candida albicans, Endodontic, Root canal

* Endodontics dept, Faculty of dentistry, Zahedan University of Medical Sciences and health services, Zahedan, Iran.

** Parasitology and Mycology dept, Faculty of medicine, Zahedan University of Medical Sciences and health services, Zahedan, Iran.

*** Dentist.