



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102985051 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201180019585. 6

(22) 申请日 2011. 02. 18

(30) 优先权数据

2004260 2010. 02. 18 NL

61/305, 691 2010. 02. 18 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 10. 17

(86) PCT申请的申请数据

PCT/NL2011/050118 2011. 02. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02011/102724 EN 2011. 08. 25

(71) 申请人 尼京克制药有限公司

地址 荷兰艾恩德霍芬

(72) 发明人 叙泽特·韦罗尼卡·范德尔瓦尔

斯坦利·布鲁尔

约翰内斯·雅各布·德泽特

卢卡斯·威廉默斯·玛丽亚·范德尔

斯勒伊斯

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 李丙林 张英

(51) Int. Cl.

A61K 6/00(2006. 01)

A61K 9/00(2006. 01)

A61K 47/12(2006. 01)

A61K 47/26(2006. 01)

A61Q 11/00(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 19 页 附图 2 页

(54) 发明名称

消毒组合物及其在牙齿治疗中的应用

(57) 摘要

本发明涉及消毒或抗菌组合物,其用于牙齿治疗,如治疗和/或预防牙周炎、齿龈炎或其他形式的口腔感染。本发明人发现感染牙齿组织并引发其炎症的微生物,易受渗透胁迫影响的程度为:在治疗或预防感染和/或炎症中应用高渗组合物是有效的。此外,发现了这些微生物还易受酸性胁迫的影响。因此,本发明提供了组合物,当局部应用时,其在引发牙齿组织感染的微生物中诱导渗透胁迫,优选渗透以及酸性胁迫。本发明还考虑到涉及本发明组合物的方法和应用。

1. 组合物,包括赋予所述组合物高渗性的量的一种或多种张度剂,在牙齿治疗中用作消毒或抗菌制剂,所述组合物包括选自有机酸和 / 或其盐的组中的张度剂。

2. 根据权利要求 1 所述的组合物,其中,所述张度剂选自由有机酸盐构成的组,优先选自由有机酸的钠盐、钾盐和镁盐构成的组。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的组合物,包括赋予所述制剂高渗性的量的所述有机酸和 / 或有机酸盐。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述钠盐选自由以下构成的组:乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠、乙酸钾、山梨酸钾、乳酸钾和甲酸钾。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,包括来自自由无机盐和糖醇构成的组中的另外的张度剂。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,用于治疗 and / 或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染的方法中。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述组合物被缓冲至低于 7 的 pH。

8. 根据前述权利要求 1 中任一项所述的组合物,在牙髓、修复或牙周治疗,尤其是根管治疗中用作消毒或抗菌制剂。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,其中,所述制剂包括所述张度剂的高渗水溶液。

10. 根据权利要求 9 所述的组合物,其中,所述高渗水溶液具有至少 $1.25 \cdot 10^7 \text{Pa}$ 的渗透值和至少 2.5M 的摩尔浓度。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的组合物,进一步包括选自以下构成的组中的一种或多种试剂:着色剂、增味剂、医药化合物、表面活性剂、去垢剂、稳定剂、粘度调节剂、稀释剂、流量控制添加剂、聚合增稠剂、防腐剂、显像剂、以及造影剂和 / 或对比增强剂。

12. 在受试者中进行牙齿、牙髓或牙周治疗或植入手术的方法,所述方法包括应用消毒或抗菌制剂,所述消毒或抗菌制剂以赋予组合物高渗性的量包含一种或多种张度剂,所述制剂包括选自有机酸和其盐的组中的第一张度剂。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其中,所述制剂包括有机酸的钠盐、钾盐或镁盐。

14. 根据权利要求 12 或 13 所述的方法,其中,所述第一张度剂选自由以下构成的组:乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠、乙酸钾、山梨酸钾、乳酸钾和甲酸钾。

15. 根据权利要求 12-14 中任一项所述的方法,其中,所述制剂包括选自自由无机盐和糖醇构成的组中的另外的张度剂。

16. 根据权利要求 12-15 中任一项所述的方法,其是用于治疗 and / 或预防根尖、侧部和 / 或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎 and / 或其他形式的口腔感染的方法。

17. 根据权利要求 12-16 中任一项所述的方法,其中所述消毒或抗菌制剂被缓冲至低于 7 的 pH。

18. 根据权利要求 12-17 中任一项所述的方法,其中所述方法包括根管治疗。

19. 牙髓或牙周试剂盒,包括容纳消毒或抗菌制剂的第一容器、安瓿或注射器,所述消毒或抗菌制剂包括赋予组合物高渗性的量的张度剂,所述张度剂包括一定量的有机酸和 / 或有机酸盐,连同一种或多种选自自由以下构成的组中的物品:牙髓和牙周冲洗针和头;牙髓或牙周冲洗器;容纳根管填充剂、根管封闭剂或粘固剂的另外的容器、安瓿或注射器;以

及螺旋分配器。

消毒组合物及其在牙齿治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及适合用于牙齿治疗的消毒或抗菌组合物。更特别地,本发明涉及组合物,其用于治疗或预防根尖、侧部(lateral)或边缘牙周炎、齿龈炎(牙龈炎)、种植体周围炎(种植牙周炎)或其他形式的口腔感染,尤其是在牙髓和/或牙周治疗或植入(implant)手术期间,尤其是在根管治疗期间。本发明还涉及包括本发明的组合物的这些方法和应用。

背景技术

[0002] 根管系统中的微生物和它们的副产物引起牙髓和根尖周(periapical)发炎(Kakehashi et al, 1965)。因此,认为根管系统的不完全消毒是持续性根尖周炎的主要原因(Seltzer & Bender 1967, Lin et al. 1992)。微生物感染的消除是根管治疗的主要目标之一。尽管极为努力,然而组织和培养研究证实了在根管治疗后微生物的持续存在(Nair et al. 2005)。我们不能使根管系统完全消毒的原因之一是其结构的复杂性(Vertucci 1984, Wu et al. 2000)。

[0003] 另一个原因是,诸如细菌的微生物生存于生物膜结构中(Costerton et al. 1995, Watnick & Kolter 2000)。这使得它们对牙髓治疗过程更有耐性。由于其复杂的形态,根管系统的彻底机械清洗是不可能的。进行机械填充以使得能够用抗菌剂冲洗。目前的根管冲洗剂具有表面工作范围。由于其反应性质,最有效的消毒剂次氯酸钠不从主管(main canal)渗入侧部。一旦次氯酸钠遇到有机物质就失活(Moorer & Wesselink 1982)。洗必太(双氯苯双胍己烷)不渗入生物膜(Zaura-Arite et al. 2001)。

[0004] 诸如 IKI (IPI)、乙醇或洗必太的冲洗剂在清除根管系统中是不太有效的,因为它们缺乏组织溶解性质。

[0005] 在化学-机械清创之后平均每颗牙齿上持续存在 4 百万 CFU。经由副管可以接近根尖周组织的残余细菌和其他微生物,保持慢性的炎性过程。取决于牙齿类型,多达百分之五十牙齿发生根尖分支。慢性感染和炎症是牙髓治疗失败的原因。由于检测失败的增加,随着 CBCT (锥形束计算机断层成像)的引入失败率将增加(Estrela et al. 2008)。根管治疗以两种方式进行:i) 在牙科医生的椅子上的一次会见(就诊, session),用 NaOCl 作为消毒冲洗剂或 ii) 包括用 NaOCl 冲洗的两次或多次会见(就诊),同时在会见(就诊)之间将氢氧化钙($\text{Ca}(\text{OH})_2$)封入根管中以便进一步消毒。

[0006] 目前 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 用作两次治疗会见(就诊, session)之间的管内涂敷(intracanal dressing)。其 pH 为 12, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 是弱杀菌性的。这在一些关于细菌悬浮液(浮游细菌)的研究中有报道。对经诊断患有根尖周炎的受试者给予 $\text{Ca}(\text{OH})_2$, 以便达到额外的消毒并预防在两次治疗会见之间的管内菌群再生长。

[0007] 用于牙髓的抗菌剂具有一定劣势。例如,只有当氢氧化钙与微生物直接接触时是有效的(Siqueira & Lopes 1999)。而且, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 仅对一些菌种是杀菌性的,其刺激微生物菌群向更有耐性的菌种转化(Nakajo et al. 2006)。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 不能根除与牙髓治疗失败相关的粪肠球菌(*E. faecalis*) (Siren et al. 1997, Sundqvist et al. 1998)。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的长

期应用削弱了牙质,并且 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 糊剂的残余物难以去除。

[0008] 在我们的研究中观察到有趣的发现。使双菌种生物膜暴露至 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 。在最初细菌百倍减少之后,在一周之后(实验结束)细菌数量恢复到十倍减少。这引起了对 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 在生物膜上的抗菌效能的怀疑。而且,氢氧化钙组(类,group)显示存活菌落存在的生物膜的钙化(在死/活染色后用共焦激光扫描显微镜观测)。通过用棉球擦拭或用硬塑料设备刮削不能将钙化的斑块从模型中去除。这是本研究有趣的发现,因为 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 是世界上唯一公认的管内药物。如果钙化也发生在根管中,那么这将更多地妨碍消毒。

[0009] 本发明的目的是提供改进的消毒或抗菌组合物,其能有助于克服目前可用的治疗的劣势。

发明内容

[0010] 本发明人出乎意料地发现,典型地感染牙齿组织并引起其炎症的微生物易受渗透胁迫(osmotic stress)的影响,影响程度为:对经感染的组织或处于受感染的风险中的组织应用高渗组合物将治愈或预防感染和/或由其引起的炎症。在不希望受到任何特定理论限制的情况下,假设是由于渗透胁迫,诸如细菌的引起炎症的微生物代谢耗尽,而导致其死亡。

[0011] 此外,发现了牙齿组织感染中涉及的微生物也易受酸性胁迫的影响。在不希望受到任何特定理论限制的情况下,假设酸性胁迫也有助于诸如细菌的引起炎症的微生物代谢耗尽。进一步假设,渗透胁迫和酸性胁迫的组合将比单独地应用这些胁迫因素中的一个更快速地导致微生物的死亡。

[0012] 因此本发明提供组合物,当局部应用时,在导致牙齿组织感染的微生物中引起渗透胁迫。本发明特别优选的实施方式中提供了组合物,当局部应用时,在导致牙齿组织感染的微生物中引起渗透胁迫以及酸性胁迫。

[0013] 此外,本发明提供了以上组合物在牙齿治疗中的应用,尤其是用于治疗或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染,例如在牙髓和/或牙周治疗期间,如根管治疗。

[0014] 而且,本发明提供了牙齿治疗的方法,尤其是治疗或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染的方法,例如在牙髓和/或牙周治疗期间或在植入手术期间,如根管治疗,包括引起渗透和可选地酸性胁迫的组合物的应用。

[0015] 而且,本发明提供了张度剂(tonicity agent)在制备用于牙齿治疗的药物中的应用,尤其是在治疗或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染中,例如在牙髓和/或牙周治疗期间或在植入手术期间,如根管治疗期间。

附图说明

[0016] 图 1:NaCl 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 对粪肠球菌和绿脓杆菌(*P. aeruginosa*)的减少的影响。图表显示了在暴露(小时)至 NaCl 和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 之后,以 \log CFU/生物膜(计)的细菌菌种 CFU 数量的减少。阴性对照包括平均 2.0×10^8 CFU 的粪肠球菌和 3.5×10^8 CFU 的绿脓杆菌,其数量随时间增长。

[0017] 图 2:用山梨酸钾 0.05M、0.5M、1M、1.5M、2M (pH7)、乙酸钠 0.5M、1M、1.5M、2M (pH6

或 7) 治疗 2 小时, 生物膜的刃天青试验 (Resazurin assay) 的荧光读数。NaOCl 充当阳性对照, PBS 和不治疗是阴性对照。最后的柱代表无菌对照。3 小时后采集读数。

具体实施方式

[0018] 因此, 在第一个方面中, 提供了一种组合物, 其包括赋予该组合物高渗性的量的张度剂 (tonicity agent), 该组合物适宜用作牙齿治疗中的消毒或抗菌制剂。

[0019] 在本文档和其权利要求中, 以非限制性意义使用动词“包括”和其变形, 以意指包括该词后面的项目, 而不排除没有特别提到的项目。此外, 通过不定冠词“一个”或“一种”指代的要素不排除以下可能性, 即存在多于一个该要素, 除非上下文明确要求有一个且仅有一个该要素。因此不定冠词“一个”或“一种”通常意味着“至少一个”。

[0020] 本发明的“组合物”典型地包括两种或更多种不同物质的组合, 并且典型地将是固体、半固体或液体形式, 其中半固体指的是流变学典型的假塑性或塑性流体。适宜的实例包括粉剂、分散剂、乳液、悬浮液和溶液。如上指出的, 本发明的组合物适宜用于牙齿治疗, 其意味着该组合物适宜应用在人类口腔中。因此, 该组合物典型地是“生理可接受的”, 即它不包括任何以下量的成分, 当应用在人类受试者的口腔中时, 将对所述受试者引起超过任何有益效果的程度的伤害。

[0021] 如在本文中使用的, 术语“张度剂”包括可以溶解在水中以便在张力 (渗透压, tonicity) 或水势中产生差异的任何物质。通常, 张度剂可以是无机盐或有机盐、低分子量分子或 (水溶性) 聚合物。原则上, 张力是依数特性的, 即它取决于溶质的浓度但不取决于其特性 (identity)。因此, 在本发明的背景下, 用作张度剂的给定试剂的适用性将取决于其溶解度, 高度水溶性试剂典型地优选于水难溶性试剂 (sparingly water-soluble agent), 并且取决于其 (被动地或主动地) 穿过细胞膜的能力, 由于如果可以形成浓度差异, 溶质可以仅影响张力。选择最适当的张度剂的次要考虑可以典型地包括生理可容忍性 (physiological tolerability), 进一步的生物和 / 或化学 (反应) 活性、处理的容易性和 (其他) 经济和环境因素。

[0022] 在本发明的特别优选的实施方式中, 提供了任意上文定义的组合物, 其中渗透剂 (osmotic agent) 选自由以下构成的组: 无机钠盐、有机钠盐、无机钾盐、有机钾盐、无机镁盐、有机镁盐、糖醇和其混合物, 优选由以下构成的组: 无机钠盐、有机钠盐、无机镁盐、有机镁盐、糖醇和其混合物。正如本领域的技术人员通常已知的, 根据本发明, 糖醇, 也常称为多元醇, 具有通式 $H(HCHO)_{n+1}H$ (具有化学式 $H(HCHO)_nHCO$ 的糖), 并且也可以充当张度剂。然而, 一些糖醇可以也充当牙齿组织中微生物的代谢底物 (代谢基质, metabolic substrate) 或能源, 而这些糖醇是为本发明目的较不优选的。优选的糖醇是甘露醇。在本发明的特别优选的实施方式中, 提供了任意上文定义的组合物, 其中渗透剂选自由以下构成的组: 氯化钠、碘化钠、氯化镁、乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠、乙酸钾、山梨酸钾、乳酸钾和甲酸钾、甘露醇和其混合物, 更优选由以下构成的组: 氯化钠、碘化钠、氯化镁、乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠、甘露醇和其混合物。

[0023] 如上文指出的, 本组合物是高渗性组合物。“高渗性 (hypertonic)”通常表示给定的组合物包括比另一种溶液更高浓度的非渗透溶质 (impermeable solute), 以便当所述溶液置于半透膜的反面 (对侧) 时产生水势 (water potential)。在生物学和医学领域中, 当

描述浸没在外部溶液中的细胞的应答时,典型地采用张力(tonicity)。因此,在本发明的背景下,术语“高渗性”表示组合物中溶质的浓度高于与该组合物接触的细胞,以便水将从所述细胞中扩散出去。为了本发明的目的,典型地采用术语“高渗性”以意指包含以下量的溶质的组合物,该量足以产生高于人血液、活细胞或最优选地诸如那些典型地感染牙齿组织引起其发炎的微生物的细胞液(细胞溶质、胞液, cytosol)的水势。

[0024] 正如本领域的技术人员应理解的,在身体治疗的部位产生引起渗透胁迫的环境,不仅可以通过向其应用张度剂(多种张度剂)的水溶液,还可以通过以其他形式或制剂应用所述试剂(多种试剂)实现,例如包含非溶解形式的张度剂,其可以溶解在应用部位存在的生理流体中。本发明不特别地限制在这个方面中。然而,本发明的优选实施方式提供了任意上文定义的组合物,其中该组合物包括张度剂的高渗性水溶液。在本发明的背景下,术语“溶液”用于表示包含水相的组合物,其中张度剂已溶解;不意图将本发明的范围限制于排他地由水溶液相构成的组合物。

[0025] 更特别地,在本发明的优选实施方式中,提供了任意上文定义的组合物,包含水相,其包含以下量的张度剂,该量赋予所述水相高渗性,以及一种或多种其他成分,其实例将在下文给出,其中的每一种可以溶解在所述水相中或者可以包含在特定相中。优选,虽然不必要,本组合物包含水相作为连续相,该水相中包含溶解的张度剂。因此,在本发明实施方式中,组合物可以采取包含连续水相的乳液、悬浮液、分散液或溶液的形式,张度剂以向其提供高渗性的量溶解在其中。

[0026] 如上面指出的,高渗环境迫使水离开包含在所述环境中的细胞。在真核细胞中,这将导致细胞形状变形和褶皱,称为锯齿(皱缩, crenation)的状态。在包括细胞壁的细胞中,效应甚至更剧烈。可变形的细胞膜从刚性细胞壁脱离,但是仍然在称为胞间连丝(plasmodesmata)的点与细胞壁连接。细胞呈现针垫状外形,并且胞间连丝几乎停止作用,因为它们变得狭窄(constricted),称为质壁分离的情况。在环境中的溶质为高浓度的情况下,除了水通过渗透从细胞中渗出之外,还阻止基质(substrate)和辅助因子运输至细胞中,从而引起细胞中(高渗性)“胁迫”或“冲击”。正如本领域的技术人员应理解的,本组合物应用于用本发明治疗的部位,以产生高渗环境以便在所述部位的细菌和/或其他微生物中引起(高)渗胁迫或冲击。细菌和/或其他微生物可以具有以下机制,其可以使得它们在某种程度上对渗透性冲击做出应答。

[0027] 由于上述考虑,本组合物特别优选具有高于血液、细胞或微生物的细胞液的同渗容摩(osmolality),其大约为 0.3 渗摩/L。因此,本组合物的水相包括以下量的张度剂,该量满足组合物的同渗容摩为至少高于 0.5、1、2、5 或 10 渗摩/L。如本领域的技术人员应理解的,这意味着如果张度剂是分离成两种离子的试剂,如本发明大多数优选的张度剂的情况,这相当于该组合物的优选摩尔浓度,例如至少 0.25、至少 0.5、至少 1、至少 2.5、至少 3.5 或至少 5。

[0028] 而且,特别优选本组合物的水相包含足以产生以下渗透值的量的张度剂,至少 $0.125 \times 10^7 \text{Pa}$ 、至少 $0.25 \times 10^7 \text{Pa}$ 、至少 $0.5 \times 10^7 \text{Pa}$ 、至少 $1.25 \times 10^7 \text{Pa}$ 、至少 $2.5 \times 10^7 \text{Pa}$ 或至少 $3 \times 10^7 \text{Pa}$ 。渗透值,其与渗透压同义,可以简单地通过范特霍夫法则(van 't Hoff law)计算,该法则通过等式 $\pi = RTC$ 描述,其中 π 是渗透压(atm.), R 是理想气体常数, T 是热力学(绝对)温度(开尔文), C 是总溶质浓度,表示为溶质的渗透压摩尔每升溶液,如本领域通

常已知的。

[0029] 正如之前在本文中指出的, 本发明人已经发现在本文中称为有机酸胁迫的机制可以适当抑制牙齿组织上细菌的增长。因此, 在本发明的优选实施方式中, 提供了任意上文定义的组合物, 其包括有效量的有机酸和 / 或有机酸阴离子, 尤其是有机酸和 / 或有机酸盐。如本领域的技术人员应理解的, 水溶性有机盐将增加该组合物的张力。因此, 在本发明的实施方式中, 张度剂选自有机酸盐的组, 优选有机酸钠盐, 如选自由乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠和其混合物构成的组中的那些和 / 或选自由乙酸钾、山梨酸钾、乳酸钾、甲酸钾构成的组中的那些, 并且该组合物包含向制剂提供高渗性的量的所述有机酸盐。在本发明另一个实施方式中, 提供了根据任何上文的组合物, 其包括张度剂的组合, 其中, 存在的第一试剂选自无机盐和糖醇的组, 优选无机钠盐(如氯化钠、碘化钠)、无机钾盐(如氯化钾和碘化钾)、无机镁盐(如氯化镁)、和其混合物, 并且存在的进一步试剂选自有机酸和 / 或其盐的组, 优选有机酸钠盐, 如乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠、乙酸钾、山梨酸钾、乳酸钾和甲酸钾和其混合物, 其中所述试剂的总量向组合物提供高渗性。在另一个实施方式中, 存在张度剂的组合, 第一试剂选自无机盐和糖醇的组, 优选无机钠盐(如氯化钠和碘化钠)、无机镁盐(如氯化镁)、和其混合物, 以及进一步的试剂, 选自有机酸和 / 或其盐的组, 优选有机酸钠盐, 如乙酸钠、山梨酸钠、乳酸钠、甲酸钠和其混合物, 其中所述试剂的总量向组合物提供高渗性。

[0030] 在不希望受到任何特定理论限制的情况下, 认为有机酸在较低 pH 值下是最有效的。在溶液中, 弱有机酸在解离态(dissociated state)和未解离态(undissociated state)之间存在平衡。酸的两种形式的分布由其 pKa 值和环境的 pH 决定。因此, 在酸性更强的环境中, 平衡向未解离形式移动。带电荷的分子, 如质子和阴离子, 不能穿过脂质膜。然而, 中性未解离的酸是相对膜可渗透的并且能够在膜上扩散。在细胞内, 在解离态和未解离态之间形成新的平衡。由于大多数微生物显示细胞内的 pH 接近中性, 因此平衡向酸的解离态移动。因此, 质子释放到细胞液中, 降低质子梯度。部分用来建立质子梯度的能量(例如 ATP 合成)从而立即丧失。取决于细胞的缓冲能力, 质子的进入可以使细胞液酸化。细胞内 pH 的改变将实质上影响所有生物化学过程, 包括氧化还原状态、DNA 转录、蛋白质合成和折叠、酶活性、和在膜上的运输。

[0031] 由于未解离的酸进入到细胞中是通过扩散驱动的, 这个过程持续直至内膜和外膜的片层(层, leaflet)上的未解离酸的浓度相等。环境(较低的 pH)和细胞的内部(较高的 pH)之间的初始 pH 差异越大, 细胞内的阴离子浓度可以达到越高。

[0032] 而且, 当与有机酸比较时, 生长抑制效应似乎与它们的膜溶解性有关, 正如通过辛醇 - 水分配系数(log K_{ow})反映的。为了获得类似的微生物生长率的降低, 通常与较高亲水性弱有机酸相比, 需要较低浓度的较高疏水性弱有机酸。观察到这种关系将可能是较高疏水性弱有机酸较快 / 较容易进入到细胞中的结果。总之, 似乎没有单一的机制解释有机酸的抗菌活性。认为它们的作用模式主要涉及质子梯度的消散(解偶联(uncoupling))和细胞液的酸化作用, 但是诸如膜破裂的其他因素和通过使特定的酶失活的代谢紊乱也可以是相关的。

[0033] 与提出的解偶联和细胞液酸化作用的机制一致, 本发明人发现如果将组合物缓冲至酸性 pH 值, 可以获得特别好的结果。因此在发明的优选实施方式中, 提供了在前文中定

义的组合物,其包括缓冲系统。正如本领域技术人员应理解的,缓冲系统典型地包括弱酸和其共轭碱(conjugate base)的组合。适宜的和通常已知的生理上可接受的缓冲系统的实例包括以下组合:柠檬酸盐/HCl;柠檬酸/柠檬酸盐;苹果酸/马来酸盐、琥珀酸/琥珀酸盐、乙酸/乙酸盐、山梨酸/山梨酸盐、乳酸/乳酸盐和 M_2HPO_4/MH_2PO_4 (其中M是单价阳离子)。优选缓冲系统选自由柠檬酸盐/HCl;柠檬酸/柠檬酸盐;苹果酸/马来酸盐、琥珀酸/琥珀酸盐、乙酸/乙酸盐、和 M_2HPO_4/MH_2PO_4 构成的组。因此,本发明的实施方式中提供了前文中定义的组合物,其包括引起渗透和酸性胁迫的量的以下组合:i)一种或多种有机酸和/或其盐,优选其钠盐或钾盐,最优选其钠盐,优选有机酸选自乙酸、甲酸,山梨酸和乳酸的组;ii)一种或多种缓冲剂,优选由以下构成的组:柠檬酸盐缓冲液(缓冲剂,buffer)、琥珀酸盐缓冲液、马来酸盐缓冲液、山梨酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液,更优选由柠檬酸盐缓冲液、琥珀酸盐缓冲液、马来酸盐缓冲液、乙酸盐缓冲液、乳酸盐缓冲液和磷酸盐缓冲液构成的组,可选地,iii)一种或多种另外的张度剂,优先选自无机钠盐、无机钾盐、无机镁盐和糖醇,更优先选自无机钠盐、无机镁盐和糖醇,最优先选自氯化钠、氯化镁、碘化钠和甘露醇,其中所述试剂的总量向组合物提供高渗性。在优选实施方式中,组合物包含列举的组分i)-iii)的水溶液。本领域的技术人员应理解,在水相中组合列举的组分典型地获得动力学平衡的系统,其包括溶解的、未解离的和/或部分解离的有机酸分子、有机酸阴离子、无机阳离子和,可选地,无机阴离子。

[0034] 在本发明优选的实施方式中,提供了任意上文定义的组合物,其中该组合物缓冲至低于7的pH。远低于5.5的值在引起酸性胁迫中将仍然是有效的,但是还可以引起牙釉质脱钙,因此不是优选的。典型地,该组合物缓冲至5.5-6.7范围内的pH,优选在5.7-6.5范围内,最优选在6-6.25范围内。本领域的技术人员应理解,该组合物的最佳pH将尤其取决于选择的用作引起酸性胁迫试剂的有机酸。

[0035] 本组合物可以包括一种或多种额外的“活性组分”。在优选实施方式中,该组合物包括一种或多种额外的试剂(另外的试剂,additional agent),这些试剂充当抗菌剂、防腐剂、杀微生物剂(microbiocide)、杀细菌剂(bacteriocide)、杀病菌剂(germicide)、抗生素、细菌素和/或生物膜抑制剂。这样的额外活性组分的优选实例包括抗菌剂,优选选自由以下构成的组的那些:次氯酸钠、EDTA、IPI(碘-碘化钾(iodine potassium iodide), I_2KI 或“鲁戈氏碘液(Lugol's iodine)”)、乙醇、洗必太(葡糖酸盐)、弗氏菌丝素(Framycetin)(硫酸盐)、 β -内酰胺、氨基糖苷(aminoglycoside)、三氯生(二氯苯氧氯酚,triclosan)、甲硝唑、四环素、喹诺酮、植物精油(plant essential oil)、樟脑、麝香草酚、香芹酚、薄荷醇、桉树脑、和水杨酸甲酯,最优选选自由次氯酸钠、IPI(碘-碘化钾, I_2KI 或“鲁戈氏碘液”)、乙醇和洗必太构成的组中的那些。正如在本文档的背景技术部分中表明的,本领域已知大多数这些试剂在牙齿治疗中的应用。本领域的技术人员应理解,尽管存在以下事实:与本组合物治疗相比,单独用这些试剂中的任意一种治疗典型地获得较差的结果,但它们在本组合物中的合并可以进一步增强(可能协同地)其抗菌作用。确定要并入在本组合物中的适当量的这样的额外成分在本领域的技术人员的通常能力内。

[0036] 此外,本组合物将典型地包括一种或多种额外成分,如着色剂、增味剂、医药化合物、表面活性剂、去垢剂、稳定剂、粘度调节剂、稀释剂、流量控制添加剂、聚合增稠剂(polymeric thickener)、防腐剂、显像剂、造影剂和/或对比增强剂等。正如前文指出的,

特别优选该组合物至少包括水,以便获得张度剂已经溶解在其中的水相以及,可选地,一种或多种含有或不含有缓冲剂的酸性胁迫引发剂。

[0037] 优选本组合物存在于常规牙科学中使用的产物形式中。特别地,组合物可以是以选自填料、冲洗液或清洗液的组中的产物形式。在发明特别优选的实施方式中,提供了任意上文定义的组合物,其具有凝胶、糊剂、软膏或黏性或假塑性液体的形式,该组合物包括如在前文中定义的水相,其可以是连续相或分散相。这样的组合物特别适合在根管治疗期间作为“(临时) 填料”。在本发明的另一个优选实施方式中,提供了任意前文定义的组合物,其具有液体形式,优选溶液、乳液或悬浮液,包括一种或多种上文定义的额外成分分散在所述水相中。这样的液体组合物特别适合用于牙齿治疗,其作为冲洗液、清洗液或作为钻孔(drilling)或填充流体。同样,在本文中涉及的不同制剂对本领域的技术人员是已知的或者将明了的(参见,例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed. Mack Publishing Co. (1990))。因此,本领域的技术人员将明白如何在本说明书的基础上,在本发明的范围内设计和制备适宜的组合物。

[0038] 如在上文中表明的,本发明的组合物适合并意图用于牙齿治疗,典型地作为消毒或抗菌制剂。以其最广义的术语“牙齿治疗”指的是旨在预防和/或治愈人体的颌部(下颌)、口腔、上颌面区域以及相邻和相关结构的软组织和硬组织的疾病、紊乱以及病症的任何治疗方法。如在本文中使用的,当意指杀死或者抑制诸如细菌、酵母和霉菌(真菌)、或原生动物、以及破坏性病毒的微生物的生长时,认为术语“消毒剂”和“抗菌剂”是同义的,并且可以互换使用。认为杀细菌剂、抗生素、杀病菌剂和防腐剂都构成“抗菌剂”的具体子类。因此,本发明的具体实施方式提供如在前文中定义的组合物,其适合或意图用作防腐剂、抗生素、杀细菌剂、杀病菌剂或杀真菌剂的制剂。

[0039] 根据本发明,组合物优选适合并意图用于治疗和/或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染的方法中,优选用于治疗根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎或其他形式的口腔感染的方法中,最优选用于治疗根尖、侧部或边缘牙周炎的方法中。而且,优选组合物适合并意图用于牙髓和牙周治疗,尤其是根管治疗。

[0040] 因此,在一个实施方式中,提供了如在任何上文中定义的组合物,其包括能够引发酸性胁迫的一种或多种试剂,优选有机酸的钠盐,在牙齿治疗中用作消毒或抗菌制剂,优选在牙髓或牙周治疗中,尤其是在根管治疗中。在另一个实施方式中,提供了这样的组合物,其用于治疗 and / 或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎、种植体周围炎或其他形式的口腔感染的方法中,更优选用于治疗 and / 或预防根尖、侧部或边缘牙周炎、齿龈炎或其他形式的口腔感染的方法中。

[0041] 在另一个实施方式中,提供了如在任何上文中定义的组合物,其包括向组合物提供高渗性的量的张度剂,在牙髓或牙周治疗或植入手术中用作消毒或抗菌制剂,优选在牙髓或牙周治疗中,尤其是在根管治疗中。在另一个实施方式中,提供了这样的组合物,其用于治疗根尖、侧部或边缘牙周炎的方法中。

[0042] 本发明的第二个方面涉及在受试者中的牙齿治疗的方法,优选牙髓治疗或牙周治疗,所述方法包括如之前本文中定义的组合物的使用或应用。如可由上文推断的,优选本方法涉及治疗和/或预防根尖、侧部或边缘牙周炎;治疗和/或预防齿龈炎;治疗和/或预防种植体周围炎;治疗和/或预防口腔感染。本发明特别优选的实施方式涉及根管治疗的

方法。如本领域的技术人员应理解的,本发明的治疗方法中进行的特定步骤将部分地取决于该方法的具体(exact)目标和性质(nature)。

[0043] 在第一个优选的实施方式中,提供了一种用于治疗和 / 或预防口腔感染的方法,口腔感染包括齿龈炎、种植体周围炎和牙周炎,其中该方法包括以一定量的冲洗液清洗受感染的牙齿组织或处于受感染的风险中的牙齿组织,优选整个口腔,该清洗液包括在任何上文中定义的组合物。典型地,本方法包括在治疗期间重复冲洗,优选至少两次,更优选至少三次,最优选至少 4 次。在特别优选的实施方式中,提供了预防性治疗,其中该方法包括冲洗处于受感染的风险中的牙齿组织,优选整个口腔,至少每月一次,更优选至少每两周一次,更优选至少每周一次,更优选至少两次,更优选至少每周四次,例如每日一次或两次。在本发明范围内确定最佳治疗方案在训练有素的医疗专业人员的技能范围内。

[0044] 在第二个优选的实施方式中,提供了根管治疗的方法,例如治疗根尖或侧部牙周炎,其中该方法包括以下步骤:i)机械打开并扩大根管的空间,从所述根管空间中去受感染的牙髓(pulp);ii)通过用冲洗液冲洗根管空间,对根管空间消毒;iii)用临时性或永久性填料填充根管空间,以及iv)临时或永久地密封开口;其中如在本文中之前描述的组合物用作所述冲洗液和 / 或用作所述临时性根管填充剂(root canal filler)。在优选的实施方式中,根据本发明使用冲洗液和临时性根管填充剂。而且,如本领域的技术人员已知的,在机械打开和扩大根管空间的步骤期间,有时可以使用流体,其在本文中指的是“钻孔流体(钻孔液体,drilling fluid)”或“填充流体”。根据本发明,组合物也可以用于这种特定的目的。在钻孔 / 填充期间使用本发明的高渗流体,将减少生存的微生物在这样的手术期间沿着根管移动(drag)。

[0045] 在本方法特别优选的实施方式中,使用如上文描述的高渗液体或高渗流体之后,使用蒸馏水(低渗性)。高渗性和低渗性液体和 / 或流体的使用可以交替若干次。在不希望受任何特定理论的限制的情况下,应认为这样的交替使用将进一步增强消毒的过程,因为细菌将适应高渗性和低渗性环境。适应(adaptation)花费时间和能量并且由于代谢耗尽最后将失败。

[0046] 本领域的普通技术人员已知用于治疗牙髓管(pulp canal)的技术,并且本发明特别地限制在这一点上。常规的技术包括使用由扭转的(twisted)或摇动的(grinded)正方形或三角形丝线制作的手动杆(手持杆),以各种量规的铰刀(reamer)或锉刀(file)和 / 或发动机驱动旋转铰刀或铰刀的形式。用于将冲洗液(irrigation liquid)和 / 或填料引入至根管空间中的各种技术也是可用的。虽然使用手动冲洗设备可以冲洗仪器化(instrumented)的牙齿开口,但是用于将治疗液引入至牙髓腔和髓管中的机械自动化系统也是可用的。在此之前涉及的治疗,是本领域的技术人员已知的或者将明了的。因此,本领域的技术人员将明了如何在前文的基础上实施本发明。

[0047] 本发明的第三个方面涉及试剂盒,优选牙髓或牙周试剂盒,其包括第一容器、安瓿或注射器,容纳本发明的消毒剂或抗菌组合物,连同多个选自以下构成的组中的物品(项目,items):牙髓或牙周毛刷(bristle)、铰刀(reamer)和锉刀;牙髓或牙周冲洗针或头;牙髓或牙周冲洗器;容纳牙髓或牙周治疗组合物的另外的容器、安瓿和注射器,该组合物选自根管填充剂、根管封闭剂和牙齿粘固剂(cement);以及螺旋分配器(分配螺旋器,distributing spirals),例如螺旋输送器(lentulo spirals)。在本文中涉及的各种项目,

是本领域的技术人员已知或将明了的。

[0048] 本发明的第四个方面涉及张度剂在药物制备中的应用,所述药物在牙齿治疗中用作消毒或抗菌制剂,其中所述消毒或抗菌制剂包括向药物提供高渗性的量的所述张度剂,根据已经在任何上文中定义的。

[0049] 下列实施例进一步示出了本发明的某些实施方式,而不以任何方式限制其范围。

[0050] 实施例

[0051] 实验 1

[0052] 进行这个实验以确立本发明的组合物(实验药物或“EM”)的效能(有效性),在根管治疗中使用 6.2M 的 NaCl 溶液,并与氢氧化钙(CH)比较其效能,如在本文档的背景技术中已经解释的,目前氢氧化钙是对治疗的选择。因此,实验设置是在粪肠球菌和绿脓杆菌的生物膜上将 EM 的杀菌效果与 CH 进行比较。

[0053] 材料和方法

[0054] 最近 Deng et al, 2009 描述了在此处使用的生物膜模型。简而言之,使附着在订制的不锈钢边缘上的圆形盖玻片,悬浮在接种细菌的培养基中。在这个模型中,生物膜生长是对抗重力的活性过程。

[0055] 使用双菌种生物膜,因为其对抗菌剂增加的耐性(Ozok et al. 2007, Kara et al. 2007, Adriaio et al. 2008)。将粪肠球菌选定为测试的生物体,因为报道了与持续性根尖周病(periapical pathosis)有关(Sundqvist et al. 1998, Siqueira & Rocas 2004, Stuart et al. 2006)。促进其以持续性损害存在于经填充的牙根管中的因子包括以下能力:侵入牙质管中(Haapasalo & Ørstavik 1987, Weiger et al. 2002)、耐受 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的碱性 pH (Evans et al. 2002, Nakajo et al. 2006)、经受长期饥饿(starvation)随后在血清存在下恢复(Figdor et al. 2003)、没有额外的营养素的情况下在根管中长期存活(Sedgley et al. 2005)、以及在实验室设置下容易生长。而且,已知粪肠球菌有效地从培养基中积累相容性溶质以中和(抵消)增加的渗透压(Pichereau et al. 1999)。绿脓杆菌是需氧的革兰氏阴性能动杆菌(motilerod),以其优良的产生海藻酸盐的性质而闻名。无论表面多么平滑,绿脓杆菌在 30 秒内附着(Vanhaecke et al. 1990)。虽然归类为需氧的,绿脓杆菌在厌氧条件下存活(Yoon et al. 2002)。其存在于牙根管中与失败的牙髓治疗有关(Ranta et al. 1998, Sirén et al. 1997)。

[0056] 微生物学

[0057] 使粪肠球菌 V583 和绿脓杆菌的细胞(均为临床分离物)生长,并在血琼脂平板上保持为纯培养物。在厌氧条件(80% 的 N_2 , 10% 的 H_2 和 10% 的 CO_2) 下使粪肠球菌生长,同时在空气中使绿脓杆菌生长,两者均在 37°C 下。因为它们的形状、革兰氏染色和气氛偏爱性,用 CLSM 和 CFU 区分两个菌种是十分简单的。在生物膜生长期间,培养物和生物膜的过夜生长培养基是脑心浸出物肉汤(BHI, Oxoid, Basinstoke, UK)和 BHI- 肉汤,其包括 0.5 的 BHI、50mM 的管(pipes)、5% 的蔗糖、1mM 的 Ca^{2+} 。在实验阶段,向 BHI- 肉汤中加入氯化钠(NaCl) (Merck, 达姆施塔特, 德国)以提高渗透值。使用的其他药物是 BHI- 肉汤中的饱和 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (淤浆)、2% 的次氯酸钠(NaOCl) (Merck, 达姆施塔特, 德国)、在蛋白胨水(水中的 1% 蛋白胨(Oxoid)) 中的 2% 硫代硫酸钠(STS),用于中和 NaOCl 。磷酸盐缓冲盐(PBS, Oxoid)用于洗涤阴性对照,对于 NaCl、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为中和试剂,并且用于连续稀释。

[0058] 生物膜生长

[0059] 通过使一环(loopful)细菌悬浮在 5mL 的 BHI 中并在空气中在 37° C 下培养过夜获得每一种微生物的新鲜培养物。通过 600nm 的光学密度测量估算 CFU 的数量,并且使读数与之前进行的细菌数量相关。在包含 1.5mL 的 BHI-肉汤的 24-孔多孔板(Greiner Bio-one, Frickenhausen, 德国)的孔中接种含有大约 2×10^9 个粪肠球菌的 100 μ L 和含有大约 2×10^7 个绿脓杆菌的 100 μ L。使安装在订制的不锈钢边缘中的直径为 15mm 的圆形盖玻片(MMG, 盖玻片)悬浮在 BHI-肉汤中。生物膜在盖玻片上生长,能够用共焦激光扫描显微镜(CLSM; Leica SP2-OBS)监测生物膜的生长。使生物膜稳固地附着在玻璃片上,在不破坏生物膜的情况下允许处理盖玻片。

[0060] 在暴露在药物中之前,使生物膜在盖玻片上生长 96h。在 96-h 生长之后,生物膜中的生物量增加,同时或多或少地建立了活细胞的量(Wilson et al. 1996)。每日更新肉汤。在 37° C 下于空气中接种细菌,并使生物膜生长。在 48h 之后,借助于 CLSM 证实生物膜的生长。根据生产商的使用说明,在用 Syto 9 和碘化丙啶(PI)(LIVE/DEAD[®] BacLight[™])染色之后,用 CLSM 观测带有附着的生物膜的三个盖玻片。完整的活细胞染成荧光绿,而带有破损的质膜的死亡细胞染成荧光红。之后临床证实了生物膜的生长。

[0061] 实验

[0062] 在 96h 之后,将带有附着的生物膜的盖玻片浸没在 NaCl-肉汤或 Ca(OH)₂-肉汤中持续 4h、24h、48h、72h 和 168h。阴性对照保存在 BHI-肉汤中。当适用的情况下,每日更新孵育流体。在 2% 的 NaOCl 中浸没 10 分钟充当阳性对照。在实验之后,从边缘上去除盖玻片,并将盖玻片浸没在大量中和试剂中:对于 NaCl 组、Ca(OH)₂ 组和阴性对照在 PBS 中 10 分钟,对于阳性对照在 STS 中 30 分钟。使用无菌棉签收获细菌细胞,并通过在 1.5mL 的试管(Eppendorf, Standard Micro Test Tube 3810)中激烈地上下移动棉签 50 次使其再次悬浮于 1mL 的 PBS 中。连续稀释悬浮液,并将其放置在血琼脂平板上,用于总的活性数量测定(CFU)。当在空气中生长时,粪肠球菌和绿脓杆菌的 CFU 形态类似于彼此,但是当在缺氧下孵育时,与粪肠球菌相比,绿脓杆菌的 CFU 具有明显不同的形态。菌落非常小。因此,在 37° C 下厌氧地孵育板 48h。测定了粪肠球菌(大的白色菌落)和绿脓杆菌(小的黑色菌落)两者的 CFU。然后在空气中孵育板另外 24h,以证明绿脓杆菌(大的黄绿色菌落)的存在或不存在。每一组由三个样品组成,并且每一次实验进行三次。

[0063] 共焦激光扫描显微镜 (CLSM) 分析

[0064] 为了成像,使用 Leica DM-IRB 倒置显微镜/SP2-AOBS 共焦系统。用 40x/NA 1.25HCX PLAPO 油镜(oil objective)获得图像(512×512 像素)。最终像素尺寸是 0.776 μ m。将针孔尺寸设置为 1Airy,导致大约 0.5 μ m 的 Z 分辨率。获得具有 0.3 μ m 步长的图像栈(image stack)。用 488nm 激发,并分别对 SYTO-9 用 500-550nm 检测以及对 PI 用 600-690nm 检测,同时进行 Syto-9 和碘化丙啶(PI)的激发/检测。使用图片倍增管的增益和补偿(offset),将图像调节至系统的全(8 位元)动态范围。用 Leica 软件产生 2 张图像(绿色和红色)的叠加。

[0065] 统计分析

[0066] 用对数转换 CFU 数量。通过单向方差分析(ANOVA)分析数据,以将实验组与阴性对照进行比较。显著性水平设置为 $\alpha=0.05$ 。用统计包 SPSS 版本 12 (SPSS Inc. 芝加哥, IL,

USA) 进行分析。

[0067] 结果：

[0068] 微生物学

[0069] 与对照相比,以 log CFU 减少每生物膜给出结果(图 1)。对照包括 $8.1 \pm 0.6 \log$ (CFU) 微生物每生物膜,其随时间逐渐增加。

[0070] 对于粪肠球菌和绿脓杆菌两者在 72h 之后和在 168h 之后在 NaCl 组中的 CFU 的平均 log 减少分别为 6 和 8,并且与对照相比,是统计上显著的。在 168h,对照生物膜包含平均 1.5×10^9 CFU 的绿脓杆菌,在 168h 之后不能检测到 NaCl。粪肠球菌减少至平均 40CFU。减少对于两个菌种是非常显著的($P < 0.001$),并且显示随时间的显著线性趋势。

[0071] $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 显著减少绿脓杆菌, ($P=0.02$),然而,随着增加的应用时间,减少没有增加。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 对粪肠球菌的减少是不显著的($P=0.09$)。在 72h 之后对于两个菌种检测到 log 2 减少,但是在 168h 之后,细菌恢复增长直至平均 log 1 减少。

[0072] 在 10 分钟暴露之后 NaOCl 组显示 100% 死亡。

[0073] 在实验阶段之后,用视觉观察暴露至 NaCl 的盖玻片,显示没有生物膜蚀斑(biofilm plaque)的迹象。在 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 组中,出乎意料地观测到蚀斑的钙化。在 24h 之后,所有样品显示生物膜钙化。在实验期间蚀斑的厚度增加。钙化的蚀斑稳固地附着在盖玻片上并且通过用棉签擦拭不能完全去除。

[0074] 共焦激光扫描显微镜 (CLSM)

[0075] 对照生物膜显示活细胞和死细胞的质量嵌入非晶质量(amorphous mass)中。

[0076] NaCl 影响存活的细菌细胞的生长模式。用视觉观测以及在 CLSM 图像上,没有非晶物质是可见的。因为 NaCl 组的盖玻片几乎不包含细菌,我们以更高的放大率检测盖玻片以寻找留下的细胞。

[0077] $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 影响生物膜的生长模式。细菌细胞形成集落(cluster)。在相同的样品的剖视图中这是清楚可见的。

[0078] 讨论：

[0079] 在该生物膜模型中 NaCl 对细菌载量的减少显著高于 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (图 1)。通过吸收或合成不干扰其代谢的小离子和分子恢复胞内溶质的浓度,微生物中和由于胞外的高渗值导致的水活度(water activity)的降低(Csonka 1989, Guttierrez et al. 1995, Record et al. 1998)。具有低水活度的环境是否是致命的,也部分地取决于微生物适应这些改变的能力,并且取决于它们可达(范围)之内相容性溶质的可用性。低的高渗浓度的 NaCl 足以在低相容性的溶质的培养基中杀死细菌(Lee et al. 1972, Faklam et al. 1973, Pichereau et al. 1999, Bautista et al. 2008)。很有可能牙根管系统的未清除区域堆积营养素,给予微生物抵消环境变化的机会。在本研究中,通过在加入 NaCl 或 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的 BHI-肉汤中使生物膜生长模拟未清除的根管。提供营养素也会防止饥饿导致的细菌死亡。

[0080] 储存以及合成相容性溶质是需能过程。一旦相容性溶质的储备或能源耗尽,细菌进入稳定期,随后细菌最终死亡(Csonka & Hanson 1991)。渗透现象仅依赖于溶质的浓度。溶质对溶剂的吸引持续直至已经达到特定的平衡。因此,可以预期主根管的侧部的一些效果。

[0081] 值得注意的是,在暴露至 NaCl 之后,盖玻片上的粘液的增长(生物膜)已经消失,

因此,用视觉观察,盖玻片比阴性对照和氢氧化钙组“更洁净”。用 CLSM 图像证实了非晶质的去除。显然,NaCl 对生物膜基质的结构有一些影响。此外对于生物膜增长必要的胞外聚合糖类的形成可能已经被 NaCl 的存在所干扰。众所周知,生理盐的摄入有助于清除鼻塞或鼻窦。检索了文献,探寻解释。预先使用反渗透膜,回收废水用于产生洁净的水。该产业的主要挑战是膜的清洁,废水中的大量有机碎屑堵塞(污垢, foule)了膜。使用单独的冲洗剂不能去除膜上堵塞物质。膜的清洁涉及物理和化学清洁;大块堵塞物的物理去除之后化学消毒(Ang et al. 2006)。据发现,将堵塞的膜暴露至 NaCl 溶液中致使堵塞层的破坏和去除(Lee & Elimelech 2007)。在本研究中,没有提到术语生物膜,而是着力于堵塞的污染层。作者在其实验中使用海藻酸盐模拟堵塞物。本研究中发现的结果不能推断至根管系统中的情形,但是本研究可以对 NaCl 的清洁效果给予启示。

[0082] $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 是世界范围内最常用的管内药物。Byström 和同事(1985)首先测试了在根管中 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的抗菌性能。细菌数量减少。在 1991 年 Sjögren 和合作者证实了这些发现。在受感染的根管中应用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 一周之后,没有重新获得或培养出细菌,暗示了 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 使根管无可培养的细菌。然而,应谨记根管的临床采样是由纸尖技术(paper point technique)完成的。现今普遍承认这个技术是有许多缺点的,主要是因为纸尖不可能到达整个根管壁、侧管以及在化学机械清除过程存活的微生物可以占据的位置。该纸尖采样技术给出以下良好的指示:可以从根管去除的那些不是仍然残存的那些(Sathorn et al. 2007^a)。而且,不可能培养或检测饥饿阶段的微生物。基于目前最好的可用的证据,当通过培养技术评估时,氢氧化钙从人类根管中消除细菌方面具有有限的效能(Peters et al. 2002, Waltimo et al. 2005, Sathorn et al. 2007^b)。氢氧化钙对浮游细菌具有抗菌效能(Stuart et al. 1991, Georgopoulou et al. 1993, Ferreira et al. 2007),然而,微生物位于生物膜结构中的根管系统中(Chavez de Paz 2007^a)。关于 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 对生物膜的影响的研究显示,在生物膜中粪肠球菌对 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 是有耐性的(Abdullah et al. 2005, Chavez et al. 2007^b)。 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 对微生物的作用的精确模式还没有充分阐明(Siqueira & Lopes 1999)。临床成果研究比较了用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的药物的一次性治疗(single-visit treatment)与多次性治疗(multi-visits treatment),显示在组间的治愈中没有显著差异(Weiger et al. 2000, Peters et al. 2002, Sathorn et al. 2005, Molander et al. 2007)。除了可疑的抗菌效果之外,使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 有更多缺点。生物膜的钙化是 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的不希望的副作用并且严重妨碍彻底消毒。CLSM 图像显示活性细菌聚集体嵌入至钙化的基质中。已显示粪肠球菌的生物膜在牙质上的钙化(Kishen et al. 2006)。

[0083] 氢氧化钙是弱杀菌性的(Nakajo et al. 2006),可能引起牙髓菌群向更有耐性的菌种转化。当 Ca^{2+} 可用时,一些细菌菌种产生更多胞外多糖(Lattner et al. 2003, Sarkisova et al. 2005)。在本研究的实验期间,当 1mM 的 Ca^{2+} 加入到肉汤中,同时在肉汤中没有钙时,CLSM 图像显示在盖玻片上形成活性粪肠球菌聚集体,粪肠球菌没有附着。这些研究结果可以使得使用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 作为无害的内部-访问空间修复物(inter-visit space-maintainer)可疑,但是这需要进一步研究。

[0084] 结论:

[0085] 在这个模型中,粪肠球菌和绿脓杆菌产生了可再现的和稳定的双菌种生物膜。高渗盐溶液能够在生物膜中杀死受感染的根管的菌群的典型微生物,因此适宜于用作根管消

毒剂。在这个模型中氢氧化钙是无效的。

[0086] 实验 2

[0087] 弱酸具有低于 5 的 pKa。只有当酸的质子化、不带电的形式扩散至细胞中时,可以引发弱酸胁迫。因此,药物的 pH 值必须低于细胞的 pH 值。相比于在较高的 pH 值下,在低于 5.5 的低 pH 值下需要具有较低的酸浓度,为了相同的效能,必须提高浓度。但是在 pH5.7 下,牙质和釉质发生脱盐(脱矿质)。

[0088] 证明肉汤溶液中 6.2M 的 NaCl 在双菌种生物膜上是杀菌性的。在暴露一周之后达到 10^8 减少和 10^7 减少,导致一个菌种的根除(实验 1)。应认为,较高浓度的吸湿性盐将是更强杀菌性的,导致所有菌种(包括粪肠球菌)更快和更可靠的根除。通过对细菌施加另一种附加的胁迫因子,将增加效能。

[0089] 这致使 EM 以较高的摩尔浓度发展,并且 EM 的发展刺激微生物内额外的弱酸胁迫,或两者。在初步研究中使用的相同的生物膜模型中,将根据效能筛选在各种优选的实施方式中提到的已经确定的化合物。

[0090] 材料和方法

[0091] 在悬浮于细菌接种液中的盖玻片上培养粪肠球菌和绿脓杆菌的双菌种生物膜。培养生物膜 24h。在 4h、24h、48h 期间将附着有生物膜的盖玻片浸没在实验化合物中。2% 的次氯酸钠和 BHI- 肉汤充当阳性和阴性对照。在用生理盐水(PBS)冲洗之后,从盖玻片上收获细菌细胞并将其再次悬浮于 PBS 中,连续稀释,置于血琼脂平板上,并在 37° C 下厌氧地孵育 48h 和在空气中 24h。通过测定菌落形成单位(CFU)评估杀菌效率。

[0092] 测试了碘化钠、氯化镁和甘露醇(高渗透值)和乳酸钠、乙酸钠、山梨酸钠和甲酸钠(渗透和弱酸胁迫的结合)。

[0093] 实验 3

[0094] 本研究的目的是研究牙质对 EM 的作用模式是否有抑制性影响。

[0095] 似乎冲洗溶液和局部消毒剂在牙髓中的抗菌效能在体内比在体外更差。对于在体内性能较低的原因有几个,但是显然牙质和存在于坏死的根管中的其他物质使消毒剂失活是一个因素,其对从根管系统中完全根除微生物的公认困难做出贡献。当向试管中加入微生物和抗菌剂时,在体内研究中牙质碎屑具有缓冲能力。在该体外研究中粪肠球菌的过夜培养暴露在含有和不含附加的牙质碎屑的药物中。在孵育 24h 之后,进行连续十倍稀释并在血琼脂平板上培养。对菌落计数。

[0096] 这致使证实了 EM 的不同实施方式的活性以及 EM 的不同实施方式的最佳缓冲。

[0097] 实验 4:在粪肠球菌生物膜上筛选将用作根管消毒剂的化合物的刃天青代谢试验。

[0098] 在非外科根管治疗之后,在如峡部(isthmuses)的远解剖部位仍然可以检测到在生物膜上成群的微生物。生物膜是一个宽泛的定义,其为通常在固液界面积累并装入在高度水合的胞外聚物质(EPS)的基质中的微生物聚集体。微生物细胞存在于并包围在 EPS 的自产生基质(self-produced matrix)中,因此,其不易受如,例如抗生素的抗菌作用的影响。

[0099] 本研究的目的是选择具有其最有效的浓度和 pH 的最有效的化合物,其抑制粪肠球菌的单菌种生物膜的代谢。选择了几种化合物,其饱和溶液比氯化钠具有更高的摩尔浓

度或其结合高溶解度和弱酸胁迫作用。为了证实抗生物膜的作用,在生物膜模型中筛选了这些化合物。

[0100] 在生物膜研究活力测试中,通常应用菌落形成单位(CFU)计数。这种方法是费力的、消耗时间的,并且不适合高通量筛选。此外,生物膜在平板接种之前必须有效地从表面去除和分散,而该过程的效率通常是值得怀疑的。之前已经建议了更简单的方法(例如,荧光活/死细胞染色和代谢活性指示剂),因为它们可以是高通量的并且避免生物膜脱离/分散的步骤。

[0101] 刃天青是常用的代谢活性指示剂中的一种。其为无毒的、水溶性染料(蓝色和非荧光性的),其可以由代谢活性细菌还原成水溶性试卤灵(resorufin)(粉红色和高度荧光性的)。其已经用于评估浮游细菌的活力,对胁迫和细菌污染的适应性。最近,还开发了其在微量滴定板中生物膜定量的潜能,并且从测试的六次试验,建议其作为CFU计数的最佳替换。其也成功用于在几种临床相关(不经口的)病菌的单菌种生物膜上评估消毒效能。

[0102] 材料和方法

[0103] 在本研究中使用了临床粪肠球菌株 E2 (由 Dr CM. Sedgley 馈赠) (22)。在 37° C 下,在血琼脂上厌氧地常规培养菌株。如之前描述的(17),生物膜在改良的半组合生物膜培养基(BM) (modified semidefined biofilmmedium) 中生长。培养基的 pH 为 7.0。

[0104] 生物膜在活性附着卡尔加里(Calgary)生物膜模型中生长。该模型由标准 96-孔微量滴定板和适合该孔(Nunc™, Roskilde, Denmark) 的带有相同数量的聚苯乙烯柱(栓、钉, peg)的盖(23, 24)构成。选择在平底 96-孔微量滴定板中避免潜在的细菌沉降,而对消毒治疗试验保持 96-孔的高通量优势。

[0105] 将粪肠球菌的过夜培养物稀释至加有 0.2% 蔗糖的 BM 培养基中的大约 1.2×10^8 个细胞/mL。将 200 μ L 的细胞悬浮液分配至无菌的 96-孔板中。然后用包含 96 个柱的无菌盖覆盖板。在孵育 8 小时后,将柱置于新鲜 BM (含有 0.2% 蔗糖) 中。在孵育另外 16 小时后,将带有附着的生物膜的柱转移至含有待测化合物的 96-孔板中。处理生物膜 15min、1 或 2 小时,在这之后,通过将生物膜柱浸没在中和剂(用 1% 硫代硫酸钠缓冲的蛋白胍水)中持续 5 分钟停止处理(18)。使治疗对照组也经受中和剂孵育,在这之后,在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤生物膜三次。随后,将柱浸没在含有 0.2% 蔗糖的 BM 培养基中的 0.016mg/mL 刃天青中并在 37° C 孵育。

[0106] 使用 485nm 激发和 580nm 发射波长的荧光设置,在室温下,在荧光计(Spectramax M2; Molecular Device, Sunnyvale, CA)中记录每一个孔的荧光强度(FI)。在 10 分钟和 3 小时采集读数。

[0107] 对于一次实验,需要 1 个和半个 96-孔板以测试具有 pH 6 或 7 的各种浓度的化合物。对照组为保存在 BMS 中的生物膜、保存在 PBS 中的生物膜,阴性对照,而用 2% 次氯酸钠处理的生物膜作为阳性对照组。孔的其余部分用于无菌对照。

[0108] 基于它们的高溶解度、无毒性和弱酸性质,选择测试的化合物。在本试验中,测试了甲酸钠、乙酸钠、乳酸钠和山梨酸钾。也包括氯化钠从而仅基于渗透胁迫使其效能与具有渗透和弱酸胁迫的化合物相比较。

[0109] 在一系列级联实验中,顺序地删除证明为不令人满意的化合物或浓度。

[0110] 关于治疗效能的评估

[0111] 刃天青代谢试验。如最近已经由 Jiang et al. 2011 建立的,刃天青可以用作粪肠球菌的代谢活性指示剂。当在治疗之后评估生物膜的代谢时,在 37° C 下在加入刃天青储备溶液的 BMS 中孵育生物膜,以获得最终浓度为 0.0016%。在 10 分钟(基线)或 3 小时(恰好在峰读数之前)之后,采集 FI 读数。进行四次该实验并重复两次。对于所有 FI 读数,包括 0.0016% 的刃天青与无菌 BMS 混合的背景对照组以记录背景 FI 变化,随后从每一个孔的 FI 中减去(扣除)。在治疗之后,将治疗效能计算为 FI 值相对于对照组中的值的百分数减少。在图 2 中示出了结果。

[0112] 参考文献

[0113] •Abdullah M,Ng YL,Gulabivala K,Moles DR,Spratt DA(2005)Susceptibilities of two *Enterococcus faecalis* phenotypes to root canal medications. *Journal of Endodontics* 31,30-6.

[0114] • Adrião A,Vieira M,Fernandes I,Barbosa M,Sol M,Tenreiro RP,Chambel I,Barata B,Zilhao I,Shama G,Perni S,Jordan SJ,Andrew PW,Falciro ML. (2008)Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces. *International Journal of Food Microbiology* 31,142-50.

[0115] • Ang WS, Lee S, Elimelech M(2006)Chemical and physical aspects of cleaning of organic-fouled reverse osmosis membranes. *Journal of Membrane Science* 272,198-210.

[0116] • Bautista-Gallego J, Arroyo-López FN, Durán-Quintana MC, Garrido-Fernández A(2008)Individual Effects of Sodium, Potassium, Calcium, and Magnesium Chloride Salts on *Lactobacillus pentosus* and *Saccharomyces cerevisiae* Growth. *Journal of Food Protection* 71,1412-21.

[0117] • Byström A, Claesson R, Sundqvist G(1985)The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontic & Dental Traumatology* 1,170-5.

[0118] • Chávez de Paz LE(2007^a)Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *Journal of Endodontics* 33,652-62.

[0119] • Chávez de Paz L, Bergholtz G, Dahlén G, Svensäter G(2007^b)Response to alkaline stress by root canal bacteria in biofilms. *International Endodontic Journal* 40,344-55.

[0120] • Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM(1995)Microbial Biofilms. *Annual Reviews Microbiology* 49,711-45.

[0121] • Csonka LN(1989)Physiological and Genetic Responses of Bacteria to Osmotic Stress. *Microbiological Reviews* 53,121-47.

[0122] • Csonka LN, Hanson AD(1991)Prokaryotic osmoregulation: genetics and physiology. *Annual Review of Microbiology* 45,569-606.

[0123] • Deng DM, Hoogenkamp MA, Exterkate AM, Jiang LM, Van der Sluis LWM, Ten Cate JM, Crielaard WM(2009)Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus*

faecalis Biofilm Formation. *Journal of Endodontics* 35,1249-52.

[0124] • Estrela C, Bueno MR, Leles CR, Azevedo B, Azevedo JR. Accuracy of cone beam computed tomography and panoramic periapical radiography for detection of apical periodontitis. *J Endod* 2008 ;34 :273-279

[0125] • Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D (2002) Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *International Endodontic Journal* 35,221-8.

[0126] • Faklam RR (1973) Comparison of Several Laboratory Media for Presumptive Identification of Enterococci and Group D Streptococci. *Applied Microbiology* 26,138-45.

[0127] • Fan B, Cheung GS, Fan M, Gutmann JL, Bian Z (2004) C-shaped canal system in mandibular second molars; Part I--Anatomical features. *Journal of Endodontics* 30,899-903.

[0128] • Ferreira FB, Torres SA, Rosa OP, Ferreira CM, Garcia RB, Marcucci MC, Gomes BP (2007) Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 104,709-16.

[0129] • Figdor D, Davies JK, Sundqvist G (2003) Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiology and Immunology* 18,234-9.

[0130] • Georgopoulou M, Kontakiotis E, Nakou M (1993) In vitro evaluation of the effectiveness of calcium hydroxide and paramonochlorophenol on anaerobic bacteria from the root canal. *Endodontic & Dental Traumatology* 9,249-253.

Gutierrez C, Abee T, Booth IR (1995) Physiology of the osmotic stress response in microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 28,233-44.

[0131] • Haapasalo M, Ørstavik D (1987) In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *Journal of Dental Research* 66,1375-9.

[0132] • Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 20,340-9.

[0133] • Kara D, Luppens SB, van Marle J, Özok R, ten Cate JM (2007) Microstructural differences between single-species and dual-species biofilms of *Streptococcus mutans* and *Veillonella parvula*, before and after exposure to chlorhexidine. *FEMS Microbiology Letters* 271,90-7.

[0134] • Kishen A, George S, Kumar R (2006) *Enterococcus faecalis*-mediated biomineralized biofilm formation on root canal dentine in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 77,406-15.

[0135] • Lattner D, Flemming HC, Mayer C (2003) ¹³C-NMR study of the interaction of bacterial alginate with bivalent cations. *International Journal of Biological*

Macromolecules 33,81-8.

[0136] • Lee WS(1972) Improved Procddure for Identification of Group D Enterococci with TwoNew Media. Applied Microbiolog 24,1-3.

[0137] • Lee S, Elimeleeh M(2007) Salt Cleaning of organie-fouled reverse osmosis mcmbranes. Water Research 41,1134-42.

[0138] • Lin LM, Skribner JE, Gaengler P(1992) Faetors associated with endodontic trcatmentfailures. Journal of Endodontics 18,625-7.

[0139] • Molander A, ReitC, Dahlen G, Kvist T(1998) Microbial status of root-filled teeth withapieal periodontitis. International Endodontic Journal 31,1-7.

[0140] • Molander A, Warfvinge J, ReitC, Kvist T(2007) Clinical and radiographie ovaluation ofone-and two-visit endodontic treatment of asymptomatic necrotic teeth with apicalperiodontitis :a randomized clinical trial. Journal of Endodontics 33,1145-8.

[0141] • Morfis A, Sylaras SN, Georgopoulou M, Kcmani M, Prountzos F(1994) Study of theapices of human permanent teeth with the use of a scanning electron microscope. OralSurgery, Oral Medicine and Oral Pathology 77,172-6.

[0142] • Nair PN, Henry S, Cano V(2005) Microbial status of apical root canal system of humanmandibular first molars with primary apical periodontitis after 'one-visit' endodontictreatment. Oral Surgery, Oral Medicine. Oral Pathology, Oral Radiology andEndodontics 99,231-52.

[0143] • Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, Suzuki Y, Iwami Y, Takahashi N(2006) Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen Enterococcusfaecalis. Oral Microbiology and Immunology 21,283-8.

[0144] • Özok AR, Wu MK, Luppens SB, Wesselink PR(2007) Comparison of growth andsusceptibility to sodium hypochlorite of mono-and dual-species biofilms ofFusobacterium nueleatum and Peptostreptococcus(nicromonas)micros. Journal ofEndodontics 33,819-22.

[0145] • Peters LB, Van Winkelhoff AJ, Buijs JF, Wesselink PR(2002) Effects of intrumentation, irrigation and dressing with calcium hydroxide on infection in pulplsss teeth withperiapical bone lesions. International Endodontic Journal 35,13-21.

[0146] • Piehereau V, Bourot S, Flahaut S, Blanco C, Auffray Y, Bernard T(1999) Theosmoprotectant glycine bctaine inhibits salt-induced cross-tolerance towards lethaltreatment in Enterococcus faecalis. Microbiology 145,427-35.

[0147] • Portenier I, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M(2005) The Susceptibility of Starved, Stationary Phase, and Growing Cells of Enterococcus faecalis to EndodonticMedicaments. Journal of Endodontics 31,380-6.

[0148] • Ranta K, Haapasalo M, Ranta H(1988) Monoinfection of root canal with

Pseudomonasaeruginosa. *Endodontics & Dental Traumatology* 4,269-72.

[0149] • Record MT Jr, Courtcnay ES, Caylcy DS, Guttman HJ(1998)Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water. *Trends in Biochemical Sciences* 23,143-8.

[0150] • Sarkisova S, Patrauchan MA, Berglund D, Nivens DE, Frahclin MJ(2005) Calcium-induced virulence factors associated with the extracellular matrix of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of Bacteriology* 187,4327-37.

[0151] • Sathorn C, Parashos P, Messer HH(2005) Effectiveness of single-versus multiple-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal* 38, 347-55.

[0152] • Sathorn C, Parashos P, Messer HH(2007^a) How useful is root canal culturing in predicting treatment outcome? *Journal of Endodontics* 33,220-5.

[0153] • Sathorn C, Parashos P, Messer HH(2007^b) Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *International Endodontic Journal* 40,2-10.

[0154] • Sedgley CM, Lennan SL, Appelbe OK(2005) Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. *International Endodontic Journal* 38,735-42.

[0155] • Seltzer S, Bender IB, Smith J, Freedman I, Nazimov H(1967) Endodontic failures—analysis based on clinical, roentgenographic, and histologic findings I & II *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 23,500-30.

[0156] • Siqueira JF Jr, Lopes HP(1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International Endodontic Journal* 32, 361-9. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2004) Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 97,85-94.

[0157] • Sirén EK, Haapasalo MP, Ranta K, Salmi P, Kerosuo EN(1997) Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigations. *International Endodontic Journal* 30,91-5.

[0158] • Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G (1991) The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *International Endodontic Journal* 24,119-25.

[0159] • Sperber WH(1983) Influence of water activity on foodborne bacteria—a review. *Journal of Food Protection* 46,142-50.

[0160] • Stuart KG, Miller CH, Brown CE Jr, Newton CW(1991) The comparative antimicrobial effect of calcium hydroxide. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 72,101-4.

[0161] • Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB(2006) *Enterococcus faecalis*:

Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *Journal of Endodontics* 32,93-8.

[0162] • Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U (1998) Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 85,86-93.

[0163] • Vanhaecke E, Remon JP, Moors M, Raes F, De Rudder D, Van Peteghem A (1990) Kinetics of *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion to 304 and 316-L Stainless Steel: Role of Cell Surface Hydrophobicity. *Applied Environmental Microbiology* 56, 788-95.

[0164] • Vertucci FJ (1984) Root canal anatomy of the human permanent teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine and Oral Pathology* 58,589-99.

[0165] • Waltimo R, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D (2005) Clinical Efficacy of Treatment Procedures in Endodontic Infection Control and One Year Follow-Up of Periapical Healing. *Journal of Endodontics* 31,863-6.

[0166] • Watnick P, Kolter R (2000) Biofilm, City of Microbes. *Journal of Bacteriology* 182,2675-9.

[0167] • Weiger R, Rosendahl R, Löst C (2000) Influence of calcium hydroxide intracanal dressing on the prognosis of teeth with endodontically induced periapical lesions. *International Endodontic Journal* 33,219-26.

[0168] • Weiger R, de Lucena J, Decker HE, Löst C (2002) Vitality status of microorganisms in infected human root dentine. *International Endodontic Journal* 35,166-71.

[0169] • Wilson M, Patel H, Fletcher J (1996) Susceptibility of biofilms of *Streptococcus sanguinis* to chlorhexidine gluconate and cetylpyridinium chloride. *Oral Microbiology and Immunology* 11,118-92.

[0170] • Wu MK, Roris A, Barkis D, Wesselink PR (2000) Prevalence and extent of long oval canals in the apical third. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* 89,739-43.

[0171] • Wijnker JJ, Koop G, Lipman LJA (2006) Antimicrobial properties of salt (NaCl) used for the preservation of natural casings. *Food Microbiology* 23, 657-62.

[0172] • Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, Ochsner UA, Parvatiyar K, Kamani MC, Allen HL, DeKievit RE, Gardner PR, Schwab T, Rowe JJ, Iglewski BH, McDermott TR, Mason RP, Wozniak DJ, Hancock REW, Parsek MR, Noah TL, Boucher RC, Hassett DJ (2002) *Pseudomonas aeruginosa* Anaerobic Respiration in Biofilms: Relationships to Cystic Fibrosis Pathogenesis. *Developmental Cell* 3,593-603.

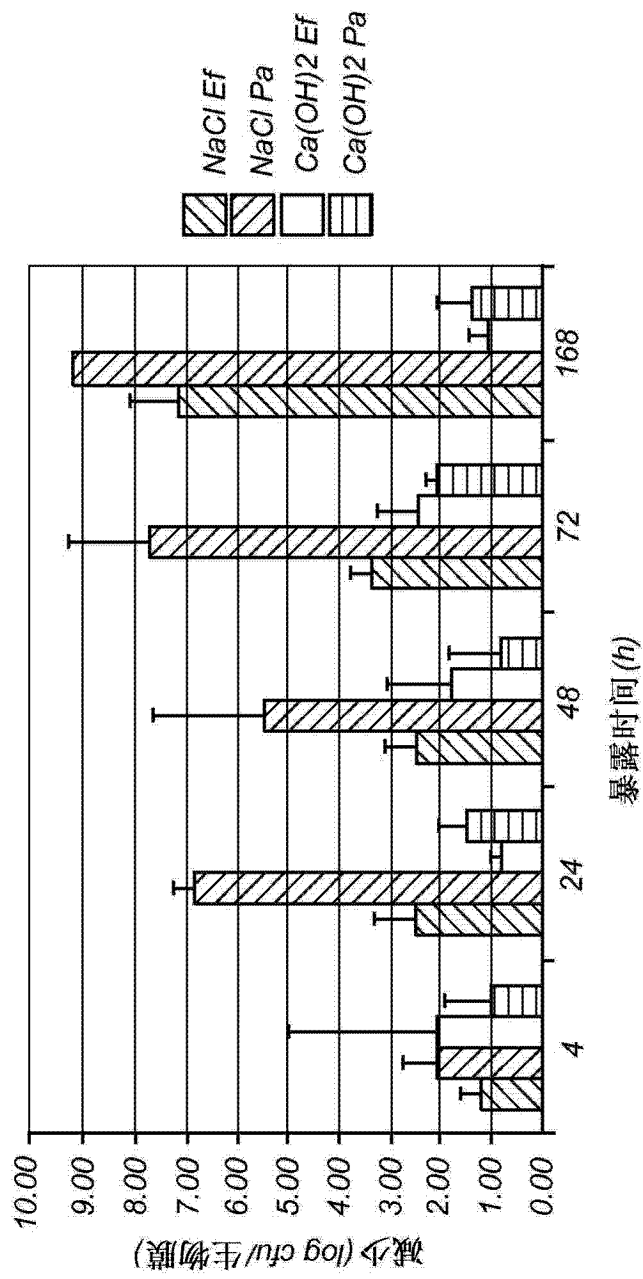


图 1

