



คุณสมบัติของสารผสมคลอร์เฮกซิดีน, อะเล็กซิดีน หรือออกทินิดีน  
กับโพลอกซาเมอร์ 407 ศึกษาในหลอดทดลอง

**Properties of Mixtures of Chlorhexidine, Alexidine or Octenidine**

**Contained in Poloxamer 407 *In Vitro* Study**

ศิรยา ศิลปรัสมิ์

**Siraya Sinlaparatsamee**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา  
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก  
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the**

**Degree of Master of Science in Oral Health Sciences**

**Prince of Songkla University**

**2561**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



คุณสมบัติของสารผสมคลอร์เฮกซิดีน, อะเล็กซิดีน หรือออกทินิดีน

กับโพลอกซาเมอร์ 407 ศึกษาในหลอดทดลอง

**Properties of Mixtures of Chlorhexidine, Alexidine or Octenidine**

**Contained in Poloxamer 407 *In Vitro* Study**

ศิรยา ศิลปรัสมิ์

**Siraya Sinlaparatsamee**

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the**

**Degree of Master of Science in Oral Health Sciences**

**Prince of Songkla University**

**2561**

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์      คุณสมบัติของสารผสมคลอโรเฮกซีดีน, อะเลกซีดีน หรือออกทีนิติน กับ  
โพลอกซาเมอร์ 407 ศึกษาในหลอดทดลอง

ผู้เขียน              นางสาวศรียา ศิลปรัสมิ

สาขาวิชา            วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)	.....ประธานกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชนิดา ศรีสุวรรณ)
.....	.....กรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	.....กรรมการ
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวณีน ธรรมสิทธิ์บุรณ์)	(ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)
.....	.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร วรกุล)	(รองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร วรกุล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์  
สุขภาพช่องปากประยุกต์

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งแสง)  
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(3)

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(ศาสตราจารย์ ดร.รวิ เตียรไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิรษา ศิลปรัมย์)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ  
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวศิรยา ศิลปรัสมิ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	คุณสมบัติของสารผสมคลออร์เฮกซิดีน, อะเล็กซิดีน หรือออกทินิดีน กับ โพลอกซาเมอร์ 407 ศึกษาในหลอดทดลอง
ผู้เขียน	นางสาวศรียา ศิลปรัสมิ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ปีการศึกษา	2560

### บทคัดย่อ

ความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟันมีสาเหตุจากการติดเชื้อระยะยาว (persistent infection) และติดเชื้อซ้ำในคลองรากฟัน (secondary infection) เชื้อที่สัมพันธ์กับความล้มเหลวที่เกิดขึ้นคือเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส (*Enterococcus faecalis*) และ เชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*Candida albicans*) ปัจจุบันสารในกลุ่ม bisbiguanide ที่นำมาใช้เพื่อกำจัดเชื้อกลุ่มนี้คือ คลออร์เฮกซิดีน (Chlorhexidine, CHX) แต่ยังมีข้อจำกัดไม่สามารถใช้ร่วมกับโซเดียมไฮโปคลอไรด์ (NaOCl) ซึ่งเป็นสารที่นิยมใช้ในการล้างคลองรากฟันได้ สารในกลุ่ม bisbiguanide ตัวอื่น ๆ ที่นำมาใช้ในทางด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพได้แก่ อะเล็กซิดีน (Alexidine, ALX) และ ออกทินิดีน (Octenidine, OCT) ดังนั้นการนำสารกลุ่มนี้มาพัฒนาเป็นยาใส่ในคลองรากฟันเพื่อเป็นทางเลือกในการลดข้อจำกัดของการใช้ CHX ร่วมกับ NaOCl จำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของสารก่อนนำมาใช้จริงในทางคลินิก วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ การศึกษาคุณสมบัติในการต้านต่อเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) ในสภาวะ planktonic ต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ของสาร CHX, ALX และ OCT ด้วยวิธี Agar diffusion และ Broth microdilution ซึ่งประกอบด้วย การหาค่าปริมาณต่ำสุดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง (minimum inhibition concentration, MIC) และปริมาณต่ำสุดที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (minimum bactericidal concentration, MBC) และเลือกสารระหว่าง ALX และ OCT มาเปรียบเทียบกับ CHX ในการศึกษาคุณสมบัติในด้านอื่น ๆ ประกอบด้วย การศึกษาประสิทธิภาพในการต้าน biofilm ต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ด้วยวิธี MTT assay ศึกษาการปลดปล่อยสาร (drug releasing) เมื่อนำมาผสมกับ P407 โดยหาอัตราส่วนผสมของสาร P407 ที่เหมาะสม ศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารในรูปแบบของสารผสมกับ P407 และ ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู (cytotoxicity) ผลการศึกษาพบว่าสารทุกชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อในรูปแบบ planktonic ทั้ง *E. faecalis* และ *C. albicans* สังเกตได้จากโซนยับยั้งของสารทั้ง 3 ชนิด ทั้งนี้ OCT ให้ค่า MIC และ MBC ที่ต่ำที่สุดทั้งในเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* (*E. faecalis*: 0.24 และ 0.49 µg/ml, *C. Albicans*: 0.29 และ 0.49 µg/ml ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับ

ALX (*E. faecalis* :2.44 และ 4.30  $\mu\text{g/ml}$ , *C. Albicans*: 2.44 และ 4.39  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) และ CHX (*E. faecalis*: 4.88 และ 9.77  $\mu\text{g/ml}$ , *C. Albicans*: 9.77 และ 19.53  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ) การทดสอบประสิทธิภาพในการต้าน biofilm OCT มีประสิทธิภาพในการต้าน biofilm ของเชื้อทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า CHX ทั้งการยับยั้งการสร้าง และการต้านเชื้อที่อยู่ในสภาวะ biofilm โดยค่าต่ำสุดในการยับยั้งการสร้าง biofilm และ การกำจัดเชื้อที่อยู่ในสภาวะ biofilm ต่อเชื้อ *E. faecalis* คือ 62.5 และ 125  $\mu\text{g/ml}$  และสำหรับเชื้อ *C. albicans* คือ 62.5 และ 312.5  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ สัดส่วน P407 ที่เหมาะสมในการนำไปเตรียมเป็นสารผสม CHX และ OCT คือ 16% w/w สารผสม P407 กับ CHX และ OCT เมื่อพิจารณาจากค่า  $R^2$  สารทั้ง 2 ชนิดและทุกความเข้มข้นมีรูปแบบการปลดปล่อยเป็นไปตามแบบจำลองของ Higuchi มากที่สุด และมีกลไกการปลดปล่อยร่วมกันสองรูปแบบคือ diffusion และ erosion ความเป็นพิษต่อเซลล์ สารทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อช่องปาก L929 โดย OCT ทุกความเข้มข้นและทุกช่วงเวลา ที่ใช้ทดสอบให้ค่าความเป็นพิษที่ต่ำกว่า CHX เล็กน้อย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า OCT สามารถนำมาใช้เป็นทางเลือกในการกำจัดเชื้อในคลองรากฟันได้

<b>Thesis Title</b>	Properties of Mixtures of Chlorhexidine, Alexidine or Octenidine Contained in Poloxamer 407 <i>In Vitro</i> Study
<b>Author</b>	Miss Siraya Sinlaparatsamee
<b>Major Program</b>	Oral Health Sciences
<b>Academic Year</b>	2017

### ABSTRACT

Failure in endodontic treatment is commonly caused by persistent or secondary infection. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) and *Candida albicans* (*C. albicans*) have been shown to be related to failed cases. Chlorhexidine (CHX) is bisbiguanide agent that used for eliminating of these two pathogens. The limitation of CHX is the interaction with Sodium hypochlorite (NaOCl), causing gold standard irrigant in root canal treatment. Recently, other bisbiguanide agents have been applied in medical field consists of Alexidine (ALX) and Octenidine (OCT). Therefore, these agents can be developed as an alternative for reducing the limitation of CHX. The aim of this *in vitro* study was carried out to study the antimicrobial efficacy of 3 bisbiguanide agents (CHX, ALX and OCT) against these two pathogens. The antimicrobial activity was performed by using agar diffusion and broth microdilution methods. Minimum inhibition concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) were determined. Antibiofilm efficacy was examined by using MTT assay. Drug releasing was studied for the suitable proportion of poloxamer 407 (P407) containing in these bisbiguanide agents by measuring gelation temperature and to study the model of drug releasing. The toxicity of these bisbiguanide agents to fibroblast cell (L929) was tested by MTT assay. The results revealed that both *E. faecalis* and *C. albicans* were susceptible to all tested agents with variable degrees of inhibition zone. OCT gave the lowest action MIC and MBC against *E. faecalis* and *C. albicans* (*E. faecalis*: 0.24 and 0.49 µg/ml, *C. Albicans*: 0.29 and 0.49 µg/ml, respectively) compared with ALX (*E. faecalis*: 2.44 and 4.30 µg/ml, *C. Albicans*: 2.44 and 4.39 µg/ml, respectively), and CHX (*E. faecalis*: 4.88 and 9.77 µg/ml, *C. Albicans*: 9.77 and 19.53 µg/ml, respectively). OCT was more efficient than CHX in inhibiting and eradicating of biofilms. The minimum concentrations of OCT in biofilm inhibition and eradication against *E. faecalis* were 62.5 and 125 µg/ml, *C.*



*albicans* were 62.5 and 125  $\mu\text{g/ml}$ . The appropriate proportion of P407 with CHX and OCT was 16%. The kinetic of 16% P407 with all concentration of CHX and OCT was followed by Higuchi's model and the releasing mechanism analyzed by Korsmeyer-Peppas model that consisted of erosion and diffusion. All test concentrations and time intervals, OCT expressed slightly lower toxicity than CHX when tested with L929. These results suggested that OCT might be alternatively used for root canal disinfection.

## กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาและความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.วี ภิเษรไพศาล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์บุญ และรองศาสตราจารย์ ดร.นิมิตร วรกุล ผู้ให้คำปรึกษา อำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือสถานที่ และคำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์เพื่อให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุน การทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณหน่วยบัณฑิตศึกษาและนักศึกษาหลังปริญญาสาขาวิชาเอ็น โดคอนต์ ภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

ขอขอบพระคุณนายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดนครศรีธรรมราช ผู้อำนวยการโรงพยาบาลมหาราช นครศรีธรรมราช ที่สนับสนุนทุนการศึกษาต่อของข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนุชิต ชินาจริยวงศ์ ผู้ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์สถิติ และให้คำแนะนำที่ดีในการเขียนรายงานวิทยานิพนธ์

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และทุกคนในครอบครัวที่คอยสนับสนุนและเป็นกำลังใจแก่ข้าพเจ้าเสมอมา ขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา ชี้แนะและให้กำลังใจทั้งด้านการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์เสมอมา คุณงามความดีที่เกิดจากการวิจัยครั้งนี้ ขอมอบแด่บุพการีและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษาของข้าพเจ้า

ศรียา ศิลปรัสมิ์

## สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการแผนภาพ	(13)
สัญลักษณ์และคำย่อ	(14)
บทที่	
1. บทนำ	1
- บทนำตั้งเรื่อง	1
- การทบทวนวรรณกรรม	3
- วัตถุประสงค์	12
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน	13
3. ผลการวิจัย	26
4. บทวิจารณ์	38
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	44
เอกสารอ้างอิง	46
ภาคผนวก	53
ประวัติผู้เขียน	61

## รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ชนิดของ poloxamer	10
2 ปริมาณสาร Chlorhexidine digluconate (CHX-DG) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	15
3 ปริมาณสาร สาร Alexidine dihydrochloride (ALX-DH) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Alexidine (ALX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	15
4 ปริมาณสาร Octenidine dihydrochloride (OCT-DH) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	16
5 ชนิดและความเข้มข้นของสารที่ผสม poloxamer 407 ในสัดส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้หาค่า gelation temperature	21
6 ฤทธิ์ของสาร Chlorhexidine (CHX), Alexidine (ALX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> และ <i>Enterococcus faecalis</i> ด้วยวิธี agar diffusion	26
7 ฤทธิ์ของสาร Chlorhexidine (CHX), Alexidine (ALX) และ octenidine (OCT) ในการยับยั้งเชื้อ <i>Candida albicans</i> และ <i>Enterococcus faecalis</i> ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC, $\mu\text{g/ml}$ ) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC, $\mu\text{g/ml}$ )	28
8 ค่า $R^2$ และค่า K ในแต่ละแบบจำลอง ของสารผสมที่ปลดปล่อยออกมา	35
9 ค่า n ของสารผสมแต่ละชนิดที่ปลดปล่อยออกมาตามแบบจำลองของ Korsmeyer-Peppas	36
10 เปรอ์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> และ <i>Candida albicans</i> (biofilm inhibition $\leq 100$ )	57
11 เปรอ์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการต้านเชื้อที่อยู่ในรูป biofilm ต่อเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> และ <i>Candida albicans</i> (biofilm eradication $\leq 100$ )	57
12 ค่าเฉลี่ย T sol-gel ( $^{\circ}\text{C}$ ) ของโพลอกซามาเมอร์เจลที่ผสม Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	58

**รายการตาราง (ต่อ)**

<b>ตารางที่</b>		<b>หน้า</b>
13	ร้อยละของ cell viability ของสาร Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 ในระยะเวลาต่าง ๆ	60
14	ร้อยละของ cell viability ของสาร Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 ในระยะเวลาต่าง ๆ	60

## รายการแผนภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	โครงสร้างทางเคมีของ Chlorhexidine (CHX)	6
2	โครงสร้างทางเคมีของ Parachloroaniline (PCA)	7
3	โครงสร้างทางเคมีของ Alexidine (ALX)	8
4	โครงสร้างทางเคมีของ Octenidine (OCT)	9
5	ลักษณะโครงสร้างของ Poloxamer	10
6	ค่า Gelation temperature ของ Poloxamer 407 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	11
7	ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion ของสารทดสอบต่อเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>E. faecalis</i> ) และ <i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> )	17
8	ขั้นตอนการหาค่า gelation temperature	21
9	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>E. faecalis</i> ) และ <i>Candida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	29
10	เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งสภาวะที่เป็น biofilm ต่อเชื้อ <i>Enterococcus faecalis</i> ( <i>E. faecalis</i> ) และ <i>Canida albicans</i> ( <i>C. albicans</i> ) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	30
11	ค่า T sol-gel (°C) ของ P407 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	31
12	ค่า T sol-gel (°C) ของสารผสม P407 กับ Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	32
13	ค่า T sol-gel (°C) ของสารผสม P407 กับ Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่างๆ	32
14	ปริมาณและเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Chlorhexidine (CHX) ของสารผสม P407 16 % w/w ณ เวลาต่างๆ	33
15	ปริมาณและเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Octenidine (OCT) ของสารผสม P407 16 % w/w ณ เวลาต่างๆ	34
16	ค่าร้อยละของ cell viability ของ Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ณ ความเข้มข้นต่างๆ	37

**สัญลักษณ์และคำย่อ**

CHX	= Chlorhexidine
ALX	= Alexidine
OCT	= Octenidine
SDW	= Sterile distilled water
CHX-DG	= Chlorhexidine digluconate
ALX-DH	= Alexidine dihydrochloride
OCT-DH	= Octenidine dihydrochloride

## บทที่ 1

### บทนำ

#### บทนำต้นเรื่อง

ฟันเป็นอวัยวะหนึ่งที่มีความสำคัญในการบดเคี้ยวอาหาร หากมีการติดเชื้อหรือได้รับอุบัติเหตุบริเวณฟัน โดยไม่ได้ทำการรักษาต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดการติดเชื้อในโพรงประสาทและคลองรากฟัน การติดเชื้อบริเวณคลองรากฟันมีสาเหตุจากเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันอักเสบใน ระยะเริ่มต้น หากปล่อยทิ้งไว้ทำให้เนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟันตายและเกิดพยาธิสภาพบริเวณปลายรากฟัน การรักษาคลองรากฟันจึงเป็นวิธีหนึ่งเพื่อป้องกันไม่ให้สูญเสียฟันธรรมชาติ และใช้งานในการบดเคี้ยวได้อย่างมีประสิทธิภาพ ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการรักษาคลองรากฟันมีไว้เพื่อเก็บฟันธรรมชาติให้นานที่สุดเท่าที่จะทำได้ การกำจัดเชื้อภายในคลองรากฟันด้วยการใช้เครื่องมือ (mechanical instrumentation) ร่วมกับการล้างคลองรากฟัน (irrigation) ด้วยสารที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อการกำจัดเชื้อที่อยู่อย่างหนาแน่นและอาศัยอยู่ในบริเวณที่ซับซ้อนทางกายวิภาคของคลองรากฟัน ดังนั้นการใช้สารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อใส่ในคลองรากฟัน (intracanal medication) เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตและกำจัดเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟันระหว่างการนัดหมายกับทันตแพทย์จึงเป็นสิ่งจำเป็น สารที่นิยมใส่ในคลองรากฟันคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide,  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) เนื่องจากผสมง่าย ราคาถูก<sup>1</sup> และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อในคลองรากฟัน

ปัจจุบันการรักษาคลองรากฟันให้ผลสำเร็จในการรักษาที่สูงคือ 74 – 98%<sup>2,3</sup> แต่อย่างไรก็ตามยังพบอุบัติการณ์ของการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว สาเหตุหลักของความล้มเหลวคือการติดเชื้อในระยะยาว (persistent infection) และการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) เชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) เป็นเชื้อที่พบบ่อยที่สุด เนื่องจากสามารถทนอยู่ในสภาวะที่มีความเป็นเบสได้ดี<sup>4</sup> และมีระบบการนำประจุบวกเข้าสู่เซลล์ ทำให้คงระบบความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ได้ ส่งผลให้เชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล<sup>5,6,7,8</sup> นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียยังพบเชื้อราบางชนิด เชื้อรา *Candida albicans* (*C. albicans*) เป็นเชื้อราที่พบมากที่สุด<sup>9</sup> เนื่องจาก *C. albicans* ทนต่อภาวะความเป็นเบสของ  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ที่อยู่ในคลองรากฟันได้<sup>10</sup> ปัจจุบันมีการใช้สารอีกชนิดหนึ่งคือ สารคลอร์เฮกซิดีน (Chlorhexidine, CHX) ในผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อในระยะยาวและติดเชื้อซ้ำ



CHX เป็นสารต้านเชื้อที่จัดอยู่ในกลุ่ม bisbiguanide มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* แต่การใช้ CHX ในการรักษาคล่องรากฟันยังมีข้อจำกัด หากใช้ CHX ร่วมกับ โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (Sodium Hypochlorite, NaOCl) ซึ่งเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ล้างคล่องรากฟัน โดยทั่วไปนั้น ก่อให้เกิดปฏิกิริยาเป็นตะกอนสีส้ม เรียกว่า parachloroaniline (PCA)<sup>11</sup> ตะกอนนี้มีผลต่อการติดสีของเนื้อฟัน<sup>12</sup> ล้างออกยากทำให้มีผลต่อการปิดผนึกของวัสดุอุดคล่องรากฟัน<sup>13</sup> ยิ่งกว่านั้นยังมีความเป็นพิษและเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง<sup>14</sup> เพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าวจึงนำสารในกลุ่ม bisbiguanide ชนิดอื่นมาเป็นทางเลือก ปัจจุบันสารในกลุ่มนี้ที่นำมาใช้ในทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ ได้แก่ อะเล็กซิดีน (Alexidine, ALX) และ ออกทีนิน (Octenidine, OCT) มีการศึกษาว่า ALX ฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ได้ดีกว่า CHX<sup>15</sup> ส่วน OCT เป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบบกว้าง (broad spectrum) สามารถยับยั้งได้ทั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อรา *C. albicans*<sup>16</sup> แต่ยังไม่มีการศึกษาใดเปรียบเทียบประสิทธิภาพและคุณสมบัติของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ได้อย่างชัดเจน

สารในกลุ่ม bisbiguanide มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อที่ดี แต่การที่สารอยู่ในรูปแบบสารละลายไม่สามารถนำมาใช้เป็นยาสำหรับใส่ในคล่องรากฟันได้ จำเป็นต้องพัฒนาสารในกลุ่ม bisbiguanide ให้คงสภาพอยู่ภายในคล่องรากฟัน และรักษาระดับความเข้มข้นของสารตลอดช่วงเวลาที่รักษา การพัฒนาให้สารกลุ่มนี้ให้อยู่ในรูปแบบของเจลจึงเป็นแนวทางที่เหมาะสม สาร Poloxamer 407 (P 407) เป็นสารชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เนื่องจากเป็นเจลเบสที่มีราคาที่ไม่สูง ใช้งานได้ง่าย ไม่มีความเป็นพิษ และยังมีลักษณะพิเศษคือเป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ และเปลี่ยนสถานะเป็นเจลกึ่งแข็งเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นหากนำมาใช้ในช่องที่อุณหภูมิต่ำช่วยให้สารในกลุ่มนี้ไหลผ่านเข้าสู่คล่องรากฟันได้ง่ายและเมื่ออยู่ในร่างกายซึ่งอุณหภูมิสูงขึ้น<sup>17</sup> สารผสม P 407 เปลี่ยนสถานะเป็นเจล ทำให้สามารถคงสภาพอยู่ในคล่องรากฟันได้นาน จึงเป็นที่มาของการศึกษาครั้งนี้ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพการต้านเชื้อของสารในกลุ่ม bisbiguanide (CHX, ALX และ OCT) ในด้านคุณสมบัติของสารในกลุ่ม bisbiguanide ในการปลดปล่อยสารและเมื่อนำมาผสมกับ Poloxamer 407 (P 407) รวมทั้งความเป็นพิษของสารในกลุ่ม bisbiguanide ก่อนนำมาพัฒนาเป็นยาที่ใส่ในคล่องรากฟัน

## การทบทวนวรรณกรรม

การติดเชื้อบริเวณคลองรากฟัน สามารถแบ่งได้ตามลักษณะทางกายวิภาค ประกอบด้วย

**1. Intraradicular infection** คือ การที่เชื้อสามารถดำรงอยู่ได้ภายในคลองรากฟัน สามารถแยกย่อยการติดเชื้อได้ออกเป็น 3 ลักษณะตามระยะเวลาที่เชื้อเข้าไปสู่คลองรากฟัน ดังนี้

**a) Primary intraradicular infection** เชื้อแบคทีเรียที่พบเป็นเชื้อที่เข้าสู่คลองรากฟัน เป็นสาเหตุเบื้องต้นทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อในโพรงประสาทฟัน ซึ่งมีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียทั้งชนิดแกรมลบหลายชนิด ได้แก่ *Fusobacterium*, *Dialister*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Tannerella*, *Treponema*, *Campylobacter* และ *Veillonella* และชนิดแกรมบวก ได้แก่ *Parvimonas*, *Filifactor*, *Pseudoramibacter*, *Actinomyces*, *Peptostreptococcus*, *Streptococcus*, *Pripionibacterium* และ *Eubacterium* ปัจจุบันมีการศึกษาเกี่ยวกับเชื้อที่อยู่ในโพรงประสาทฟันมากขึ้น และใช้เทคนิคที่ทันสมัยมากขึ้น ทำให้พบเชื้อใหม่ๆ เพิ่มขึ้น ในฟันที่เนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันตายร่วมกับมีรอยโรคปลายรากฟันและไม่มีอาการปวด มักพบเชื้อ *Dialister invisus* และในกรณีที่ติดเชื้อในโพรงประสาทฟันมีพยาธิสภาพปลายรากฟันและมีอาการมักพบเชื้อ *Treponema denticola*<sup>18</sup> แต่อย่างไรก็ตามอุบัติการณ์การพบเชื้อในคลองรากฟันแบบ primary infection นั้นยังมีความหลากหลายขึ้นอยู่กับการศึกษาและเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบ<sup>18, 19</sup> สารใช้ล้างคลองรากฟันกลุ่มนี้ได้เป็นอย่างดีมีประสิทธิภาพและใช้กันอย่างแพร่หลายคือ NaOCl

**b) Secondary infection** เชื้อแบคทีเรียที่พบไม่ใช่เชื้อแบคทีเรียกลุ่มแรก แต่เป็นเชื้อแบคทีเรียที่เข้ามาภายหลังหรือระหว่างการรักษาคคลองรากฟันที่เกิดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย<sup>19</sup> เช่น มีการปนเปื้อนของเชื้อ *E. faecalis* ที่อยู่ในน้ำลายแล้วเข้าไปในคลองรากฟันขณะที่ทำการรักษา

**c) Persistent infection** เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการติดเชื้อแบบถาวร อาจเป็นเชื้อที่ทำให้เกิด primary infection หรือ secondary infection ที่ยังคงมีชีวิตอยู่ในคลองรากฟัน ภายหลังจากการรักษาคคลองรากฟัน และสามารถทนต่อสารต้านเชื้อที่ใช้ในระหว่างการรักษา ทั้ง secondary และ persistent infection นั้นเป็นสาเหตุสำคัญสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การรักษาคคลองรากฟันเกิดความล้มเหลว (endodontic treatment failure) ซึ่ง *E. faecalis* เป็นเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดในกรณีการรักษาคคลองรากฟันล้มเหลว<sup>19</sup> นอกจากนี้ยังพบเชื้อรา *C. albicans* อีกด้วย<sup>19</sup>

**2. Extraradicular infection** ถึงแม้ว่าส่วนใหญ่เชื้อโรคที่อยู่ภายในคลองรากฟันมีผลทำให้เกิดพยาธิสภาพบริเวณปลายรากฟัน การรักษาคลองรากฟันโดยการกำจัดเชื้อภายในคลองรากฟันให้ผลการรักษาที่ประสบความสำเร็จสูง เนื่องจากเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากเชื้อโรค แต่อย่างไรก็ตามเชื้อบางชนิดสามารถบุกรุกเข้าไปยังเนื้อเยื่อบริเวณปลายรากฟันได้ จึงเป็นสาเหตุหนึ่งของการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว ส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Actinomyces* และเชื้อ *Propionibacterium propionigum* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถต้านต่อกระบวนการ phagocytosis ได้<sup>19</sup> ดังนั้นหากเกิด persistent infection จาก extraradicular infection การรักษาคลองรากฟันซ้ำร่วมกับการทำ endodontic microsurgery จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของการรักษาพยาธิสภาพของฟันที่ประสบความสำเร็จ<sup>20</sup>

เชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุ ให้เกิดพยาธิสภาพในการรักษาคลองรากฟัน มีทั้งที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา

### เชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus faecalis*

*Enterococcus* species เป็นเชื้อกลุ่ม facultative anaerobes แกรมบวก รูปร่างกลม หรือรี เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนได้ กระจายตัวทั่วไปในธรรมชาติ ในภาวะที่ขาดออกซิเจนมีการเจริญเติบโตแบบ fermentation<sup>21</sup> *E. faecalis* เป็นเชื้อประจำถิ่น ในรอยโรค secondary infection และ persistent endodontic infection<sup>22, 23</sup> ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกระบวนการที่เชื้อชนิดนี้ที่ทำให้รอยโรคบริเวณปลายรากฟันไม่หาย แต่มีสมมุติฐานที่เป็นไปได้<sup>24</sup>

a) เป็น primary colonizer ในฟันที่มีการติดเชื้อของระบบคลองรากฟัน และเชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตอยู่ได้แม้ได้รับการรักษาคลองรากฟันแล้ว เนื่องจากเป็นเชื้อที่ดำรงชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะเป็นเบสสูง

b) เป็นเชื้อฉวยโอกาสที่เข้ามาภายหลังการรักษาคลองรากฟันแล้ว (opportunistic canal invaders) มีหลายการศึกษาพบปริมาณ *E. faecalis* ต่ำในการติดเชื้อในคลองรากฟันครั้งแรก (primary infection) และแทบไม่ปรากฏในรอยโรคฟันผุ ในการเก็บน้ำลายมนุษย์มาทดสอบหา *E. faecalis* ตรวจพบ *E. faecalis* ร้อยละ 21.8 และไม่ปรากฏในผู้ที่มีสุขภาพช่องปากที่ดี แสดงให้เห็นว่า *E. faecalis* ไม่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่น ที่ปรากฏอยู่ตลอดเวลาในช่องปาก<sup>24</sup>

เชื้อ *E. faecalis* สามารถเจริญเติบโตในคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาแล้วเนื่องจาก

a) สามารถคงอยู่ในสภาวะที่ขาดอาหารได้เป็นเวลานาน โดยสามารถคงอยู่ในสภาวะที่ขาดอาหาร (glucose-limited และ phosphate-limited media) นานกว่า 4 เดือน หากมีชีรุ่มออกมาจากกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และเอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) เพียง 1% เชื้อสามารถมีชีวิตและเจริญเติบโตได้<sup>25</sup>

b) สามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟัน (dentinal tubule)<sup>22, 5, 26</sup> และผลิตเอนไซม์ serine protease gelatinase และ collagen-binding protein เพื่อการยึดเกาะกับ type I collagen ในเนื้อฟัน หากมีส่วนประกอบของชีรุ่มจากเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน เป็นปัจจัยช่วยส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะกับ collagen ได้ดีขึ้น ในขณะที่ชีรุ่มทำหน้าที่ยับยั้งการยึดเกาะของเชื้อ *S. gordonii* และ *S. mutans*<sup>22</sup>

c) สามารถสร้างไบโอฟิล์ม (biofilm) ทำให้ต้านการเกิด phagocytosis ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ ยา หรือสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ได้มากกว่าปกติถึง 1,000 เท่า โดย *E. faecalis* ในคลองรากฟันสามารถสร้างเป็น biofilm ได้ในระยะเวลาเพียง 2 วัน แม้จะมีการใส่สารต้านเชื้อ (intracanal medication) หรือไม่ก็ตาม และเมื่อเวลาผ่านไป 86 วัน เชื้อยังคงสามารถมีชีวิตอยู่ได้<sup>27</sup>

d) สามารถทนต่อสภาวะเป็นเบสสูงเนื่องจาก *E. faecalis* คงระดับความเป็นกรดเบสภายในเซลล์ให้เกิดความสมดุลได้ด้วยกระบวนการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ (proton pump) ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้ค่าระดับความเป็นกรดเบสในเซลล์ต่ำลง สอดคล้องกับที่  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกำจัดเชื้อชนิดนี้<sup>4</sup>

### เชื้อรา *Candida albicans*

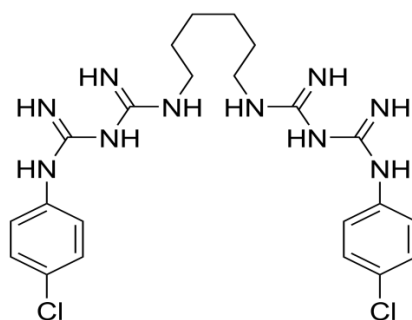
นอกจากเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อและเกิดพยาธิสภาพบริเวณปลายรากฟัน เชื้อราเป็นจุลินทรีย์อีกกลุ่มที่เป็นสาเหตุดังกล่าวด้วย ในคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาแล้วยังมีเชื้อราในกลุ่ม *Candida* ถึง 18%<sup>19</sup> Waltimo และคณะ (1999) ได้ศึกษาชนิดของเชื้อที่เกิดขึ้นภายในของรากฟันของผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อซ้ำ (secondary infection) และติดเชื้อในระยะยาว (persistent infection) จำนวนทั้งหมด 692 ราย มีเชื้อราคิดเป็น 47 ราย และเป็นเชื้อรา *Candida albicans*

(*C. albicans*) มากที่สุด<sup>10</sup> Sundqvist และคณะ (1998) รายงานว่า *C. albicans* สามารถบุกรุกเข้าไปใน dentinal tubules ได้แต่ช้ากว่า *E. faecalis* และ ทนต่อ  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ <sup>9</sup>

สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม bisbiguanide ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วย Chlorhexidine (CHX), Alexidine (ALX) และ Octinidine (OCT)

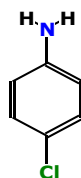
### Chlorhexidine (CHX)

CHX เป็นสารกลุ่ม bisbiguanide ที่มีประจุบวก มีสูตร โครงสร้างดังรูปที่ 1 มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แบบ broad spectrum มีผลทำลายองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียที่เป็นไขมัน ที่ความเข้มข้นต่ำ CHX มีฤทธิ์ยับยั้งแบบ bacteriostatic เนื่องจากมีผลเฉพาะบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ และที่ความเข้มข้นสูงมีฤทธิ์ bactericidal เนื่องจากมีผลทำให้เซลล์เชื้อแบคทีเรียแตกกลายเป็นตะกอนของโปรตีน และกรดนิวคลีอิก<sup>10</sup> CHX มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ดี<sup>5, 6, 9, 26</sup> การศึกษาของ Gomes และคณะ (2001) ในห้องปฏิบัติการได้เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ของสาร NaOCl ความเข้มข้น 0.5%, 1.0%, 2.5%, 4.0% และ 5.25% และสาร CHX ความเข้มข้น 0.2%, 1.0% และ 2.0% ในรูปแบบสารละลายและเจลเบส สารทุกชนิดที่ทดสอบมีความสามารถในการกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ โดยระยะเวลาในการต้านเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร<sup>28</sup>



รูปที่ 1 โครงสร้างทางเคมีของ Chlorhexidine (CHX)<sup>28</sup>

CHX นอกจากมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแล้วยังมีคุณสมบัติคงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (antimicrobial substantivity) เนื่องจากโมเลกุลของ CHX เป็นประจุบวกสามารถจับกับเนื้อฟัน ดังนั้นหลังจากที่ล้าง CHX ออกไป CHX ยังคงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ<sup>29</sup> ระยะเวลาของการคงฤทธิ์มีความแตกต่างกันไปตามรูปแบบการศึกษา รูปแบบของสาร และระยะเวลาที่สารสัมผัสกับเนื้อฟัน จากการศึกษาของ White และคณะ (1997) ในห้องปฏิบัติการโดยใช้ฟันมนุษย์ให้ผลว่า การใช้ 2% CHX เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันสามารถคงฤทธิ์ไม่ต่ำกว่า 72 ชั่วโมง<sup>30</sup> ต่อมาได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการคงฤทธิ์ของ CHX ในห้องปฏิบัติการ CHX สามารถคงฤทธิ์ได้ถึง 3 สัปดาห์<sup>31</sup>, 4 สัปดาห์<sup>32</sup> และ 12 สัปดาห์<sup>33</sup> การศึกษาทางคลินิก CHX คงฤทธิ์ได้นาน 48 ชั่วโมง<sup>34</sup> นอกจากนี้ Komorowski และคณะ (2000) ได้ศึกษาจากฟันวัวด้วยการใส่ CHX ในคลองรากฟันเป็นระยะเวลา 7 วัน ทำให้ความสามารถในการคงฤทธิ์อยู่ได้ตลอดระยะเวลา 21 วัน จึงเป็นสรุปให้ใช้ CHX เป็น intracanal medication อย่างน้อย 7 วัน<sup>31</sup> ถึงแม้ว่า CHX มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่ดีแต่ไม่มีคุณสมบัติในการละลายเนื้อเยื่อเหมือนกับ NaOCl นอกจากนี้หากนำ CHX มาใช้ร่วมกับ NaOCl ยังมีข้อจำกัดเนื่องจาก CHX ทำปฏิกิริยากับ NaOCl ได้ตะกอนสีส้ม เรียกว่า parachloroaniline (PCA) PCA ทำให้เกิดการติดสีของเนื้อฟัน<sup>12</sup> ล้างออกยาก มีผลต่อการปิดผนึก (seal) ของวัสดุอุดคลองรากฟัน<sup>13</sup> มีความเป็นพิษ และเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง<sup>14</sup> PCA มีโครงสร้างดังรูปที่ 2

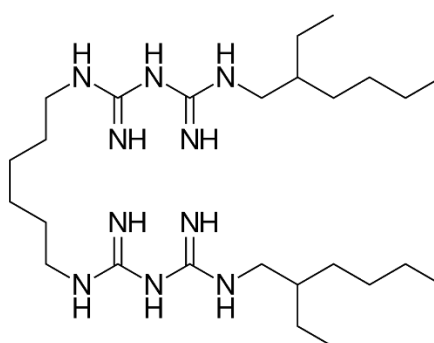


รูปที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของ Parachloroaniline (PCA)<sup>4</sup>

นอกจาก CHX ทำปฏิกิริยากับ NaOCl แล้ว CHX ยังสามารถทำปฏิกิริยากับ EDTA ซึ่งเป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการล้างคลองรากฟัน เกิดเป็นตะกอนเกลือสีขาวแต่ไม่ได้เป็นตะกอนของ PCA ตะกอนที่เกิดขึ้นนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นตะกอนชนิดใดและยังไม่ได้มีการศึกษาถึงความ เป็นพิษของตะกอนชนิดนี้<sup>35</sup> ด้วยข้อจำกัดนี้จึงนำสารในกลุ่ม bisbiguanide ตัวอื่นมาศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเป็นทางเลือก ปัจจุบันได้นำสาร bisbiguanide มาใช้ในงานสาขาวิทยาศาสตร์สุขภาพมากขึ้น เช่น อะเล็กซิดีน (Alexidine, ALX) และ ออกทีนิติน (Octenidine, OCT)

### Alexidine (ALX)

ALX เป็นสารในกลุ่ม bisbiguanide มีโครงสร้างใกล้เคียงกับ CHX ต่างกันตรงที่ ส่วนปลายของโครงสร้างเป็น ethylhexyl group ดังรูปที่ 3 ด้วยเหตุนี้ ALX มีความสามารถในการจับกับ lipopolysaccharide บนที่อยู่บนผนังเซลล์เชื้อแบคทีเรียแกรมลบ และ lipoteichoic acid บนแบคทีเรียชนิดแกรมบวกได้ดีและเร็วกว่า CHX<sup>36,15</sup> ALX เริ่มนำมาใช้ในด้านวิทยาศาสตร์สุขภาพ โดยพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปากและน้ำยาล้าง contact lens ในเวลาต่อมาได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟันมากขึ้น และการใช้ 1% ALX ในเวลา 5 และ 10 นาที สามารถฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ได้ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับ 2% CHX<sup>37</sup> ความเข้มข้นของ ALX ที่มีความสามารถต้านการสร้างและฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ในรูปแบบของ biofilm คือ 0.03-2%<sup>38</sup> การศึกษาของ Barrios และคณะ (2013) พบว่า ALX สามารถคงฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (Antimicrobial substantivity) ได้ โดยเฉพาะเชื้อ *E. faecalis* เมื่อใช้ ALX 1-2% ล้างในคลองรากฟันเป็นระยะเวลา 1 นาที และให้ผลในการคงฤทธิ์ได้ดีกว่า 2% CHX<sup>37</sup> ถึงแม้ว่ามีการศึกษาไม่มากนักเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการต้านเชื้อราของ ALX แต่โครงสร้างของ ALX มีประจุบวกเช่นเดียวกับ CHX จึงทำให้สามารถจับ plasma membrane ของเชื้อราได้ ปฏิกริยาระหว่าง ALX กับ NaOCl เกิด แต่เป็นตะกอนสีเหลืองไม่ใช่ PCA แต่ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเป็นสารชนิดใด<sup>39</sup>

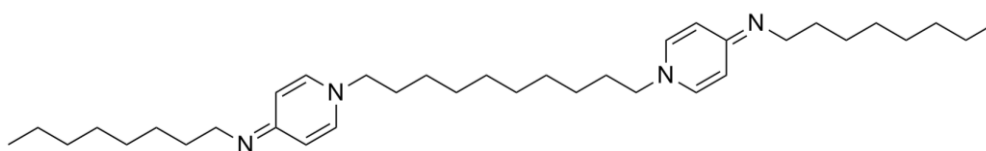


รูปที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของ Alexidine (ALX)<sup>4</sup>

### Octinidine (OCT)

OCT เป็นสารในกลุ่ม bisbiguanide และเป็นประจุบวกเช่นเดียวกับ CHX และ ALX เป็นอนุพันธ์ของ bispyridine มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (broad spectrum efficacy) ทั้ง

ชนิดแกรมบวกและ แกรมลบรวมทั้งเชื้อรา *C. albicans*<sup>16</sup> กลไกการฆ่าเชื้อเกิดจากการทำลายผนังเซลล์ และเยื่อหุ้มเซลล์ OCT ในรูปแบบ octenidine hydrochloride ถูกพัฒนาขึ้นจาก Sterlig Winthrop Research Institute มีสูตรทางเคมีเป็น [N,N'-(1,10 decanediyl-1[4H] -pyridinyl-4-pyridene)bis (1-octanamine) dihydrochloride] ดังโครงสร้างรูปที่ 4 และได้นำมาใช้ในทางวิทยาศาสตร์สุขภาพหลายแขนง โดยในช่วงแรกใช้เป็นสารฆ่าเชื้อบริเวณผิวหนังที่ใหม่และใช้ในการล้างแผลในผู้ป่วยรายที่มีแผลเรื้อรัง ทางทันตกรรมเริ่มจากการพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปากเพราะมีคุณสมบัติในการต้านการสะสมของแผ่นคราบจุลินทรีย์<sup>40</sup> มีหลายการศึกษายืนยันว่า OCT มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้หลายชนิดและดีกว่า CHX Slee และคณะ (1983) ให้ข้อสรุปว่า OCT สามารถฆ่าเชื้อ *S. mutan*, *S. sanguis*, *A. viscosus* และ *A. naeslundii* ที่อยู่ในคราบจุลินทรีย์ได้รวดเร็วกว่า CHX อย่างมีนัยสำคัญ<sup>41</sup> สำหรับการเปรียบเทียบผลของสาร OCT ต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ พบว่า Octenisept® (0.1% OCT) มีผลในการต้านการยึดเกาะและต้านฤทธิ์ของเชื้อ *S. sanguinis* มากที่สุดเมื่อเทียบกับ 0.13% Olafur® (Amide fluoride), 0.1% CHX, chitosan และ 0.9% NaCl<sup>42</sup> และยังสามารถกำจัดเชื้อ *S. aureus*, *E. faecalis* และ *C. albicans* ได้ในระยะเวลา 15 วินาที<sup>43</sup> เมื่อนำ CHX และ OCT มาเป็นยาใส่ในคลองรากฟันในระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ<sup>44</sup> การศึกษาในแบบจำลองฟันเมื่อเปรียบเทียบ 0.1% OCT และ 2% CHX ในการใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันพบว่าที่ระยะเวลา 2 นาที 0.1% OCT ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* ได้มากกว่า 2% CHX อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ<sup>45,46</sup> การศึกษาทางด้าน cytotoxicity พบว่า OCT มีความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ fibroblast และ เซลล์ epithelial เมื่อเทียบกับ CHX<sup>47</sup> อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึง antimicrobial substantivity ของ OCT และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง OCT และ NaOCl



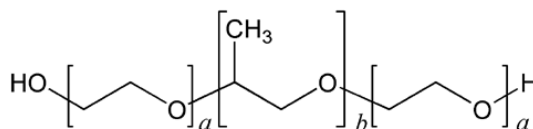
รูปที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของ Octenidine (OCT)<sup>48</sup>

เจลเบสที่นำมาใส่เพื่อให้สารในกลุ่ม bisbiguanide ทั้ง 3 ชนิดคงรูปอยู่ในคลองรากฟันได้ คือ Poloxamer 407 (P407)



### Poloxamer 407 (P 407)

Poloxamer เป็นสารสีขาว ไม่มีกลิ่นและรส (odorless and tasteless) เรียกชื่อได้หลายอย่าง เช่น Lutrol, Monolan, Pluronic และ Poloxalkol เป็นต้น มีชื่อทางเคมี คือ  $\alpha$ -Hydro- $\omega$ -hydroxypoly(oxyethylene)poly(oxypropylene) มีหลายชนิด (grade) แต่ละชนิดมีส่วนประกอบหลักเหมือนกัน ต่างกันที่ปริมาณของ propylene และ ethylene oxides ที่ใส่ในกระบวนการผลิต<sup>49</sup> ลักษณะของโครงสร้างแสดงดังรูปที่ 5



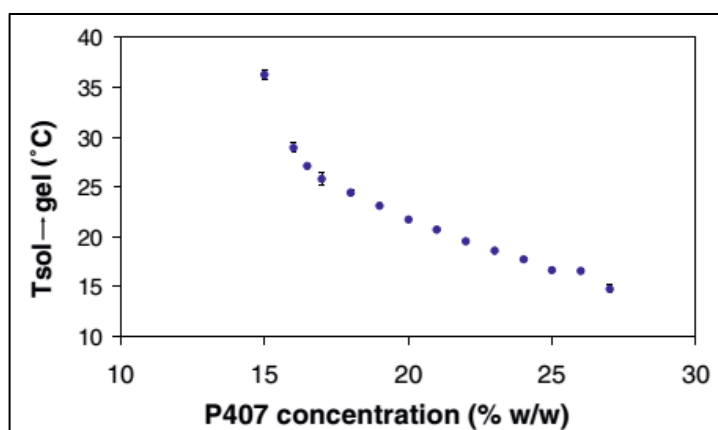
รูปที่ 5 ลักษณะโครงสร้างทางเคมีของ Poloxamer<sup>49</sup>

การเรียกชื่อ Poloxamer โดยเรียก Poloxamer แล้วตามด้วยตัวเลข 3 ตัว ซึ่ง 2 ตัวแรก นำมาคูณ 100 ได้เป็นน้ำหนักของโมเลกุล polyoxypropylene โดยประมาณ และตัวเลขตัวสุดท้ายเมื่อนำมาคูณ 10 จะได้น้ำหนักโดยเปอร์เซ็นต์ของ polyoxyethylene ชนิดและน้ำหนักแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของ Poloxamer<sup>49</sup>

Poloxamer	Physical form	A	b	Average molecular weight
124	Liquid	12	20	2,090-2,360
188	Solid	80	27	7,680-9,510
237	Solid	64	37	6,840-8,830
338	Solid	141	44	12,700-17,400
407	Solid	101	56	9,840-14,600

Poloxamer เป็นสารที่ไม่มีประจุ (nonionic polyoxyethylene-polyoxypropylene copolymer) โครงสร้างประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนของ polyoxyethylene มีคุณสมบัติละลายน้ำ (hydrophilic) และส่วนของ polyoxypropylene มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำ (hydrophobic) หากอุณหภูมิเปลี่ยนแปลง Poloxamer สามารถเปลี่ยนสถานะระหว่างเหลวและเจลได้ (sol-gel transition) คือ ที่อุณหภูมิต่ำมีลักษณะเป็น aqueous solution และเปลี่ยนสถานะเป็น hydrogel เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงสถานะขึ้นอยู่กับความชนิดและเข้มข้นของสาร ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 ค่า Gelation temperature ของ Poloxamer 407 (P 407) ที่ความเข้มข้นต่างๆ<sup>50</sup>

Poloxamer ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้คือ Poloxamer 407 (P407) ปัจจุบันได้นำ P407 มาใช้ในด้านการศึกษาหลายอย่าง อาทิ ใช้เป็นสาร เพื่อเคลือบยาเม็ด และเป็นตัวนำยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery) เช่น ที่ความเข้มข้น 0.001-0.85% w/v ใช้กับดวงตา (ocular delivery system)<sup>51</sup> นำมาผสมกับยาชา lidocaine เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์<sup>52</sup> นำมาผสมยาแก้ปวด ibuprofen เพื่อใช้ในรูปแบบยาฉีดเพื่อบรรเทาอาการอักเสบ นอกจากนี้ P407 สามารถผ่านส่วนของเยื่อหุ้มสมองชั้นดูรา (dural membrane) ได้<sup>53</sup> ในทางทันตกรรม ในปี 2010 Wannachaiyasit และ Phaechamud ได้ศึกษาการพัฒนา chlorhexidine gel สำหรับฆ่าเชื้อในช่องปาก (mouth antiseptic) โดยใช้ Poloxamer 407 (Lutrol F127) เป็นเจลเบส ความเข้มข้น Poloxamer ร้อยละ 25 %w/w ช่วยชะลอการปลดปล่อย chlorhexidine ให้ออกอย่างช้าๆ<sup>54</sup> ในการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (สุนัข และกระต่าย) พบว่าการให้ poloxamer ที่ความเข้มข้น 5% w/v และ 10% w/v ในตา เหงือก และผิวหนัง ไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง (nonirritating) หรือการแพ้ (nonsensitizing) แก่สัตว์ทดลอง<sup>49</sup>

## วัตถุประสงค์การวิจัย

เนื่องจากสารในกลุ่ม bisbiguanide มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อที่สัมพันธ์กับการเกิด secondary และ persistent infection ในคลองรากฟันได้เป็นอย่างดี การนำสารกลุ่มนี้มาพัฒนาเป็นยาใส่ในคลองรากฟันเพื่อเป็นทางเลือกในการลดข้อจำกัดของการใช้ CHX จำเป็นต้องเลือกสารที่เหมาะสมและศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของสารก่อนนำมาใช้จริงในทางคลินิก ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ

1. เลือกสารในกลุ่ม bisbiguanide ที่เหมาะสม โดยเปรียบเทียบจากการศึกษาคุณสมบัติในการต้านต่อเชื้อจุลชีพ ในสภาวะ planktonic ต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ของสาร CHX, ALX และ OCT โดยพิจารณาเลือกสารระหว่าง ALX และ OCT มาเปรียบเทียบกับ CHX และนำมาศึกษาคุณสมบัติในด้านอื่น ๆ ในวัตถุประสงค์ข้อถัดไป
2. ศึกษาความสามารถในการต้านต่อไบโอฟิล์ม (antibiofilm activity) ต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans*
3. ศึกษาการปลดปล่อยสาร (drug releasing) เมื่อนำมาผสมกับ P407 โดย
  - a) หาอัตราส่วนผสมของสาร P407 กับสาร ALX หรือ OCT และสาร CHX
  - b) ศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารในรูปแบบของสารผสมกับ P407
4. ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู (cytotoxicity)

## สมมุติฐานการศึกษา

สารต้านจุลชีพ ALX หรือ OCT และ CHX มีคุณสมบัติในการต้านจุลชีพ การต้านต่อ biofilm การปลดปล่อยสารในรูปแบบของเจลเมื่อผสมกับ P407 และความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถเลือกสารในกลุ่ม bisbiguanide (ระหว่าง ALX และ OCT) มาพัฒนาเป็นยาใส่ในคลองรากฟันได้อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อลดข้อจำกัดของการใช้ CHX ร่วมกับ NaOCl

## บทที่ 2

### วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

#### วัสดุ

1. Poloxamer 407 (P 407, Lutrol® F 127, BASF, Germany)
2. สารเคมี
  - a) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ
  - b) สารละลาย
    - CHX (chlorhexidine digluconate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)
    - ALX (alexidine dihydrochloride, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Switzerland)
    - OCT (octenidine dihydrochloride, Alfa Aesa, United Kingdom)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ
  - a) Brain heart infusion: Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD 37 g /l
  - b) Blood agar base: RCI Labscan Asia Co., Ltd 40 g /l
4. อาหารสำหรับไฟโบร بلاสต์ (GIBCO BRL Products, Invitrogen Co., USA)
5. candle jar
6. ภาชนะสำหรับใส่สารทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ: petri plate (dish), glass bottles, beaker, flasks (Pyrex, USA)

#### อุปกรณ์

1. เครื่องชั่ง Digital ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Sartorius analytic รุ่น E5500s, Scientific promotion Co., LTD, USA)
2. water-bath (รุ่น WNE 45 SC, Memert, UK)
3. shaking incubator (LSI-3016R, LabTech®, Korea)
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (microplate reader Expert Plus รุ่น G020151: Asyshitech, Germany)
5. เครื่องเขย่าสาร (Vortex: New York, USA)

6. ตู้บ่มเพาะเชื้อขนาด 400 ลิตร (Binder; Scientific promotion Co., LTD, USA)
7. ตู้อบความร้อนสูง (Hot air oven: Memmert, Germany)
8. ตู้แช่เย็น -20°C (Whirlpool, USA)
9. ตู้เย็นทั่วไปสำหรับอุณหภูมิต่ำ -4°C (Whirlpool, USA)
10. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy, Tokyo, Japan)

## วิธีการดำเนินงาน

การดำเนินงานประกอบด้วย 4 การทดลองได้แก่

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพของสาร CHX, ALX และ OCT ในสภาวะ planktonic
2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการยับยั้งเชื้อในรูปแบบ biofilm ด้วยวิธี MTT assay
3. การศึกษาการปลดปล่อยของสารที่ผสมกับ P407
4. การศึกษาความเป็นพิษของสารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู

### 1. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพของสาร CHX, ALX และ OCT ในสภาวะ planktonic

เป็นการทดสอบความไวในการต้านเชื้อในสภาวะ planktonic ของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อ CHX, ALX และ OCT ตามวิธีมาตรฐานของ Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)<sup>55</sup> ประกอบด้วย 2 วิธี คือ วิธี Agar diffusion และวิธี Broth microdilution

#### a) วิธี Agar diffusion

##### การเตรียมสาร

กลุ่มสารตัวอย่างที่ใช้ในการทดสอบในการศึกษา Agar diffusion มีทั้งหมดดังนี้

**กลุ่มควบคุม** ประกอบด้วย sterile distill water (SDW) และ 17% P407 w/w

**กลุ่มทดสอบ** ประกอบด้วย

- 1) CHX ความเข้มข้น 2%, 1% และ 0.5% w/v
- 2) ALX ความเข้มข้น 2%, 1% และ 0.5% w/v
- 3) OCT ความเข้มข้น 0.2%, 0.1% และ 0.05% w/v

### วิธีการเตรียมสารทดสอบ

การเตรียม 17% P407 โดยชั่งสาร P407 ให้ได้ปริมาณ 0.34 g ใส่ลงในขวดสำหรับผสมสารละลาย เติม sterile distill water (STDW) ลงไปในขวดที่มีสาร P407 ปริมาณ 2 g นำสารละลายที่ผสมแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำมาทดสอบ

การเตรียม CHX ด้วยการเจือจางสารละลาย 20% Chlorhexidine digluconate (CHX-DG) ซึ่งเป็นของเหลว ให้ได้ความเข้มข้นที่ 2%, 1% และ 0.5% ในขวดแก้วสำหรับเก็บสารละลายปริมาณ 2 ml ในแต่ละความเข้มข้นทำการผสมดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณสาร Chlorhexidine digluconate (CHX-DG) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	ปริมาณ CHX-DG (µl)	ปริมาณ SDW (µl)	ปริมาณโดยรวม(µl)
2% CHX	200	1800	2000
1% CHX	100	1900	2000
0.5% CHX	50	1950	2000

การเตรียมสารละลาย ALX ชั่งสาร Alexidine dihydrochloride (ALX-DH) ซึ่งมีลักษณะเป็นผง เติมสาร DMSO เพื่อเป็นตัวทำละลาย ละลายให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้ได้ปริมาณตามที่แสดงไว้ในตารางที่ 3 หลังจากนั้นเติม SDW ได้ปริมาณ 2 ml

ตารางที่ 3 ปริมาณสาร สาร Alexidine dihydrochloride (ALX-DH) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Alexidine (ALX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	ปริมาณ ALX-DH (g)	ปริมาณ DMSO (µl)
2% ALX	0.04	100
1% ALX	0.02	100
0.5% ALX	0.01	100

การเตรียมสารละลาย OCT เตรียมจากสาร Octenidine dihydrochloride (OCT-DH) ซึ่งเป็นของเหลว ทำการผสมเช่นเดียวกับ ALX แต่ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย ปริมาณของสารที่ใช้ในการผสม และปริมาณของ ethanol แสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ปริมาณสาร Octenidine dihydrochloride (OCT-DH) ที่ใช้ผสมเพื่อให้ได้สารละลาย Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	ปริมาณ OCT-DH (g)	ปริมาณ ethanol (µl)
0.2% OCT	0.004	100
0.1% OCT	0.002	100
0.05% OCT	0.001	100

#### การเตรียมเชื้อและการทดสอบ

##### เชื้อ *Enterococcus faecalis*

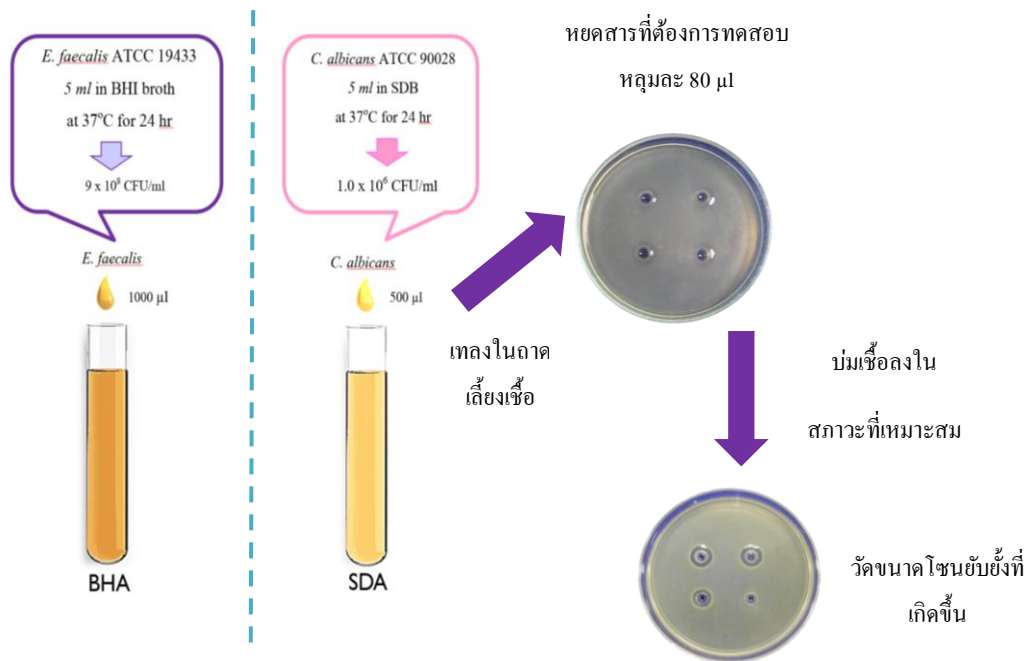
ใช้ *E. faecalis* ชนิด ATCC 19433 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion agar (BHA) ที่ปราศจากเชื้อ จำนวน 20 ml ต้มให้เหลว และนำมาตั้งให้อุ่น เติมเชื้อ *E. faecalis* ปรับให้มีปริมาณเชื้อ  $9 \times 10^8$  CFU/ml (ปรับค่า OD<sub>600nm</sub> = 0.1) จำนวน 1000 µl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHA ที่อุ่นแล้ว เทลงในจานเพาะเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 mm จำนวน 4 วงวางอยู่โดยมีระยะห่างเท่ากันและเทให้ความหนาของวุ้นสม่ำเสมอ รองอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง นำนวงแหวนโลหะออกเพื่อสร้างหลุมสำหรับบรรจุสารที่ต้องการทดสอบ ที่ได้กล่าวไว้ในขั้นตอนการเตรียมสาร โดยในแต่ละกลุ่มทดลองใช้สารหลุมละ 80 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน candle jar แปลผลด้วยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง (inhibition zone) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ครั้งในแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำ

##### เชื้อ *Candida albicans*

ใช้ *C. albicans* ชนิด ATCC 90028 ทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis* โดยเปลี่ยนเป็น ปรับให้มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง  $1.0 \times 10^6$  CFU/ml (ปรับค่า OD<sub>600nm</sub> = 0.2) ปริมาณ 500 µl ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA) และนำไปบ่มในสภาวะ aerobic

ในขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion สามารถสรุปเป็นแผนภาพได้ดังรูปที่

7 ดังนี้



รูปที่ 7 ขั้นตอนการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion ของสารทดสอบต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) และ *Candida albicans* (*C. albicans*)

#### b) วิธี Broth microdilution

ทำการทดสอบวิธีนี้เพื่อทดสอบความไวของสารต่อเชื้อที่ต้องการทดสอบเป็นการทดสอบเพื่อวิเคราะห์ในเชิงปริมาณ มีหลักการคือการเจือจางของสารละลายด้านจุลชีพและทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อดูความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ โดยหาปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC: Minimum Bacterial Concentration) มีวิธีการทดสอบดังนี้

#### การเตรียมสารทดสอบ

สารที่นำมาใช้ในการทดสอบนี้ประกอบด้วย 2% CHX, 2%ALX และ 0.2% OCT w/v การเตรียมสารทดสอบมีวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับในการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion



### การเตรียมเชื้อและการทดสอบ

#### เชื้อ *Enterococcus faecalis*

ใช้ *E. faecalis* ชนิด ATCC 19433 เช่นเดียวกับวิธี Agar diffusion เตรียมสารอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI) ที่ผ่านกระบวนการปราศจากเชื้อปริมาณ 100  $\mu$ l เติมนลงในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) เติมนสารละลายที่ต้องการทดสอบดังที่ได้กล่าวมาแล้วในขั้นตอนการเตรียมสารทดสอบ ทำเป็นแบบ serial-two-fold dilution หลุมละ 100  $\mu$ l สุดท้ายเตรียมเชื้อที่ต้องการจะเติม ปรับเชื้อให้ได้ประมาณ  $1.5 \times 10^8$  CFU/ml (ปรับค่า  $OD_{600nm} = 0.01$ ) โดยเติมเชื้อลงไปหลุม หลุมละ 100  $\mu$ l ดังนั้นจึงได้ปริมาณสุดท้ายของแต่ละหลุมคือ 200  $\mu$ l สำหรับหลุมที่เป็นตัวควบคุมบวกให้เติมเชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ผสมสารทดสอบ หลุมควบคุมลบให้เติมเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการบ่มโดยภายใน candle jar และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดของสารแต่ละชนิดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ (ไม่ขุ่น) คือค่า MIC ของสาร หลังจากนั้นนำสารละลายในหลุมที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อทุกหลุมจำนวน 10  $\mu$ l ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมเลือด (blood agar) ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อคือค่า MBC โดยในแต่ละสารทำ 3 ครั้ง และในแต่ละครั้งทำ 2 ซ้ำเพื่อหาค่าเฉลี่ย

#### เชื้อ *Candida albicans*

ใช้ *C. albicans* ชนิด ATCC 90028 ทำเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis* แต่เปลี่ยนสารอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเป็น Sabouraud Dextrose Broth (SDB) และในขั้นตอนการใส่เชื้อ ปรับปริมาณเชื้อ *C. albicans* ให้ได้  $1.0 \times 10^3$  CFU/ml (ปรับค่า  $OD_{600nm} = 0.02$ ) และในขั้นตอนสุดท้ายเมื่อหาค่า MBC ต้องนำสารทดสอบไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด SDA

### c) เกณฑ์ในการพิจารณาเลือกสารระหว่าง ALX และ OCT เพื่อนำมาเปรียบเทียบกับ CHX

เนื่องจากวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ คือการเลือกสารที่เหมาะสมในการนำมาพัฒนาต่อเพื่อเป็นสารที่นำมาใส่ในคลองรากฟัน จึงจำเป็นต้องเลือกสารตัวใดตัวหนึ่งระหว่าง ALX และ OCT ที่มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อที่ดีกว่าเพื่อมาเปรียบเทียบกับ CHX ในการศึกษาถัดไป มีเกณฑ์ในการพิจารณา ดังนี้

ในการทดสอบ Agar diffusion ต้องมี inhibition zone และในการทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution สารที่ทดสอบจะต้องให้ค่า MIC และ MBC น้อยที่สุด

## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการยับยั้งเชื้อในรูปแบบ biofilm ด้วยวิธี MTT assay

เป็นการทดสอบประสิทธิภาพในการต้าน biofilm โดยประยุกต์มาจากวิธี Broth microdilution<sup>56, 57, 58</sup> ซึ่งประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย คือ การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm และการทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการกำจัดเชื้อในสภาวะ biofilm

### a) การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm (Inhibition of biofilm formation)

การทดสอบนี้เป็นการทดสอบการยับยั้งการฟอร์มตัวเป็น biofilm ของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยใช้สารที่ต้องการทดสอบลงในภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ชนิดก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) พร้อมกับเชื้อที่ต้องการศึกษา เพื่อประเมินประสิทธิภาพประเมินการยับยั้งการสร้าง biofilm ด้วยวิธี MTT assay มีหลักการคือ สาร MTT ไปทำปฏิกิริยากับสารเมตาบอลิโกล์ที่ผลิตจากเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต โดยการกระทำของ enzyme dehydrogenase โดยสารสีเหลืองของสาร tetrazolium MTT เปลี่ยนเป็นตะกอนสีม่วงจากสาร formazan จากนั้นทำการวัดปริมาณตะกอน formazan ที่เกิดขึ้นด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยค่าที่ได้แปรผันตามปริมาณเชื้อที่มีชีวิตในสภาวะ biofilm เพื่อใช้คำนวณปริมาณเชื้อที่มีชีวิต

#### การเตรียมสาร

เตรียมสารละลายด้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบให้ได้ความเข้มข้นดังที่ได้กล่าวไว้ในขั้นตอนการทดสอบแบบวิธี Broth microdilution และเตรียมสารละลาย MTT ให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 mg/ml ในสารละลาย buffer ที่ปราศจากเชื้อ

#### การเตรียมเชื้อ

เตรียมเชื้อโดยเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในอาหารชนิดเหลวดังที่ได้กล่าวไว้ในวิธี Broth microdilution

#### การทดสอบ

เตรียมสารด้านจุลชีพ สารอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เช่นเดียวกับวิธี Broth microdilution แต่สารอาหารเลี้ยงเชื้อ ต้องเติม 1% ของ mucin เพื่อให้เชื้อมีการสร้าง biofilm เติมสารอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม mucin ลงใน ภาชนะพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ชนิดก้นแบน (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) ปริมาณหลุมละ 100  $\mu$ l หลังจากนั้นเติมสารด้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบลงในหลุมแรกปริมาณ 100  $\mu$ l เจือจางสารด้านจุลชีพด้วยวิธีลดครึ่งละ 2 เท่า (two-fold serial dilution) สุดท้ายเติมเชื้อที่ต้องการทดสอบหลุมละ 100  $\mu$ l สำหรับหลุมที่เป็นตัวควบคุมบวกให้เติมเฉพาะเชื้อ โดยไม่มีส่วนผสมของสารด้านจุลชีพ เพื่อยืนยันว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วนหลุมที่เป็นตัวควบคุมลบใส่เฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อที่

ผสม 1% mucin เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน หลังจากนั้นจึงบ่มเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ทำการล้างเซลล์ที่อยู่ในสภาวะ planktonic ออกด้วยสารละลาย phosphate buffer pH 7.0 หลังจากนั้นใส่สาร MTT 20  $\mu$ l ลงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่ได้เตรียมไว้แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงในที่มืด เมื่อครบกำหนดเวลา ดูดสารละลายทิ้งและล้างสีตะกอนด้วย 100% DMSO ปริมาณ 100  $\mu$ l แล้วนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 15 นาที และดูดสารละลาย 90  $\mu$ l ใส่ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์กันแบนชนิด 96 หลุมอันใหม่แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm นำค่าที่ได้จากการทดสอบไปลบกับหลุมที่เป็นตัวควบคุมบวกที่มีความเข้มข้นที่เท่ากัน แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการสร้าง biofilm จากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = [1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control})] \times 100\%$$

หาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการสร้างเป็น biofilm ได้ 100%

#### b) การทดสอบประสิทธิภาพของสารต่อการกำจัดเชื้อในสภาวะที่เป็น biofilm

##### (Eradication of biofilm formation)

การทดสอบนี้เพื่อทดสอบการกำจัดเชื้อที่อยู่ในสภาวะที่เป็น biofilm ของสารที่ต้องการทดสอบ วิธีการทดสอบเช่นเดียวกันกับการประเมินการยับยั้งการสร้าง biofilm แต่ต่างกันที่ การทดสอบนี้ต้องทดสอบหลังจากเชื้อที่อยู่ในสภาวะ biofilm แล้ว 24 ชั่วโมง เตรียมโดยใส่เชื้อลงในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์กันแบนชนิด 96 หลุม (flat-bottomed 96-well polystyrene microtiter plat) บ่มเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้อยู่ในสภาวะ biofilm ก่อนที่ 24 ชั่วโมง แล้วค่อยเติมสารต้านจุลินทรีย์แต่ละชนิดลงไป และทำการทดสอบ MTT ต่อ ค่าดูดกลืนแสงที่ได้นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การกำจัดเชื้อในสภาวะ biofilm โดยมีสูตรดังนี้

$$\% \text{ Eradication} = (1 - (A_{570} \text{ of the test} / A_{570} \text{ of non-treated control})) \times 100\%$$

หาค่าความเข้มข้นที่ต่ำสุดต่อการกำจัดเชื้อที่อยู่ในสภาวะ biofilm ได้ 100%

### 3. ศึกษาการปลดปล่อยของสารที่ผสมกับ P407

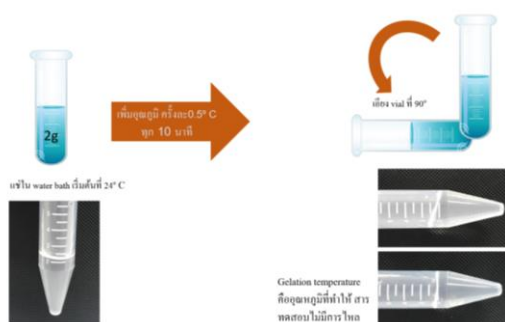
#### a) หาค่า Gelation temperature ของสารใน P407

การทดลองนี้ประกอบด้วย 2 การทดลองย่อย ได้แก่ การหาค่า Gelation temperature ของสารต้านจุลินทรีย์ที่ผสมใน P407 การศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์ในรูปแบบของเจลเมื่อผสมกับ P407 โดยวิเคราะห์สมการการปลดปล่อย และกลไกการปลดปล่อยสารต้านจุลินทรีย์เมื่อผสมกับ P407

**ตารางที่ 5** ชนิดและความเข้มข้นของสารที่ผสม poloxamer 407 ในสัดส่วนต่าง ๆ เพื่อใช้หาค่า gelation temperature

สาร	ความเข้มข้นสาร (%w/w)	P 407 (%w/w)
CHX	0.5, 1., 2.0	
ALX	0.5, 1.0, 2.0	15, 15.5, 16, 16.5, 17
OCT	0.05, 0.1, 0.2	

เตรียมสารต้านจุลชีพที่ต้องการทดสอบโดยละลาย P407 ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ หลังจากนั้นนำสารละลาย P407 เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำผสมกับสารละลาย CHX, ALX และ OCT ให้ได้ความเข้มข้นตามตารางที่ 5 โดยสาร ALX ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลายปริมาณ 100 µl ในทุกความเข้มข้น สาร OCT ใช้ Ethanol เป็นตัวทำละลาย ปริมาณ 100 µl ในทุกความเข้มข้นเช่นกัน หลังจากนั้นนำสารที่ผสมได้ไปหาค่า Gelation temperature ของกลุ่มตัวอย่าง โดยนำตัวอย่างมา 2 g ใส่ vial นำ vial ไปแช่น้ำที่อุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ในเครื่อง water bath หลังจากนั้นเพิ่มอุณหภูมิขึ้น 0.5°C ทุก 10 นาที โดยก่อนเพิ่มอุณหภูมิให้พลิก vial 90 องศา ก่อนค่า gelation temperature คือ อุณหภูมิที่พลิก vial 90 องศาแล้วตัวอย่างไม่มีการไหล ดังรูปที่ 8



**รูปที่ 8** ขั้นตอนการหาค่า gelation temperature

(อุณหภูมิที่พลิก vial 90 องศาแล้วตัวอย่างไม่มีการไหล)

เลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมคือสารต้านจุลชีพที่ผสม P407 เมื่ออยู่ในอุณหภูมิห้อง ต้องมีสภาพในรูปแบบของของเหลว และมีเปลี่ยนรูปเป็นเจลที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายเล็กน้อย (เหลวที่อุณหภูมิ 25 - 28°C และเป็นเจลที่อุณหภูมิ 33 - 36°C) เมื่อได้ความเข้มข้นของ P407 ที่เหมาะสมแล้ว กำหนดให้ค่าความเข้มข้นของสารต้านจุลชีพที่ผสม P 407 เป็น X%

### b) การศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารต้านจุลชีพจากเจลที่เตรียมขึ้น

เมื่อได้ความเข้มข้นของ P407 ที่เป็นเจลในช่วงอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายเล็กน้อยแล้วจึงนำมาวิเคราะห์การปลดปล่อยสารต้านจุลชีพแต่ละชนิดจากเจลที่เตรียมขึ้น โดยนำตัวอย่างปริมาณ 2 g ใส่ใน vial ทำให้เป็นเจลก่อนที่อุณหภูมิ 37°C ใช้ SDW เป็น medium ปริมาตร 5 ml จากนั้นนำ vial ใส่ในเครื่อง shaking incubator หมุนด้วยความเร็วรอบ 30 rpm ควบคุมอุณหภูมิที่ 37°C เก็บตัวอย่างปริมาณ 2 ml ที่เวลา 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง และเติม distilled water ด้วยปริมาตรเท่ากัน หลังจากเก็บตัวอย่างปริมาณ นำตัวอย่างที่เก็บได้ไปวัดปริมาณของ CHX และ ALX หรือ OCT ที่ถูกปลดปล่อยออกมา ด้วยเครื่อง microplate reader Expert Plus โดยอาศัยหลักการความสามารถของสารในแต่ละชนิดดูดกลืนแสงได้ดีในช่วงความยาวคลื่นที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นปริมาณของสารในแต่ละชนิดที่ถูกปลดปล่อยออกมาจะแปรผันตามค่าดูดกลืนแสงนำไปคำนวณเพื่อหาความเข้มข้นของสารที่ปลดปล่อยออกมาในช่วงเวลาต่าง ๆ โดย CHX ดูดกลืนแสงที่ยาวคลื่น 253 nm<sup>33</sup> ALX ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 237 nm และ OCT ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 285 nm<sup>59</sup>

### c) การศึกษารูปแบบและกลไกการปลดปล่อยสารจากเจลที่เตรียมขึ้นเมื่อผสมกับ

#### P407

#### การวิเคราะห์รูปแบบการปลดปล่อย

รูปแบบการปลดปล่อยของสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ ที่ผสม P407 มีความเป็นไปได้จากแบบจำลอง 3 รูปแบบดังสมการ<sup>(59)</sup>

1) Zero-order model: อัตราการปลดปล่อยยาที่ไม่ขึ้นกับความเข้มข้น ดังสมการ

$$C = k_0 t$$

C คือ ความเข้มข้นของสารที่ปลดปล่อยออกมา

K<sub>0</sub> คือ ค่าคงที่ของสมการ zero order (หน่วย ความเข้มข้น/เวลา)

t คือ เวลา

โดยใช้ข้อมูลระหว่าง ร้อยละความเข้มข้นสะสมของยาที่ถูกปลดปล่อยออกมา (% cumulative drug release) กับ เวลา (time)

2) First order model: อัตราการปลดปล่อยยาขึ้นกับความเข้มข้นที่เหลือ ดังสมการ

$$\ln C = \ln C_0 - k_1 t$$

C คือ ความเข้มข้นของสารที่เหลือภายในเจล

C<sub>0</sub> คือ ความเข้มข้นของสารเริ่มต้น

$k_1$  คือ ค่าคงที่ของสมการ first order

$t$  คือ เวลา

โดยใช้ข้อมูลระหว่าง  $\ln$  ของร้อยละความเข้มข้นสะสมของปริมาณยาที่เหลืออยู่ (ln cumulative of % drug remaining) กับ เวลา (time)

3) Higuchi model: อธิบายการปลดปล่อยยาโดยการแพร่ (Fickian diffusion) จาก ระบบที่ไม่ละลายน้ำ (insoluble matrix) เทียบกับรากที่สองของเวลา (square root of time) ดังสมการ

$$C = k_h t^{1/2}$$

$C$  คือ ความเข้มข้นของสารที่ปลดปล่อยออกมา

$k_h$  คือ ค่าคงที่ของสมการ Higuchi

$t$  คือ เวลา

โดยใช้ข้อมูลระหว่าง ร้อยละความเข้มข้นสะสมของยาที่ถูกปลดปล่อยออกมา (% cumulative drug release) กับ รากที่สองของเวลา (square root of time)

สุดท้ายเลือกสมการที่อธิบายรูปแบบการปลดปล่อยสาร CHX และ ALX หรือ OCT ได้ใกล้เคียงกับผลการทดลองมากที่สุด โดยพิจารณาจากค่า  $R^2$

d) การวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยจากเจลที่เตรียมขึ้น ที่ผสมกับ P407<sup>59, 60</sup>

การวิเคราะห์กลไกการปลดปล่อยสารด้านจุลชีพแต่ละสูตรที่ผสม P407 โดยใช้ Korsmeyer-Peppas model ซึ่งมีสมการดังนี้

$$M_t/M_\infty = kt^n \quad \text{-----} \rightarrow \quad \text{Log}(M_t/M_\infty) = \text{log}k + n\text{log}t$$

โดยที่  $M_t/M_\infty$  คือ fraction of drug release

$t$  คือ release time

$k$  คือ diffusion rate constant

$n$  คือ release exponent

กลไกการปลดปล่อยสารด้านจุลชีพพิจารณาจากค่า  $n$  โดยเกณฑ์ดังนี้

$n = 0.5$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Fickian diffusion

$0.5 < n < 1.0$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Anomalous หรือ non-Fickian transport

$n = 1.0$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Zero-order (time-independent)

#### 4. การศึกษาความเป็นพิษของสารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือ เซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 ซึ่งถูกเลี้ยงในภาชนะขนาด 75 ตารางเซนติเมตรสำหรับเลี้ยงเซลล์ ด้วยอาหารสำหรับไฟโบรบลาสต์ (fibroblast growth medium) ซึ่งในอาหารปริมาณ 500 ml ประกอบด้วย

- a) Dulbecco's modified media (DMEM) 90% จำนวน 450 ml
- b) Fetal bovine serum 10% จำนวน 50 ml
- c) Medium supplement: 100 IU/ml penicillin และ 100 µg/ml streptomycin ปริมาณ 5 ml

ทำการบ่มเซลล์ในตู้บ่มที่มีความชื้นสัมพัทธ์ 90% คาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°C นำเซลล์ออกจากภาชนะเลี้ยงเมื่อเซลล์มีปริมาณร้อยละ 80-90 ของภาชนะสำหรับเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 ตารางเซนติเมตร หลังจากนั้นจึงดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออก และใส่ PBS จำนวน 5 ml แล้วทำการดูดออกมาเพื่อล้างโดยใช้ PBS 2 ครั้ง ใส่ 0.25% trypsinizing solution จำนวน 1 ml และทำการบ่มในตู้ประมาณ 8-10 นาที ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ ในภาชนะเลี้ยงปริมาณ 5 ml ล้างเซลล์ให้หลุดจากภาชนะ และใช้ pipette ดูดขึ้นลง เพื่อให้เซลล์ไม่เกาะกัน หลังจากนั้นนำ cell suspension ไปใส่ในหลอดขนาด 15 ml และปั่นด้วยความเร็ว 1,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจึงดูดส่วน supernatant ที่เหลือส่วนตะกอนของเซลล์ที่ก้นประมาณ 100 µl ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 1 ml นับจำนวนเซลล์ที่เลี้ยงได้ และทำการเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 จำนวน  $1 \times 10^4$  เซลล์ต่อหลุม ในถาดพลาสติกเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม (round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate) ภายในตู้บ่มเป็นเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ล้างเซลล์ในแต่ละหลุมด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง ก่อนที่จะใส่สารทดสอบหลุมละ 200 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม โดยมีสารทดสอบ ประกอบด้วย น้ำกลั่น สารต้านจุลชีพ CHX และ ALX หรือ OCT ที่ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองข้างต้น ดังแสดงในตารางที่ 2-4 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ครั้งละ 2 ซ้ำ

เมื่อเวลาผ่านไป 0.5, 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง วัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต โดยวัดการเกิด bio-reduction ของสีสังเคราะห์ tetrazolium 3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็น formazan product และใช้สารละลาย DMSO เป็นตัวทำละลายของ formazan product ทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตรตามสูตร

$$\% \text{ cell viability} = \frac{(\text{OD of control} - \text{OD of sample}) \times 100}{\text{OD of control}}$$

เพื่อหาความเข้มข้นที่สูงที่สุดที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ L929 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

### การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียต่อสาร CHX, ALX และ OCT ในการทดสอบความไวในการต้านเชื้อในสถานะ planktonic cell ด้วยวิธี Agar diffusion และ Broth microdilution วิเคราะห์โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาโดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์โดยใช้สถิติ Kruskal-Wallis test ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p$  value  $< 0.05$  และถ้าหากพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติให้ทดสอบเปรียบเทียบคู่ความแตกต่างโดยใช้ Mann-Whitney U test
2. การทดสอบประสิทธิภาพของสาร ต่อการกำจัดเชื้อในสถานะ biofilm โดยเปรียบเทียบปริมาณการกำจัดเชื้อของสาร (% inhibition, % eradication) ในรูปแบบ biofilm และการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney U test เปรียบเทียบฤทธิ์ของสารระหว่างที่ชุดที่ใส่สารทดสอบ(ชุดทดสอบ) และชุดที่ไม่ใส่สารทดสอบ (ชุดควบคุมลบ)
3. การเตรียมสาร CHX และ ALX หรือ OCT ใน P407 ที่เหมาะสม เป็นการวิเคราะห์ข้อมูลเชิงคุณภาพโดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาพิจารณาเลือกความเข้มข้น P407 ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า Gelation temperature ที่ต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายเล็กน้อย
4. การปลดปล่อยสาร
  - a) รูปแบบการปลดปล่อยสาร วิเคราะห์โดยใช้ regression analysis เพื่อใช้ในการพิสูจน์ว่า รูปแบบการปลดปล่อยยามีความเหมาะสมกับสมการในแบบจำลองจาก 3 สมการที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 3.3 โดยพิจารณาจากค่า  $R^2$  ของแต่ละสมการที่มีค่าใกล้เคียง 1 มากที่สุด
  - b) กลไกการปลดปล่อยสาร วิเคราะห์โดยคำนวณจาก Korsmeyer-Peppas model ซึ่งได้กล่าวรายละเอียดการแปลผลไว้ในข้อ d)
5. การศึกษาความเป็นพิษของสาร CHX และ ALX หรือ OCT ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ วิเคราะห์โดยใช้สถิติ ใช้ Mann-Whitney U test เปรียบเทียบค่าความมีชีวิตของเซลล์ในแต่ละช่วงเวลา (ชุดทดสอบ) และชุดที่ไม่ใส่สารทดสอบ (ชุดควบคุมลบ)



### บทที่ 3

#### ผลการวิจัย

#### ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสาร CHX, ALX และ OCT ในสภาวะ planktonic

การทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion พบว่า 17% P407 ไม่ทำให้เกิดโซนยับยั้ง แต่สำหรับสารทดสอบ ทั้ง CHX, ALX และ OCT ที่ทุกความเข้มข้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ ทั้ง *E. faecalis* และ *C. albicans* โดยจะให้โซนยับยั้งอยู่ในช่วงระหว่าง 11-24 มิลลิเมตร เมื่อทดสอบทางสถิติโดยใช้ Kruskal-Wallis test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสารที่นำมาทดสอบ ( $p < 0.05$ )

เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* พบว่า 2% CHX และ 1% CHX ให้ค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งสูงสุดคือ  $24 \pm 0.16$  และ  $24 \pm 0.19$  mm ตามลำดับ สำหรับ CHX ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบ พบว่า 0.5% CHX ให้โซนยับยั้งที่น้อยกว่า 1% และ 2% CHX ดังตารางที่ 6 สาร ALX และ OCT ขนาดของโซนยับยั้งขึ้นอยู่กับค่าความเข้มข้นคือยิ่งความเข้มข้นของสารมากค่าเฉลี่ยของโซนในการยับยั้งมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบแต่ละคู่โดยใช้ Mann-Whitney U test พบว่ามีสารทดสอบต่างชนิดกันมีความแตกต่างกัน และในสารชนิดเดียวกันแตกต่างกันเกือบทุกความเข้มข้น ( $p < 0.05$ ) ดังตารางที่ 6

เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* พบว่า 2% และ 1% CHX ให้ค่าเฉลี่ยของโซนยับยั้งสูงสุด คือ  $20 \pm 0.1$  และ  $20 \pm 0.0$  mm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในสารชนิดเดียวกันพบในสารชนิดเดียวกันให้ขนาดของโซนยับยั้งเท่ากันเป็นส่วนใหญ่ และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละคู่โดยใช้ Mann-Whitney U test สารต่างชนิดกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ในสารชนิดเดียวจะไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในแต่ละความเข้มข้น ( $p < 0.05$ ) ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 6ฤทธิ์ของสาร Chlorhexidine (CHX), Alexidine (ALX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Enterococcus faecalis* ด้วยวิธี agar diffusion

ชนิดของสาร	ขนาดเฉลี่ยของโซนการยับยั้ง (mm) *	
	<i>Candida albicans</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
SDW (control)	0 ± 0.00 <sup>a</sup>	0 ± 0.00 <sup>a</sup>
17% P407	0 ± 0.00 <sup>a</sup>	0 ± 0.00 <sup>a</sup>
2% CHX	24 ± 0.16 <sup>b</sup>	20 ± 0.10 <sup>b</sup>
1% CHX	24 ± 0.19 <sup>b</sup>	20 ± 0.00 <sup>b</sup>
0.5% CHX	22 ± 0.19 <sup>c</sup>	19 ± 0.10 <sup>b</sup>
2% ALX	14 ± 0.16 <sup>d</sup>	12 ± 0.13 <sup>c</sup>
1% ALX	14 ± 0.13 <sup>d</sup>	12 ± 0.10 <sup>c</sup>
0.5% ALX	12 ± 0.14 <sup>e</sup>	12 ± 0.00 <sup>c</sup>
0.2% OCT	14 ± 0.25 <sup>d</sup>	11 ± 0.10 <sup>d</sup>
0.1% OCT	13 ± 0.25 <sup>f</sup>	11 ± 0.16 <sup>d</sup>
0.05% OCT	11 ± 0.25 <sup>g</sup>	11 ± 0.13 <sup>d</sup>

\*ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษร (a-g) ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) โดยวิธี Mann-Whitney U test

ความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารทั้งสามชนิด เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละคู่โดยใช้ Mann-Whitney U test ของเชื้อในแต่ละชนิดพบว่าสารทุกชนิดให้ค่าที่แตกต่างกันทั้งค่า MIC และ MBC ( $p < 0.05$ ) สารที่ให้ค่าต่ำสุดคือ OCT, ALX และ CHX ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า OCT ให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดโดยมีค่า MIC และ MBC คือ  $0.29 \pm 0.01$  และ  $0.49 \pm 0.00$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับในเชื้อ *C. albicans* และ สำหรับเชื้อ *E. faecalis* คือ  $0.24 \pm 0.00$  และ  $0.49 \pm 0.00$   $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ ดัง

แสดงในตารางที่ 7 และในสารทดสอบสารในแต่ละชนิดทุกชนิดให้ค่า MIC น้อยกว่า MBC แสดงให้เห็นว่า สารทั้งสามชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบบ static ดังนั้นสารที่จะนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป จึงเลือก OCT เพื่อเปรียบเทียบกับ CHX

**ตารางที่ 7** ฤทธิ์ของสาร Chlorhexidine (CHX), Alexidine (ALX) และ octenidine (OCT) ในการยับยั้งเชื้อ *Candida albicans* และ *Enterococcus faecalis* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC,  $\mu\text{g/ml}$ ) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC,  $\mu\text{g/ml}$ )

ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของสารต่อเชื้อชนิดต่าง ๆ ( $\mu\text{g/ml}$ )				
ชนิดของสาร	<i>Candida albicans</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC
CHX	$9.77 \pm 0.00$	$19.53 \pm 0.00$	$4.88 \pm 0.00$	$9.77 \pm 0.00$
ALX	$2.44 \pm 0.00$	$4.39 \pm 0.91$	$2.44 \pm 0.00$	$4.39 \pm 0.91$
OCT	$0.29 \pm 0.01$	$0.49 \pm 0.00$	$0.24 \pm 0.00$	$0.49 \pm 0.00$

#### ประสิทธิภาพของสาร CHX และ OCT ต่อ biofilm

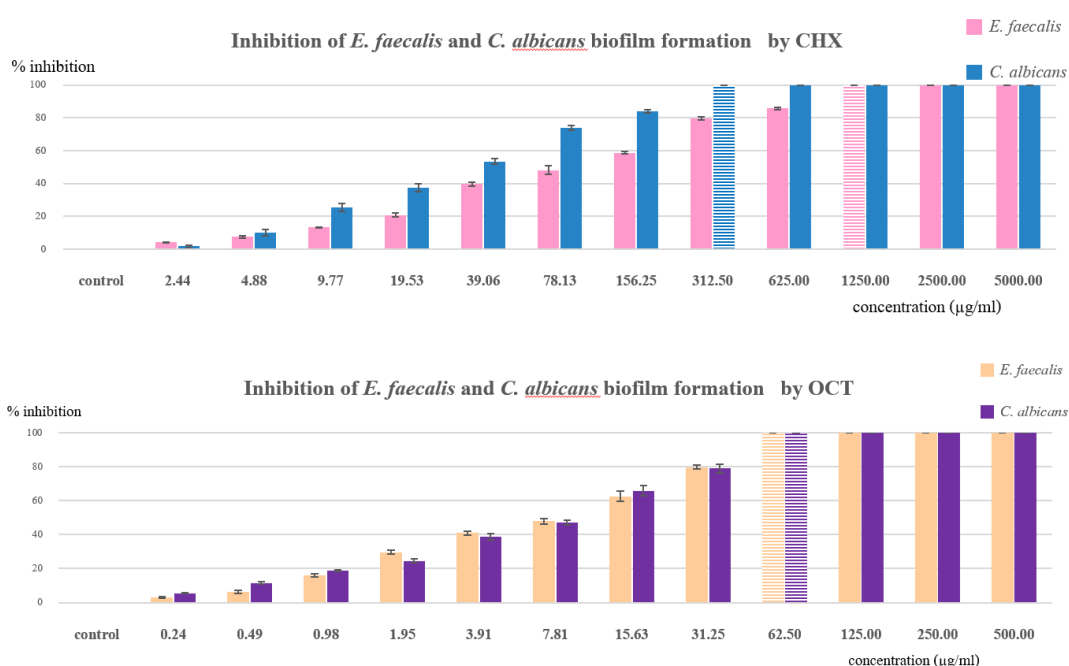
การทดลองในหัวข้อนี้ แบ่งเป็น การทดสอบการยับยั้งการสร้าง biofilm และการกำจัดเชื้อในสถานะ biofilm

#### ประสิทธิภาพของ CHX และ OCT ต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm (Inhibition of biofilm formation)

สาร CHX และ OCT มีประสิทธิภาพต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ความเข้มข้นของสารเพิ่มมากขึ้นให้เปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งสูงขึ้น โดย OCT ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า CHX ดังแผนภูมิแท่งในรูปที่ 9 ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร OCT และ CHX ที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm ของเชื้อ *E. faecalis* ได้ 100 % คือ  $62.5$  และ  $1,250 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *C. albicans* คือ  $62.5$  และ  $312.5 \mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ โดยใช้ Mann-Whitney U test พบว่าทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นต่ำสุดของสาร CHX ที่มีผลต่อการยับยั้งการสร้าง biofilm ได้ 100% ของเชื้อ *E. faecalis* มีค่าสูงกว่า *C. albicans* แสดงให้เห็นว่า CHX กำจัด *E. faecalis* ได้น้อยกว่า *C. albicans* ในขณะที่ OCT ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มี 100% มีค่าเท่ากับต่อเชื้อทั้งสองชนิดนอกจากนี้ค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่มี 100% inhibition of biofilm formation ต่อเชื้อทั้งสองชนิด OCT ต่ำกว่า CHX หลายเท่า

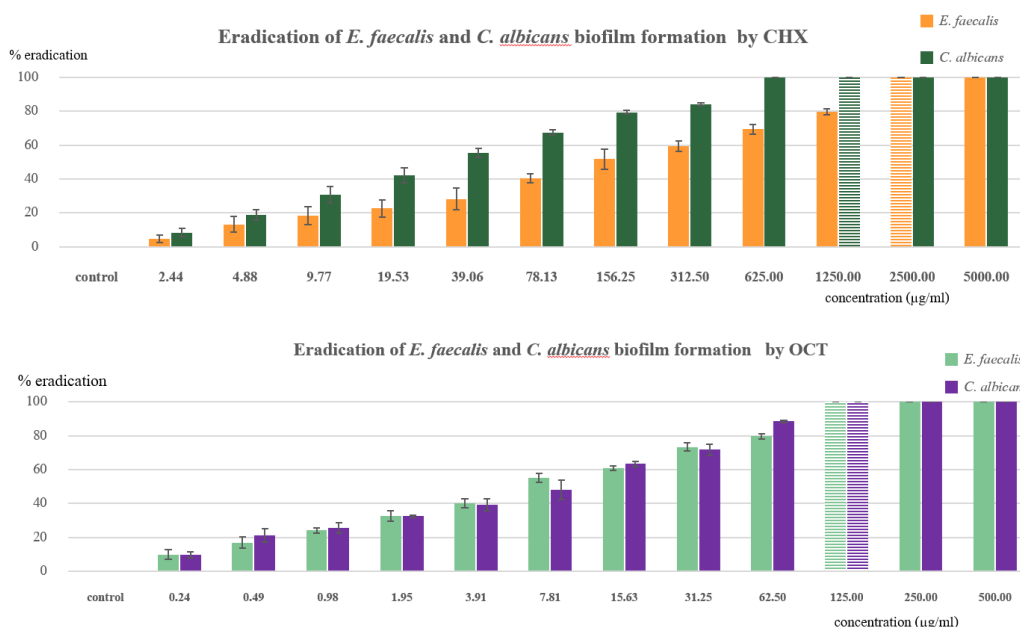


**รูปที่ 9** เปรอ์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) และ *Candida albicans* (*C. albicans*) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

#### ประสิทธิภาพของ CHX และ OCT ต่อการกำจัดเชื้อในสภาวะ biofilm (Eradication of biofilm)

ประสิทธิภาพของสาร CHX และ OCT ต่อการกำจัดเชื้อในสภาวะ biofilm สารทั้ง 2 ชนิด สามารถยับยั้งเชื้อที่อยู่ในรูปแบบ biofilm ผลที่ได้เป็นทำนองเดียวกันกับการทดสอบการยับยั้งการสร้าง biofilm ดังรูปที่ 10 ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร OCT และ CHX ที่มีผลต่อการยับยั้ง biofilm ของเชื้อ *E. faecalis* ได้ 100 % คือ 125 และ 2,500  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ และสำหรับเชื้อ *C.*

*albicans* คือ 125 และ 625  $\mu\text{g/ml}$  ตามลำดับ หากเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ใส่สารทดสอบ โดยใช้ Mann-Whitney U test ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )



**รูปที่ 10** เปอร์เซ็นต์ค่าเฉลี่ยและค่าความคลาดเคลื่อนของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งสถานะที่เป็น biofilm ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) และ *Canida albicans* (*C. albicans*) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

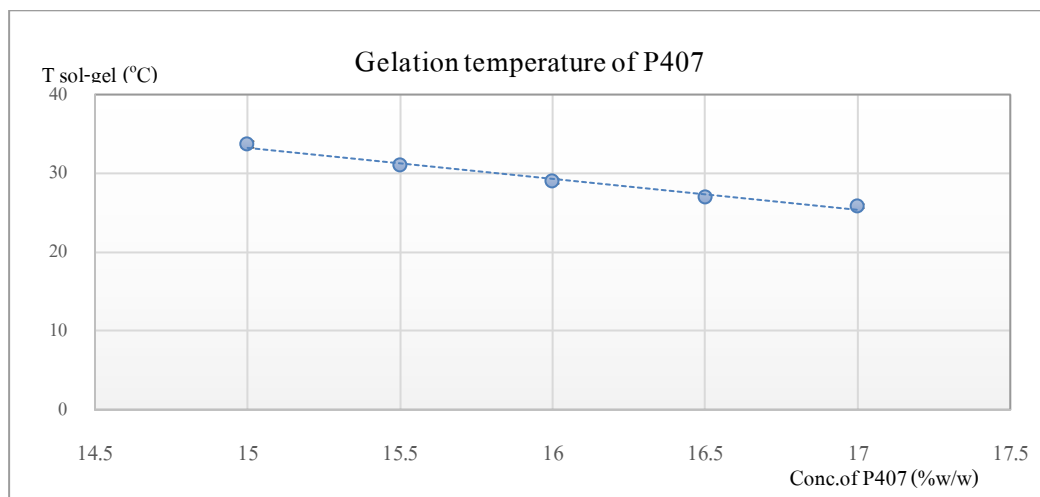
#### การปลดปล่อยของสาร CHX และ OCT ที่ผสมกับ P407

การทดลองในหัวข้อนี้แบ่งเป็นการหาค่า gelation temperature ของ P407 ที่สัดส่วนต่าง ๆ เพื่อเลือกสัดส่วนที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้จริงในการรักษาคอลงรากฟัน รวมทั้งศึกษา รูปแบบและกลไกการปลดปล่อยสารต้านจุลชีพที่ผสมกับ P407

#### Gelation temperature ของ Poloxamer 407 ที่สัดส่วนต่าง ๆ

จากการหาค่า T sol-gel ของ P407 ที่มีความเข้มข้น 15, 15.5, 16, 16.5 และ 17 %w/w ปริมาณความเข้มข้นของ P407 ที่มากขึ้นค่า gelation temperature ลดลงดังกราฟในรูปที่ 11

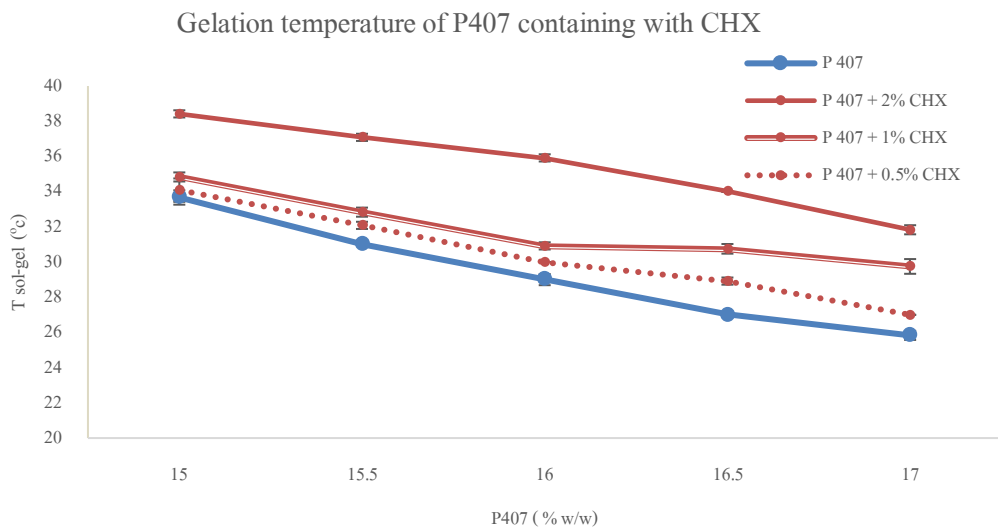
นอกจากนี้ยังพบว่า P 407 ในความเข้มข้นต่าง ๆ ที่รูปแบบเจลเมื่อนำมาเขย่าเล็กน้อย และสังเกตด้วยตา เจลที่มีสัดส่วนของ P407 น้อยจะมีลักษณะที่นุ่มกว่าเจลที่มีสัดส่วนของ P407 ที่สูงกว่า



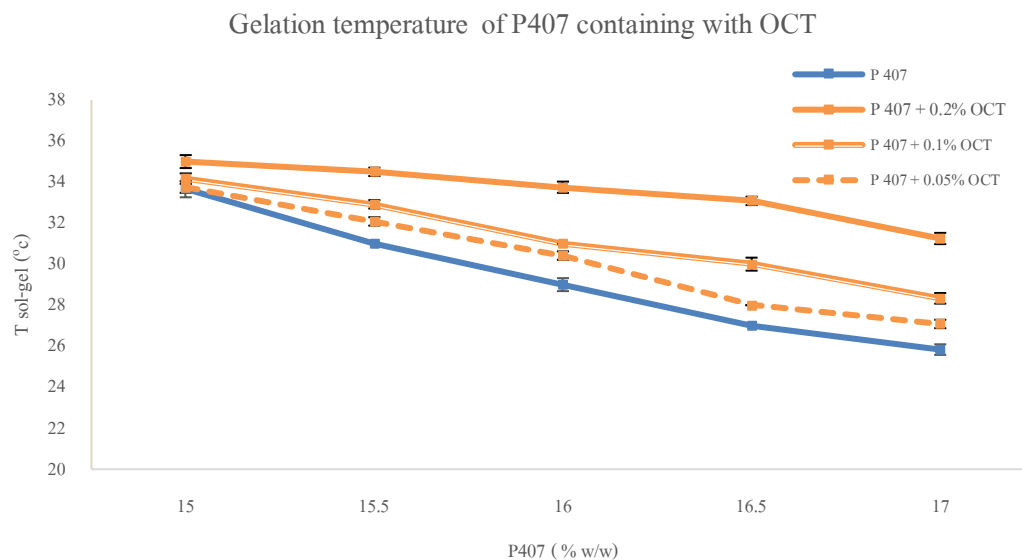
รูปที่ 11 ค่า T sol-gel (°C) ของ P407 ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

#### Gelation temperature ของสารผสม CHX และ OCT ในสัดส่วนต่าง ๆ

โดยภาพรวมพบว่าค่า T sol-gel ของสารผสม P407 กับสารทั้งสองชนิด คือ CHX และ OCT ลดลงเมื่อสัดส่วนของ P407 เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบสารผสมในแต่ละชนิด พบว่าค่า T sol gel มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารผสม CHX และ OCT เพิ่มขึ้น ดังแสดงรายละเอียดในกราฟเส้นของรูปที่ 12 และ 13



รูปที่ 12 ค่า T sol-gel (°C) ของสารผสม P407 กับ Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



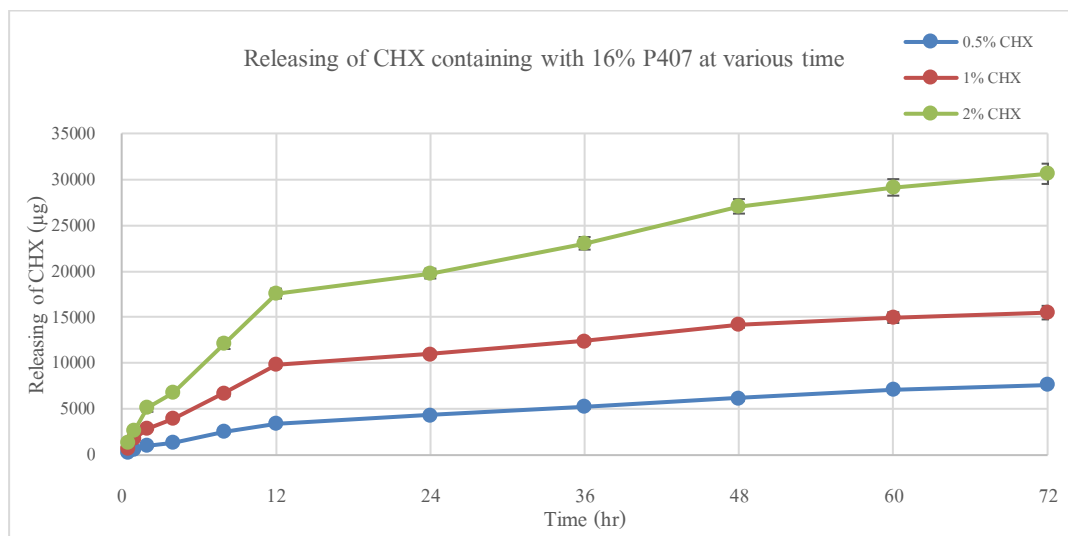
รูปที่ 13 ค่า T sol-gel (°C) ของสารผสม P407 กับ Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง

สำหรับเกณฑ์ในการพิจารณาสัดส่วนของ P407 ที่เหมาะสมพิจารณาจากค่า T sol-gel ที่สูงกว่าอุณหภูมิห้อง (อุณหภูมิห้องจะอยู่ในช่วงระหว่าง 26 – 30°C) และต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกาย (37°C) เล็กน้อย ดังนั้นสารผสม P407 ควรจะมีค่า T sol-gel อยู่ในช่วงระหว่าง 30 – 35°C เมื่อ

พิจารณาจากผลการทดลองตามกราฟเส้นในรูปที่ 10 และ 11 สัดส่วนของ P407 ที่สามารถนำมาใช้ในการศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารได้นั้น คือ 15 – 16 % w/w แต่พบว่า P407 ในสัดส่วนที่น้อยจะมีลักษณะของเจลที่นิ่มกว่า เพื่อลดปัญหาการสูญเสียของน้ำเจลในขั้นตอนการศึกษาการปลดปล่อยของสาร จึงเลือกสัดส่วนของ P407 ที่ 16% w/w

### การศึกษารูปแบบการปลดปล่อยสารต้านจุลชีพจากเจลที่เตรียมขึ้น

การปลดปล่อยสารต้านจุลชีพจากเจลที่เตรียมขึ้นโดยใช้ P407 16% w/w สาร CHX ทุกความเข้มข้น มีการปล่อยสารออกมาทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (30 นาที – 72 ชั่วโมง) และมีปริมาณการปลดปล่อย ( $\mu\text{g}$ ) การปลดปล่อยสารอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และปล่อยช้าลงเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง ดังรูปที่ 14

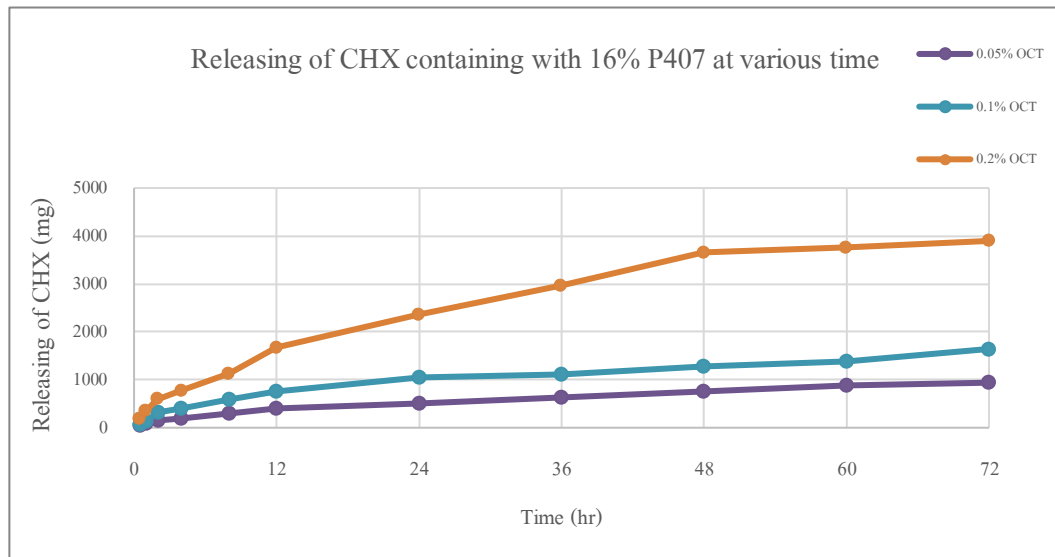


รูปที่ 14 ปริมาณและเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Chlorhexidine (CHX) ของสารผสม P407 16 % w/w ณ เวลาต่าง ๆ

สำหรับสารผสม OCT ในทุกความเข้มข้นมีการปล่อยสารออกมาทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา มีการปลดปล่อยสารออกมามากในช่วง 12 ชั่วโมงแรกไปและค่อยๆ ลดลง โดย 0.2%



OCT ถูกปลดปล่อยออกมามากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ 0.1% และ 0.05% OCT ตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 15



รูปที่ 15 ปริมาณและเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อย Octenidine (OCT) ของสารผสม P407 16% w/w ณ เวลาต่าง ๆ

#### กลไกการปลดปล่อยจากเจลที่เตรียมขึ้น (CHX และ OCT ที่ผสมกับ P407)

การวิเคราะห์รูปแบบการปลดปล่อยสารจากค่า  $R^2$  และค่า  $K$  ของแต่ละแบบจำลอง (ตารางที่ 8) สารผสมทุกชนิดและทุกความเข้มข้นมีรูปแบบการปลดปล่อยใกล้เคียงกับแบบจำลองของ Higuchi นั่นคือ ร้อยละความเข้มข้นสะสมของสารที่ถูกปลดปล่อยออกมา (% cumulative drug release) แปรผัน โดยตรงกับ รากที่สองของเวลา (square root of time)

ตารางที่ 8 ค่า  $R^2$  และค่า K ในแต่ละแบบจำลอง ของสารผสมที่ปลดปล่อยออกมา

ชนิดของสารผสม	ค่า $R^2$ ของแต่ละแบบจำลอง			ค่า K ของแต่ละแบบจำลอง		
	First order	Zero order	Higuchi	First order (/hr)	Zero order (mg/hr)	Higuchi (mg/hr <sup>1/2</sup> )
P407 + 0.5% CHX	0.9912	0.9409	<b>0.9961</b>	0.0189	0.1	<b>0.9433</b>
P407 + 1% CHX	0.9448	0.8407	<b>0.9576</b>	0.0201	0.1968	<b>1.9235</b>
P407 + 2% CHX	0.9664	0.8812	<b>0.9753</b>	0.0194	0.3951	<b>3.8104</b>
P407 + 0.05% OCT	0.9667	0.9560	<b>0.9962</b>	0.0349	0.0121	<b>0.1135</b>
P407 + 0.1% OCT	0.9648	0.9094	<b>0.9843</b>	0.023	0.0197	<b>0.1878</b>
P407 + 0.2% OCT	0.9833	0.9312	<b>0.9908</b>	0.0485	0.0538	<b>0.5088</b>

#### สมการกลไกการปลดปล่อยจากเจลที่เตรียมขึ้นด้วย Korsmeyer-Peppas model

สำหรับแบบจำลองของสมการนี้เป็นการประเมินรูปแบบของการปลดปล่อยสารจากเจลที่เตรียมขึ้น โดยดูจากค่า n ที่ได้โดยใช้เกณฑ์ดังนี้

$n = 0.5$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Fickian diffusion

$0.5 < n < 1.0$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Anomalous หรือ non-Fickian transport

$n = 1.0$  มีกลไกการปลดปล่อยแบบ Zero-order (time-independent)

ซึ่งจากการแทนค่าปริมาณของสารที่ปลดปล่อยออกมาจากแบบจำลองนี้พบว่าสารผสมแต่ละชนิดจะให้ค่า n ดังตารางที่ 9 นี้

ค่า n ในแบบจำลองของ Korsmeyer-Peppas ของสารผสมทุกชนิดอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5 - 1 แสดงว่า สารผสมที่ทำการทดสอบมีกลไกการปลดปล่อยเป็นแบบ Anomalous หรือ non-Fickian transport

ตารางที่ 9 ค่า n ของสารผสมแต่ละชนิดที่ปลดปล่อยออกมาตามแบบจำลองของ Korsmeyer-Peppas

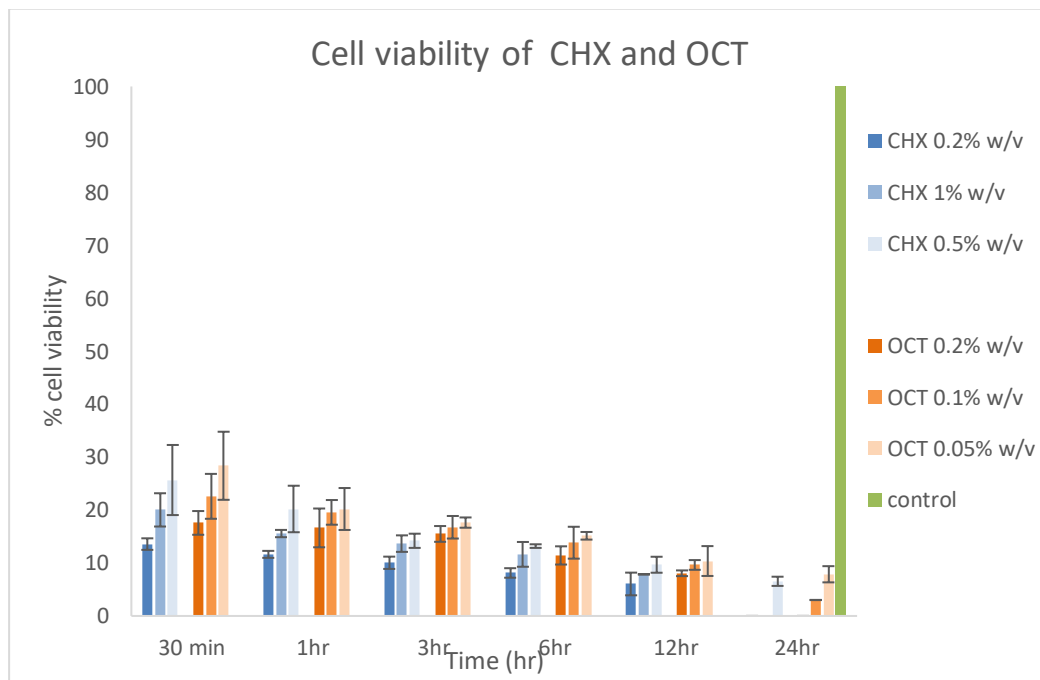
สารผสม	ค่า n จากแบบจำลองของ Korsmeyer-Peppas
P407 + 0.5% CHX	0.6296
P407 + 1% CHX	0.6045
P407 + 2% CHX	0.6450
P407 + 0.05% OCT	0.5573
P407 + 0.1% OCT	0.5868
P407 + 0.2% OCT	0.6104

#### ความเป็นพิษของสารต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929

ผลของการศึกษาความเป็นพิษของสาร CHX และ OCT ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู L929 ที่เวลา 30 นาที 1, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง โดยพิจารณาค่าความเป็นพิษจากเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 สารทั้ง 2 ชนิดมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม การวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Mann-Whitney U test เพื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสารทุกชนิด ทุกความเข้มข้น และทุกช่วงเวลาที่ทดสอบ ( $p < 0.05$ )

เมื่อเปรียบเทียบในสารชนิดเดียวกัน ณ ช่วงเวลาเดียวกันในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า มีความเป็นพิษสูงกว่า ขณะที่ความเข้มข้นเท่ากัน หากใช้เวลาดัมผัสที่นานกว่า (ณ ช่วงเวลาที่นานกว่า) สารแสดงความเป็นพิษสูงกว่า สังเกตได้จากค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงในรูปที่ 16

ในทุกความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิดที่ใช้ทดสอบให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของหนู L929 ลดลงเกิน 50 % ตั้งแต่เริ่มทดสอบที่ 30 นาทีแรก และลดลงไปเรื่อยๆ จนต่ำกว่า 10% เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง



**รูปที่ 16** ค่าร้อยละของ cell viability ของ Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ณ ความเข้มข้นต่าง ๆ

## บทที่ 4

### บทวิจารณ์

เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* เป็นเชื้อสาเหตุที่ทำให้เกิดความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟัน สารที่สามารถต้านเชื้อกลุ่มนี้ได้คือ CHX<sup>61, 62</sup> อย่างไรก็ตาม CHX มีข้อจำกัดไม่สามารถใช้ร่วมกับ NaOCl ซึ่งเป็นน้ำยาที่ใช้ล้างคลองรากฟันได้ เพื่อให้เกิดทางเลือกและหลีกเลี่ยงข้อจำกัดจึงมีการศึกษานี้เกิดขึ้น ผลการศึกษานี้ สารทั้ง 3 ชนิด คือ CHX, ALX และ OCT มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อ *C. albicans* และ *E. faecalis* ได้ดี จากผลการทดลองด้วยวิธี Agar diffusion สารทั้งหมดที่ใช้ในการทดสอบให้โซนในการยับยั้ง สำหรับค่า MIC และ MBC สารที่ให้ค่าต่ำสุดคือ OCT, ALX และ CHX ตามลำดับ โดย OCT ใช้ปริมาณความเข้มข้นที่น้อยกว่า CHX 20 - 40 เท่า และ น้อยกว่า ALX 2 - 4 เท่า แม้ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารทั้งสามชนิดด้วยกัน แต่ก็มีหลายการศึกษาที่เปรียบเทียบ OCT และ ALX ให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีกว่า CHX และสารอื่น ๆ ที่ใช้ในการรักษาคลองรากฟันคือ NaOCl และ Ca(OH)<sub>2</sub> จากรายงานของ Kim และคณะ (2013) 1% ALX มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ไม่แตกต่างกับ 2% CHX<sup>63</sup> Lucena และคณะ (2013) ได้นำ 5% CHX-gel, 5% OCT-gel และ Ca(OH)<sub>2</sub> มาใส่ในคลองรากฟันที่ทำให้ติดเชื้อ *E. faecalis* เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ให้ผลคือ 5% OCT-gel มีประสิทธิภาพที่ดีที่สุด<sup>44</sup> และการศึกษาของ Tirali และคณะ (2009) เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *S. aureus*, *E. faecalis*, และ *C. albicans* ของสาร 100% Octenisept® (0.1%OCT), 50% Octenisept® (0.05%OCT), 5.25% NaOCl และ 2.5% NaOCl โดยดูการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อต่อหนึ่งหน่วยเวลาด้วยวิธี Time-kill curves assay ได้สารที่ให้ประสิทธิภาพได้ดีที่สุด คือ 100% Octenisept® (0.1% OCT), 50% Octenisept® (0.05%OCT), 5.25% NaOCl และ 2.5% NaOCl ตามลำดับ และเมื่อการทดสอบ MIC, MBC ของสารทดสอบทั้ง 3 ชนิด Octenisept® (OCT) ให้ค่าที่ดีที่สุด<sup>64</sup>

นอกจากการศึกษาคคุณสมบัติในการต้านเชื้อในรูปแบบ planktonic แล้ว จำเป็นต้องศึกษาในรูปแบบของ biofilm เพิ่มเติม เนื่องจากว่าในคลองรากฟันเชื้อแบคทีเรียอยู่อาศัยกันใน

รูปแบบของ biofilm เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่เป็น planktonic เชื้อที่อยู่ในรูปแบบของ biofilm สามารถคงอยู่ในสถานะที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า และทนต่อสารต้านเชื้อได้มากกว่าเชื้อที่อยู่ในสถานะที่เป็น planktonic ได้ 10-1,000 เท่า จึงเป็นที่มาในการศึกษาครั้งนี้ถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อที่อยู่ในรูปแบบ biofilm

การทดสอบประสิทธิภาพในการต้าน biofilm ของการศึกษานี้ด้วยวิธี MTT assay ซึ่งเป็น metabolic assay วิธีหนึ่ง สาร MTT เป็นสารที่มีสีเหลืองจับกับเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างพลังงานเมื่อ NADP เปลี่ยนเป็น NADPH เกิดปฏิกิริยากับสาร MTT เปลี่ยนเป็นสารสีม่วง (Formazan) ทำให้ทราบปริมาณของเซลล์ที่มีชีวิตที่อยู่ในรูปแบบ biofilm ได้<sup>65</sup> ในปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการวัดความมีชีวิตของเซลล์เชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในรูปแบบของ biofilm ด้วยวิธี Confocal laser scanning microscopic analysis โดยมีหลักการ คือ การใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิด confocal ในการศึกษาการเกิด biofilm โดยใช้เลเซอร์ในการสแกนเชื้อที่ถูกเคลือบด้วยฟลูออเรสเซนและใช้คอมพิวเตอร์ช่วยในการแปลผล ทำให้สามารถแปลผลภาพในรูปแบบที่เป็น 3 มิติที่มีความซับซ้อนได้ นอกจากนี้ทำให้ทราบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียที่อยู่ในรูปแบบ biofilm ที่มีชีวิต ยังให้เห็นภาพการเกาะกลุ่มของเชื้อ และคุณลักษณะของ biofilm แบบ 3 มิติอีกด้วย แต่วิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Confocal laser scanning ซึ่งมีราคาที่สูง และมีขั้นตอนในการทดสอบที่ซับซ้อน ผู้ทำการทดสอบต้องมีความรู้และประสบการณ์ ประกอบกับวัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการทราบเพียงคุณสมบัติเบื้องต้นในการต้าน biofilm ของสารในกลุ่ม bisbiguanide ซึ่งการทดสอบด้วยวิธี MTT assay สามารถทำได้สะดวกและง่ายในห้องทดลอง และในปัจจุบันยังมีหลาย ๆ การศึกษาที่ยังกล่าวถึงและใช้วิธีนี้อยู่<sup>66</sup>

การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อจุลชีพในสถานะ biofilm เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นต่ำสุดระหว่าง CHX และ OCT ทั้งความสามารถในการยับยั้งการสร้าง biofilm และความสามารถในการยับยั้งเชื้อในสถานะที่เป็น biofilm ได้ 100% นั้น ได้ผลการทดสอบว่าการใช้ OCT ปริมาณน้อยกว่า CHX ประมาณ 5 และ 20 เท่าตามลำดับ ทั้งในเชื้อ *C. albicans* และ *E. faecalis* ทำให้ OCT มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อในรูปแบบ biofilm ได้ดีกว่า CHX อย่างชัดเจน ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Bukhary และคณะ (2017) เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการกำจัด biofilm ในเชื้อ *E. faecalis* ในชิ้นฟันมนุษย์ระหว่าง Octenisept® (0.1% OCT), 1% ALX และ 2% CHX พบว่า Octenisept® (0.1% OCT) ให้ประสิทธิภาพสูงสุด<sup>66</sup>

เมื่อเปรียบเทียบผลการต้านเชื้อในสภาวะ planktonic ต้องใช้ความเข้มข้นของ CHX และ OCT ที่สูงขึ้นหลายเท่าเพื่อกำจัดเชื้อในสภาวะที่เป็น biofilm ได้ แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นเริ่มต้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้รวมถึงความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาอื่น ๆ ที่กล่าวได้ไว้ข้างต้นยังคงสูงกว่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ต้าน biofilm ได้ 100% ดังนั้นการเลือกปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมของ OCT ในการนำมาใช้ในการรักษาคล่องรากฟันจริงมีแนวโน้มที่จะมีความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่เลือกนำมาใช้ในการศึกษานี้ซึ่งต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

การพัฒนาสาร CHX และ OCT เป็นยาใส่ในคล่องรากฟันจำเป็นต้องเติมสารบางอย่างให้อยู่ในรูปแบบเจลเพื่อให้ตัวยาคงสภาพอยู่ในคล่องรากฟันได้ ปัจจุบันมีบริษัทผู้ผลิต ผลิต CHX ในรูปแบบเจลสำเร็จรูป (Consepsis<sup>®</sup> V) เมื่อมีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ที่อยู่ในแบบจำลองฟันที่ติดเชื้อ Consepsis<sup>®</sup> V มีคุณสมบัติดีกว่า Ca(OH)<sub>2</sub> ที่ผสมกับ polymer ชนิดต่าง ๆ เช่น propylene glycol (PG), methycellulose (MC) เนื่องจากความหนืดของ Consepsis<sup>®</sup> V ทำให้ตัวยาไหลแผ่ไปยัง dentinal tubules และบริเวณต่าง ๆ ของคล่องรากฟันได้ไม่ทั่วถึงทั้ง ๆ ที่ Consepsis<sup>®</sup> V มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ได้ดีกว่า Ca(OH)<sub>2</sub><sup>67</sup> นอกจากนี้ยังมี polymer ที่นำมาใช้ในทางเภสัชเพื่อนำมาพัฒนาเป็นระบบนำส่งยา และอยู่ในรูปแบบเจล เช่น Hydroxypropyl Methylcellulose (HPMC) และ Polyethylene glycol (PEG) แต่อย่างไรก็ตาม P407 มีคุณสมบัติพิเศษที่เหนือกว่า polymer ตัวอื่น ๆ คือ ที่อุณหภูมิห้องเป็นของเหลว แต่เมื่ออยู่ในอุณหภูมิร่างกาย มีลักษณะเป็นเจล ดังนั้นในขณะที่นำมาใช้งานมีคุณสมบัติเป็นของเหลว ทำให้ตัวยาสามารถให้แผ่ไปยังบริเวณต่าง ๆ รวมทั้ง dentinal tubules ได้ดี และคงสภาพในรูปแบบเป็นเจลเมื่ออยู่ในคล่องรากฟันซึ่งมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิร่างกาย

เกณฑ์ในการพิจารณาความเข้มข้นของ P407 เพื่อใช้ในการทดสอบการปลดปล่อยสารนั้นจำเป็นต้องพิจารณาจากค่า T sol-gel ของสารผสมที่มีค่าต่ำกว่าอุณหภูมิของร่างกายเล็กน้อย ค่าที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 30-35°C การพัฒนาสาร CHX และ OCT มาผสมกับ P407 พบว่าส่งผลต่อค่า T sol-gel ของ P407 คือมีผลทำให้ค่า T sol-gel สูงขึ้น จากการทบทวนวรรณกรรมยังไม่พบการศึกษาที่ให้ข้อสรุปว่า CHX มีผลต่อ T sol-gel ของ P407 แต่ในการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า CHX มีผลทำให้ T sol-gel สูงขึ้น และแปรผันตามค่าความเข้มข้นของ CHX นอกจากนี้ OCT มีผลต่อ T sol-gel ของสารผสม P407 เช่นกัน แม้ว่าความเข้มข้นของ OCT ที่นำไปผสมกับ P407 เป็นปริมาณที่น้อยคือ 0.2%, 0.1% และ 0.05% (น้อยกว่า CHX ประมาณ 10 เท่า) แต่ในการเตรียมสารผสม OCT ต้องใช้

ethanol เป็นตัวทำละลายเพื่อให้ OCT ละลายได้มากขึ้น (ส่วนผสม OCT ในการศึกษาค้างนี้มี ethanol เป็นองค์ประกอบ 2.5%) จึงมีความเป็นไปได้ที่ทำให้ T sol-gel เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจาก แอลกอฮอล์มีผลทำให้ลด hydrophobic interaction ได้ ดังนั้นแอลกอฮอล์อาจมีผลทำให้ลด hydrophobic interaction ที่อยู่รอบ ๆ โมเลกุลของ P407 ที่เป็นส่วน hydrophobic ได้ส่งผลให้ กระบวนการก่อตัวกลายเป็นเจลเกิดได้ยากขึ้น<sup>68</sup> จากผลการศึกษาค้างนี้ได้สัดส่วนที่เหมาะสมของ P407 คือ 15 - 16% w/w แต่เนื่องจากสัดส่วนของ P407 ที่น้อยจะได้เจลที่มีลักษณะที่นุ่มกว่า ดังนั้น เพื่อให้เจลคงรูปร่างได้ดี จึงเลือกสัดส่วนของ P407 ที่ 16% w/w

การศึกษารูปแบบปลดปล่อยสาร CHX และ OCT ในสารผสม P407 เมื่อพิจารณา จากค่า  $R^2$  พบว่าทุกความเข้มข้นของสารทุกชนิดมีการปลดปล่อยเป็นแบบ Higuchi โดยอัตราการ แพร่แปรผันตามรากที่สองของเวลา หากวิเคราะห์สมการ Korsmeyer-Peppas เพื่อดูกลไกการ ปลดปล่อยสารพบว่าสารทุกความเข้มข้น มีค่าอยู่ในช่วงมากกว่า 0.5 แต่น้อยกว่า 1 แสดงถึงกลไก การปลดปล่อยเป็นแบบ Anomalous หรือ non-Fickian transport นั่นคือสารผสม P407 มีกลไกการ ปลดปล่อยร่วมกันมากกว่า 1 รูปแบบ ดังนั้นเมื่อพิจารณาปริมาณการปลดปล่อยสารจากกราฟเส้นโค้ง แสดงในรูปที่ 12 และ 13 พบว่าในช่วง 12 ชั่วโมงแรกสารผสมทั้ง 2 ชนิด มีการปลดปล่อยของสารใน ทุกความเข้มข้นออกมาในปริมาณที่สูงสังเกตได้จากกราฟเส้นมีความชันมากกว่าในช่วง 12-72 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลของสาร CHX และ ALX ถูกปลดปล่อยออกมาจากการแพร่ผ่านผิว เจลไปยังน้ำที่อยู่บนผิวเจลร่วมกับการกร่อนของผิวหน้าเจล เมื่อเวลาผ่านไปอัตราการปลดปล่อย ของสารทั้ง 2 ชนิดลดลงเนื่องจากสารที่อยู่บริเวณผิวหน้าเจลหมดไปจึงทำให้การปลดปล่อยของ สารในช่วงหลังอยู่ในรูปแบบการแพร่เพียงอย่างเดียว<sup>69</sup> จึงทำให้สรุปได้ว่าการศึกษาค้างนี้การ ปลดปล่อยของสารจะอยู่ในรูปแบบของการแพร่และการสึกกร่อนของผิวหน้าเจล แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ไม่สามารถเปรียบเทียบเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นจริงภายในช่องปากได้ เนื่องจากใน 24 ชั่วโมง พันธธรรมชาติไม่ได้มีการขยับตลอดเวลา โดยจะมีการขยับเฉพาะเวลาพูดและรับประทานอาหาร เท่านั้น ดังนั้นการกร่อนของผิวหน้าเจลอาจมีน้อยกว่าในการศึกษาค้างนี้ หรืออาจมีการปลดปล่อย สารในรูปแบบ diffusion เพียงอย่างเดียว

ผลการศึกษาความเป็นพิษของ CHX และ OCT ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟ- โบรบลาสต์หนู L929 พบว่าสารทั้งสองชนิดมีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไปเพียง 30 นาที % cell viability ลดลงเกิน 50% จนเมื่อเวลาผ่านไปถึง 24 ชั่วโมง % cell viability จะลดลงจนต่ำกว่า



10% ทั้ง CHX และ OCT มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Babish และคณะ (1995) ที่ ศึกษาในห้องปฏิบัติการได้ข้อสรุปว่า CHX มีความเป็นพิษต่อเซลล์เหงือกของมนุษย์โดยความเป็นพิษขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ CHX สัมผัสกับเซลล์ และความเข้มข้นของสาร การศึกษาของ Öncag และคณะ (2003) ได้เปรียบเทียบสารที่ใช้ในการล้างคลองรากฟัน ซึ่งประกอบด้วย 5.25% NaOCl และ 2% CHX โดยการฉีดสารเข้าไปใต้ผิวหนังของหนูทดลอง และตรวจดูปริมาณเซลล์ที่อักเสบให้ผลว่า 2% CHX ทำให้เกิดเซลล์อักเสบน้อยกว่า 5.25% NaOCl ถึง 3 เท่า<sup>69</sup> ถึงแม้ว่าไม่มีการศึกษาถึงความเป็นพิษของ OCT ต่อเซลล์ภายในช่องปาก แต่จากการศึกษานี้ OCT มีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามการรักษาคลองรากฟันถือเป็นการทำในระบบปิด โอกาสที่เซลล์จะสัมผัสโดยตรงกับตัวสารที่ใช้ทำเป็นยาใส่ในคลองรากฟัน หรือน้ำยาล้างคลองรากฟันมีน้อยเห็นได้จากปัจจุบันสารที่ใส่ไปในคลองรากฟันเพื่อล้าง คือ NaOCl ซึ่งทุก ๆ ความเข้มข้นที่นำมาใช้ล้างคลองรากฟันมีความเป็นพิษต่อเซลล์เช่นกัน ดังนั้นทันตแพทย์จึงควรใช้อย่างระมัดระวัง หากเปรียบเทียบความเป็นพิษระหว่าง CHX และ OCT OCT มีความเป็นพิษที่น้อยกว่า เนื่องจากความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของ OCT ที่น้อยกว่า CHX ถึง 10 เท่า เหตุผลที่เลือกใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่าเนื่องจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของ 2% CHX ไม่แตกต่างกับ 0.1% OCT ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น

สำหรับข้อจำกัดของการใช้ร่วมกันระหว่าง CHX และ NaOCl ทำให้มีการศึกษานี้เกิดขึ้นเพื่อเป็นทางเลือกหนึ่ง ในปัจจุบันยังไม่ได้มีการศึกษาที่ชัดเจนเกี่ยวกับปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง OCT และ NaOCl แต่ Thaha และคณะ (2017) ได้ทำการศึกษาปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นระหว่าง Octenisept<sup>®</sup> (มีองค์ประกอบหลักคือ 0.1% OCT dihydrichloride และ 2% phynoxyethanol ) และ NaOCl พบว่าตะกอนที่ได้เป็นตะกอนสีขาวคล้ายน้ำมันซึ่งเป็น phynoxyethanol ที่ไม่ละลาย เมื่อนำ Octenisept<sup>®</sup> ไปล้างร่วมกับ NaOCl บนชิ้นฟันมนุษย์ พบว่าตะกอนสีขาวมีอย่างเบาบางและติดอยู่ในบริเวณ dentinal tubules น้อยกว่าตะกอน ที่เกิดจาก CHX ผสมกับ NaOCl นอกจากนี้ ตะกอน phynoxyethanol สามารถละลายใน ethanol และ chloroform อีกทั้งยังสามารถล้างออกด้วยวิธี passive ultrasonic อีกด้วย<sup>70</sup> ดังนั้นการนำ OCT มาใช้ในการรักษาคลองรากฟันจึงถือเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและนำมาศึกษาต่อในอนาคต

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดในการทำ Agar diffusion ของสารที่นำมาศึกษาถึงแม้ว่าสารทุกชนิดให้โซนยับยั้ง โดย CHX ให้โซนในการยับยั้งมากกว่า ALX และ OCT

ตามลำดับ แต่ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของสารทั้ง 3 ชนิดกลับมี OCT ที่ให้ประสิทธิภาพที่ดีที่สุดและมากกว่า ALX และ CHX ตามลำดับ เนื่องจากปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของ โชนยับยั้งนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพของสารในการต้านเชื้อจุลชีพเพียงอย่างเดียว ยังมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ไม่ว่าจะเป็นความเข้มข้นของสาร โดยในสารชนิดเดียวกันถ้าความเข้มข้นสูงขึ้นมักมีแนวโน้มให้ โชนในการยับยั้งที่กว้างกว่า ในส่วนของมวลโมเลกุลของสารแต่ละชนิดสารที่มีมวลโมเลกุลมากมักมีอัตราการแพร่ของสารในเจลได้ช้ากว่าสารที่มีมวล โมเลกุลที่เล็กกว่า<sup>71</sup> ดังนั้นเมื่อพิจารณามวล โมเลกุลของ CHX, ALX และ OCT คือ 578.368, 581.72 และ 623.84 g/mol<sup>66,67,68</sup> ตามลำดับ จึงมีผล ทำให้ OCT แพร่ผ่านเจลได้ช้ากว่า CHX และ ALX ดังนั้นการทดสอบด้วยวิธี Agar diffusion จึงให้ข้อสรุปได้ว่า สารทั้ง 3 ชนิดมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* เพียงอย่างเดียว แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสารชนิดไหนให้ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีที่สุด ซึ่งจำเป็นที่จะต้องทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อวิธีอื่นร่วมด้วย คือ การหาค่า MIC และ MBC

ภายใต้ข้อจำกัดของการศึกษานี้ทำให้สรุปได้ว่า OCT เป็นสารชนิดหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้เป็นทางเลือกในการรักษาคอลงรากฟันได้ทั้งในรูปแบบของสารละลาย และสารผสม P407 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นหากพัฒนาไปใช้ในทางคลินิกจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมโดยจำลองเหตุการณ์ที่ใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากขึ้น เช่น ทำในแบบจำลองฟัน และศึกษาต่อในทางคลินิก

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### บทสรุป

ภายใต้ข้อจำกัดจากการศึกษาของการศึกษาในห้องปฏิบัติการครั้งนี้สรุปได้ว่า

1. ทุกความเข้มข้นของสารทั้ง 3 ชนิด (CHX, ALX และ OCT) ที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในสภาวะ planktonic สารที่ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อได้ดีที่สุดคือ OCT, ALX และ CHX ตามลำดับ
2. สาร CHX และ OCT มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในรูปแบบของ biofilm โดย OCT ให้ประสิทธิภาพที่ดีกว่า CHX
3. การปลดปล่อยของสาร
  - a) สัดส่วน P407 ที่เหมาะสมเพื่อเตรียมเป็นสารผสม CHX และ OCT คือ 16%
  - b) สารผสม P407 กับ CHX และ OCT มีรูปแบบการปลดปล่อยร่วมกันสองรูปแบบคือ diffusion และ erosion
4. สาร CHX และ OCT มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 โดย CHX ให้ค่าความเป็นพิษที่สูงกว่า OCT ในทุกช่วงเวลาทดสอบ

#### ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารต้านจุลชีพในกลุ่ม bisbiguanide และพัฒนาสารผสม OCT กับ P407 เพื่อนำมาใช้เป็นยาใส่ในคลองรากฟัน หากนำไปทดสอบในช่องปากอาจให้ผลที่แตกต่างจากการทดสอบครั้งนี้ เนื่องจากคลองรากฟันเป็นระบบที่ซับซ้อน การอยู่อาศัยของเชื้อภายในคลองรากฟันมีความหลากหลาย สำหรับการศึกษการปลดปล่อยของสารไม่อาจจำลองสภาพความเป็นจริงได้ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงกลไกการปลดปล่อยของตัวสารเท่านั้น นอกจากนี้การศึกษาค่าความเป็นพิษ

ของสารต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์หนู L929 นั้นเป็นการทดสอบโดยให้สารสัมผัสกับเซลล์โดยตรง มีความแตกต่างจากสถานะความเป็นจริง ทั้งนี้การรักษาคลองรากฟันอยู่ในระบบปิด โอกาสที่สารสัมผัสกับเซลล์มีน้อย ยังจำเป็นที่จะต้องศึกษาคุณสมบัติของสารผสม P407 เพิ่มเติมก่อนนำมาใช้จริง ทั้งในแง่ของอายุการใช้งาน รูปแบบในการนำไปใช้ และความคงสภาพของสารผสม P407 แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้สามารถนำองค์ความรู้มาเป็นพื้นฐานในการศึกษาเพื่อพัฒนามาใช้ในผู้ป่วยจริงต่อไป

## เอกสารอ้างอิง

1. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005; 31(12): 863-6.
2. Salehrabi R, Rotstein I. Endodontic treatment outcomes in a large patient population in the USA: an epidemiological study. *J Endod* 2004; 30(12): 846-50.
3. Friedman S, Mor C. The success of endodontic therapy healing and functionality. *CDA J* 2004; 32(6): 493-503.
4. Evans M, Davies J, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35(3): 221-8.
5. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP, et al. Efficacy of chlorhexidine-and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis in vitro*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5): 618-24.
6. Gomes B, Souza S, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Valdrighi L, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003; 36(4): 267-75.
7. Evans MD, Baumgartner JC, Khemaleelakul S-u, Xia T. Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as an intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003; 29(5): 338-9.
8. Safavi KE, Spngberg LS, Langeland K. Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 1990; 16(5): 207-10.
9. Sundqvist G, Figdor D, Persson S, Sjögren U. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85(1): 86-93.
10. Waltimo T, Siren E, Orstavik D, Haapasalo M. Susceptibility of oral *Candida species* to calcium hydroxide *in vitro*. *Int Endod J* 1999; 32(2): 94-8.

11. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 2007; 33(8): 966-9.
12. Souza M, Cecchin D, Barbizam JV, Almeida JF, Zaia AA, Gomes BP, et al. Evaluation of the colour change in enamel and dentine promoted by the interaction between 2 % chlorhexidine and auxiliary chemical solutions. *Aust Endod J* 2013; 39(3): 107-11.
13. Bui TB, Baumgartner JC, Mitchell JC. Evaluation of the interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate and its effect on root dentin. *J Endod* 2008; 34(2): 181-5.
14. Chhabra R, Huff J, Haseman J, Elwell M, Peters A. Carcinogenicity of p-chloroaniline in rats and mice. *Food Chem Toxicol* 1991; 29(2): 119-24.
15. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12(1): 147-79.
16. Sedlock DM, Bailey DM. Microbicidal activity of octenidine hydrochloride, a new alkanediylbis [pyridine] germicidal agent. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28(6): 786-90.
17. Niu G, Du F, Song L, Zhang H, Yang J, Cao H, et al. Synthesis and characterization of reactive poloxamer 407s for biomedical applications. *J Control Release* 2009; 138(1): 49-56.
18. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Univ.; 1976.
19. Hargreaves KM, Berman LH. Cohen's pathways of the pulp. Elsevier Health Sciences; 2015.
20. Signoretti FG, Endo MS, Gomes BP, Montagner F, Tosello FB, Jacinto RC. Persistent extraradicular infection in root-filled asymptomatic human tooth: scanning electron microscopic analysis and microbial investigation after apical microsurgery. *J Endod* 2011; 37(12): 1696-700.
21. รวี เกียรไพศาล. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อ ที่พบบ่อยในช่องปาก. เล่ม 1. ไอคิว มีเดีย สงขลา; 2009.
22. Love R. *Enterococcus faecalis*—a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34(5): 399-405.

23. Stuart CH, Schwartz SA, Beeson TJ, Owatz CB. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. **J Endod** 2006; 32(2): 93-8.
24. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of *enterococci* in filled root canals. **Int Endod J** 2009; 42(4): 277-87.
25. Figdor D, Davies J, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. **Oral Microbiol Immunol** 2003; 18(4): 234-9.
26. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. **J Endod** 2005; 31(1): 53-6.
27. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. **J Endod** 2002; 28(10): 689-93.
28. Gomes B, Ferraz C, ME V, Berber V, Teixeira F, Souza-Filho F. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate in the elimination of *Enterococcus faecalis*. **Int Endod J** 2001; 34(6): 424-8.
29. Ayhan H, Sultan N, Cirak M, Ruhi M, Bodur H. Antimicrobial effects of various endodontic irrigants on selected microorganisms. **Int Endod J** 1999; 32(2): 99-102.
30. White R, Hays G, Janer L. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. **J Endod** 1997; 23(4): 229-31.
31. Komorowski R, Grad H, Wu XY, Friedman S. Antimicrobial substantivity of chlorhexidine-treated bovine root dentin. **J Endod** 2000; 26(6): 315-7.
32. Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. **Aust Endod J** 2006; 32(3): 112-5.
33. Rosenthal S, Spångberg L, Safavi K. Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004; 98(4): 488-92.
34. Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Silva LA, Nelson Filho P, Bonifacio KC, Ito IY. *In vivo* antimicrobial activity of 2% chlorhexidine used as a root canal irrigating solution. **J Endod** 1999; 25(3): 167-71.
35. Rossi-Fedele G, Dogramaci EJ, Guastalli AR, Steier L, de Figueiredo JAP. Antagonistic interactions between sodium hypochlorite, chlorhexidine, EDTA, and citric acid. **J Endod** 2012; 38(4): 426-31.

36. Zorko M, Jerala R. Alexidine and chlorhexidine bind to lipopolysaccharide and lipoteichoic acid and prevent cell activation by antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(4): 730-7.
37. Barrios R, Ferrer-Luque CM, Arias-Moliz MT, Ruiz-Linares M, Bravo M, Baca P. Antimicrobial substantivity of alexidine and chlorhexidine in dentin. *J Endod* 2013; 39(11): 1413-5.
38. Silveira LFM, Baca P, Arias-Moliz MT, Rodríguez-Archilla A, Ferrer-Luque CM. Antimicrobial activity of alexidine alone and associated with N-acetylcysteine against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Int J Oral Sci* 2013; 5(3): 146-9.
39. Kim H-S, Zhu Q, Baek S-H, Jung I-Y, Son W-J, Chang S-W, et al. Chemical interaction of alexidine and sodium hypochlorite. *J Endod* 2012; 38(1): 112-6.
40. Patters M, Ånerud K, Trummel C, Kornman K, Nalbandian J, Robertson P. Inhibition of plaque formation in humans by octenidine mouthrinse. *J Periodontal Res* 1983; 18(2): 212-9.
41. Slee AM, O'Connor JR. In vitro antiplaque activity of octenidine dihydrochloride (WIN 41464-2) against preformed plaques of selected oral plaque-forming microorganisms. *Antimicrob Agents Chemother* 1983; 23(3): 379-84.
42. Decker EM, Weiger R, Wiech I, Heide PE, Brex M. Comparison of antiadhesive and antibacterial effects of antiseptics on *Streptococcus sanguinis*. *Eur J Oral Sci* 2003; 111(2): 144-8.
43. Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(5): e117-e20.
44. Lucena J, Decker E, Walter C, Boeira L, Löst C, Weiger R. Antimicrobial effectiveness of intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis*: chlorhexidine versus octenidine. *Int Endod J* 2013; 46(1): 53-61.
45. Cherian B, Gehlot PM, Manjunath MK. Comparison of the Antimicrobial Efficacy of Octenidine Dihydrochloride and Chlorhexidine with and Without Passive Ultrasonic Irrigation-An *In vitro* Study. *J Clin Diagn Res* 2016; 10(6): ZC71-7.



46. Tirali RE, Bodur H, Ece G. *In vitro* antimicrobial activity of Sodium hypochlorite, Chlorhexidine gluconate and Octenidine Dihydrochloride in elimination of microorganisms within dentinal tubules of primary and permanent teeth. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(3): e517.
47. Schmidt J, Zyba V, Jung K, Rinke S, Haak R, Mausberg R, et al. Cytotoxic effects of octenidine mouth rinse on human fibroblasts and epithelial cells—an *in vitro* study. *Drug Chem Toxicol* 2016; 39(3): 322-30.
48. Welk A, Zahedani M, Beyer C, Kramer A, Müller G. Antibacterial and antiplaque efficacy of a commercially available octenidine-containing mouthrinse. *Clin Oral Investig* 2015: 1-8.
49. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. Handbook of pharmaceutical excipients: Pharmaceutical press London; 2006.
50. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006; 23(12): 2709-28.
51. Bochot A, Fattal E, Grossiord JL, Puisieux F, Couvreur P. Characterization of a new ocular delivery system based on a dispersion of liposomes in a thermosensitive gel. *Int J Pharm* 1998; 162(1): 119-27.
52. Ricci E, Bentley M, Farah M, Bretas R, Marchetti J. Rheological characterization of Poloxamer 407 lidocaine hydrochloride gels. *Eur J Pharm Sci* 2002; 17(3): 161-7.
53. Paavola A, Kilpeläinen I, Yliruusi J, Rosenberg P. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *Int J Pharm* 2000; 199(1): 85-93.
54. Wannachaiyasit S, Phaechamud T. Development of chlorhexidine thermosensitive gels as a mouth antiseptic. *J Met* 2010; 20: 165-8.
55. Standard A. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pa: 2008.
56. Tang H-J, Chen C-C, Ko W-C, Yu W-L, Chiang S-R, Chuang Y-C. *In vitro* efficacy of antimicrobial agents against high-inoculum or biofilm-embedded meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with vancomycin minimal inhibitory concentrations equal to 2µg/mL (VA2-MRSA). *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38(1): 46-51.

57. Wu W-S, Chen C-C, Chuang Y-C, Su B-A, Chiu Y-H, Hsu H-J, et al. Efficacy of combination oral antimicrobial agents against biofilm-embedded methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Microbiol Immunol Infect* 2013; 46(2): 89-95.
58. Brambilla E, Gagliani M, Ionescu A, Fadini L, García-Godoy F. The influence of light-curing time on the bacterial colonization of resin composite surfaces. *Dent Mater J* 2009; 25(9): 1067-72.
59. Dash S, Murthy PN, Nath L, Chowdhury P. Kinetic modeling on drug release from controlled drug delivery systems. *Acta Pol Pharm* 2010; 67(3): 217-23.
60. Ritger PL, Peppas NA. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices. *J Control Release* 1987; 5(1): 37-42.
61. Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod* 1998; 24(7): 472-6.
62. Portenier I, Waltimo TM, Haapasalo M. *Enterococcus faecalis*—the root canal survivor and ‘star’ in post-treatment disease. *Endod Topics* 2003; 6(1): 135-59.
63. Kim H-S, Kum K-Y, Zhu Q, Chang SW, Han SH, Baek S-H, et al. Antimicrobial effect of alexidine and chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* infection. *Int J Oral Sci* 2013; 5(1): 26.
64. Tirali RE, Turan Y, Akal N, Karahan ZC. *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 108(5): e117-e20.
65. Kairo SK, Bedwell J, Tyler PC, Carter A, Corbel MJ. Development of a tetrazolium salt assay for rapid determination of viability of BCG vaccines. *Vaccine* 1999; 17(19): 2423-8.
66. Bukhary S, Balto H. Antibacterial Efficacy of Octenisept, Alexidine, Chlorhexidine, and Sodium Hypochlorite against *Enterococcus faecalis* Biofilms. *J Endod* 2017; 43(4): 643-7.
67. de Magalhães Silveira CF, Cunha RS, Fontana CE, de Martin AS, de Almeida Gomes BPF, Motta RHL, et al. Assessment of the antibacterial activity of calcium hydroxide combined

- with chlorhexidine paste and other intracanal medications against bacterial pathogens. *Eur J Dent* 2011; 5(1): 1.
68. Ben-Naim AY. Hydrophobic Interactions, An Overview. *Solution Behavior of Surfactants*: Springer; 1982. p. 27-40.
69. Önçag Ö, Hoşgör M, Hilmioglu S, Zekioglu O, Eronat C, Burhanoglu D. Comparison of antibacterial and toxic effects of various root canal irrigants. *Int Endod J* 2003; 36(6): 423-32.
70. Thaha KA, Varma RL, Nair MG, Joseph VS, Krishnan U. Interaction between octenidine-based solution and sodium hypochlorite: A mass spectroscopy, proton nuclear magnetic resonance, and scanning electron microscopy-based observational study. *J Endod* 2017; 43(1): 135-40.
71. Davis W, Stout T. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay I. Factors Influencing Variability and Error. *J Appl Microbiol* 1971; 22(4): 659-65.

ภาคผนวก

## ภาคผนวก 1

### การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

#### 1. Sabouraud's dextrose agar (SDA; KEMMAR)

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Agar	15	กรัม

##### วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouraud's dextrose agar commercial product)

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ  $5.6 \pm 0.2$
- นำเข้า autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- รอให้เย็นที่  $45-50^{\circ}\text{C}$  เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น

\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

#### 2. Brain heart infusion agar (BHI Agar; Bacto)

##### ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brain Infusion	7.7	กรัม
Beef Heart Infusion	9.8	กรัม
Peptose Peptone	10.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม
สารเพิ่มเติม		
Agar (Difo)	15	กรัม
Yeast Extract (Bacto)	5.0	กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Agar commercial product)

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์และเติมน้ำลงไปตามสัดส่วนที่กำหนด เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ  $7.4 \pm 0.2$
- นำเข้า autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 45 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- รอให้เย็นที่  $45-50^{\circ}\text{C}$  เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น

\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

### 3. Brain heart infusion Broth (BHI Broth; Bacto)

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

Calf Brain Infusion	7.7	กรัม
Beef Heart Infusion	9.8	กรัม
Peptose Peptone	10.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม

### วิธีเตรียม (สำหรับ Brain Heart Infusion Broth commercial product)

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ  $7.4 \pm 0.2$
- นำเข้า autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- รอให้เย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น

\*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

### 4. Blood agar (BA)

#### ส่วนประกอบต่อลิตร

Heart Infusion	10	กรัม
Meat Peptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม

Agar 15 กรัม

**วิธีเตรียม (สำหรับ Blood agar base commercial product)**

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ  $7.3 \pm 0.2$
  - นำเข้า autoclave ที่  $118-121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
  - รอให้เย็นที่  $45-50^{\circ}\text{C}$  เติม sterile expired human blood ในอัตราส่วน 5% โดยปริมาตร เข้าอาหารที่เตรียมเบา ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
  - เทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวและเก็บตู้เย็น
- \*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

**5. Sabouraud's dextrose broth (SDB; Difco)**

**ส่วนประกอบต่อลิตร**

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Animal tissue	15	กรัม

**วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouard's dextrose broth commercial product)**

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาณที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ  $5.6 \pm 0.2$
  - นำเข้า autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
  - รอให้อาหารเย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น
- \*\* ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

**6. Phosphate buffer saline (PBS); pH 7.0**

**ส่วนประกอบ**

Sodium chloride	6	กรัม
Ortho-phosphoacetic acid	5	กรัม

**วิธีเตรียม**

- ชั่งสารเคมีตามปริมาณข้างต้น เติมน้ำกลั่น 750 มิลลิลิตร ปรับ pH ด้วย NaOH หรือ HCl ให้ได้ 7.0
- นำเข้า autoclave ที่  $121^{\circ}\text{C}$  ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

c. รอให้เย็นลงแล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

## ภาคผนวก 2

### ข้อมูลผลการศึกษา

ตารางที่ 10 เปรอ์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการสร้าง biofilm ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Candida albicans* (biofilm inhibition  $\leq 100$ )

ชนิดของสาร	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )
CHX	1250	312.5
OCT	625	625

ตารางที่ 11 เปรอ์เซ็นต์ความเข้มข้นต่ำสุดของสาร Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ในการยับยั้งการต้านเชื้อที่อยู่ในรูป biofilm ต่อเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ *Candida albicans* (biofilm eradication  $\leq 100$ )

ชนิดของสาร	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )
CHX	2500	1250
OCT	0125	125



ตารางที่ 12 ค่าเฉลี่ย T sol-gel (°C) ของโพลอกซามเมอร์เจลที่ผสม Chlorhexidine (CHX) และ Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (%w/w)			Gelation temperature (° C)	SD
P407	CHX	OCT		
15.0	-	-	33.67	0.41
15.5	-	-	31.00	0.00
16.0	-	-	29.00	0.32
16.5	-	-	27.00	0.00
17.0	-	-	25.83	0.26
15.0	2	-	38.42	0.41
15.5	2	-	37.08	0.00
16.0	2	-	35.92	0.32
16.5	2	-	34.00	0.00
17.0	2	-	31.83	0.26
15.0	1	-	34.83	0.26
15.5	1	-	32.83	0.26
16.0	1	-	30.92	0.20
16.5	1	-	30.75	0.27
17.0	1	-	29.75	0.42
15.0	0.5	-	34.08	0.66
15.5	0.5	-	32.08	0.20
16.0	0.5	-	30.00	0.00
16.5	0.5	-	28.92	0.20
17.0	0.5	-	27.00	0.00

15.0	-	0.2	35.00	0.32
15.5	-	0.2	34.08	0.20
ความเข้มข้น (%w/w)			Gelation temperature (° C)	SD
P407	CHX	OCT		
16.0	-	0.2	34.50	0.00
16.5	-	0.2	33.08	0.20
17.0	-	0.2	32.83	0.41
15.0	-	0.1	34.17	0.26
15.5	-	0.1	32.92	0.20
16.0	-	0.1	31.00	0.00
16.5	-	0.1	30	0.32
17.0	-	0.1	28.33	0.26
15.0	-	0.05	35.00	0.32
15.5	-	0.05	34.08	0.20
16.0	-	0.05	33.75	0.27
16.5	-	0.05	33.08	0.20
17.0	-	0.05	31.25	0.27

ตารางที่ 13 ร้อยละของ cell viability ของสาร Chlorhexidine (CHX) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์  
ไฟโบร بلاสต์หนู L929 ในระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	% cell viability $\pm$ SD					
	30 นาที	1 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
20,000	13.57 (1.09)	11.63 (0.66)	10.04 (1.16)	8.12 (0.90)	6.04 (2.14)	0
10,000	20.03 (3.14)	15.56 (0.69)	13.66 (1.56)	11.63 (2.34)	7.86 (1.57)	0
5,000	25.67 (6.62)	20.20 (4.39)	14.19 (1.34)	13.19 (0.34)	9.67 (1.51)	6.54(0.87)
2,500	39.42 (12.43)	32.54 (6.16)	19.15 (1.71)	16.89 (2.02)	11.38 (1.99)	7.95 (1.23)
1,250	52.32 (7.43)	32.33 (9.61)	27.61 (5.65)	18.22 (3.42)	14.68 (5.69)	9.63 (1.29)
625	66.52 (2.88)	40.12 (1.87)	46.59 (8.86)	31.03 (4.18)	24.45 (9.36)	12.75 (2.34)
312.5	71.69 (20.48)	53.95 (0.79)	44.62 (0.82)	32.88 (3.51)	23.82 (4.99)	13.08 (3.46)

ตารางที่ 14 ร้อยละของ cell viability ของสาร Octenidine (OCT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ไฟ  
โบร بلاสต์หนู L929 ในระยะเวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้น ( $\mu\text{g/ml}$ )	% cell viability $\pm$ SD					
	30 นาที	1 ชั่วโมง	3 ชั่วโมง	6 ชั่วโมง	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
2,000	17.57 (2.24)	16.63 (3.66)	15.49 (1.49)	11.43 (1.72)	8.06 (0.54)	0
1,000	22.59 (4.24)	19.56 (2.33)	16.75 (2.13)	13.83 (3.01)	9.63 (0.97)	3.01 (0.02)
500	28.36 (6.43)	20.20 (3.96)	17.63 (0.97)	15.14 (0.72)	10.37 (2.82)	7.87(1.53)
250	42.28 (9.64)	37.98 (10.60)	20.15 (1.97)	17.78 (1.28)	12.13 (2.39)	9.05 (0.73)
125	54.26 (10.35)	39.67 (11.65)	29.61 (5.12)	19.84 (2.76)	15.77 (0.94)	10.74 (1.34)
62.5	66.83 (2.88)	52.12 (3.64)	48.59 (6.08)	33.12 (5.64)	29.26 (4.63)	13.45 (1.84)
31.25	74.69 (23.95)	59.95 (9.12)	49.84 (2.24)	36.72 (4.13)	32.16 (5.01)	15.07 (2.13)

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศิรยา ศิลปรัสมิ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5710820015

### วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาทันตชีววัสดุศาสตร์	มหาวิทยาลัยมหิดล	2554

### ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2558 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ปีงบประมาณ 2559 จากกองทุนวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

### ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลมหาราชนครศรีธรรมราช

### การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ศิรยา ศิลปรัสมิ, รวี เถียรไพศาล, เกวลิน ชรรณสิทธิ์บุรณ์, นิมิตร วรกุล. การต้านจุลชีพและการต้านไบโอฟิล์ม ของสารคลอร์เฮกซิดีน อะเลกซิดีน และออกทีนิตินต่อเชื้อในคลองรากฟันในห่องปฏิบัติการ. นำเสนอแบบโปสเตอร์ (Proceeding หน้า 363-373) ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ "มศว วิจัย" ครั้งที่ 11 วันที่ 29-30 มีนาคม 2561 มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ณ อาคารนวัตกรรม: ศาสตราจารย์ ดร.สาโรจน์ บัวศรี