

Η αντιμικροβιακή δράση του υποχλωριώδους νατρίου ως συνάρτηση της συγκέντρωσής του.

Z. ΨΗΜΜΑ¹, Ε. ΤΣΑΛΙΓΟΠΟΥΛΟΥ¹
Οδοντιατρική Σχολή του Α.Π.Θ.

Antimicrobial efficacy of sodium hypochlorite as a function of concentration.

Z. PSIMMA¹, E. TSALIGOPOULOU¹
Dental School, Aristotle University of Thessaloniki.

Περίληψη

Τα υγρά διακλυσμού έχουν πρωτεύοντα ρόλο κατά τη διάρκεια μιας ενδοδοντικής θεραπείας, διότι συμβάλλουν στη μείωση του μικροβιακού φορτίου των ριζικών σωλήνων και στη χημικομηχανική επεξεργασία γενικά. Μεταξύ των υγρών διακλυσμού επικρατέστερο είναι το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) που χρησιμοποιείται σε ποικίλες συγκεντρώσεις (0,5-5,25%).

Σκοπός αυτής της βιβλιογραφικής ανασκόπησης είναι να διερευνήσει την επίδραση της συγκέντρωσης του NaOCl στην αντιμικροβιακή του δράση. Στις περισσότερες μελέτες δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση διαλυμάτων 0,5%-5,25%. Επιπρόσθετοι παράγοντες που καθορίζουν τη ιδανική συγκέντρωση του NaOCl για ενδοδοντική χρήση είναι η τοξικότητα και η διαλυτική ικανότητα του διαλύματος. Υψηλές συγκεντρώσεις παρουσιάζουν σημαντική τοξικότητα για τους περιακρορριζικούς ιστούς σε περίπτωση διαφυγής του υγρού από το ριζικό σωλήνα. Χαμηλές συγκεντρώσεις έχουν μικρότερη διαλυτική ικανότητα, η οποία όμως μπορεί να βελτιωθεί με την αύξηση της θερμοκρασίας του διαλύματος, τη συχνή ανανέωσή του και την αύξηση του χρόνου παραμονής εντός των ριζικών σωλήνων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αντιμικροβιακή δράση, συγκέντρωση, υποχλωριώδες νάτριο.

Summary

Elimination of bacteria and their products from the root canal system is an essential part of root canal treatment and highly critical for successful outcome. Irrigation of the root canal with antibacterial solutions contributes to this goal. Several irrigating solutions have been suggested in the literature. The most frequently used is sodium hypochlorite at various concentrations, ranging from 0,5%-5,25%. Sodium hypochlorite has been widely recommended as an irrigant because of its unique solvent activity for both necrotic and vital tissue and its ability to act against most of the microbial species consisting the endodontic flora. The aim of this review paper is to compare the antibacterial effects of sodium hypochlorite in different concentrations.

Concentration of the free available chlorine is the factor determining the antimicrobial properties of the solution and usually differs from the salt concentration reported by the manufacturer. Sodium hypochlorite is also vulnerable to rapid deterioration due to the effect of storing conditions. It appears that chlorination and oxidation reactions are mostly responsible for the antimicrobial action.

There is no consensus regarding the ideal concentration in respect to the antimicrobial action. Higher concentrations appear to be highly toxic for the periapical tissues in case of accidental extrusion. Sodium hypochlorite in low concentrations might not dissolve all pulpal remnants. It is suggested that frequent irrigation with copious amounts of a weaker sodium hypochlorite solution may be sufficient to eliminate a significant number of bacteria. Furthermore, the dissolving capacity of sodium hypochlorite may be improved when used at body temperature.

KEY WORDS: Antimicrobial action, concentration, sodium hypochlorite.

Εισαγωγή

Η μικροβιακή μόλυνση του ριζικού σωλήνα αποτελεί αντικείμενο έρευνας στην ενδοδοντία, καθώς ο επιτυχής περιορισμός της μικροβιακής χλωρίδας και των προϊόντων της επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την πρόγνωση μιας ενδοδοντικής θεραπείας. Η χλωρίδα του ριζικού σωλήνα σε ενδοδοντικές λοιμώξεις είναι κατά κανόνα πολυμικροβιακή και κατά μέσο όρο ανευρίσκονται 3-12 διαφορετικά είδη μικροβίων, σχετιζόμενα συχνά με περιακρορριζικές αλλοιώσεις¹. Η πυκνότητα των σχηματιζόμενων αποικιών κυμαίνεται από 102-108 βακτηριακά κύτταρα ανά mg περιεχομένου του σωλήνα², ενώ μεταξύ των διαφόρων ειδών συγκαταλέγονται σταφυλόκοκκοι, πεπτοστρεπτόκοκκοι, λακτοβάκιλλοι και εντερόκοκκοι³, όπως ο *E. faecalis*, ένα ιδιαίτερα ανθεκτικό μικρόβιο⁴, που ανευρίσκεται συχνά σε ενδοδοντικά θεραπευμένα δόντια με εμμένουσα ακρορριζική περιοδοντίτιδα⁵.

Κατά τη μηχανική προπαρασκευή του ριζικού σωλήνα ένα ποσοστό 35-53% του τοιχώματος παραμένει μη προπαρασκευασμένο⁶. Για το λόγο αυτό ο διακλυσμός των ριζικών σωλήνων με αντιμικροβιακά διαλύματα αποτελεί αναπόσπαστο τμήμα της χημικομηχανικής προπαρασκευής, καθότι στοχεύει, κυρίως, στην περαιτέρω ελάττωση του μικροβιακού φορτίου² προσεγγίζοντας τα τμήματα του ριζικού σωλήνα που παραμένουν μη-προπαρασκευασμένα⁷. Μεταξύ των υγρών διακλυσμού που χρησιμοποιούνται στην ενδοδοντία, κυρίαρχη θέση κατέχει το διάλυμα NaOCl. Εντούτοις, η ιδανική συγκέντρωση του διαλύματος αποτελεί σημείο διαφωνίας των ερευνητών^{8,9}.

Σκοπός αυτής της εργασίας είναι να διερευνήσει τη διαθέσιμη βιβλιογραφία σχετικά με την επίδραση της συγκέντρωσης του NaOCl στην αντιμικροβιακή του δράση.

Ιδιότητες του διαλύματος NaOCl

Η ευρεία αποδοχή την οποία απολαμβάνει το διάλυμα NaOCl στη ενδοδοντία οφείλεται στο συνδυασμό εξαιρετικά ευνοϊκών ιδιοτήτων. Το NaOCl διαλύει τα πολφικά υπολείμματα¹⁰, ιδιότητα που δε διαθέτει κανένα από τα υπόλοιπα υγρά διακλυσμών που χρησιμοποιούνται σήμερα¹¹. Η διαλυτική ικανότητα του NaOCl διαφοροποιείται μεταξύ ζωντανού και νεκρού πολφού, καθώς οι χαμηλές συγκεντρώσεις αδυνατούν να διαλύσουν υπολείμματα ζωντανού πολφού¹², ενώ η δράση τους σε νεκρό πολφό είναι ικανοποιητική¹³. Το διάλυμα NaOCl εμφανίζει ακόμη ισχυρή αντιμικροβιακή δράση, ενώ δρα και ως λιπαντικό, διευκολύνοντας τη μηχανική προπαρασκευή¹⁴.

Το NaOCl σε συγκέντρωση 5% παρουσιάζει υψηλή τοξικότητα. Επιπλέον, διαλύει τόσο νεκρούς όσο και ζωντανούς ιστούς γρήγορα και ανεξέλεγκτα με πιθανότητα πρόκλησης επιπλοκών στους περιακρορριζικούς

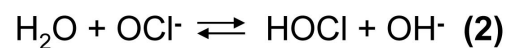
ιστούς σε περίπτωση εξόδου κατά τη διάρκεια της χημικομηχανικής επεξεργασίας¹⁵⁻¹⁸. Η συγκέντρωση 0,5% φαίνεται να έχει το πλεονέκτημα ότι διαλύει νεκρούς μόνο ιστούς, με αποτέλεσμα η ερεθιστική δράση στους περιακρορριζικούς ιστούς να περιορίζεται σημαντικά, ενώ οι αντιμικροβιακές ιδιότητες διατηρούνται¹⁹. Ο ρόλος του υποχλωριώδους νατρίου στην αφαίρεση του ρυπαρού επιχρίσματος (smear layer) θεωρείται ασθενής²⁰.

Συγκέντρωση των διαλυμάτων NaOCl

Το NaOCl μέσα σε υδατικό διάλυμα υφίσταται σχεδόν πλήρη διάσπαση ως άλας (αντίδραση 1, Πιν. Ι)²¹. Μέρος των υποχλωριωδών ιόντων αντιδρούν με το νερό δημιουργώντας το ασθενές υποχλωριώδες οξύ (αντίδραση 2, Πιν. Ι). Η σταθερά διάστασης pKa του HOCl είναι 7,6. Αυτό σημαίνει ότι στο υψηλό pH των μη ρυθμισμένων διαλυμάτων NaOCl (~12) που χρησιμοποιούνται, συνήθως, το ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο υφίσταται, κυρίως, με τη μορφή του OCl⁻²².

ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Χημικές αντιδράσεις του NaOCl σε υδατικά διαλύματα.



Το OCl⁻ αποσυντίθεται υπό την επίδραση φωτός (αντίδραση 3, Πιν. Ι). Το άτομο οξυγόνου που παράγεται μπορεί είτε να αντιδράσει με ένα ίδιο άτομο δημιουργώντας μοριακό οξυγόνο (αντίδραση 4, Πιν. Ι) είτε να αντιδράσει με ένα υποχλωριώδες ιόν προς σχηματισμό χλωριώδους και στη συνέχεια χλωρικού ιόντος (αντίδραση 5, Πιν. Ι)^{21,23,25}. Τα αντίστοιχα οξέα έχουν σταδιακά αυξανόμενη ισχύ, για το λόγο αυτό καθώς προχωρά η αποσύνθεση του OCl⁻, το pH του διαλύματος μειώνεται^{21,25}. Τα ιόντα χλωρίου που δημιουργούνται τελικά οδηγούν στο σχηματισμό χλωριούχου νατρίου το οποίο είναι το πρώτο από τα άλατα που παράγονται και κρυσταλλώνεται ως ίζημα κατά την αποσύνθεση του NaOCl, διότι είναι το πιο δυσδιάλυτο^{26,27}. Ορισμένοι κατασκευαστές προσθέτουν επιπλέον NaCl στο διάλυμα με σκοπό να παρεμποδίσουν την αποσύνθεση του NaOCl²³.

Τα εμπορικά διαθέσιμα σκευάσματα NaOCl ποικίλουν σε συγκέντρωση από 0,5 – 5,25%²³. Οι συγκεντρώσεις αυτές αναφέρονται σε μάζα NaOCl (gr) ανά 100 mL διαλύματος (wt/vol) και αντιπροσωπεύουν την αρχική μάζα NaOCl που βρισκόταν στο διάλυμα αμέσως μετά τη διαδικασία παραγωγής του. Εντούτοις, λόγω της αστάθειας του διαλύματος και της σταδιακής αποδόμησής του με την πάροδο του χρόνου^{23,25} είναι πιθανόν η αρχική συγκέντρωση που αναγράφεται στην συσκευασία να μην αντιπροσωπεύει την πραγματικά διαθέσιμη ποσότητα NaOCl.

Με σκοπό την εξακρίβωση της πραγματικά διαθέσιμης ποσότητας, η συγκέντρωση των διαλυμάτων προσδιορίζεται, στα πλαίσια μελετών, με μεθόδους τιτλοποίησης αμέσως πριν τη χρήση^{22,24}. Όμως και σε αυτή την περίπτωση ο όρος «ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο» που χρησιμοποιείται είναι παραπλανητικός, καθώς, κατά τη διάρκεια της τιτλοποίησης, το pH του διαλύματος ελαττώνεται σημαντικά, αλλαγή που οδηγεί στην απελευθέρωση του συνόλου του διαθέσιμου χλωρίου του συστήματος²⁸.

Ο όρος «διαθέσιμο χλώριο» χαρακτηρίζει μια ποικιλία χημικών ενώσεων, οι οποίες, όταν διαλυθούν σε νερό, οδηγούν στο σχηματισμό υποχλωριώδους οξέος (HOCl). Το «διαθέσιμο χλώριο» μπορεί να διαχωριστεί περαιτέρω σε δύο κατηγορίες:

- Το «ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο» (Free Available Chlorine, FAC) και
- Το «δεσμευμένο διαθέσιμο χλώριο» (Combined Available Chlorine, CAC).

Το «ελεύθερο διαθέσιμο χλώριο» περιγράφει το οξειδωτικό δυναμικό που μπορεί να αποδοθεί στο χλώριο που βρίσκεται στο διάλυμα ως HOCl, OCl⁻ ή σε πολύ όξινα διαλύματα ως Cl₂. Αντίθετα, το «δεσμευμένο διαθέσιμο χλώριο» βρίσκεται σε ενώσεις όπως ανόργανες (NH₂Cl, NHCl₂) ή οργανικές (RNHCl, όπου R= αλκύλιο) χλωραμίνες και υπόκειται σε μικρού βαθμού υδρόλυση σε υδατικά διαλύματα, οδηγώντας στη δημιουργία ελάχιστου HOCl, ενώ το υπόλοιπο χλώριο παραμένει δεσμευμένο. Στην ίδια κατηγορία περιλαμβάνονται τα ιόντα ClO₂⁻ και ClO₃⁻, τα οποία δεν οδηγούν στη δημιουργία HOCl. Το «ενεργό χλώριο» που προσδιορίζεται με μεθόδους τιτλοποίησης περιλαμβάνει το σύνολο του ελεύθερου και του δεσμευμένου διαθέσιμου χλωρίου²⁹, το οποίο όμως δεν είναι εξ ολοκλήρου διαθέσιμο κατά την κλινική χρήση του διαλύματος, καθώς το pH παραμένει βασικό²².

Σταθερότητα διαλύματος NaOCl

Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη δραστηριότητα του NaOCl είναι η σταθερότητα του διαλύματος. Το διάλυμα NaOCl είναι εγγενώς ασταθές²⁵. Η αποσύνθεση ενός διαλύματος NaOCl, όπως και κάθε χημική αντίδραση, επηρεάζεται καθοριστικά από τη θερμοκρασία. Αύξηση της θερμοκρασίας από 4°C σε

24°C οδηγεί σε ταχύτερη αδρανοποίηση του διαλύματος και η επίδραση αυτή είναι σαφώς ισχυρότερη σε πυκνά διαλύματα (5%)²⁵.

Η αδρανοποίηση του διαλύματος επιταχύνεται επίσης με τη μείωση του pH³⁰. Η αποσύνθεση του NaOCl εξελίσσεται ταχύτατα όταν το pH μεταβληθεί από 11 σε 7²⁹. Γενικά προτείνεται το pH να είναι >9³⁰, ενώ οι κατασκευαστές ρυθμίζουν το pH τουλάχιστον ίσο με 11²³.

Επιπλέον, η επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύματος είναι εξίσου σημαντική. Τα αραιά διαλύματα φαίνεται να είναι περισσότερο σταθερά²⁵, αντίθετα με την επικρατούσα άποψη, αν και η διαφορά αυτή δεν παρατηρείται όταν τα διαλύματα διατηρούνται σε θερμοκρασία 4°C²⁵. Έτσι, η πρακτική της διατήρησης του διαλύματος σε πυκνή μορφή και η καθημερινή αραιώση για την παραγωγή «φρέσκου» διαλύματος δεν τεκμηριώνεται. Αντίθετα, προτείνεται η άμεση αραιώση του εμπορικά διαθέσιμου πυκνού διαλύματος στη συγκέντρωση που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί²³.

Η παρουσία φωτός, καταλυτών, οργανικού υλικού και ατμοσφαιρικού CO₂^{23,25} επιταχύνει την αδρανοποίηση του διαλύματος. Συστήνεται η αποθήκευση του διαλύματος σε δοχεία με αδιαφανή τοιχώματα μέσα σε σκιερό χώρο²³.

Η σταθερότητα των διαλυμάτων NaOCl μειώνεται ακόμη με την παρουσία μεταλλικών ιόντων²⁸, τα οποία αντιδρούν με το διάλυμα. Για το λόγο αυτό είναι αναγκαίο να μη φυλάσσεται το διάλυμα σε μεταλλικά δοχεία²³.

Μηχανισμός αντιμικροβιακής δράσης

Τόσο η διαλυτική ικανότητα^{22,31} όσο και η αντιμικροβιακή δράση του διαλύματος NaOCl^{11,32} σχετίζονται άμεσα με το ποσό του ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου (OCl⁻/HOCl). Μεταξύ των δύο μορφών, το υποχλωριώδες οξύ εμφανίζει ισχυρότερη οξειδωτική^{21,33} και αντιμικροβιακή δράση³². Βέβαια, στα συνήθη διαλύματα, λόγω του υψηλού pH, η μορφή του υποχλωριώδους ιόντος επικρατεί^{22,32}.

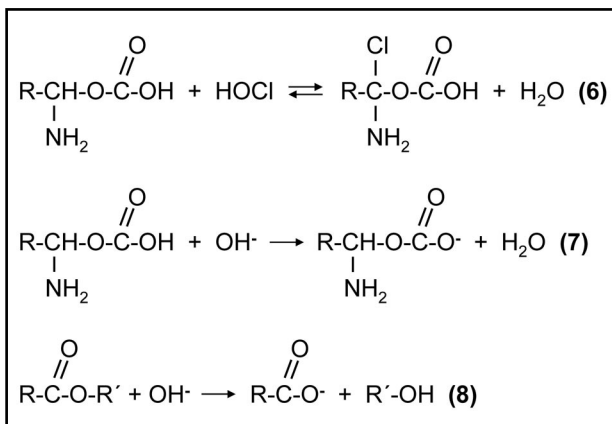
Το διαθέσιμο χλώριο επεμβαίνει στο βακτηριακό μεταβολισμό προκαλώντας μετουσίωση ενζύμων και άλλων πρωτεϊνών³⁴. Οι πρωτεΐνες υφίστανται χλωρίωση, αλλά και οξειδωση υπό την επίδραση υποχλωριώδους νατρίου. Σε αλκαλικά διαλύματα, όπως αυτά που χρησιμοποιούνται κλινικά, η οξειδωση επικρατεί, επηρεάζεται όμως από το pH²⁴. Μη αντιστρεπτή οξειδωση των σουλφυδρικών ομάδων (-SH) των αμινοξέων οδηγεί σε ταχεία καταστροφή μεγάλου αριθμού μικροβίων³⁴. Η επίδραση του διαθέσιμου χλωρίου οδηγεί επίσης στο σχηματισμό χλωραμινών, λόγω της αντικατάστασης ατόμων H των αμινοξέων και άλλων αζωτούχων ενώσεων από Cl (αντίδραση 6, Πιν. II)³⁴. Οι χλωραμίνες εμφανίζουν κάποια αντιμικροβιακή δράση³⁴.

Υποστηρίζεται ότι σημαντικό ρόλο στην αντιμικρο-

βιακή δράση του NaOCl διαδραματίζουν αντιδράσεις εξουδετέρωσης μεταξύ αμινοξέων και OH⁻ (αντίδραση 7, Πιν. II), όπως και αντιδράσεις σαπωνοποίησης μεταξύ εστέρων και OH⁻ (αντίδραση 8, Πιν. II)³⁴. Αντιδράσεις αυτού του τύπου επηρεάζονται καθοριστικά από το pH του διαλύματος. Εφόσον όμως έχει δειχθεί ότι ελάττωση του pH από 11 σε 9 δεν επηρεάζει την αντιμικροβιακή δράση του διαλύματος²², οι αντιδράσεις αυτές είναι πιθανώς δευτερεύουσας σημασίας.

ΠΙΝΑΚΑΣ II

Χημικές αντιδράσεις κατά την επίδραση του NaOCl σε οργανικά μόρια.



Συγκέντρωση και αντιμικροβιακή δράση του NaOCl

Δεν υπάρχει ομοφωνία ως προς την ιδανική συγκέντρωση του NaOCl για χρήση ως υγρό διακλυσμού στην ενδοδοντία. Οι προτεινόμενες συγκεντρώσεις ποικίλουν από 0,5–5,25%. Στη βιβλιογραφία ξεχωρίζουν δύο τάσεις ως προς την προτεινόμενη συγκέντρωση.

Υποστηρίζεται ότι δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά στην αντιμικροβιακή δράση συγκεντρώσεων που κυμαίνονται μεταξύ 1–5,25% σε μολυσμένους ριζικούς σωληνες³⁵. Προτείνονται χαμηλές

συγκεντρώσεις NaOCl (0,5%)³⁶, καθότι διαπιστώθηκε παρόμοια μείωση του μικροβιακού φορτίου σε δόντια στα οποία χρησιμοποιήθηκε NaOCl σε συγκεντρώσεις μεταξύ 0,5-5%^{11,37}. Επιπλέον, οι Estrela και συν. σε πειραματική μελέτη συμπεραίνουν ότι σε ίσα χρονικά διαστήματα (5, 10, 15, 20, 30 min) συγκεντρώσεις NaOCl που ποικίλουν μεταξύ 0,5–5% εμφανίζουν εξίσου αποτελεσματική αντιμικροβιακή δράση³⁴.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις δεν προτείνονται επίσης για χρήση, διότι έχουν υψηλή τοξικότητα¹⁹, όταν διαφεύγουν προς τους περιακρορριζικούς ιστούς κατά τη διάρκεια των διακλυσμών¹⁵. Επιπλέον, υποστηρίζεται ότι επιδρούν αρνητικά στις μηχανικές ιδιότητες της οδοντίνης (μέτρο ελαστικότητας, όριο θραύσης) σε αντίθεση με χαμηλές συγκεντρώσεις³⁸.

Σε αντίθεση με τα ανωτέρω έρχονται μελέτες που υποστηρίζουν ότι η αντιμικροβιακή δράση του NaOCl 5,25% είναι σημαντικά μεγαλύτερη του διαλύματος 0,5%, ιδίως, όταν οι συγκεντρώσεις συγκρίνονται σε μικρή διάρκεια παραμονής των υγρών στο ριζικό σωλήνα^{39–41}. Διαφορά εντοπίζεται ως προς τον ελάχιστο χρόνο που απαιτείται για το μέγιστο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα, ο οποίος στη συγκέντρωση 5,25% είναι σημαντικά μικρότερος από ότι στη συγκέντρωση 0,5%^{40–43}. Ιδιαίτερα ανθεκτικά μικρόβια, όπως τα *E.faecalis*, *S.aureus* και *C.albicans*, που ανευρίσκονται συχνά σε αποτυχημένες ενδοδοντικές θεραπείες⁴⁴, απαιτούν μεγαλύτερης διάρκειας επαφή για την καταστροφή τους όταν χρησιμοποιούνται χαμηλές συγκεντρώσεις (Πιν. III, IV). Επίσης, η αποτελεσματικότητα των συγκεντρώσεων 0,5–5,25% φαίνεται να διαφοροποιείται σε βαθύτερα στρώματα των οδοντοσωληναρίων, όπου οι υψηλότερες συγκεντρώσεις παρουσιάζουν μεγαλύτερη μείωση των μικροβιακών στελεχών που έχουν διεισδύσει στα οδοντοσωληνάρια⁸. Στο ίδιο συμπέρασμα καταλήγουν και οι Berber και συν. οι οποίοι διαπίστωσαν ότι τα πυκνά διαλύματα NaOCl (5%) παρουσιάζουν πολύ καλύτερο αντιμικροβιακό αποτέλεσμα σε οδοντοσωληνάρια μολυσμένα με *E.faecalis* συγκρινόμενα με αραιά διαλύματα NaOCl⁸.

ΠΙΝΑΚΑΣ III

Απαιτούμενος χρόνος επαφής με NaOCl και χλωρεξιδίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις για να προκύψει 100% αρνητική καλλιέργεια για τους υπό εξέταση μικροοργανισμούς⁴¹.

	Συγκέντρωση	<i>E.faecalis</i>	<i>S.aureus</i>	<i>C.albicans</i>
NaOCl	0,50%	30 m	30 m	30 m
	1,00%	20 m	20 m	20 m
	2,50%	10 m	10 m	10 m
	4,00%	5 m	5 m	5 m
	5,25%	15 s	15 s	15 s
χλωρεξιδίνη (διάλυμα)	0,20%	30 s	15 s	15 s
	1,00%	15 s	15 s	15 s
	2,00%	15 s	15 s	15 s

ΠΙΝΑΚΑΣ IV

Αντιμικροβιακή δράση διαλυμάτων NaOCl εναντίον του *E.faecalis* εκφραζόμενη σε ποσοστά επιβίωσης⁴³.

Χρόνος επαφής (min)	0,5% NaOCl	1% NaOCl	2,5% NaOCl	5,25% NaOCl
0	100*	100	100	100
0,5	83	53	35	21
1	62	35	21	5
2	50	25	3	0
5	33	10	0	0
10	13	0	0	0
30	0	0	0	0

* 100% ανταποκρίνεται σε 4,90X10⁹ CFU/ml.

Η αντιμικροβιακή δράση του NaOCl μελετήθηκε και όσον αφορά τους λιποπολυσακχαρίτες ή ενδοτοξίνες των Gram- μικροβίων (LPS). Τα Gram- μικρόβια, τα οποία εμφανίζονται συχνά σε δόντια με χρόνια ακρορριζική περιοδοντίτιδα⁴⁵⁻⁴⁷, περιέχουν λιποπολυσακχαρίτες στο κυτταρικό τους τοίχωμα, που απελευθερώνονται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού ή της καταστροφής τους και διεγείρουν τα μακροφάγα, τα οποία απελευθερώνουν κυτοκίνες⁴⁸⁻⁵⁰ που συμβάλλουν στην έναρξη και διατήρηση της φλεγμονής, καθώς και στην οστική απορρόφηση⁵¹⁻⁵³. Οι μέχρι τώρα έρευνες δείχνουν ότι ακόμη και πυκνά διαλύματα NaOCl αδυνατούν να αδρανοποιήσουν τους μικροβιακούς λιποπολυσακχαρίτες και να μειώσουν την προκαλούμενη από αυτούς φλεγμονή⁵⁴.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα μεταξύ μελετών αντανακλούν συχνά διαφορές στη μεθοδολογία, στα εξεταζόμενα μικροβιακά στελέχη, στην ποσότητα και τη διάρκεια του ενοφθαλμισμού, στο χρόνο και τις συνθήκες επώασης, καθώς και στα χρησιμοποιούμενα θρεπτικά υλικά⁵⁵. Η αξιολόγηση της αντιμικροβιακής δράσης του NaOCl μέσω ex vivo και in vitro μελετών παρουσιάζει εγγενείς περιορισμούς. Συχνά αγνοείται η περίπλοκη μορφολογία του ριζικού σωλήνα, η πολυμικροβιακή φύση της ενδοδοντικής χλωρίδας και η οργάνωση ορισμένων μικροβίων σε βιοϋμένια (biofilms)⁵⁶. Ως βιοϋμένιο περιγράφεται μια συνάθροιση μικροβίων που βρίσκονται καθηλωμένα σε μια επιφάνεια και περιβάλλονται από μια εξωκυττάρια μήτρα από πολυσακχαρίτες⁵⁷. Τα μικρόβια των βιοϋμένων διαφέρουν ουσιαστικά συγκρινόμενα με τα αντίστοιχα σε πλακτωνική μορφή, αλλά και με τα μικρόβια που διατηρούνται σε καλλιέργειες⁵⁷. Επιπλέον, η δομή των βιοϋμένων περιορίζει τη διάχυση των αντιμικροβιακών ουσιών, παρεμποδίζοντας την επαφή με τα μικρόβια⁴³. Ένας επιπρόσθετος παράγοντας που επηρεάζει τη δράση του NaOCl στο περιβάλλον του ριζικού σωλήνα είναι η αλληλεπίδραση με τα συστατικά του αίματος,

των οδοντικών ιστών και με οργανικά υπολείμματα⁴³. Συνεπώς, τα αποτελέσματα αυτών των μελετών πρέπει να ερμηνεύονται λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς τους¹⁰.

Τοξικότητα NaOCl – κλινικές περιπτώσεις

Οι τοξικές επιδράσεις του διαλύματος NaOCl όταν έρχεται σε επαφή με ζωντανούς ιστούς συνίστανται σε αιμόλυση, ελκώσεις του δέρματος και εκτεταμένες νεκρώσεις ιστών⁵⁸. Η έξοδος μικρών ποσοτήτων NaOCl στους περιακρορριζικούς ιστούς θεωρείται ότι συμβαίνει συχνά κατά τη διάρκεια της χημικομηχανικής προπαρασκευής των ριζικών σωλήνων και οδηγεί σε λιγότερο ή περισσότερο έντονες κλινικές εκδηλώσεις¹⁵. Πολλές μελέτες υποστηρίζουν ότι τα διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης (5-5,25%) προκαλούν εκτεταμένες νεκρωτικές βλάβες όταν εξέρχονται από το ακρορριζικό τρήμα προς τους περιακρορριζικούς ιστούς¹⁶. Το σύμβαμα αυτό προκαλείται πιο συχνά σε δόντια με αδιάπλαστο τρήμα ή όταν η δομή αυτού έχει καταστραφεί είτε κατά τη διάρκεια της χημικομηχανικής προπαρασκευής είτε λόγω εξωτερικής απορρόφησης της ρίζας. Επίσης, κατά την άσκηση υπέρμετρης πίεσης κατά τη διάρκεια των διακλυσμών ή και λόγω απόφραξης του στομίου του ριζικού σωλήνα από τη βελόνα διακλυσμού, όποτε δεν είναι δυνατή η έξοδος του υγρού από το μυλικό στόμιο⁵⁹.

Οι βλάβες των ιστών εξαρτώνται γενικά από την ιδιοσυγκρασία του οργανισμού, την πυκνότητα του υποχλωριώδους νατρίου και την ποσότητα του διαλύματος που διαχέεται στους ιστούς¹⁵. Τα γενικά συμπτώματα που αναφέρονται κατά την έξοδο του NaOCl στους περιακρορριζικούς ιστούς είναι έντονος πόνος που εμφανίζεται άμεσα, άμεσο αίσθημα καύσου, αιμορραγία από το στόμιο του ριζικού σωλήνα, οίδημα, αιμάτωμα και εκχυμώσεις στους παρακείμενους της έγχυσης ιστούς¹⁵⁻¹⁸.

Βελτίωση της αντιμικροβιακής δράσης του NaOCl

Τα μικρόβια μπορεί να βρεθούν σε ποικίλα βάθη των οδοντινοσωληναρίων, (μέγιστο 300 - 1100 μm από το πολφικό άκρο)⁶⁰⁻⁶³. Σε αυτό το περιβάλλον βρίσκονται προστατευμένα από τη μηχανική προπαρασκευή και την επίδραση του NaOCl. Επιπλέον, το ρυπαρό επίχρισμα που δημιουργείται κατά τη διάρκεια της προπαρασκευής και το οποίο δεν αφαιρείται από το NaOCl, αποτελεί επιπλέον προστατευτικό παράγοντα των μικροβίων^{64,65}, διότι εμποδίζει το ελεύθερο χλώριο να έρθει σε επαφή με αυτά⁶⁵⁻⁶⁷.

Υποστηρίζεται ότι ο συνδυασμός NaOCl και EDTA 15-17% (αιθυλενο-διαίμινο-τετραοξικό οξύ) είναι περισσότερο αποτελεσματικός για την απολύμανση των ριζικών σωλήνων, συγκριτικά με τη μεμονωμένη χρήση του NaOCl³⁶, καθώς το EDTA αφαιρεί αποτελεσματικά το ρυπαρό επίχρισμα^{68,69}, ιδιότητα στην οποία υστερεί το NaOCl^{69,70}. Μ' αυτόν τον τρόπο μεταβάλλει την επιφάνεια του ριζικού σωλήνα, ώστε το NaOCl να δράσει πιο εύκολα ενάντια σε μικρόβια που βρίσκονται στο εσωτερικό των οδοντινοσωληναρίων, αν και η δράση αυτή περιορίζεται σε βάθος περίπου 130 μm, ακόμα και μετά την αφαίρεση του ρυπαρού επίχρισματος⁶⁵⁻⁶⁷. Βέβαια, σύμφωνα με νεότερες έρευνες το EDTA μειώνει σημαντικά το ποσοστό του ελεύθερου χλωρίου του διαλύματος⁷¹. Για το λόγο αυτό συνιστώνται μεγάλες ποσότητες NaOCl, μετά τη χρήση του EDTA, για απομάκρυνση των υπολειμμάτων του⁷².

Προτείνεται, ακόμη, η συνδυασμένη χρήση NaOCl και χλωρεξιδίνης 2%. Η χλωρεξιδίνη έχει αντιμικροβιακή δράση παρόμοια με αυτή του NaOCl 5,25%, χαμηλή τοξικότητα και χρησιμοποιείται για να ενισχύσει την αντιμικροβιακή του δράση, καθώς θεωρείται ότι δρα συνεργικά με το NaOCl⁶⁸.

Η αύξηση της θερμοκρασίας αραιών διαλυμάτων NaOCl βελτιώνει τη διαλυτική ικανότητα του διαλύματος, προσεγγίζοντας, έτσι, τα επίπεδα αποτελεσματικότητας πυκνών συγκεντρώσεων σε θερμοκρασία περιβάλλοντος⁹, ενώ αυξάνει και την αντιμικροβιακή δράση⁹. Τα διαλύματα NaOCl με υψηλή θερμοκρασία αποκτούν γρήγορα τη θερμοκρασία του ιστού⁷³ με αποτέλεσμα να μην επηρεάζονται άμεσα οι περιακρορριζικοί ιστοί, σε περίπτωση διαφυγής του υγρού προς τους περιακρορριζικούς ιστούς. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τη χαμηλή συγκέντρωση των διαλυμάτων, τα καθιστά λιγότερο τοξικά σε σύγκριση με τα διαλύματα αυξημένης πυκνότητας¹⁹. Εντούτοις, δεν υπάρχουν κλινικές έρευνες που να τεκμηριώνουν τη χρήση θερμών διαλυμάτων NaOCl στην κλινική πράξη¹⁰.

Μία εναλλακτική προσέγγιση για τη βελτίωση των ιδιοτήτων των χαμηλών συγκεντρώσεων είναι η αύξηση της ποσότητας και της συχνότητας των διακλυσμών, με την οποία η συγκέντρωση του ελεύθερου χλωρίου διατηρείται σταθερά σε υψηλό επίπεδο, αυξάνοντας τη διαλυτική και αντιμικροβιακή δράση των αραιών διαλυ-

μάτων³⁵. Κατά αυτόν τον τρόπο νέες ποσότητες NaOCl φθάνουν συνεχώς στο ριζικό σωλήνα, με συνέπεια η συγκέντρωση να μην παίζει καθοριστικό ρόλο στην αποτελεσματικότητά του ως υγρό διακλυσμού⁷⁴.

Η ελάττωση του pH με σκοπό την αλλαγή της αναλογίας $\text{OCl}^- / \text{HOCl}$ προς όφελος του πιο δραστικού HOCl δε φαίνεται να μεταβάλλει σημαντικά την αντιμικροβιακή δράση του διαλύματος, καθότι οι επιφερόμενες μεταβολές του pH είναι μικρές. Η ρύθμιση του pH θα μπορούσε να είναι αποτελεσματική, μόνο, εάν οδηγούσε σε ελαφρώς όξινο διάλυμα²².

Συμπεράσματα

Δεν υπάρχει ομόφωνη άποψη όσον αφορά την ιδανική συγκέντρωση του NaOCl για χρήση ως υγρό διακλυσμού κατά τη χημικομηχανική επεξεργασία των ριζικών σωλήνων. Η ιδανική συγκέντρωση πρέπει να αποτελεί συμβιβασμό ανάμεσα στην αντιμικροβιακή δράση και την τοξικότητα. Η υψηλή τοξικότητα των πυκνών διαλυμάτων (>2,25% και ιδιαίτερα στη συγκέντρωση 5,25%)¹⁹ εγκυμονεί κινδύνους σε περιπτώσεις εξόδου του υγρού προς τους περιακρορριζικούς ιστούς¹⁵, με συνέπειες που περιλαμβάνουν επίπονες και εκτεταμένες νεκρωτικές βλάβες στην περιοχή εξόδου¹⁶. Οι χαμηλές συγκεντρώσεις (0,5%-1%) παρουσιάζουν μειωμένη δραστηριότητα, λόγω ταχείας δέσμευσης μεγάλου ποσοστού του ελεύθερου διαθέσιμου χλωρίου από τις πρωτεΐνες των οργανικών υπολειμμάτων του πολφού³⁵. Συνολικά, όμως, φαίνεται να πλεονεκτούν λόγω μειωμένης τοξικότητας. Για τη βελτίωση της δραστηριότητας των διαλυμάτων προτείνεται καταρχήν προσεκτική αποθήκευση, ώστε να επιβραδύνεται η αδρανοποίηση, αύξηση της συχνότητας των διακλυσμών και της ποσότητας του υγρού, και βέβαια συνδυασμένη χρήση με άλλα υγρά, όπως το EDTA και η χλωρεξιδίνη.

Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά τον κ. Θ. Λαμπριανίδη, καθηγητή του Εργαστηρίου Ενδοδοντολογίας της Οδοντιατρικής Σχολής Α.Π.Θ., για την πολύτιμη καθοδήγησή του στη συγγραφή αυτής της εργασίας.

Βιβλιογραφία

1. Sjögren U, Frigdor D, Persson S, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991; 24:119-25.
2. Baumgartner C, Hutter J. *Endodontic Microbiology and Treatment of Infections*. In: Cohen S, Burns R. *Pathways of the pulp*. 8th ed. St Louis: Mosby. 2002:503.
3. Sundqvist G. Taxonomy, ecology and pathogenicity of the root canal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1994; 78:522-30.
4. Engstrom B. The significance of enterococci in root canal treatment. *Odontol Revy* 1964; 15:87-105.
5. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjogren U. Microbi-

- ologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1998; 85:86-93.
6. Peters OA, Laib A, Ghöhring TN, Barbakow F. Changes in root canal geometry after preparation assessed by high resolution computed tomography. *J Endod* 2001a; 27:1-6.
 7. Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endodontic Topics* 2005; 10:103-22.
 8. Berber VB, Gomes BPF, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CCR, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int End J* 2006; 39:10-17.
 9. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M. The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005; 31:669-71.
 10. Hand RE, Smith ML, Harrison JW. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. *J Endod* 1978; 4:60-64.
 11. Zehnder M. Root canal irrigants. *J Endod* 2006; 32:389-98.
 12. Trepagnier CM, Madden RM, Lazzari EP. Quantitative study of sodium hypochlorite as an in vitro endodontic irrigant. *J Endod* 1977; 3:104-6.
 13. Austin JH, Taylor HD. Behavior of hypochlorite and of chloramine-vivo. *J Exp Med* 1918; 27:627-33.
 14. Barbakow F, Lutz F, Toth L. Materials and technics in root canal treatments in Switzerland- a determination of their status. *Schweitz Monatsschr Zahnmed* 1995; 105:1265-71.
 15. Lambrianidis TP: Risk management in root canal treatment; Thessaloniki: University Studio Press, 2001: 163-73.
 16. Gatot A, Arbelle J, Leiberman A, Yanai-Inbar I. Effects of sodium hypochlorite on soft tissues after its inadvertent injection beyond the root apex. *J Endod* 1991; 17:58-62.
 17. Gemhardt CR, Eppendorf K, Kozlowski A, Brandt M. Toxicity of concentrated sodium hypochlorite used as an endodontic irrigant. *Int J Endod* 2004; 37: 272-80.
 18. Sabala GL, Powell SE. Sodium hypochlorite injection into periapical tissues. *J Endod* 1989; 15: 490-492.
 19. Spangberg L, Engstrom B, Langeland K. Biologic effects of dental materials. 3. Toxicity and antimicrobial effect of endodontic antiseptics in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1973; 36:856-70.
 20. Baumgartner JC, Cuenin PR. Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *J Endod* 1992; 18:605-12.
 21. Μανουσάκης ΓΕ. Χημεία ιατρικών επιστημών. Θεσσαλονίκη: Αφοι Κυριακίδη, 1995, 155-76, 325-30.
 22. Zehnder M, Kosicki D, Luder H, Serer B, Waltimo T. Tissue-dissolving capacity and antibacterial effect of buffered and unbuffered hypochlorite solutions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2002; 94:756-62.
 23. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J* 1998; 43:250-6.
 24. Baker RWR. Studies on the reaction between sodium hypochlorite and proteins: 1. Physico-chemical study of the course of the reaction. *Biochem* 1947; 41:337-42.
 25. Piskin B, Türkün M. Stability of various sodium hypochlorite solutions. *J Endod* 1995; 21:253-55.
 26. Lide DR. CRC Handbook of Chemistry and Physics, 85th edn. Boca Raton: CRC Press, 2005: 4.84-85 (<http://www.hbcpnetbase.com>).
 27. Weast RC. Handbook of chemistry and physics, 51st edn. Ohio: Chemical Rubber Co, 1971: B-137.
 28. Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod* 2004; 30:785-7.
 29. Saad B, Wai WT, Ali ASM, Saleh MI. Sequential flow injection determination of chlorine species using a triiodide-selective electrode detector. *Analytical Sciences* 2006; 22:45-50.
 30. Dychdala GR. Chlorine and chlorine compounds. In: Block SS, ed. Disinfection, sterilization and preservation. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983; 157-82.
 31. Grawher M, Sener B, Waltimo T, Zehnder M. Interactions of ethylenediamine tetraacetic acid with sodium hypochlorite in aqueous solutions. *Int Endod J* 2003; 36:411-7.
 32. Bloomfield SF, Miles GA. The antibacterial properties of sodium dichloroisocyanurate and sodium hypochlorite formulations. *J Appl Bacteriol* 1979; 46:65-73.
 33. Παπαπαναγιώτου ΙΚ. Ιατρική μικροβιολογία και ανοσοβιολογία. Τόμος Α. Θεσσαλονίκη: Παρατηρητής, 1999, 80-1.
 34. Estrela C, Estrela CRA, Barbin EL, Spanfi JCE, Marcesan MA, Pecora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazil Dent J* 2002; 13:113-7.
 35. Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A, Lima KC. Chemico-mechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 26:331-4.
 36. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 1985; 18:35-40.
 37. Cveck M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal debridement in teeth with immature root. A clinical and biologic study. *Odontol Revy* 1976; 27:1-10.
 38. Sim TP, Knowles JC, Ng YL, Shelton J, Gulabivala K. Effect of sodium hypochlorite on mechanical properties of dentine and tooth surface strain. *Int End J* 2001; 34:120-32.
 39. Senia ES, Marraro RV, Mitchell JL, Lewis AG, Thomas L. Rapid sterilization of gutta-percha with 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 1975; 1:136-40.
 40. Gomes BPF, Ferraz CCR, Vianna ME, Berber VB, Teixeira FB, Souza -Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2001; 34: 424-8.
 41. Vianna M, Gomes BPF, Berber V, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2004;

- 97:79-84.
42. Sassone LM, Fidel L, Fidel S, Vieira M, Hirata JrR. The influence of organic load on the antimicrobial activity of different concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine in vitro. *Int Endod J* 2003; 36:848-53.
 43. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37:438-46.
 44. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int End J* 1996; 29:69-75.
 45. Sundqvist G. Bacterial studies of necrotic pulps. Odontological Dissertation no 7 Uema, Sweden 1976.
 46. Assed S, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin D. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol* 1996; 12:66-8.
 47. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J* 1998; 31:39-47.
 48. McGee JOD, Isaacson PG, Wright NA. Oxford textbook of pathology. Principles of Pathology. Oxford University Press 1992; 895.
 49. Barthel CR, Levin LG, Reisner HM, Trope M. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J* 1997; 30:155-9.
 50. Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Ptakada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod* 1999; 25:795-9.
 51. Dwyer TG, Torabinejan M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. *J Endod* 1981; 7:31-5.
 52. Pitts DL, Williams BL, Morton TH, Jr. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod* 1982; 8:10-5.
 53. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scientific American* 1992; 267:26-32.
 54. Buck RA, Cai J, Elazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. *J Endod* 2001; 27:325-27.
 55. Siqueira JF, Batista MMD, Fraga RCF, De Uzeda M. Antibacterial effects of endodontic irrigants on black-pigmented, Gram-negative anaerobes and facultative bacteria. *J Endod* 1998; 24:414-6.
 56. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K. An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int End J* 2001; 34:300-7.
 57. Wilson M. Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases. *Int End J* 1994; 44:181-9.
 58. Pashley CJ, McLundie AC. Apical penetration by root canal irrigant: a case report. *Int J Endod* 1989; 22: 197-199.
 59. Hülsmann M, Hahn W. Complications during root canal irrigation- literature review and case reports. *Int J Endod* 2000; 33: 186-193.
 60. Horiba N, Mackawa Y, Matsumoto T, Nakamura H. A study of the distribution of endotoxin in the dentinal wall of infected root canals. *J Endod* 1990; 16:331-4.
 61. Kouchi Y, Ninomiya J, Yasuda H, Fukui K, Moriyama T, Okamoto H. Location of *Streptococcus mutans* in the dentinal tubules of open infected root canals. *J Dent Res* 1980; 59:2038-46.
 62. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987; 66:1375-9.
 63. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11:6-9.
 64. Wayman BE, Kopp WM, Pinero GJ, Lazzari EP. Citric and lactic acids as root canal irrigants in vitro. *J Endod* 1979; 5:258-60.
 65. Baker NA, Eleazer PD, Averbach RE, Seltzer S. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J Endod* 1975; 1:127-35.
 66. Vahdaty A, Pitt Ford TR, Wilson RF. Efficacy of chlorhexidine in disinfecting dentinal tubules in vitro. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9:243-8.
 67. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997; 23:725-7.
 68. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994; 20:276-8.
 69. Yamada RS, Armas A, Goldman M, Lin PS. A scanning electron microscopic comparison of a high volume final flush with several irrigating solutions. Part 3. *J Endod* 1983; 9:137-42.
 70. Liolios E, Economides N, Parissis-Messimeris S, Boutsioukis A. The effectiveness of three irrigating solutions on root canal cleaning after hand and mechanical preparation. *Int End J* 1997;30:51-57.
 71. Baumgartner JC and Ibay AC. The chemical reactions of irrigants used for root canal debridement. *J Endod* 1987; 13:47-51.
 72. Zehnder M, Schmidlin P, Sener B, Waltimo T. Chelation in root canal therapy reconsidered. *J Endod* 2005; 31:817-20.
 73. Cunnigham WT, Balekjian AY. Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 1980; 49:175-7.
 74. Moorer WR, Wesselink PR. Factors promoting the tissue dissolving capability of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 1982; 15:187-96.