

ผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ ค่าพีเอชที่แตกต่างกัน
ต่อแผ่นชีวภาพของเชื้อ *Enterococcus faecalis*
ชาเรรัตน์ จิตต์ตรง^๑ พิรยา สุรพิพงษ์พันธ์^{๑*} และ วิสาขะ ลิ้มวงศ์^๒

The effects of different pH of 2.5% sodium hypochlorite
on *Enterococcus faecalis* biofilms
Chareerat Jittrong^๑, Peraya Surapipongpuntr^{๑*} and Visaka Limwongse^๒

^๑ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^๒ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

^{*}Restorative Department, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok Province.

^๒Oral biology Department, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Phitsanulok Province.

*Corresponding Author. E-mail address: perayap@nu.ac.th

Received 30 April 2013; accepted 12 July 2013

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อประเมินผลของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอชที่แตกต่างกันต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้น นำชิ้นเนื้อฟันตัวอย่าง (n=140) ที่เตรียมจากรากฟันส่วนที่ติดกับคอฟันของฟันกรามน้อยของมนุษย์มาสร้างแผ่นชีวภาพของเชื้อ *E. faecalis* จำนวน 130 ชิ้น ยกเว้นในกลุ่มควบคุมลบ (n=10) สุ่มชิ้นเนื้อฟันตัวอย่างที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแผ่นชีวภาพเชื้อโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอช 12 พีเอช 9 และพีเอช 4.5 (n=30 ต่อกลุ่ม) ยกเว้นในกลุ่มควบคุมบวก (n=10) จากนั้นนำชิ้นเนื้อฟันตัวอย่างมาประเมินผลการเจริญของเชื้อจากการสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสังเกตการปรากฏของแผ่นชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้น ณ พีเอช 12 พีเอช 9 และพีเอช 7 มีแนวโน้มลดลงตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และ ณ พีเอช 4.5 ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบการทำลายการยึดเกาะของเชื้อบนแผ่นเนื้อฟัน มีแนวโน้มลดลงเมื่อค่าพีเอชลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) ยกเว้นกลุ่มที่มีพีเอช 7 กับ พีเอช 4.5 ($p > 0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการปรับลดค่าพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นและไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายการยึดเกาะของเชื้อ *E. faecalis* กับผิวเนื้อฟัน

คำสำคัญ: โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ค่าพีเอช *Enterococcus faecalis* แผ่นชีวภาพ

Abstract

The purpose of this study was to determine the effect of different pH values of 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl) on artificial *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) biofilm. Dentin specimens (n=140) were prepared from the coronal one-third of the root from extracted premolar teeth. *E. faecalis* biofilm was simulated on 130 specimens, except in the negative control group (n=10). The specimens with *E. faecalis* biofilm were randomly assigned to immerse in 2.5% NaOCl at pH 12, pH 9, pH 7, and pH 4.5 (n=30 for each group), except in the positive control group (n=10). Bacterial growth was determined by observing the turbidity of culture media. The presence of artificial biofilm was observed under a scanning electron microscope (SEM). The growth inhibition of artificial *E. faecalis* biofilm at pH 12, pH 9 and pH 7 had potential to decrease respectively, but the difference was not significant ($p > 0.05$). At pH 4.5 did not inhibit bacterial growth. SEM results showed the significant decrease in biofilm removal capacity when pH was lowered ($p \leq 0.05$), except between the pH 7 and pH 4.5 groups ($p > 0.05$). These results indicated that lowering the pH values of 2.5% NaOCl solution did not increase bacterial growth inhibition and biofilm removal capacity of artificial *E. faecalis* biofilm.

Keywords: Sodium hypochlorite, pH value, *Enterococcus faecalis*, biofilm

บทนำ

เชื้อแบคทีเรีย คือสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อของเนื้อเยื่อใน (pulp) ซึ่งส่งผลทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อใน และลุกลามทำให้เกิดพยาธิสภาพที่ปลายรากฟันได้ (Kakehashi et al., 1965) สำหรับกรณีที่มีการรักษารากฟันล้มเหลว จะพบอุบัติการณ์ของเชื้อ *E. faecalis* มาก

ที่สุด (Pinheiro et al., 2003) ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการอาศัย และเจริญเติบโตตามลำพัง (monoinfection) ภายในคลองรากฟัน โดยไม่ต้องพึ่งพาแบคทีเรียชนิดอื่น (Siren et al., 1997) สามารถปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่จำกัดได้ดี (Sundqvist & Figdor, 2003) ยึดเกาะและแทรกซึมเข้าโพรงที่อยู่ภายในหลอดเลือดในเนื้อฟัน (Peters et al., 2000; Love, 2001) มีความสามารถในการต้าน

ต้านทานต่อยาแคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Evans et al., 2002) และอีกความสามารถหนึ่งที่สำคัญ คือ การสร้างแผ่นชีวภาพ (biofilm) ในคลองรากฟัน (Distel et al., 2002) ซึ่งโครงสร้างของแผ่นชีวภาพจะต้านทานต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เป็นอันตรายรวมทั้งสารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) และมีความสามารถในการก่อโรคได้มากกว่าเชื้อที่ลอยลอยอิสระ (planktonic state) 2 ถึง 1,000 เท่า (Johnson et al., 2002 as cited in Svensäter & Bergenholtz, 2004)

การรักษาคลองรากฟันมีวัตถุประสงค์หลัก คือ การกำจัดเชื้อแบคทีเรียภายในคลองรากฟัน และป้องกันการติดเชื้อซ้ำ ซึ่งขั้นตอนการล้างและทำความสะอาดคลองรากฟันเป็นขั้นตอนสำคัญในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียด้วยการใช้เครื่องมือชุดตัดผนังคลองรากฟันที่ติดเชื่อออกร่วมกับการใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันที่มีฤทธิ์ต้านต่อแบคทีเรีย โดยเฉพาะในคลองรากฟันที่มีความซับซ้อน เช่น บริเวณที่เป็นส่วนคอด (isthmus) หรือบริเวณส่วนปลายคลองรากฟันที่แตกแขนง (apical delta) ที่ไม่สามารถใส่เครื่องมือเข้าไปทำความสะอาดได้ ดังนั้น การใช้น้ำยาล้างคลองรากฟันร่วมด้วยในขณะทำความสะอาดคลองรากฟันจึงเข้ามามีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียออกจากคลองรากฟัน

น้ำยาล้างคลองรากฟันมีให้เลือกใช้หลายชนิด ซึ่งแต่ละชนิดมีคุณสมบัติในการกำจัดเชื้อแบคทีเรีย การสลายเนื้อเยื่อ (tissue dissolution) ซ่อติ และข้อเสียที่แตกต่างกัน ปัจจุบันน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite; NaOCl) ได้รับความนิยมใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันตัวหลักมากที่สุด เนื่องจากมีคุณสมบัติต้านจุลชีพแบบกว้าง (broad antimicrobial action) ร่วมกับมีความสามารถในการสลายเนื้อเยื่อ ซึ่งประสิทธิภาพของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการต้านจุลชีพในคลองรากฟันนั้น ขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ปริมาณ ความเข้มข้น ระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อ และอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญและผู้วิจัยมีความสนใจ คือ ค่าพีเอช (pH) เมื่อค่าพีเอชที่มีค่าประมาณ 11-12 ของสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ลดลง จะส่งผลให้ปฏิกิริยาการแตกตัวได้กรดไฮโปคลอรัสสูงขึ้น (hypochlorous acid, HOCl) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพให้สูงขึ้นถึง 80 เท่า (Morris, 1966 as cited in Christensen et al., 2008)

ความเข้มข้นของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ใช้ในปัจจุบัน คือ ระหว่างร้อยละ 0.5 ถึง ร้อยละ 5.25 โดยยังไม่มียกข้อสรุปที่ชัดเจนถึงความเข้มข้นที่เฉพาะเจาะจงในการใช้น้ำยาชนิดนี้ล้างคลองรากฟัน มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านจุลชีพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 5.25 และร้อยละ 2.5 พบว่าให้ผลในการทำละลายเชื้อไม่แตกต่างกันเมื่อสัมผัสน้ำยานาน 2 นาที (Harrison & Hand, 1981) และจากการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการสลายเนื้อเยื่อของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์พบว่าความเข้มข้นร้อยละ 5.25 และร้อยละ 2.5 ไม่มีความแตกต่างกัน (Baumgartner & Cuenin, 1992) เมื่อพิจารณาในเรื่องประสิทธิภาพในการ

ต้านจุลชีพและการสลายเนื้อเยื่อของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ก็น่าจะมีประสิทธิภาพเพียงพอ อีกทั้งยังมีความเป็นพิษน้อยกว่า อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาน้อยมากที่ศึกษาประสิทธิภาพ การต้านจุลชีพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ต่อแบคทีเรียที่อยู่ในแผ่นชีวภาพที่เกิดขึ้นในคลองรากฟันและผลของการปรับลดค่าพีเอชเพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการต้านจุลชีพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ ค่าพีเอชต่าง ๆ ต่อแผ่นชีวภาพในเนื้อฟันเพื่อนำข้อมูลดังกล่าวไปพัฒนาปรับปรุงการรักษาผู้ป่วยต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมฟัน

นำฟันกรามน้อยแท้ของมนุษย์ที่ถูกถอนเพื่อการจัดฟัน จำนวน 70 ซี่ มีจำนวนราก 1 ราก การเจริญของรากฟันปกติ และสมบูรณ์ ปราศจากรอยผุ วัสดุอุด รอยร้าว รอยแตก การละลายของรากฟัน แขนงฟันที่ภายหลังการถอนในสารละลายไทโมลความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาทำการทดลองทันที โดยกรอตัดส่วนตัวฟันออกที่ระดับคอฟันในแนวระนาบให้เหลือแต่ส่วนรากฟัน โดยใช้แผ่นกลมกากเพชร (Diamond disk, Carborundam, Carbodent-Gysi, Buenos Aires, Argentina) จากนั้นตัดรากฟันส่วนที่ติดคอฟัน (coronal part) ให้มีความสูง 3 มิลลิเมตร และแบ่งส่วนรากฟันในแนวตั้ง ด้านใกล้กลาง-ไกลกลาง ออกเป็น 2 ชั้น ภายหลังจากการแบ่งฟันจะได้ชั้นฟันทั้งหมด 140 ชั้น โดยชั้นฟันที่ได้ทั้งหมดจะนำมาวัดขนาดพื้นที่ของคลองรากฟัน และวัดขนาดพื้นที่เนื้อฟันด้านข้างคลองรากฟัน ชั้นฟันที่ใช้ในการวิจัย ครั้งนี้กำหนดให้มีขนาดพื้นที่ของคลองรากฟันเท่ากับ 5 ± 0.5 ตารางมิลลิเมตร และขนาดพื้นที่เนื้อฟันด้านข้างคลองรากฟันเท่ากับ 10.5 ± 0.5 ตารางมิลลิเมตร จากนั้นนำชั้นฟันไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Sturdy รุ่น SA-252F, Sturdy Industrial, Taipei, Taiwan) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที สุ่มแบ่งชั้นฟันเป็นกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม (n=30) กลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม (n=10)

การเตรียมเชื้อ *E. faecalis*

นำเชื้อ *E. faecalis* (ATCC 29212) มาเพาะเลี้ยงบนอาหารทริปติกซอย (tryptic soy agar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในตูบเลี้ยงเชื้อ (Incubator, Shellab รุ่น 1535-2E, Shalson Manufacturing, Cornelius, USA) จากนั้นนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารเหลวทริปติกซอย (tryptic soy broth) ปริมาตร 5 มิลลิตร แล้วนำไปบ่มข้ามคืนจนกระทั่งมีความขุ่นเชื้อเทียบเท่าความขุ่นของสารละลายมาตรฐานแมคฟาร์แลนด์ หมายเลข 0.5 (McFarland's standard No. 0.5) โดยวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer, Genesys

G 10-s, Thermo electron, Wisconsin, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 540 นาโนเมตร ซึ่งเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตประมาณ 1.5×10^8 CFUต่อมิลลิลิตร

การสร้างแผ่นชีวภาพ และการแบ่งกลุ่มทดลอง

นำชิ้นพื้นในกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม กลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ วางในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 24 หลุม (24 well plate) เติมหาอาหารเหลวทริปติกชอย ปริมาตร 350 ไมโครลิตร เติมน้ำเชื้อ *E. faecalis* ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 75 ไมโครลิตร เฉพาะในกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุมบวก จากนั้นนำชิ้นพื้นไปเก็บไว้ในตู้บเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุก ๆ 2 วัน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อครบ 7 วัน ทำการดูดสารละลายออกแล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (phosphate buffer saline; PBS) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะกับพื้นผิวออกไป

นำชิ้นพื้นในกลุ่มทดลองที่ผ่านการเพาะเลี้ยงแผ่นชีวภาพแช่ในน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ที่มีระดับพีเอชที่แตกต่างกัน ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระยะเวลา 15 นาที ดังนี้ กลุ่ม 1 พีเอช 12 กลุ่ม 2 พีเอช 9 กลุ่ม 3 พีเอช 7 และกลุ่ม 4 พีเอช 4.5 ซึ่งเตรียมปรับค่าพีเอชโดยใช้กรดอะซิติก (acetic acid) ความเข้มข้นร้อยละ 99.5 วัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter, Thermo Orion รุ่น 960 Thermo Electron, MA, USA) จากนั้นนำพื้นในกลุ่มทดลองทั้งหมดมาแช่ในโซเดียมไธโอซัลเฟต (sodium thiosulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ระยะเวลา 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของโซเดียมไฮโปคลอไรต์

การเพาะเลี้ยงเชื้อ

สุ่มเลือกพื้นจากทุกกลุ่มมาอย่างละครั้งไปเพาะเชื้อโดยนำไปใส่ในขวดแก้วบรรจุอาหารเหลวทริปติกชอย นำไปเพาะไว้ในตู้บเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง บันทึกผลเพาะเชื้อบวก หรือลบ เพื่อตรวจสอบความมีชีวิตของเชื้อ *E. faecalis* ในชิ้นพื้น

การเตรียมชิ้นพื้น และสังเกตดูแผ่นชีวภาพในเนื้อพื้นผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

นำชิ้นพื้นที่เหลืออีกครึ่งหนึ่งในแต่ละกลุ่มไปทำการคงสภาพด้วยกลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่ 4 องศาเซลเซียส แล้วล้างออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลินความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ทำการดึงน้ำออกจากพื้นตัวอย่างด้วยการแช่ชิ้นพื้นตัวอย่างในเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70, 80, 95 ครั้งละ 10 นาที และความเข้มข้นร้อยละ 100 ครั้งละ 20 นาที 3 ครั้ง ตามลำดับ ทำชิ้นพื้นให้แห้งด้วยเครื่องทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point dryer, Polaron CPD 7501, Quorum Technologies, East Sussex, UK) ตัดชิ้นพื้นตัวอย่างบนแท่นสำหรับตัดตัวอย่าง (Stub, G301F, Agar scientific, Stansted, UK) และพ่นทับด้วยทอง (Gold coating) ด้วยเครื่องฉาบทอง (Putter coater module, Spi 12155-Ax, Structure Probe, PA, USA) นำไปตรวจลักษณะการ

ปรากฏของแผ่นชีวภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope; SEM, Leo1455VP, Karl Zeiss, Cambridge, UK) ที่กำลังขยาย 2000 เท่า โดยพิจารณาพื้นที่ในคลองรากฟันทั้งหมด โดยกำหนดเกณฑ์การให้คะแนนเป็น 3 ระดับ คือ (1) แผ่นชีวภาพสมบูรณ์ไม่ถูกทำลาย (intact) (2) แผ่นชีวภาพถูกทำลายบางส่วน (disrupt) หรือ (3) แผ่นชีวภาพถูกทำลายทั้งหมด (absent) และบันทึกภาพ

ผลการศึกษา

ผลจากการเพาะเลี้ยงเชื้อของชิ้นพื้นภายหลังแช่น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ แสดงในตาราง 1 จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การทดสอบครัสคัล-วอลล์ (Kruskal-Wallis test) พบว่าน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอชที่แตกต่างกันมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพต่อแผ่นชีวภาพของเชื้อ *E. faecalis* ในเนื้อพื้นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 โดยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 12 มีประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ *E. faecalis* ได้มากที่สุด และลดลงตามลำดับ คือ พีเอช 9 พีเอช 7 และพีเอช 4.5 เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยสถิติการทดสอบฟิชเชอร์ (Fisher's Exact test) พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีพีเอช 12 กับ พีเอช 4.5 พีเอช 9 กับ พีเอช 4.5 และพีเอช 7 กับพีเอช 4.5

ลักษณะของแผ่นชีวภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดที่พบในแต่ละกลุ่มแสดงในตาราง 2 เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้การทดสอบครัสคัล-วอลล์ พบว่าน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอชที่แตกต่างกันมีผลต่อการทำลายแผ่นชีวภาพ ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ .05 โดยน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 12 มีความสามารถทำลายแผ่นชีวภาพอย่างสมบูรณ์ (absent) ได้มากที่สุด และลดลงตามด้วยพีเอช 9 ส่วน ณ พีเอช 7 และพีเอช 4.5 ไม่สามารถทำลายแผ่นชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มโดยใช้สถิติการทดสอบฟิชเชอร์ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มที่มีค่าพีเอชที่แตกต่างกันยกเว้น พีเอช 7 กับพีเอช 4.5 ตัวอย่างภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของพื้นผิวเนื้อพื้นภายหลังการสัมผัสกับน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ระดับพีเอชต่าง ๆ แสดงในรูปที่ 1

ในกลุ่มควบคุมบวกได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. faecalis* บนชิ้นพื้นพบมีการเจริญของเชื้อจากการตรวจสอบโดยการเพาะเชื้อและพบการสร้างแผ่นชีวภาพจากการดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในกลุ่มควบคุมลบไม่ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *E. faecalis* บนชิ้นพื้นพบว่าไม่มีการเจริญของเชื้อบนชิ้นพื้นทั้งจากการเพาะเชื้อและดูผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ซึ่งแสดงว่าการเพาะเชื้อในการทดลองมีความบริสุทธิ์ไม่มีการปนเปื้อนจากเชื้อภายนอกในระหว่างทำการทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงผลการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นในเนื้อฟันจากการสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ภายหลังแช่น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอชต่างๆ

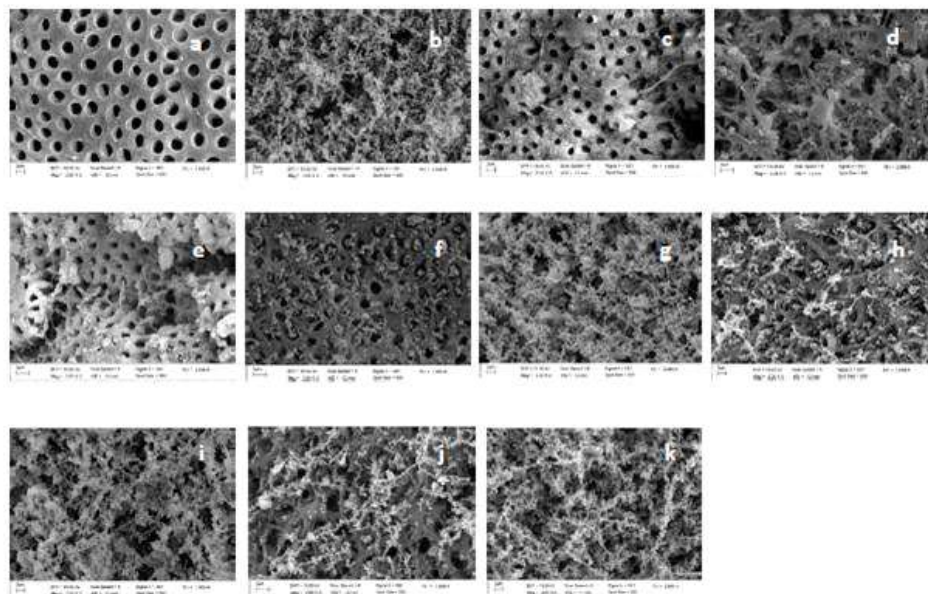
Group 2.5% NaOCl	Sample, n	Positive culture n (%)	Negative culture n (%)
pH 12 ^a	15	5(33.33%)	10(66.67%)
pH 9 ^a	15	8(53.33%)	7(46.67%)
pH 7 ^a	15	9(60%)	6(40%)
pH 4.5 ^b	15	15(100%)	0
positive control	5	5(100%)	0
negative control	5	0	5(100%)

อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ตารางที่ 2 แสดงการปรากฏของแผ่นชีวภาพของเชื้อ *E. faecalis* ภายหลังแช่น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอชต่างๆ

Group 2.5% NaOCl	Sample, n	Intact n (%)	Disrupted n (%)	Absent n (%)
pH 12 ^a	15	0	5(33.33%)	10(66.67%)
pH 9 ^b	15	2(13.33%)	10(66.67%)	3(20%)
pH 7 ^c	15	8(53.33%)	7(46.67%)	0
pH 4.5 ^c	15	9(60%)	6(40%)	0
positive control	5	5(100%)	0	0
negative control	5	0	0	5(100%)

อักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05



รูปที่ 1 ตัวอย่างภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ณ กำลังขยาย 2000 เท่า แสดงพื้นผิวเนื้อฟันในกลุ่มควบคุมลบ ไม่พบการเจริญของเชื้อบนชิ้นฟัน (a); กลุ่มควบคุมบวก พบมีการเจริญของแผ่นชีวภาพบนชิ้นฟันแบบสมบูรณ์ (intact) (b); กลุ่มน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 12 พบแผ่นชีวภาพ ถูกทำลายทั้งหมด (absent) (c) และแผ่นชีวภาพถูกทำลายบางส่วน (disrupt) (d); กลุ่มน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 9 พบแผ่นชีวภาพถูกทำลายทั้งหมด (e) แผ่นชีวภาพถูกทำลายบางส่วน (f) และแผ่นชีวภาพสมบูรณ์ไม่ถูกทำลาย (g); กลุ่มน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 7 พบแผ่นชีวภาพถูกทำลายบางส่วน (h) และแผ่นชีวภาพสมบูรณ์ไม่ถูกทำลาย (i); กลุ่มน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ พีเอช 4.5 พบแผ่นชีวภาพถูกทำลายบางส่วน (j) และแผ่นชีวภาพสมบูรณ์ไม่ถูกทำลาย (k)

อภิปรายผลการศึกษา

จากผลการศึกษาพบว่าน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ ค่าพีเอชต่างๆ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างในเนื้อฟันแตกต่างกัน โดยพบว่าเมื่อค่าพีเอชลดลง ณ พีเอช 9 และ พีเอช 7 ประสิทธิภาพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพในเนื้อฟันก็มีแนวโน้มลดลงตามไปด้วย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน ณ พีเอช 4.5 ไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ ซึ่งอาจเนื่องมาจากความสัมพันธ์ระหว่างกรดไฮโปคลอรัสที่ลดลง และแก๊สคลอรีน (Cl₂) ที่เพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ลดลงเหลือ 4 และ 5 (Fair et al., 1948 as cited in Rossi-Fedele et al., 2011) เนื่องจากแก๊สคลอรีนเป็นสารที่ไม่เสถียรเพราะมีคุณสมบัติในการระเหย (Len et al., 2000) จากผลการศึกษาจึงแนะนำว่าการปรับลดค่าพีเอชไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Mercade และคณะ ที่พบว่าการลดระดับค่าพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 4.2 มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการต้านจุลชีพต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่เพาะเลี้ยงในคลองรากฟัน โดยมีนัยสำคัญที่พีเอช 6.5 (Mercade et al., 2009) ความแตกต่างของผลการศึกษาที่เกิดขึ้นคาดว่าเกิดจากสภาวะของเชื้อที่นำมาศึกษา เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ได้สร้างสภาวะให้เกิดเป็นแผ่นชีวภาพเป็นระยะเวลา 7 วัน คล้ายกับการศึกษาของ Clegg และคณะ (Clegg et al., 2006) ในขณะที่การศึกษาของ Mercade และคณะใช้เวลาในทำให้เกิดการเชื่อมแบคทีเรียในคลองรากเพียง 48 ชั่วโมง ซึ่งระยะเวลาในการสร้างแผ่นชีวภาพเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความหนาของแผ่นชีวภาพ (Distel et al., 2002) ซึ่งอาจมีผลต่อประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้ได้ประเมินผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นจากการเพาะเชื้อโดยดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งอาจไม่เพียงพอที่จะประเมินความมีชีวิตของเชื้อทั้งหมดที่อยู่ในแผ่นชีวภาพ เนื่องจากเมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นอาจหลุดลอกกลายเป็นเชื้อที่ลอยลอยอิสระและเชื้อที่หลุดลอกดังกล่าวเท่านั้นที่ทำให้ผลเพาะเชื้อเป็นบวกแต่อาจไม่สามารถอ้างอิงถึงเชื้อทั้งหมดในแผ่นชีวภาพได้ ซึ่งอาจส่งผลให้ผลเพาะเชื้อกับผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดไม่สอดคล้องกัน การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาขั้นต้นซึ่งอาจบอกไม่ได้ถึงความแตกต่างที่ชัดเจนของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ ณ ค่าพีเอชต่างๆ ต่อเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นแต่สามารถบอกได้ว่าเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพมีแนวโน้มที่ต้านต่อน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์เพิ่มขึ้นเมื่อปรับค่าพีเอชลดลงและใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาครั้งต่อไป ดังนั้น การศึกษาในอนาคตอาจต้องเพิ่มขั้นตอนที่สามารถทดสอบความมีชีวิตของเชื้อ

ทั้งหมดในแผ่นชีวภาพ เช่น การเขย่าขึ้นฟัน (sonication) เพื่อให้เชื้อทั้งหมดที่อยู่ในแผ่นชีวภาพหลุดออกจากชิ้นฟัน (Arias-Moliz et al., 2009) ซึ่งอาจทำให้ผลการเจริญของเชื้อใช้อ้างอิงถึงเชื้อทั้งหมดในแผ่นชีวภาพได้ และควรมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ของเชื้อที่ขึ้นโดยทำการย้อมแกรม (gram stain) หรือการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) เพื่อยืนยันผลการเจริญของเชื้อ *E. faecalis*

ผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดแสดงให้เห็นว่าน้ำยาล้างคลองรากฟันโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ณ พีเอช 12 มีประสิทธิภาพในการทำลายแผ่นชีวภาพอย่างสมบูรณ์สูงสุด เมื่อปรับค่าพีเอชลดลง ณ พีเอช 9 มีประสิทธิภาพในการทำลายแผ่นชีวภาพอย่างสมบูรณ์ลดลง ส่วน ณ พีเอช 7 และพีเอช 4.5 ไม่มีประสิทธิภาพในการทำลายแผ่นชีวภาพได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งประสิทธิภาพของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์อาจมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการสลายเนื้อเยื่อ

การปรับลดพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้มีฤทธิ์เป็นกรด จะได้คลอรีนอิสระที่อยู่ในรูปของกรดไฮโปคลอรัสมากกว่าไฮโปคลอไรต์แอนไอออน ซึ่งเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามการลดค่าพีเอชของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้เป็นกลางหรือกรดจะทำให้สารละลายไม่เสถียร อีกทั้งยังมีฤทธิ์ในการสลายเนื้อเยื่อลดลง (Christensen et al., 2008; Camps et al., 2009; Aubut et al., 2010; Rossi-Fedele et al., 2011) ประสิทธิภาพในการทำมาสะอาด (cleaning effectiveness) ของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮโปคลอไรต์แอนไอออน (Fukusaki, 2006) การปรับลดค่าพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ทำให้คลอรีนอิสระในรูปของไฮโปคลอไรต์แอนไอออนลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าการปรับลดค่าพีเอชของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์เพื่อหวังผลในการกำจัดเชื้อแต่กลับมีผลลดประสิทธิภาพการสลายเนื้อเยื่อให้ต่ำลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดเมทริกซ์ (matrix) ที่เป็นเนื้อเยื่ออินทรีย์ที่ล้อมรอบแบคทีเรียได้ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพที่อยู่ในรูปของแผ่นชีวภาพให้ต่ำลงด้วย อาจกล่าวได้ว่าประสิทธิภาพในการสลายเนื้อเยื่อของน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์มีบทบาทสำคัญในการแสดงประสิทธิภาพการต้านจุลชีพเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะที่เป็นแผ่นชีวภาพ

การปรับลดค่าพีเอชในการศึกษาครั้งนี้ใช้การเติมกรดอะซิติก ซึ่ง Kuroiwa และคณะ รายงานว่ากรดอะซิติกที่ใช้เตรียมน้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ เนื่องจากมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ มีความปลอดภัยและไม่มีผลต่อปริมาณคลอรีนที่ได้จากการแตกตัว การผสมกรดอื่นๆ เช่น กรดแลคติก หรือกรดซิตริก ทำให้น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์สูญเสียคลอรีนที่ได้จากการแตกตัว และลดความสามารถของการต้านจุลชีพ (Kuroiwa et al., 2003)

การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้ใช้น้ำยาโซเดียมไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการต้านจุลชีพ และการสลายเนื้อเยื่อที่เหมาะสมเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นร้อยละ 5.25 (Harrison & Hand,

1981; Baumgartner & Cuenin, 1992) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาน้ำยาไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 ทุกระดับที่เอชยังพบมีการเจริญของเชื้อจากการเพาะเชื้อ ซึ่งอธิบายได้โดยใช้การศึกษาของ Clegg และคณะที่ได้ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาล้างคลองรากฟันกับแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นจากเชื้อในคลองรากฟันของมนุษย์ที่วินิจฉัยว่าเป็นเนื้อเยื่อในตายและมีการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด และการเพาะเชื้อ พบว่าน้ำยาไฮโปคลอไรต์ 6 เป็นเพียงชนิดเดียวที่มีความสามารถทำลายโครงสร้างของแผ่นชีวภาพได้ทั้งหมด (physically removed artificial biofilm) และไม่พบมีการเจริญของเชื้อภายหลังจากการเพาะเชื้อ ซึ่งประสิทธิภาพในการกำจัดแผ่นชีวภาพของน้ำยาไฮโปคลอไรต์อาจเป็นผลของคุณสมบัติในการกำจัดเนื้อเยื่อ ดังนั้น จึงสามารถกำจัดแบคทีเรียที่ยึดติดกับเนื้อฟันได้ ในขณะที่ไฮโปคลอไรต์ความเข้มข้นร้อยละ 3 มีความสามารถทำลายโครงสร้างของแผ่นชีวภาพได้ทั้งหมด แต่พบมีการเจริญของเชื้อภายหลังจากการเพาะเชื้อ อาจเป็นไปได้ว่ามีเชื้อแบคทีเรียหลงเหลืออยู่ภายในหลอดฝอยของเนื้อฟัน และประสิทธิภาพการต้านแบคทีเรียอาจสูงขึ้นหากเพิ่มระยะเวลาการสัมผัสเชื้อ (Clegg et al., 2006)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาค้นนี้เป็นการสร้างสภาวะให้เกิดแผ่นชีวภาพในห้องปฏิบัติการเพื่อควบคุมปัจจัยกวนซึ่งแตกต่างจากในทางคลินิก ทั้งในแง่ของชนิดและปริมาณของเชื้อที่พบ และไม่มีมีการทำความสะอาดผนังคลองรากฟันโดยใช้เครื่องมือชุดตัดซึ่งเป็นขั้นตอนหลักที่สามารถกำจัดปริมาณเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ออกจากคลองรากฟันได้ (Byström & Sundqvist, 1981) ในทางปฏิบัติเพื่อให้บรรลุวัตถุประสงค์ในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ออกจากคลองรากฟันให้สมบูรณ์ มีวิธีการอื่นที่เข้ามามีบทบาทต่อการรักษา เช่น การเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสเชื้อ (Moorer et al., 1982) การใช้สารคีเลต (chelating agent) เช่น กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก (ethylenediamine tetraacetic acid) ที่มีคุณสมบัติในการกำจัดชั้นสเมียร์ที่ประกอบไปด้วยสารอินทรีย์ และสารอินทรีย์ ซึ่งการทำลายเชื้อแบคทีเรียของกรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติกเกิดจากการกำจัดชั้นสเมียร์ที่มีแบคทีเรียอาศัยอยู่ การใช้กรดเอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติคร่วมกับน้ำยาไฮโปคลอไรต์ในการล้างคลองรากฟันมีผลลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียมากกว่าใช้น้ำยาไฮโปคลอไรต์เพียงชนิดเดียว (Byström & Sundqvist, 1985) การใช้เครื่องมือในการทำความสะอาดคลองรากฟันมีความเป็นไปได้ในการทำลายโครงสร้างของแผ่นชีวภาพ (Clegg et al., 2006) และการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นยาใส่ในคลองรากฟันช่วยเสริมฤทธิ์ในการสลายเนื้อเยื่อของน้ำยาไฮโปคลอไรต์ (Andersen et al., 1992; Türkün & Cengiz, 1997)

การหลงเหลืออยู่ของแผ่นชีวภาพไม่เพียงแต่เป็นแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย และอาจขัดขวางไม่ให้เกิดความแนบสนิทระหว่างผนังคลองรากกับวัสดุอุดคลองรากฟัน โดยเฉพาะการใช้วัสดุอุดคลองรากฟันที่มีส่วนผสมของเรซิน เนื่องจากแผ่นชีวภาพจะขัดขวางการยึดติดของเรซินกับผนังคลองรากฟัน (Clegg et al., 2006) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อความสำเร็จ และความล้มเหลวของการรักษาคอนกรากฟัน ดังนั้น การเลือกใช้น้ำยาล้างคลองรากฟัน ควรพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและความสามารถในการทำลายโครงสร้างของแผ่นชีวภาพ (physically disrupt) เพื่อกำจัดแบคทีเรีย และส่วนประกอบแอนติเจน (antigenic component) ของเชื้อได้อย่างสมบูรณ์

สรุปผลการศึกษา

ภายใต้สภาวะของการศึกษานี้สรุปได้ว่า การปรับลดค่าพีเอชของน้ำยาไฮโปคลอไรต์ไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. faecalis* ในแผ่นชีวภาพที่สร้างขึ้นและไม่มีผลเพิ่มประสิทธิภาพการทำลายการยึดเกาะของเชื้อ *E. faecalis* กับผิวเนื้อฟัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ทญ.คุณเมตต์จิตต์ นวจินดา อ.ทญ.ดร.สมลินี พิมพ์ขาว อ.ทญ.พรสุตา ห่อไชย และ อ.ทญ.ดร.สุทธิพลินทร์ สุวรรณกุล ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัยในครั้งนี้อย่างยิ่ง และขอแสดงความขอบคุณ นางสาวกฤษมา แจ่มดี นายสรพงษ์ วงษ์น้อย และเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ของคณะทันตแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยนเรศวรทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการใช้เครื่องมือ

เอกสารอ้างอิง

- Andersen, M., Lund, A., Andreasen, J.O. & Andreasen, F.M. (1992). In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Dental Traumatology*, 8(3), 104–108.
- Arias-Moliz, M.T., Ferrer-Luque, C.M., Espigares-García, M. & Baca, P. (2009). Enterococcus faecalis biofilms eradication by root canal irrigants. *Journal of Endodontics*, 35(5), 711–714.
- Aubut, V., Pommel, L., Verhille, B., Orsière, T., Garcia, S., About, I., et al. (2010). Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 109(2), e120–e125.

- Baumgartner, J. & Cuenin, P.R. (1992). Efficacy of several concentrations of sodium hypochlorite for root canal irrigation. *Journal of Endodontics*, 18(12), 605–612.
- Byström, A. & Sundqvist, G. (1981). Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scandinavian Journal of Dental Research*, 89(4), 321–328.
- Byström, A. & Sundqvist, G. (1985). The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *International Endodontic Journal*, 18(1), 35–40.
- Camps, J., Pommel, L., Aubut, V., Verhille, B., Satoshi, F., Lascola, B., et al. (2009). Shelf life, dissolving action, and antibacterial activity of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 108(2), 66–73.
- Christensen, C.E., McNeal, S.F. & Eleazer, P. (2008). Effect of lowering the pH of sodium hypochlorite on dissolving tissue in vitro. *Journal of Endodontics*, 34(4), 449–452.
- Clegg, M.S., Vertucci, F.J., Walker, C., Belanger, M. & Britto, L.R. (2006). The effect of exposure to irrigant solutions on apical dentin biofilms in vitro. *Journal of Endodontics*, 32(5), 434–437.
- Distel, J.W., Hatton, J.F. & Gillespie, M.J. (2002). Biofilm formation in medicated root canals. *Journal of Endodontics*, 28(10), 689–693.
- Evans, M., Davies, J.K., Sundqvist, G. & Figdor, D. (2002). Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus Faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal*, 35(3), 221–228.
- Fukuzaki, S. (2006). Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Science*, 11(4), 147–157.
- Harrison, J.W. & Hand, R.E. (1981). The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics*, 7(3), 128–132.
- Takehashi, S., Stanley, H.R. & Fitzgerald, R.J. (1965). The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 20(3), 340–349.
- Kuroiwa, K., Nakayama, H., Kuwahara, T., Tomagawa, K., Hattori, K., Murakami, K., et al. (2003). Augmenting effect of acetic acid for acidification on bacterial activity of hypochlorite solution. *Litters in Applied Microbiology*, 36(1), 46–49.
- Len, S.V., Hung, Y.C., Chung, D., Anderson, J.L., Erickson, M.C. & Morita, K. (2000). Effects of storage conditions and pH on chlorine loss in electrolyzed oxidizing (EO) water. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 209–212.
- Love, R. M. (2001). *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *International Endodontic Journal*, 34(5), 399–405.
- Mercade, M., Duran-Sindreu, F., Kuttler, S., Roig, M. & Durany, N. (2009). Antimicrobial efficacy of 4.2% sodium hypochlorite adjusted to pH 12, 7.5, and 6.5 in infected human root canals. *Oral surgery, Oral Medicine Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 107(2), 295–298.
- Moorer, W.R. & Wesselink, P.R. (1982). Factors promoting the tissue dissolving capacity of sodium hypochlorite. *International Endodontic Journal*, 15(4), 187–196.
- Peter, L.B., Wesselink, P.R. & Moorer, W.R. (2000). Penetration of bacteria in bovine root dentin in vitro. *International Endodontic Journal*, 33(1), 28–36.
- Pinheiro, E.T., Gomes, B.P., Ferraz, C.C., Sousa, E.L., Teixeira, F.B. & Souza-filho, F.J. (2003). Microorganisms from canals of root filled teeth with periapical lesions. *International Endodontic Journal*, 36(1), 1–11.
- Rossi-Fedele, G., Guastalli, A.R., Dogramaci, E.J., Steier, L. & De Figueiredo, J.A.P. (2011). Influence of pH changes on chlorine-containing endodontic irrigating solutions. *International Endodontic Journal*, 44(9), 792–799.

Siren, E.K., Haapasalo, M.P.P., Ranta, K., Salmi, P. & Kerosuo, E.N.J. (1997). Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *International Endodontic Journal*, 30(2), 91–95.

Sundqvist, G. & Figdor, O. (2003). Life as an endodontic pathogen: Ecological differences between the untreated and root-filled root canals. *Endodontic Topics*, 6(1), 3–28.

Svensäter, G. & Bergenholtz, G. (2004). Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics*, 9(1), 27–36.

Türkün, M. & Cengiz, T. (1997). The effects of sodium hypochlorite and calcium hydroxide on tissue dissolution and root canal cleanliness. *International endodontic Journal*, 30(5), 335–342