

RIZIKO VZNIKU KARCINOGENNEHO PARA-CHLÓRANILÍNU V RÁMCI ENDODONTICKEJ TERAPIE DEVITÁLNYCH ZUBOV

THE RISK OF GENERATION OF CARCINOGENIC PARA-CHLOROANILINE WITHIN ENDODONTIC THERAPY OF DEVITALISED TEETH

JÁN KOVÁČ, DANIEL KOVÁČ

Klinika stomatológie a maxilofaciálnej chirurgie LFUK a OÚSA Bratislava

SÚHRN

Cieľom článku je podať informáciu o možnom riziku vzniku para-chlórnilínu (PCA), ktorý je rozkladovým produktom chlórhexidínu (CHX) a zlúčeninou s toxickým a karcinogénnym účinkom. Vznik PCA je možným následkom používania chlórhexidínu, ktorý je v bežnej praxi široko používaný ako dezinfekčný prostriedok pri odstraňovaní zubného povlaku a v endodontickej terapii devitalizovaných – pulpy zbavených zubov, na redukciu mikrobiálnej flóry.

Kľúčové slová: para-chlórnilín, PCA, 4-chlórnilín, chlórhexidín, rozkladový produkt chlórhexidínu

SUMMARY

The purpose of this article is to report on potential risk of formation of para-chloroaniline (PCA), a breakdown product of chlorhexidine (CHX) a toxic and carcinogenic compound. The generation of PCA is a potential consequence of the use of chlorhexidine which has been widely used as an antiseptic agent for routine dental plaque control and irrigation of root canals in endodontic treatment of devitalised, pulpless teeth, for reduction of microbiota.

Key words: para-chloroaniline, PCA, 4-chloroaniline, breakdown product of chlorhexidine

Úvod

Endodoncia, ako jedna z disciplín stomatológie, sa zaoberá tvarom a funkciou endodontu a etiológiou, epidemiológiou, patológiou, prevenciou, diagnózou a liečbou ochorení endodontu – t. j. zubnej drene a s ňou súvisiacich tkanív – dentínu a parodontu, ktoré tvoria z vývojového hľadiska jednotný anatomický a funkčný celok. Endodontické ošetrenie predstavuje súhrn ošetrovacích postupov a techník, ktorých cieľom je zachovať zdravú a vitálnu zubnú dreň – pulpu. V prípadoch, keď došlo k ireverzibilnému poškodeniu alebo nekróze pulpy, cieľom terapie je zachovať devitálny zub ako plne funkčnú jednotku v ústnej dutine, pretože endodonticky ošetrovaný zub je tým najlepším implantátom, aký v ústnej dutine môže byť.

Chlórhexidín v endodontickej terapii devitálnych zubov

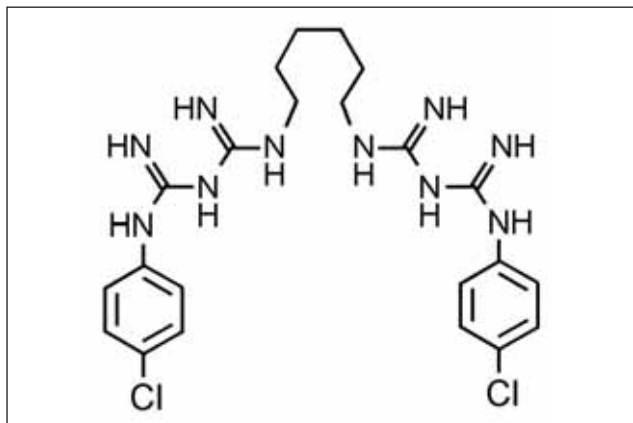
Predpokladom úspešnej terapie devitálnych zubov je úplné odstránenie a vyčistenie obsahu koreňového

kanálika zuba. Ide o infikované, vitálne či nekrotické tkanivo pulpy, prípadne jej skolikované zvyšky, baktérie s ich toxickými produktmi metabolizmu, antigénne látky, organické látky, plyny, alergény a pod. Baktérie, ktoré sa vyskytujú v infikovaných koreňových kanálikoch, predstavujú v porovnaní s celkovou flórou ústnej dutiny, kde je zatiaľ známych viac než 300 druhov, len obmedzené spektrum. Špecifické prostredie v koreňovom kanáliku umožňuje selektívny rast niektorých bakteriálnych druhov. Kľúčovými faktormi, určujúcimi výsledný obraz infekcie, sú vzájomné vzťahy medzi baktériami a prísun živín k nim. Endodontické ošetrenie, nezávisle od eliminácie baktérií, môže kompletne narušiť ich citlivé životné prostredie a zbaviť perzistujúce baktérie zdroja výživy.

Neoddeliteľnou súčasťou endodontického ošetrovania je používanie dezinfekčných prostriedkov (prípadne liečiv), či už vo forme výplachu alebo dezinfekčnej vložky. Ich primárnou úlohou je pôsobenie na mikroorganizmy prítomné v koreňovom kanáliku zuba. V súčasnej dobe z látok používaných na výplach koreňových kanálikov zaujíma dominantné postavenie hypochlorit sodný (NaOCl) a chlórhexidín (CHX)

a ako dezinfekčná vložka hydroxid vápenatý $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$. Na rozpustenie anorganického zložky drviva, v literatúre bežne označovanej ako smear layer, pokrývajúcej stenu koreňového kanálka a obturujúcej vchody do tubulov koreňového dentínu, sa používa etyléndiamíntetraoctová kyselina (EDTA) vo forme roztoku alebo gélu. EDTA zmäkčuje dentín a pomáha rozpúšťať kalcifikácie obliterujúce koreňový systém zuba (6).

Chlórhexidín patrí do skupiny bisguanidov, pričom na výplachy sa používa jeho soľ s kyselinou glukónovou – chlórhexidíndigluconát (1,6-di[N-p-chlorophenyldiguanido] hexane digluconate; Abacil; Arlacide G; Hibitane digluconate) (obr. 1). Komerčne je k dispozícii ako 20 % vodný roztok s nepatrne žltou farbou, pretože sa nemôže izolovať v pevnom skupenstve. Vo vode tvorí maximálne 50 % roztok, ale vysoká viskozita takto koncentrovaného roztoku spôsobuje, že nevyhovuje na používanie. Zriedené roztoky chlórhexidínu sa môžu uchovávať pri izbovej teplote, s predpokladanou dobou životnosti minimálne 1 rok, pri adekvátnom balení. Ich stabilitu môže nepriaznivo ovplyvňovať dlhodobá expozícia vysokej teplote alebo svetlu. CHX sa v stomatológii používa v dvoch konzistenciách, ako tekutina alebo gél (obsahuje najviac 1% natrosol) a používa sa v koncentráciách od 0,2 do 5 %. V endodoncii sa používa ako účinný výplachový roztok s antimikrobiálnym účinkom, no na rozdiel od hypochloritu sodného (NaOCl) nie je schopný rozpúšťať tkanivo pulpy. Kladne nabité molekuly CHX však majú schopnosť adsorpcie na dentín a vďaka antimikrobiálnym vlastnostiam umožňujú predchádzať mikrobiálnej kolonizácii jeho povrchu počas dlhej doby. Táto skutočnosť je veľkou prednosťou jeho použitia oproti iným dezinfekčným prostriedkom (7, 12).



Obr. 1: Štruktúrny vzorec chlórhexidínu ($\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_{10}$).

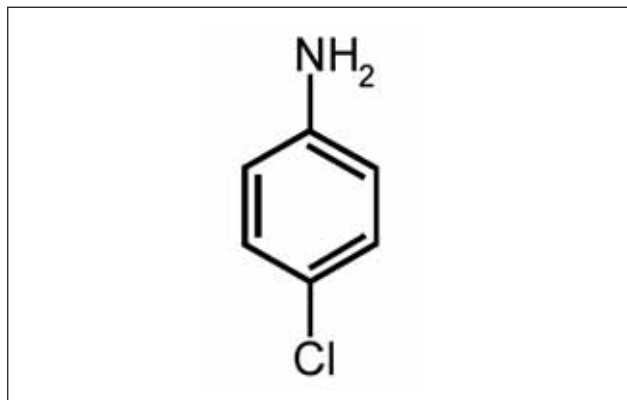
White a kolektív preukázali, že pri použití 2% chlórhexidínu ako výplachového prostriedku počas mechanického opracovania koreňového kanálka, pretrvával antimikrobiálny účinok chlórhexidínu po endodontickom ošetrení až 72 hodín (11).

Pokusy o spojenie výhodných vlastností chlórhexidínu a hydroxidu vápenatého nevedli k očakávanému výsledku, teda k zvýšeniu antimikrobiálneho účinku. Je to kvôli ich rozdielnemu pH, a tiež kvôli väzbe molekuly chlórhexidínu na ióny hydroxidu vápenatého, čo spôsobuje jej zablokovanie a znemožnenie voľného pôsobenia.

CHX je pravdepodobne najúčinnnejší antimikrobiálny prostriedok používaný v ústnej dutine. Má bakteriostatické a baktericídne vlastnosti, široké spektrum účinnosti proti gramnegatívnym (s výnimkou niektorých druhov *Pseudomonas* a *Proteus*) a grampozitívnym mikroorganizmom, kvasinkám a hubám. Chlórhexidíndigluconát je dobre rozpustný vo vode. Účinná látka sa viaže v dostatočne vysokej koncentrácii na bunkové steny baktérií a poškodzuje lipoproteínové membrány baktérií. Tým sa dosahuje bakteriostatický účinok. Pri dostatočne vysokej koncentrácii CHX preniká bunkovou stenou baktérií a pôsobí tak baktericídne. Vďaka jeho väzbe na povrch baktérií je natoľko obmedzená ich schopnosť adhézie na povrch zuba, že nastáva dodatočné potlačenie tvorby plaku. Dlhodobé klinické štúdie nezistili žiadne toxické, teratogénne a kancerogénne účinky CHX na organizmus (6).

Vznik a účinok para-chlórnilínu na ľudský organizmus

Para-chlórnilín, alebo 4-chlórnilín je halogéndrivátom anilínu. Je to zlúčenina anilínu s chlóróm viazaným v polohe 4 (obr. 2). Všetky izoméry chlórnilínu (chlór môže byť i v polohe 2 a 3) majú hemato toxický účinok. Vykazujú rovnaký typ toxicity u potkanov a myši, ale v rámci všetkých sledovaných prípadov prejavuje 4-chlórnilín (ďalej uvádzame ako PCA) najzávažnejšie toxické účinky. Okrem toho, genotoxicky pôsobí na viacero systémov. PCA je bezfarebná, slabo jantárová, kryštalická látka s jemnou aromatickou vôňou. Je rozpustná vo vode a v bežných organických rozpúšťadlách. Používa sa ako medzi-produkt pri výrobe mnohých látok, vrátane priemyselných hnojív, azo-farbív a pigmentov, kozmetiky a farmaceutických produktov.



Obr. 2: Štruktúrny vzorec 4-chlórnilínu (PCA, para-chlórnilín, p-chlórnilín, $\text{C}_6\text{H}_6\text{ClN}$).

Uvoľnenie PCA do životného prostredia tak môže nastať z viacerých priemyselných zdrojov, ako napr. z polygrafického priemyslu. Hlavným environmentálnym cieľovým prostredím, kde možno prítomnosť PCA vzhľadom na charakter jeho spracovania predpokladať, je hydrosféra. Koncentrácie namerané v riekach sa pohybujú zhruba v rozsahu 0,1 až 1 $\mu\text{g/liter}$.

V hydrosfére sa PCA rýchlo degraduje vplyvom svetla (polčas rozpadu 2–7 hodín). Polčas rozpadu

vo vzduchu je pre reakciu s hydroxylovými radikálmi 3,9 hodiny. Mnohé štúdie zamerané na degradáciu PCA naznačujú, že je prirodzene schopný rozkladu vo vode pod vplyvom aeróbných podmienok, kým pri anaeróbných podmienkach sa nezistila žiadna významná mineralizácia.

PCA sa rýchlo absorbuje a metabolizuje. Reaktívne metabolity PCA sa kovalentne viažu na hemoglobín a proteíny pečene a obličiek. Väzby na ľudský hemoglobín sú detekovateľné už za 30 minút po náhodnom vystavení jeho účinkom, s najvyššou hladinou za 3 hodiny.

Vylučovanie u ľudí alebo zvierat nastáva primárne močom, pričom PCA a jeho konjugáty sa v ňom objavajú už za 30 minút po vystavení jeho účinkom. Vylučovanie sa uskutočňuje prevažne v priebehu prvých 24 hodín a v rámci 72 hodín je takmer kompletne.

Pre potkany predstavujú orálne LD₅₀ hodnotu 300–420 mg/kg telesnej hmotnosti, pre myši 228–500 mg/kg telesnej hmotnosti a 350 mg/kg telesnej hmotnosti pokusných morčiat.

Významným toxickým prejavom je vznik methemoglobínémie. PCA indukuje methemoglobinémiu účinnejšie a rýchlejšie než anilín. PCA disponuje aj nefrotoxickým a hepatotoxickým potenciálom.

Opakované vystavovanie PCA spôsobuje vznik cyanózy a methemoglobínémie s následnými prejavmi v krvnom obraze, pečeni, slezine a obličkách. Tieto prejavy sa manifestujú ako zmeny v hematologických parametroch, splenomegália, mierna až ťažká hemosideróza v slezine, pečeni a obličkách, čiastočne sprevádzaná extramedulárnou hematopoézou. Takéto prejavy sa sekundárne vyskytujú pri nadmernej zlúčeninou indukovanvej hemolýze a zhodujú sa s regeneratívnou anémiou.

PCA má karcinogénny účinok na samcov potkanov, s indukciou nezvyčajných a vzácných tumorov sleziny (fibrosarkómy a osteosarkómy), ktoré sú typické pre anilín a látky s ním súvisiace. U samičiek potkanov sa so zvýšenou frekvenciou vyskytujú prekancerózne stupne tumorov sleziny. Zvýšený výskyt feochromocytómu v nadobličkách potkanov by mohol súvisieť s podávaním PCA. Existuje určitý dôkaz karcinogenity u samcov myši preukázaný hepatocelulárnymi tumormi a hemangiosarkómom. Vo vzorkách transformujúcich buniek prejavuje PCA transformujúcu aktivitu. Množstvo *in vitro* genotoxických testov (ako napr. Salmonella mutagénny test, vzorka myšacieho lymfómu, test chromozomálnej aberácie, indukovaná záměna sesterskej chromatídy) poukazuje na skutočnosť, že PCA má pravdepodobne genotoxický účinok, hoci výsledky sú občas sporné. Kvôli nedostatku informácií nie je možné urobiť relevantný záver týkajúci sa genotoxického účinku PCA v *in vivo* podmienkach.

Pokiaľ ide o reprodukčnú toxicitu, nie sú k dispozícii žiadne štúdie.

Údaje o pracovnej expozícii ľudí účinkom PCA sú väčšinou z niekoľkých starších správ týkajúcich sa ťažkých intoxikácií po náhodnom vystavení sa účinkom PCA počas výroby. Príznaky zahŕňajú zvýšenú hladinu methemoglobínu a sulfhemoglobínu, cyanózu, rozvoj anémie, a zmeny spôsobené anoxiou. PCA má výraznú tendenciu vytvárať hemoglobínové väzby.

Zistenie ich prítomnosti sa môže využiť v biologickom monitoringu zamestnancov vystavených 4-chlóranilínu na pracovisku.

Existujú správy o závažnej methemoglobínémii u novorodencov z jednotiek intenzívnej starostlivosti v dvoch krajinách, kde predčasne narodené deti boli vystavené účinkom PCA ako rozkladovému produktu chlórhexidínu. Chlórhexidín, ktorý sa nevedomky použil v zvlhčujúcej tekutine, sa rozložil na PCA v novom type inkubátora. V jednej správe boli traja novorodenci (14,5–43,5 % methemoglobínu) a v druhej 33 zo 415 novorodencov (6,5–45,5 % methemoglobínu) v priebehu 8-mesačnej skriningovej doby) methemoglobín pozitívni. Prospektívna klinická štúdia ukázala, že nezrelosť, ťažká choroba, doba vystavenia PCA a nízke koncentrácie NADH reduktázy, pravdepodobne prispeli k rozvoju stavu.

Z platných výsledkov testov dostupných z toxického pôsobenia PCA na rôzne vodné organizmy vyplýva, že PCA možno klasifikovať ako stredne až vysoko toxický vo vodnom prostredí. V dlhodobých nemeckých štúdiách so sladkovodnými organizmami sa napríklad zistilo, že najnižšia koncentrácia bez pozorovateľného účinku (perloočka veľká, 21 dní – 0,01 mg/liter), bola 10krát vyššia než maximálne hladiny stanovené v rieke Rýn a jej prítokoch v priebehu rokov 1980 a 1990.

Odhad vystavenia spotrebiteľa účinkom PCA prostredníctvom viacerých možných ciest vedie k súhrnnej dennej dávke 300 ng/kg telesnej váhy, s predpokladom iba 1% penetrácie cez odev. S ohľadom na non-neoplastické účinky (t.j. methemoglobinémiu) sú tieto prípadné expozície ľudí, v rámci rádovej hodnoty vypočítaného znesiteľného denného príjmu, 2 µg/kg telesnej váhy na deň. Kritická náhodná expozícia voči vysokým koncentráciám PCA môže byť smrteľná (4).

Vznik PCA pri endodontickej terapii devitálnych zubov

Medikamenty, ktoré sa používajú v rámci endodontickej terapie, či už vo forme výplachu alebo liečivej vložky, sú v literatúre jednotlivo dobre popísané. Ich vzájomným kombináciám sa venuje málo štúdií, a výsledky nie sú dost' zrozumiteľné, dokonca sú niekedy protichodné.

Všetky kombinácie CHX s už spomínanými medikamentmi – Ca(OH)₂, NaOCl, EDTA, spôsobujú tvorbu zrazenín rôznej farby, ktorých antimikrobiálny účinok voči patogénom prítomným v koreňovom kanáliku sa mení. Pri kombinácii CHX + EDTA vzniká zrazenina bielej farby, pri CHX + NaOCl zrazenina červenohnedej farby.

Väčšina publikovaných štúdií sa v rámci kombinácie uvedených látok venuje zvýšeniu či zníženiu antimikrobiálnych účinkov vznikajúcich zrazenín. Najviac preskúmanou kombináciou je NaOCl a EDTA. Ich spojením nastáva inaktivácia NaOCl a EDTA zostáva funkčnou len niekoľko minút. Protichodné závery uvádza literatúra pri kombinácii CHX + Ca(OH)₂. Jedna zo štúdií uvádza, že ich vzájomná kombinácia spôsobuje zníženie antimikrobiálnej účinnosti, potrebnej pre mikrobiálnu inaktiváciu najčas-

tejších pôvodcov zlyhania endodontickej terapie *Enterococcus faecalis* a *Candida albicans* (1). Iné štúdie uvádzajú, že ich spojenie spôsobuje zvýšenie antimikrobiálneho účinku (5, 9). Podobné rozporuplné informácie sa uvádzajú aj pri kombinácii CHX + NaOCl (3).

Z literatúry je známa skutočnosť, že samotný CHX vo vodnom roztoku pomaly hydrolyzuje a vytvára PCA. Barbin zistil v 0,2% vodnom roztoku CHX už po 14 dňoch detegovateľnú hladinu PCA (2). Proces samovoľného rozkladu CHX na PCA nastáva prostredníctvom substitúcie guanidínovej skupiny v molekule CHX.

Keď sa CHX zmieša s NaOCl, molekuly CHX sa môžu hydrolýzou rozkladať na menšie fragmenty. Každý fragment tvorí vedľajší produkt, ktorý môže mať za následok vznik PCA a ďalších zlúčenín. Vznik zrazeniny možno vysvetliť acidobázickou reakciou medzi NaOCl a CHX. Chlórhexidín je látka schopná poskytnúť dva vodíkové protóny (pH 5,5–6,0). NaOCl je zásaditý a môže prijať protóny z CHX. Táto výmena protónov má za následok vznik neutrálnej a nerozpustnej zrazeniny, ktorá obsahuje PCA a môže ho uvoľniť. Pri kombinácii CHX + NaOCl je vznik PCA v pozitívnej korelácii s koncentráciou NaOCl (10).

Pokiaľ ide o kombináciu CHX + Ca(OH)₂, výsledky nedávnych výskumov dokazujú, že CHX uvoľňuje pri ich spojení PCA. Naproti tomu Barbin vo svojej štúdii uvádza, že po vytvorení zmesi CHX + Ca(OH)₂, sa PCA nedokázal vo vzorkách, ktoré sa odobrali ihneď po namiešaní, a ani po 7 a 14 dňoch. Odôvodňuje to tým, že vzniknutá zrazenina spôsobuje okamžitú totálnu degradáciu CHX (2).

Relatívne málo sa vie o interakcii CHX + EDTA. Rasimick vo svojej štúdii uvádza, že CHX sa za normálnych okolností nedegraduje pomocou EDTA. Predpokladá však, že až pri použití citlivejších metód bude možné s istotou tvrdiť, že ich kombináciou nevzniká PCA (8).

Záver

Väčšina štúdií v literatúre hodnotí interakcie medikamentov používaných v endodontickej terapii s perspektívou zvýšenia ich účinnosti. Je známe, že reakciou chlórhexidínu s hydroxidom vápenatým, hypochloritom sodným a etyléndiamíntetraoctovou kyselinou vznikajú zrazeniny rôznej farby, ktoré môžu obsahovať karcinogénny para-chlóranylín.

V rámci endodontickej terapie nie je možné vyhnúť sa situáciám, pri ktorých prebiehajú reakcie jednotlivých zlúčenín a vznikajú zrazeniny. O možných vedľajších účinkoch vznikajúcich zrazenín sa veľa nevie. V literatúre sa štúdie a výskumné práce zaoberajú skôr zmenami antimikrobiálneho účinku chlórhexidínu po pridaní ďalšej látky. Preto je namieste zistiť, či by v podmienkach zubnej ambulancie a pri bežnom stomatologickom ošetrovaní devitálnych zubov mohol vzniknúť PCA ako vedľajší produkt degradácie CHX, a či môže ohroziť zdravie pacienta. Týka sa to aj iných zlúčenín s obsahom chlórhexidínu, s ktorými môžu pacienti bežne prísť do kontaktu, ako napr. ústne vody.

V rámci endodontickej terapie devitálnych zubov sa zatiaľ javí ako najrozumnejšie riešenie minimalizácie tvorby zrazeniny a z nej vychádzajúcej tvorby PCA vyplachovať pred použitím CHX zvyšky NaOCl a Ca(OH)₂ v koreňových kanálikoch fyziologickým roztokom alebo EDTA.

LITERATÚRA

1. Ballal V, Kundabala M, Acharya S, Ballal M. Antimicrobial action of calcium hydroxide, chlorhexidine and their combination on endodontic pathogens. Aust Dent J. 2007 Jun;52(2):118-21.
2. Barbin LE, Saquy PC, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Determination of para-chloroaniline and reactive oxygen species in chlorhexidine and chlorhexidine associated with calcium hydroxide. J Endod. 2008 Dec;34(12):1508-14.
3. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. J Endod. 2007 Aug;33(8):966-9.
4. Boehncke A, Kielhorn J, Könnecker G, Pohlenz-Michel C, Mangelsdorf I. 4-chloroaniline. Concise international chemical assessment document 48. Geneva: World Health Organization; 2003.
5. Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Papanakou SI, Tzanetakis GN. Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing ability of permanent root canal filling: a 6-month follow-up. J Endod. 2008 Jul;34(7):866-70.
6. Kováč J, Kováč D. Problematika bakteriálnej infekcie v endodoncii. Stomatológ. 2008;18(3):26-31.
7. Lin S, Zuckerman O, Weiss EI, Mazor Y, Fuss Z. Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. J Endod. 2003 Jun;29(6):416-8.
8. Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS. Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. J Endod. 2008 Dec;34(12):1521-3.
9. Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rôças IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. J Endod. 2007 May;33(5):541-7.
10. Vianna ME, Gomes BP. Efficacy of sodium hypochlorite combined with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* in vitro. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009 Apr;107(4):585-9.
11. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. J Endod. 1997 Apr;23(4):229-31.
12. White RR, Janer LR, Hays GL. Residual antimicrobial activity associated with a chlorhexidine endodontic irrigation used with sodium hypochlorite. Am J Dent. 1999 Jun;12(3):148-50.

Došlo do redakcie: 19. 1. 2010

Prijato k tisku: 4. 2. 2010

MUDr. Ján Kováč

Zochova 25

900 01 Modra

Slovenská republika

E-mail: mudr.jan.kovac@gmail.com