



การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน
ขนาดต่างๆ ในโพลอกซามเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลผสม
โพรพิลีนไกลคอล สำหรับใช้ในคลองรากฟัน

**Comparison of Antimicrobial Activity and Substantivity of Various Sizes of Silver
Nanoparticles in Poloxamer 407 Gel and in Macrogol Mixed with
Propylene Glycol as an Intracanal Medicament**

นฤพร ทาไทย

Naruhporn Thathai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
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

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน
ขนาดต่างๆ ในโพลอกซามเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลผสม
โพรพิลีนไกลคอล สำหรับใช้ในคลองรากฟัน

**Comparison of Antimicrobial Activity and Substantivity of Various Sizes of Silver
Nanoparticles in Poloxamer 407 Gel and in Macrogol Mixed with
Propylene Glycol as an Intracanal Medicament**

นฤพร ทาไทย

Naruhporn Thathai

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
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

2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลลผสมโพรพิลีนไกลคอล สำหรับใช้ในคลองรากฟัน

ผู้เขียน นางสาวนฤพร ทาไทย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)ประธานกรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมกรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรินทร์ พิวัฒน์)
..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวณีน ธรรมสิทธิ์บุญ)กรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร.รวี เกียรติไพศาล)
กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวณีน ธรรมสิทธิ์บุญ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้างู่งสูง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ

(ศาสตราจารย์ ดร.รวิ เตียรไพศาล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวติน ธรรมสิทธิบูรณ์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ

(นางสาวนฤพร ทาไทย)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวนฤพร ทาไทย)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การเปรียบเทียบความสามารถในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล สำหรับใช้ในคลองรากฟัน
ผู้เขียน	นางสาวนฤพร ทาไทย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์สุขภาพช่องปาก
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

การกำจัดเชื้อในคลองรากฟันที่ไม่สมบูรณ์ อาจเป็นสาเหตุของความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟัน โดยเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส และแคนดิดา อัลบิแคนส์ เป็นเชื้อที่มักพบในการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว ซึ่งจากคุณสมบัติในการต้านเชื้อของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่สามารถฆ่าเชื้อได้หลายชนิด จึงมีการนำมาใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน อย่างไรก็ตาม อนุภาคซิลเวอร์นาโน อยู่ในรูปแบบที่เป็นของเหลว ดังนั้นในการศึกษานี้จึงมีความสนใจที่จะนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาผสมในเจลเบสชนิดต่างๆ เพื่อให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมในการนำไปใช้งาน ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในเจลเบสชนิดต่างๆ ยังมีรายงานอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน ของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล เมื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน โดยการศึกษาความไวในการต้านเชื้อจุลชีพในสภาวะแพลงโตนิค ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ด้วยวิธี Agar diffusion, Broth microdilution และ Agar dilution method จากนั้นนำสารชนิดที่ให้ผลการทดสอบดีที่สุดไปศึกษาต่อในแบบจำลองฟันมนุษย์ ผลการศึกษาพบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM ขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร ให้ผลการทดสอบดีที่สุด โดยผลการทดสอบ agar diffusion method ให้ขนาดเฉลี่ยโซนยับยั้งมากที่สุด ในเชื้อทั้งสองชนิด ผลการทดสอบ broth microdilution method แม้จะไม่สามารถฆ่าเชื้อเอนเทอโรคอคคัส ฟีคาลิส ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยให้ค่า MIC ต่ำที่สุด และในเชื้อแคนดิดา อัลบิแคนส์ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อได้โดยให้ค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด ผลการทดสอบ agar dilution method พบว่าเมื่อใช้ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 10,000 PPM สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งสองชนิด ดังนั้นจึงเลือกใช้ สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในกรดแทนนิก ขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร ความเข้มข้น 10,000 PPM มาพัฒนาโดยผสมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ สำหรับศึกษาในแบบจำลองฟันมนุษย์ ผลการศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อ ของสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารโพลอกซาเมอร์ 407 และมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล ในแบบจำลองฟันมนุษย์พบว่า สารละลาย

(6)

อนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิด ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และโพลอกซาเมอร์ 407 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) โดยสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่าสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) และพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) ของค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อระหว่างระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.1 มิลลิเมตร กับ 0.2 และ 0.3 มิลลิเมตร ส่วนระดับความลึก 0.2 กับ 0.3 มิลลิเมตร พบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในเชื้อทั้งสองชนิด ผลการศึกษาการคงฤทธิ์ของสารทดสอบในเนื้อฟัน พบว่าสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด ไม่มีความสามารถในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน

Thesis Title	Comparison of Antimicrobial Activity and Substantivity of Various Sizes of Silver Nanoparticles in Poloxamer 407 Gel and in Macrogol Mixed with Propylene Glycol as an Intracanal Medicament
Author	Miss Naruhporn Thathai
Major Program	Oral Health Sciences
Academic Year	2018

ABSTRACT

Incomplete disinfection of root canal system may result in root canal treatment failures. *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* are the most commonly detected species in case of failed endodontic treatment. Antibacterial properties of silver nanoparticles can be shown against broad-spectrum of microorganism; recent studies have focused on using silver nanoparticles for disinfect root canal in the form of medication. The characteristic feature of silver nanoparticles is in liquid form. Therefore, this study focused on the development of a novel silver nanoparticles gel in various vehicles to be suitable for use as an intracanal medicament. A recent study to compare the antimicrobial activity of silver nanoparticles in various vehicles was limited. This study aimed to evaluate the comparison of antimicrobial activity and substantivity of various sizes of silver nanoparticles in poloxamer 407 gel and in macrogol mixed with propylene glycol as an intracanal medicament. The antimicrobial susceptibility of planktonic forms was performed by using agar diffusion, broth microdilution methods, and agar dilution method. Then, a types of silver nanoparticles have shown the most antimicrobial susceptibility was used in human tooth model. The results revealed that silver nanoparticles in tannic acid of a 200 PPM silver nanoparticles suspension and nanoparticle diameter 5-10 nm had the most antimicrobial activity. Both *E. faecalis* and *C. albicans* were susceptible to this tested agent with the most degree of inhibition zone. Although this agent was not able to eliminate *E. faecalis* but gave the lowest action MIC and gave the lowest action MIC & MBC against *C. albicans*. The application this agent with a high concentration at 10,000 PPM was able to eliminate both organisms. Therefore, this agent was used to develop the vehicle containing silver nanoparticle suspension to study in human tooth model. The antimicrobial activity of silver nanoparticles in poloxamer 407 and in macrogol mixed with propylene glycol in human tooth model found that silver nanoparticles in macrogol mixed with propylene glycol and silver nanoparticles in poloxamer 407

resulted in significant decrease in number of colonies of both organisms compared to macrogol mixed with propylene glycol and poloxamer 407, respectively ($p < 0.05$). The number of colonies of both organisms observed after dressing with silver nanoparticles in macrogol mixed with propylene glycol was significantly less than observed in silver nanoparticles in poloxamer 407 ($p < 0.05$). The number of colonies of both organisms in root dentin samples collected from the depth of 0.1 mm had significantly differ from 0.2 and 0.3 mm ($p < 0.05$). However, there was no significant difference in number of colonies between 0.2 and 0.3 mm depth in both organisms ($p > 0.05$). The antimicrobial substantivity results showed that silver nanoparticles in both vehicles have not provided residual antimicrobial effects against both organisms in dentin.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ประสบความสำเร็จได้ เนื่องจากได้รับความช่วยเหลือจากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร.รวิ เกียรไพศาล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เกวลิน ธรรมสิทธิ์ บุรณ์ ซึ่งให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์เป็นอย่างดี ตลอดจนให้ความอนุเคราะห์สถานที่ รวมทั้งวัสดุและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย เป็นอย่างดี

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ทุกท่าน ที่ได้กรุณาให้คำชี้แนะที่เป็นประโยชน์ เพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ผู้สนับสนุนทุนอุดหนุนการทำวิจัย ขอขอบคุณหน่วยบัณฑิตศึกษา และนักศึกษาหลังปริญญาสาขาวิทยาแผ่นดิน โดคอนต์ ภาควิชา ทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุกท่านที่ช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำการวิจัยในครั้งนี้

และขอขอบพระคุณนายแพทย์สาธารณสุขจังหวัดสระบุรี ผู้อำนวยการโรงพยาบาลวิหารแดง จังหวัดสระบุรี ที่สนับสนุนทุนการลาศึกษาต่อของข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวที่คอยสนับสนุนและขอขอบพระคุณคณาจารย์และบุคลากรทุกท่านในภาควิชาทันตกรรมอนุรักษ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ ตลอดจนชี้แนะในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ คุณงามความดีที่เกิดจากการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอมอบแด่บุพการีและคณาจารย์ทุกท่านที่เป็นผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษาของข้าพเจ้า

นฤพร ทาไทย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการรูป	(15)
ตัวย่อและสัญลักษณ์	(17)
บทที่	
1. บทนำ	1
- บทนำตั้งเรื่อง	1
- การทบทวนวรรณกรรม	4
- วัตถุประสงค์	16
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	17
3. ผลการวิจัย	39
4. บทวิจารณ์	56
5. บทสรุปและข้อเสนอแนะ	64
เอกสารอ้างอิง	66
ภาคผนวก	75
ประวัติผู้เขียน	99

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของโพลอกซาเมอร์	13
2	ชนิดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน (จำแนกตามปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ตัวทำละลาย สี และขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน)	18
3	ค่า MBC ค่า Biofilm eradication และค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล	26
4	ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ <i>E. faecalis</i>	27
5	ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ <i>C. albicans</i>	27
6	ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ <i>E. faecalis</i>	28
7	ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ <i>C. albicans</i>	29
8	ขนาดไซเนกการยับยั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆต่อเชื้อทดสอบ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> ในหน่วยมิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	41
9	ฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ในหน่วย PPM (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	43
10	ฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิกและมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 10,000 PPM ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ในหน่วย PPM (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)	44
11	ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>E. faecalis</i> ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเมื่อใส่สารไว้นคลอกรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	46

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12	47
ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>C. albicans</i> ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในแต่ละระดับชั้นเนื้อพื้นเมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	
13	50
ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>E. faecalis</i> ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	
14	52
ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>C. albicans</i> ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	
15	79
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ต่อเชื้อทดสอบ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i>	
16	80
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ต่อเชื้อทดสอบ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> เป็นคู่	
17	83
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)	
18	84
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ <i>E. faecalis</i> และ <i>C. albicans</i> ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) เป็นคู่	
19	88
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพื้น แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	
20	88
ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพื้นเป็นคู่ ในแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
21	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อพิน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	88
22	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ตามกลุ่มการศึกษาเป็นคู่ ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพิน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	89
23	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพิน แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	90
24	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพินเป็นคู่ ในแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	90
25	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อพิน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	90
26	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ตามกลุ่มการศึกษาเป็นคู่ ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพิน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	91
27	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	92
28	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ระหว่างกลุ่มการศึกษาเป็นคู่ ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	93
29	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ในช่วงระยะเวลา 14 วันเป็นคู่ ของแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพินเป็นเวลา 7 วัน	94

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
30	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน 95
31	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน 96
32	ค่านัยสำคัญทางสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ในช่วงระยะเวลา 14 วันเป็นคู่ ของแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน 97

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะโครงสร้างของโพรพิลีนไกลคอล	12
2	ลักษณะโครงสร้างของโพลอกซามเมอร์	13
3	ค่า Gelation temperature ของโพลอกซามเมอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	14
4	ค่า Gelation temperature ของโพลอกซามเมอร์ 407 ที่ความเข้มข้นต่างๆ	14
5	การเตรียมชิ้นพื้น	30
6	แผนภูมิแสดงการแบ่งกลุ่ม และจำนวนตัวอย่าง สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ และการคงฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในเนื้อพื้น ในตัวนำส่งสารแต่ละชนิด	31
7	การวางชิ้นพื้นลงในจานเพาะเชื้อ	33
8	เส้นผ่านศูนย์กลางของคลองรากพื้นในการกรอพื้นแต่ละชั้น	34
9	ผงเนื้อพื้นที่กรอออกมาในขวดแก้ว	34
10	(A) ผงเนื้อพื้นที่กรอออกมาในขวดแก้ว (B) ผงเนื้อพื้นในขวดแก้วที่ผสมกับเชื้อ <i>E. faecalis</i> ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth (C) ผงเนื้อพื้นในขวดแก้วที่ผสมกับเชื้อ <i>C. albicans</i> ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB	36
11	ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพื้น แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพื้นเป็นเวลา 7 วัน	46
12	ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>E. faecalis</i> ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อพื้น เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพื้นเป็นเวลา 7 วัน	47
13	ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ของแต่ละระดับชั้นเนื้อพื้น แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพื้นเป็นเวลา 7 วัน	48
14	ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ <i>C. albicans</i> ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อพื้น เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากพื้นเป็นเวลา 7 วัน	48
15	ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>E. faecalis</i> ในหน่วย Log CFU/g ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากพื้นเป็นเวลา 7 วัน	51

รายการแผนภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
16	ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ <i>C. albicans</i> ในหน่วย Log CFU/g ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไวน์โคลงรากฟันเป็นเวลา 7 วัน	53
17	กลุ่มที่มีเชื้อ <i>E. faecalis</i> ขึ้นและลักษณะ โคลิโคนีของเชื้อ <i>E. faecalis</i> เมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar	53
18	กลุ่มที่ไม่มีเชื้อ <i>E. faecalis</i> ขึ้นเมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar	54
19	กลุ่มที่มีเชื้อ <i>C. albicans</i> ขึ้นและลักษณะ โคลิโคนีของเชื้อ <i>C. albicans</i> เมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA	54
20	กลุ่มที่ไม่มีเชื้อ <i>C. albicans</i> ขึ้นเมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA	55

ตัวย่อและสัญลักษณ์

AgNPs	= Silver nanoparticles
PEG / Mc	= Polyethylene glycol / Macrogol
PG	= Propylene glycol
MP	= Macrogol + Propylene glycol
MP+Ag	= Macrogol + Propylene glycol + AgNPs
P 407	= Poloxamer 407
P 407+Ag	= Poloxamer 407 + AgNPs
CHX	= Chlorhexidine
Ca(OH) ₂	= Calcium hydroxide
TAP	= Triple antibiotic paste

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การกำจัดเชื้อในระบบคลองรากฟัน (root canal system) ที่ไม่สมบูรณ์อาจเป็นสาเหตุของการเกิดความล้มเหลวในการรักษาคคลองรากฟัน โดยทำให้เกิดการคงอยู่ของเชื้อในคลองรากฟัน และเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันได้ภายหลังการรักษา (persistent apical periodontitis)¹ โดยระบบคลองรากฟันที่มีความซับซ้อนทำให้มีเชื้อที่อยู่ในบริเวณส่วนคอด (isthmus) หรือแขนงคลองรากฟัน (ramifications) ที่ไม่สามารถถูกกำจัดได้โดยการทำความสะอาดคลองรากฟัน โดยการใช้เครื่องมือ (mechanical instrumentation) และ น้ำยาล้างคลองรากฟัน (irrigant)² นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เกาะติดอยู่บนผนังคลองรากฟันนี้ยังสามารถแทรกซึมลงไปในท่อเนื้อฟัน (dentinal tubules) ได้อีกด้วย^{3,4} ดังนั้นจึงมีการแนะนำให้ทำการใส่สารในคลองรากฟันโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1. กำจัดเชื้อที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในคลองรากฟัน 2. ป้องกันการเพิ่มจำนวนของเชื้อในคลองรากฟันระหว่างรอการนัดทำการรักษา 3. ทำหน้าที่เป็นสารขวางกั้นทางกายภาพ และเคมี (physicochemical barrier) ในคลองรากฟันเพื่อป้องกันการเกิดการติดเชื้อซ้ำ และการเป็นแหล่งสารอาหารให้แบคทีเรียที่ยังคงหลงเหลืออยู่ในคลองรากฟัน²

ปัจจุบันมีการใช้สารหลายชนิด เพื่อใส่ในคลองรากฟัน (intracanal medicaments) โดยสารที่นิยมใช้ใส่ในคลองรากฟันคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (calcium hydroxide)^{5,6} ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น คุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) จากการที่มีฤทธิ์เป็นด่าง แต่โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) อยู่ที่ 12.2-12.5⁷ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติในการสลายเนื้อเยื่อ⁸ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง (hard tissue formation) และป้องกันการเกิดการละลายของรากฟัน^{5,9} อีกทั้งยังสามารถใช้งานได้ง่ายและมีราคาถูก

แม้แคลเซียมไฮดรอกไซด์จะมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้นไม่สามารถทำลายเชื้อในคลองรากฟันได้ทุกชนิด จากการศึกษาของ Sathorn และคณะ (2007)¹⁰ ซึ่งใช้วิธี systematic review และ meta-analysis พบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ยังมีประสิทธิภาพจำกัดในการกำจัดจุลชีพในคลองรากฟัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans*¹¹⁻¹³ ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในการรักษาคคลองรากฟันที่ล้มเหลว^{3,14,15}

เชื้อ *E. faecalis* เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการแทรกซึมลงไปในท่อเนื้อฟันและคงความมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน¹⁶ สามารถยึดเกาะและสร้างเป็นไบโอฟิล์ม (biofilm) บนเนื้อฟันได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่หลากหลาย¹⁷ และจากการที่เชื้อมีกระบวนการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ (proton pump) จึงสามารถคงความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ให้อยู่ในสภาวะสมดุล ทำให้สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นด่างสูงได้¹⁸ จึงมีความสามารถในการต้านต่อสารต้านจุลชีพทั้งน้ำยาล้างและสารที่ใส่ในคลองรากฟัน ตลอดจนสามารถมีชีวิตอยู่ได้แม้ทำการอุดคลองรากฟันแล้ว¹⁹

เชื้ออีกชนิดที่มักพบในการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลวคือ *C. albicans* โดยเป็นเชื้อที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่าง (pleomorphic microorganism) ให้มีความเหมาะสมในการเจริญเติบโตภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ^{20,21} นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการก่อโรค (pathogenic characteristics) เช่น การสร้างสารยึดเกาะ (adhesion factor), การสร้างสาหร่าย (hypha formation), การมีความสามารถในการหลั่งสารที่มีคุณสมบัติในการย่อยโปรตีน (proteinase secretion) เป็นต้น²¹ จากการศึกษาของ Waltimo และคณะ (1997)¹¹ พบว่าเชื้อราสามารถพบได้ในการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันภายหลังการรักษาคลองรากฟัน โดย *C. albicans* เป็นชนิดที่พบได้บ่อยที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Siqueria และ Sen (2004)²² นอกจากนี้มีการศึกษาที่พบว่า *C. albicans* มีความสามารถในการต้านต่อแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน^{12,13}

จากความสามารถในการต้านต่อฤทธิ์แคลเซียมไฮดรอกไซด์ของเชื้อที่พบในกรณีของความล้มเหลวในการรักษาคลองรากฟัน จึงมีความพยายามในการพัฒนาสารใส่ในคลองรากฟันเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ ซึ่งจากข้อดีของซิลเวอร์ ที่มีฤทธิ์ในการต้านต่อเชื้อจุลชีพที่หลากหลาย (broad spectrum antimicrobial agent), ความเป็นพิษต่ำ และไม่ทำให้เกิดการดื้อของเชื้อ²³ ทำให้มีการนำซิลเวอร์มาใช้อย่างหลากหลายในทางการแพทย์ เช่นเป็นส่วนประกอบในผ้าพันแผล ครีมนทาแผลไฟไหม้ พื้นผิวของวัสดุที่ใช้ทำสายสวน รากเทียม และอวัยวะเทียม^{24,25} ในทางทันตกรรม มีการนำซิลเวอร์มาใช้ในรูปแบบของสารประกอบซิลเวอร์ (silver compounds) ตั้งแต่ปี 1840s โดยมีการนำซิลเวอร์ไนเตรต (silver nitrate) มาใช้เพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดฟันผุในฟันน้ำนม และป้องกันฟันผุในฟันกรามแท้ที่เริ่มขึ้น ตลอดจนใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในเนื้อฟัน (dentin sterilizing agent) และในปี 1960s ได้มีการนำฟลูออไรด์มาผสมในซิลเวอร์ เพื่อเป็นสารต้านฟันผุ แต่อย่างไรก็ตาม การนำไปใช้ในทางคลินิกพบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องการทำให้ฟันติดสีดำ^{26,27}

อนุภาคโลหะ (Metal particles) ที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตร พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ที่แตกต่างไปจากเมื่ออยู่ในรูปแบบเป็นไอออน (ion) หรือ โลหะก้อน (bulk) โดยมีคุณสมบัติพิเศษคือ การเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเคมี (catalytic activity) เนื่องมาจากลักษณะ โครงสร้างที่มีเหลี่ยมมุมมาก (Highly active facets) ทำให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง (High surface-to-volume ratio) โดยอนุภาคนาโน (nanoparticles) เป็นกลุ่มของอนุภาค (particles) ที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตร ซึ่งปัจจุบันเริ่มมีความสนใจในการนำอนุภาคนาโนมาใช้

ในทางการแพทย์กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณสมบัติที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง และมีคุณลักษณะเฉพาะทางกายภาพและเคมี²⁸ ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์จากการมีความสามารถในการจับกับเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี²⁹

อนุภาคซิลเวอร์นาโน (silver nanoparticles) ได้ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อ (disinfectant agents) ในการทำความสะอาดเครื่องมือทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อได้หลายชนิดทั้ง แบคทีเรีย ตลอดจนเชื้อไวรัส โดยมีกลไกที่สามารถจับกับผนังเซลล์ของแบคทีเรีย และแทรกซึมเข้าไปในเซลล์ทำให้เกิดการสลาย และการเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย^{28,30,31} โดยมีการศึกษาพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งมีขนาดประมาณ 10-100 นาโนเมตร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ ทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ^{28,32} รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด³³ จากคุณสมบัติที่ดีดังกล่าวจึงมีการนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้ในงานรักษาคลองรากฟัน โดยมีการนำมาใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน หรือ เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน³⁰ อย่างไรก็ตาม ซิลเวอร์นาโนมีลักษณะเป็นสารละลาย โดยอยู่ในรูปแบบที่เป็นของเหลว ดังนั้นในการนำไปใช้เป็นสารต้านเชื้อในคลองรากฟัน ควรอยู่ในรูปแบบที่สามารถนำเข้าสู่คลองรากฟันได้ง่าย เมื่อใส่ในคลองรากฟันแล้วสามารถคงสภาพอยู่ในคลองรากฟันได้ และต้องสามารถรักษาระดับความเข้มข้นของสารให้อยู่ในคลองรากฟันตลอดช่วงเวลาการรักษา

โพลอกซามเมอร์ 407 (Poloxamer 407) เป็นสารกลุ่มโพลอกซามเมอร์ ที่มีลักษณะพิเศษคือ เป็นของเหลวที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะช่วยนำสารเข้าคลองรากฟันได้ง่าย และเปลี่ยนสถานะเป็นเจลที่แข็งเมื่อมีอุณหภูมิสูง³⁴ ทำให้สามารถคงสภาพอยู่ในคลองรากฟันได้นานขึ้น และช่วยปลดปล่อยสารออกมาอย่างช้าๆ และ โพลีเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol) หรือมาโครกอล (macrogol) ผสมกับโพรพิลีนไกลคอล (propylene glycol) ชื่อย่อ MP^{35,36} เป็นตัวนำส่งสารที่ถูกนำมาใช้ในทางทันตกรรมครั้งแรกโดย Takushige และ Hoshino (1998)³⁶ โดยผสมกันในอัตราส่วน 1:1 ให้มีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง (ointment) สำหรับนำยาปฏิชีวนะใส่ในฟันน้ำนมเพื่อรักษาการติดเชื้อ^{37,38}

ในปัจจุบันการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของ อนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่มีขนาดต่างๆ ในเจลเบสชนิดต่างๆ สำหรับงานทันตกรรมยังมีรายงานอยู่จำกัด ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่มีขนาดต่างๆ ในโพลอกซามเมอร์ 407 เจล และในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล เพื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน

การทบทวนวรรณกรรม

ชนิดของการติดเชื้อในคลองรากฟัน

การติดเชื้อในระบบคลองรากฟันแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามช่วงเวลา que จุลชีพเข้าสู่คลองรากฟัน ดังนี้

1. การติดเชื้อปฐมภูมิ (Primary infection)

เป็นการติดเชื้อจุลชีพตั้งแต่ก่อนได้รับการรักษาคคลองรากฟัน โดยเชื้อจุลชีพอาจเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อใน (pulp tissue) หรืออาจเข้าสู่คลองรากฟันภายหลังจากที่เนื้อเยื่อในตายแล้ว จุลชีพที่พบในคลองรากฟันที่มีการติดเชื้อปฐมภูมินั้นจะพบแบคทีเรียเป็นส่วนใหญ่ โดยมักพบเชื้อร่วมกันหลายชนิด (polymicrobial) ตั้งแต่ 10-30 สปีชีส์ (species) ซึ่งมักพบเชื้อกลุ่มแฟคัลเททีฟ แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (Facultative anaerobic bacteria) ในระยะแรก ต่อมาเชื้อส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นกลุ่มแอนแอโรบิกแบคทีเรีย (anaerobic bacteria) โดยคิดเป็นร้อยละ 94 แบคทีเรียที่พบบ่อยมีทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ โดยจะพบแกรมลบได้บ่อยกว่า ซึ่งมักอยู่ในสกุล *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Tannerella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Dialister*, *Campylobacter* และ *Veillonella* ส่วนชนิดแกรมบวกจะอยู่ในสกุล *Streptococcus*, *Peptostreptococcus*, *Pripionibacterium*, *Pseudoramibacter*, *Actinomyces*, *Parvimonas*, *Filifactor* และ *Eubacterium* ส่วนฟันที่มีการตายของเนื้อเยื่อในร่วมกับมีรอยโรครอบปลายรากฟันและมีอาการปวด มักจะพบเชื้อ *Bacteroides melaninogenicus* และอาจพบ *Peptostreptococcus anaerobius*, *Campylobacter sputorum*, *Peptostreptococcus micros* และ *Eubacterium* นอกจากนี้ มีรายงานการพบเชื้อราได้บ้างในคลองรากฟันที่มีการติดเชื้อปฐมภูมิ แต่มักพบในอัตราที่ไม่สูงนัก โดยเชื้อราที่พบบ่อยอยู่ในสกุล *Candida*³⁹⁻⁴²

2. การติดเชื้อทุติยภูมิ (Secondary infection)

เป็นการติดเชื้อภายหลังจากเริ่มรักษาคคลองรากฟันไปแล้ว โดยจุลชีพอาจเข้าสู่คลองรากฟันขณะรักษา ระหว่างการนัดแต่ละครั้ง หรือภายหลังจากอุดคลองรากฟันไปแล้ว เช่น การมีเชื้อหลงเหลืออยู่ในรอยโรคฟันผุ แผ่นยางกั้นน้ำลายรั่ว การใช้เครื่องมือหรือน้ำยาที่ปนเปื้อน วัสดุอุดแตกหรือร้าว เกิดฟันผุซ้ำหรือฟันแตกหัก เป็นต้น^{39,42,43}

3. การติดเชื้อยึดเยื่อ (Persistent infection)

เป็นการติดเชื้อที่เกี่ยวข้องกับจุลชีพซึ่งมีความทนทานต่อกระบวนการกำจัดเชื้อที่ใช้ในการรักษาคลองรากฟัน โดยจุลชีพดังกล่าวอาจเข้าสู่คลองรากฟันแบบปฐมภูมิ หรือทุติยภูมิก็ได้ ซึ่งในทางปฏิบัตินั้นการติดเชื้อทุติยภูมิและการติดเชื้อยึดเยื่อมักจะแยกจากกัน ไม่ออก และเป็นสาเหตุของการติดเชื้อเรื้อรัง ซึ่งมักทำให้การรักษาคลองรากฟันล้มเหลว จุลชีพซึ่งเพาะเลี้ยงได้จากฟันที่รักษาคลองรากฟันล้มเหลวมักจะประกอบด้วยเชื้อเพียงไม่กี่ชนิด ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรีย แกรมบวกชนิดแฟคัลเททีฟ แอนแอโรบิกแบคทีเรีย (Facultative anaerobic bacteria) โดยพบเชื้อ *Enterococcus faecalis* ในอุบัติการณ์สูงที่สุด ส่วนเชื้ออื่นที่มีรายงานบ่อยได้แก่ *Actinomyces*, *Propionibacteria*, *Streptococci* และเชื้อรา *Candida albicans* ผลการศึกษาด้วยวิธีทางอณูชีววิทยาก็ให้ผลในทำนองเดียวกัน แต่พบว่าจุลชีพมีความหลายหลายกว่าการเพาะเชื้อ^{39,42,44}

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*)

Enterococcus species เป็นเชื้อกลุ่มจุลชีพไม่ชอบออกซิเจน แกรมบวก รูปร่างกลมหรือรี (cocci) ซึ่งสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีออกซิเจนจะเจริญเติบโตแบบออกซิเดชัน (oxidation) ส่วนในสภาวะที่ขาดออกซิเจน สามารถเจริญเติบโตแบบเฟอร์เมนเทชัน (fermentation) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในมนุษย์ โดยสามารถพบในระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง มี 2 สายพันธุ์ที่พบในมนุษย์ คือ *E. faecalis* และ *E. faecium*³⁸

E. faecalis เป็นเชื้อที่มักพบในรอยโรคที่มีการติดเชื้อยึดเยื่อ^{16,45} โดยมีสมมติฐานที่ถูกนำมาอธิบายความเป็นไปได้ในการพบเชื้อชนิดนี้คือ⁴⁶

1. *E. faecalis* เป็นแบคทีเรียตั้งถิ่นฐานครั้งแรก (primary colonizer) ในฟันที่มีการติดเชื้อของระบบคลองรากฟัน และเนื่องจากเป็นเชื้อที่สามารถทนต่อสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อที่ใช้ในระหว่างการรักษา และสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ภาวะเป็นด่างสูง (extreme alkaline) ทำให้เชื้อสามารถมีชีวิตอยู่ได้แม้ได้รับการรักษาคลองรากฟันไปแล้ว

2. *E. faecalis* เป็นเชื้อฉวยโอกาส ที่เข้ามาในคลองรากฟันภายหลังการรักษาคลองรากฟันแล้ว (opportunistic canal invaders) เนื่องจากมีหลายการศึกษาที่พบว่า การติดเชื้อในคลองรากฟันครั้งแรก มีปริมาณ *E. faecalis* ที่ต่ำ และแทบไม่พบในรอยโรคฟันผุ นอกจากนี้ในการศึกษาที่ทำการเก็บน้ำลายมนุษย์มาทดสอบ ตรวจพบ *E. faecalis* เพียงร้อยละ 21.8 และไม่พบเลยในผู้ที่มีสุขภาพช่องปากที่ดี ซึ่งแสดงถึงการที่ *E. faecalis* ไม่ได้เป็นเชื้อประจำถิ่นที่ปรากฏอยู่ตลอดเวลาในช่องปาก

ปัจจัยในการอยู่รอดและก่อโรค (Survival and virulence factors)

E. faecalis มีปัจจัยก่อโรค (virulence factors) ได้แก่ lytic enzyme, cytolysin aggregation substances และ lipoteichoic acid เป็นต้น โดยสามารถเจริญเติบโตได้ภายในคลองรากฟันที่ได้รับการรักษาแล้วเนื่องจาก

1. สามารถคงอยู่ในภาวะที่ขาดอาหาร (starvation) ได้เป็นเวลานาน โดยพบว่า *E. faecalis* สามารถคงอยู่ในภาวะที่ขาดอาหาร (Glucose-limited และ Phosphate-limited media) ได้นานกว่า 4 เดือน นอกจากนี้หากมีซีรัม (serum) ที่มาจากกระดูกเบ้าฟัน (alveolar bone) และ เอ็นยึดปริทันต์ (periodontal ligament) แม้เพียงร้อยละ 1 ก็สามารถเจริญเติบโตได้ จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ยังมีรอยโรครอบปลายรากฟันแม้ทำการรักษาคคลองรากฟันไปแล้ว⁴⁷

2. สามารถเข้าไปในท่อเนื้อฟัน^{16,48,49} และสามารถยึดเกาะกับคอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) ในเนื้อฟัน โดยการผลิต serine protease, gelatinase และ collagen-binding protein นอกจากนี้การมีสารเหลวในเนื้อเยื่อ (tissue fluid) ซึ่งมีส่วนประกอบของซีรัม จากเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟัน ยังช่วยส่งเสริมให้เกิดการยึดเกาะกับเส้นใยคอลลาเจน (unmineralized collagen) ในขณะที่ซีรัมจะยับยั้งการยึดเกาะของ *S. gordonii* และ *S. mutan*¹⁶

3. สามารถสร้างแผ่นชีวภาพ ทำให้สามารถต้านต่อกระบวนการฟาโกไซโทซิส (phagocytosis) ของระบบภูมิคุ้มกัน ของร่างกายมนุษย์, ยาหรือสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ ได้มากกว่าปกติถึง 1,000 เท่า โดย *E. faecalis* ในคลองรากฟันสามารถสร้างเป็นแผ่นชีวภาพได้ในระยะเวลาเพียง 2 วัน แม้ว่าจะมีการใส่สารต้านเชื้อหรือไม่ก็ตาม และเมื่อเวลาผ่านไป 86 วัน ก็ยังคงสามารถมีชีวิตอยู่ได้⁵⁰

4. สามารถทนต่อภาวะความเป็นด่างสูง เนื่องจาก *E. faecalis* มีกระบวนการนำโปรตอนเข้าสู่เซลล์ ผ่านทางเยื่อหุ้มเซลล์ (cytoplasmic membrane) ทำให้สามารถคงความสมดุลของระดับความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ได้¹⁸ ดังนั้นการใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันจึงไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการกำจัดเชื้อชนิดนี้

Candida albicans (*C. albicans*)

C. albicans เป็นเชื้อราที่มีสองรูป (Dimorphic fungus)⁵¹ ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงขนาดและรูปร่าง ให้มีความสามารถในการเจริญเติบโตได้ภายใต้สภาวะแวดล้อมต่างๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) , อุณหภูมิ (temperature) และสารอาหาร (nutritional source)⁵² สามารถสร้างโคโลนีได้บนผิวเคลือบฟัน (enamel), เนื้อฟัน (dentine) และเคลือบรากฟัน (cementum)¹⁵ และยังมีความสามารถในการแทรกซึมลงไปในท่อเนื้อฟันได้อีกด้วย^{3,15,53} จากการศึกษาของ Waltimo และคณะ (1997)¹¹ ซึ่งทำการเก็บตัวอย่างในฟันที่ยังมีการติดเชื้อแม้ทำการรักษาคคลองรากฟันไปแล้ว สามารถ

ตรวจพบเชื้อราได้ในตัวอย่างดังกล่าว โดยพบว่า *C. albicans* เป็นชนิดที่พบมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อ *C. albicans* สามารถต้านต่อฤทธิ์ของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟันได้^{12,13} ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อ *C. albicans* อาจมีความสัมพันธ์กับการเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อรอบปลายรากฟันแม้ทำการรักษาคลองรากฟันแล้ว^{11,12} ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nair และคณะ(1990)¹⁴ ซึ่งทำการศึกษาในฟันที่มีการติดเชื้อแม้ทำการรักษาคลองรากฟันแล้ว โดยตรวจพบเชื้อราในตัวอย่าง 2 จาก 9 ตัวอย่าง และการศึกษาของ Sen และคณะ(1995)³ ซึ่งทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (scanning electron microscope) พบเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราในคลองรากฟันและในท่อเนื้อฟันของฟันที่มีรอยโรครอบปลายรากฟัน (periapical lesion)

จากการที่เชื้อ *C. albicans* มีความสามารถในการแทรกซึมลงไปบนเนื้อฟัน⁵⁴ และการที่เนื้อฟันมีคุณสมบัติในการลดประสิทธิภาพของยาที่ใส่ในคลองรากฟัน (inactivating effect of dentin)³³ ทำให้เชื้อ *C. albicans* สามารถต้านต่อสารที่ใส่ในคลองรากฟันได้ ในปัจจุบันจึงมีความพยายามที่จะพัฒนาสารที่ใส่ในคลองรากฟัน โดยการใช้สารหลายชนิดร่วมกันเพื่อให้มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีขึ้น

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium Hydroxide, Ca(OH)₂)

แคลเซียมไฮดรอกไซด์ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายโดยใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน⁵⁵ เนื่องจากคุณสมบัติที่ดีหลายประการเช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ ความสามารถในการละลายเนื้อเยื่อ การยับยั้งการละลายของรากฟัน และเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็ง โดยในหลายการศึกษาพบว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน ทำให้เกิดการหายของรอยโรครอบปลายรากฟัน โดยมีผลข้างเคียงที่น้อย⁵⁶⁻⁶¹

คุณสมบัติทางเคมีของแคลเซียมและกลไกในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ (Chemical characteristics of calcium hydroxide and mechanisms of antimicrobial effect)

แคลเซียมไฮดรอกไซด์มีลักษณะเป็นผงสีขาว ไม่มีกลิ่น มีสูตรทางเคมีคือ Ca(OH)₂ มีฤทธิ์เป็นด่างแก่ โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ที่ 12.5-12.8 มีความสามารถในการละลายน้ำได้ดี ซึ่งจากคุณสมบัตินี้ทำให้แคลเซียมไฮดรอกไซด์สามารถออกฤทธิ์ได้เป็นเวลานาน โดยมีการละลายตัวอย่างช้าๆ เมื่อสัมผัสกับของเหลวจากเนื้อเยื่อในร่างกาย โดยกลไกในการออกฤทธิ์มาจากการปล่อยแคลเซียมไอออน (Ca²⁺) และไฮดรอกซิลไอออน (OH⁻)ซึ่งจะมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งและมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรีย⁶² โดยไฮดรอกซิลไอออน มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดสภาวะที่เป็นด่าง ซึ่งเป็นสภาวะที่เชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้⁶³ นอกจากนี้ไฮดรอกซิลไอออน

ยังมีคุณสมบัติในการเป็นสารอนุมูลอิสระ (oxidant free radicals) โดยทำให้เกิดการทำลายสารชีวโมเลกุล (biomolecules)⁶⁴ ดังนั้นแบคทีเรียในคลองรากฟันจึงสามารถถูกทำลายได้เมื่อมีการสัมผัสกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์⁵⁶ โดยมีกลไกในการทำลายเชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโครงสร้างโปรตีน และ DNA ของแบคทีเรีย⁶⁵⁻⁷⁰ นอกจากนี้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ยังมีบทบาทสำคัญในการเริ่มต้นกระบวนการคืนกลับของแร่ธาตุในเนื้อฟันอีกด้วย⁷¹

จากการที่ประสิทธิภาพของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟันนั้นขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ของไฮดรอกซิลไอออนในเนื้อฟัน ทำให้มีหลายการศึกษาที่ทำการศึกษถึงการแพร่ของไฮดรอกซิลไอออนในเนื้อฟัน โดยมีรูปแบบการศึกษาต่าง ๆ กัน จากการศึกษาของ Tronstad และคณะ (1981)⁷ ซึ่งทำการศึกษาในลิง พบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง หลังจากใส่แคลเซียมไฮดรอกไซด์ในคลองรากฟันเป็นเวลา 1 เดือน โดยพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีค่าสูงที่สุดในบริเวณรอบคลองรากฟัน และจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ในเนื้อฟันที่ห่างจากคลองรากฟัน และจากการศึกษาของ Wang และ Hume (1988)⁷² พบว่าเนื้อฟันมีความสามารถในการบัฟเฟอร์ไฮดรอกซิลไอออน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nerwich และคณะ (1993)⁷³ ที่พบว่าความสามารถในการยอมให้สารซึมผ่าน (permeability) และความสามารถในการบัฟเฟอร์ (buffering capacity) ของเนื้อฟันมีผลต่อการแพร่ของไฮดรอกซิลไอออน นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sjögren และคณะ (1991)⁷⁴ ถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของแคลเซียมไฮดรอกไซด์ในการใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน พบว่าแคลเซียมไฮดรอกไซด์ จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อเมื่อทำการใส่ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

ซิลเวอร์ (Silver; Ag)

ซิลเวอร์จัดเป็นโลหะในกลุ่มโลหะมีค่า (precious metal) ซึ่งมีการนำมาใช้ในด้านต่างๆ มาเป็นเวลานานนับพันปี เช่น ทำเป็นเครื่องประดับ อุปกรณ์ เหรียญเงิน วัสดุในการถ่ายภาพ หรือวัตถุระเบิด ในสมัยโบราณมีการนำผงซิลเวอร์มาใช้ในการรักษาแผล⁷⁵ ในทางการแพทย์มีการนำซิลเวอร์มาใช้เป็นสารต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial agent) แต่หลังจากเริ่มมีการนำยาปฏิชีวนะ (antibiotics) มาใช้ในปี 1940 ทำให้มีการนำเกลือซิลเวอร์ (silver salts) มาใช้น้อยลง และมีการนำสารประกอบซิลเวอร์ มาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านต่างๆ ในทางชีวการแพทย์ (biomedical fields)⁷⁶ โดยเมื่อทำการเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อเชื้อจุลชีพพบว่า ซิลเวอร์มีความเป็นพิษต่อเชื้อจุลชีพมากกว่าโลหะชนิดอื่น โดยเรียงลำดับจากความเป็นพิษต่อเชื้อจุลชีพจากมากไปน้อยได้ดังนี้ $Ag > Hg > Cu > Cd > Cr > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn$ โดยมีความเป็นพิษที่ต่ำต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian Cells) นอกจากนี้ ซิลเวอร์ยังมีข้อดีคือ ไม่ทำให้เกิดการดื้อของเชื้อต่อสาร⁷⁷ และมีฤทธิ์ในการต้านต่อเชื้อจุลชีพที่หลากหลาย²³ ทำให้มีการนำซิลเวอร์มาใช้อย่างหลากหลายในทางการแพทย์ เช่นเป็นส่วนประกอบในผ้าพันแผล ครีมทาแผลไฟไหม้ ฟันผิวของวัสดุที่ใช้ทำสายสวน รากเทียม และอวัยวะเทียม^{24,25} ในทาง

ทันตกรรม มีการนำซิลเวอร์มาใช้ในรูปแบบของสารประกอบซิลเวอร์ ตั้งแต่ปี 1840s โดยมีการนำ ซิลเวอร์ไนเตรด มาใช้เพื่อลดอุบัติการณ์การเกิดฟันผุในฟันน้ำนม และป้องกันฟันผุในฟันกรามแท้ที่เริ่มขึ้น ตลอดจนใช้เป็นสารฆ่าเชื้อในเนื้อฟัน และในปี 1960s ได้มีการนำฟลูออไรด์มาผสมในซิลเวอร์ เพื่อเป็นสารต้านฟันผุ แต่อย่างไรก็ตาม การนำไปใช้ในทางคลินิกพบว่ามีข้อจำกัดในเรื่องการทำให้ฟันติดสีดำ^{26,27}

แม้จะเป็นที่ทราบกันดีถึงคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อจุลชีพของซิลเวอร์ แต่อย่างไรก็ตาม กลไกในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เรี่ยนั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด²⁸ มีข้อเสนอว่า ซิลเวอร์ไอออน (ionic silver) จะทำปฏิกิริยากับหมู่ไทโธล (thiol groups) ของเอนไซม์ (enzyme) ทำให้เกิดการยับยั้ง (inactivate) การทำงานของเอนไซม์ของแบคทีเรียได้^{78,79} และจากหลักฐานทางการทดลอง พบการสูญเสียความสามารถในการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอของแบคทีเรีย (DNA replication) เมื่อทำปฏิกิริยากับซิลเวอร์ไอออน⁸⁰ นอกจากนี้มีการศึกษาที่แสดงถึงการเปลี่ยนแปลง โครงสร้าง (structural changes) ของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และการเกิดอิเล็กตรอน เดนส์ แกรนูล (electron-dense granules) ขนาดเล็กจากซิลเวอร์ (silver) และ ซัลเฟอร์ (sulfur)^{80,81}

อนุภาคซิลเวอร์นาโน (Silver nanoparticles; AgNPs)

อนุภาคโลหะที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตร พบว่ามีคุณสมบัติทางกายภาพ ที่แตกต่างไปจากเมื่ออยู่ในรูปแบบเป็นไอออนหรือโลหะก้อน โดยมีคุณสมบัติพิเศษคือ การเพิ่มความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาเคมี เนื่องมาจากลักษณะ โครงสร้างที่มีเหลี่ยมมุมมาก ทำให้มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง โดยอนุภาคนาโนเป็นกลุ่มของอนุภาคที่มีขนาดอยู่ในช่วงนาโนเมตร ซึ่งปัจจุบันเริ่มมีความสนใจในการนำอนุภาคนาโนมาใช้ในทางการแพทย์กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากคุณสมบัติที่มีอัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรสูง และมีคุณลักษณะเฉพาะทางกายภาพและเคมี²⁸ จากคุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้อนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลชีพจากการมีความสามารถในการจับกับเชื้อจุลชีพได้ดี²⁹ จากการศึกษาของ Morones และคณะ(2005)²⁸ ซึ่งทำการศึกษาถึงผลของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-100 นาโนเมตรต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *V. cholera*, *P. aeruginosa* และ *S. typhus* โดยการใช้ high angle annular dark field (HAADF) scanning transmission electron microscopy (STEM) พบว่าฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของอนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้นขึ้นกับขนาดของอนุภาคนาโน (size dependent) ซึ่งเป็นผลมาจากการที่อนุภาคโลหะที่มีขนาดเล็ก (ประมาณ 5 นาโนเมตร) จะเกิดอิเล็กตรอนิกส์ เอฟเฟค (electronic effect) โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างพื้นผิวของอนุภาค (local electronic structure) จากอิทธิพลของขนาดอนุภาค และนอกจากนี้พบว่าพลังงานยึดเหนี่ยว (binding strength) ของอนุภาคนาโนกับแบคทีเรีย จะขึ้นกับพื้นที่ผิวของอนุภาคนาโนที่เกิดปฏิกิริยากับแบคทีเรีย (surface area of interaction) โดยอนุภาคที่มี

ขนาดเล็กกว่าจะมีค่าร้อยละของพื้นที่ผิวที่จะเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุภาคที่มีขนาดใหญ่กว่า ซึ่งจากผลของทั้ง 2 ปัจจัยนี้ พบได้เฉพาะในอนุภาคนาโนที่มีขนาดอยู่ในช่วง 1-10 นาโนเมตรเท่านั้น โดยทำให้เกิดการยึดเกาะของอนุภาคนาโนกับผิวของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียและเกิดการขัดขวางการทำงานของเซลล์ เช่นการเพิ่มความสามารถในการยอมให้สารซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และขัดขวางกระบวนการหายใจของเซลล์ นอกจากนี้ อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังสามารถแทรกผ่านเข้าไปในเซลล์แบคทีเรีย และเกิดการทำลายเซลล์โดยการทำปฏิกิริยากับสารประกอบซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส เช่น ดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ และนอกจากนี้อนุภาคซิลเวอร์นาโนยังสามารถปล่อยซิลเวอร์ไอออนซึ่งช่วยเสริมฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อที่เป็นผลมาจากคุณสมบัติของการเป็นอนุภาคนาโนของซิลเวอร์อีกด้วย

อนุภาคซิลเวอร์นาโนได้ถูกนำมาใช้เป็นสารต้านเชื้อในการทำความสะอาดเครื่องมือทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อได้หลายชนิด โดยมีการศึกษาพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งมีขนาดประมาณ 10-100 นาโนเมตร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ^{28,32} รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียที่ดื้อต่อยาหลายชนิด³³ จากคุณสมบัติที่คิดกล่าวจึงมีการนำอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้ในงานรักษาคอลงรากฟัน โดยมีการนำมาใช้ในรูปแบบต่างๆ เช่น การเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน หรือ เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน³⁰ โดยจากการศึกษาของ Wu และคณะ (2014)³⁰ ซึ่งทำการศึกษถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ต่อเชื้อ *E. faecalis* ที่อยู่ในรูปแบบไบโอฟิล์ม โดยการใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน และสารใส่ในคลองรากฟัน พบว่า การใช้ 0.1 % AgNPs solution ไม่สามารถทำลายโครงสร้างไบโอฟิล์ม ของ เชื้อ *E. faecalis* ได้ แต่พบว่าการใช้ 0.02 % AgNPs gel เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน สามารถทำลายโครงสร้างไบโอฟิล์มของ เชื้อ *E. faecalis* ได้อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าจำนวนเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตของเชื้อ *E. faecalis* มีจำนวนที่น้อยกว่าการใช้ 0.01% AgNPs gel และแคลเซียมไฮดรอกไซด์ อย่างมี นัยสำคัญ ซึ่งสรุปได้ว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ขึ้นกับรูปแบบในการนำไปใช้งาน โดยพบว่าอนุภาคซิลเวอร์นาโน จะมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อในคลองรากฟันได้เมื่อใช้ในรูปแบบเป็นสารใส่ในคลองรากฟัน และจากการศึกษาของ Afkhami และคณะ (2015)³² ซึ่งทำการศึกษถึงประสิทธิภาพในการต้านต่อเชื้อ *E. faecalis* เมื่ออยู่ในรูปแบบของโครงสร้างไบโอฟิล์ม โดยการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ (vehicles) เป็นสารใส่ในคลองรากฟันที่ 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน พบว่าการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ร่วมกับตัวนำส่งสารทุกชนิด สามารถลดจำนวนเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในทั้ง 2 ช่วงเวลา และพบว่า หลังจาก 1 สัปดาห์ ในกลุ่มที่ใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีประสิทธิภาพในการต้านต่อเชื้อมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม ไม่พบความแตกต่างของการใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ร่วมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ หลังจาก 1 เดือน นอกจากนี้จากการศึกษาของ Fan และคณะ(2016)³³ ที่ทำการศึกษถึงการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน และต้านต่อเชื้อ *E. faecalis* ของ Silver-Calcium-Silicate mesoporous nanoparticle พบว่าประสิทธิภาพของ Silver-Calcium-Silicate mesoporous nanoparticle ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ใน

สภาวะแพลงก์ตอนิก (planktonic) นั้น พบจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* ในกลุ่มที่มี Silver-Calcium-Silicate mesoporous nanoparticle มีจำนวนที่น้อยกว่าในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* จะมีปริมาณที่ลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Silver-Calcium-Silicate mesoporous nanoparticle อย่างไรก็ตาม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และจากการศึกษาการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน และการคงฤทธิ์ในการต้านต่อเชื้อ *E. faecalis* เมื่อนำแผ่นเนื้อฟัน (dentin slice) ที่สัมผัสกับยาเป็นเวลา 7 วัน มาแช่ในสารละลายของเชื้อ *E. faecalis* เป็นเวลา 6 วันพบว่าแผ่นเนื้อฟัน ที่ผ่านการสัมผัสกับ Silver-Calcium-Silicate mesoporous nanoparticle มีจำนวนเชื้อน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ผ่านการสัมผัสกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

โพลีเอทิลีน ไกลคอล (Polyethylene glycol; PEG)

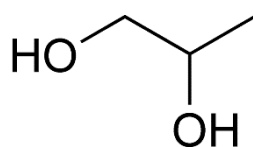
โพลีเอทิลีน ไกลคอล หรือ มาโครคอล (Macrogol; Mc) เป็นกระสายยาชนิดที่ละลายน้ำได้ มีคุณสมบัติเป็นของเหลว หรือของแข็งก็ได้ โดยสามารถระบุได้จากตัวเลข ซึ่งเป็นค่าประมาณของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งตัวเลขที่มากแสดงถึงสารมีความหนืดมากกว่า เช่น PEG 400 เป็นของเหลว ในขณะที่ PEG 4000 เป็นขี้ผึ้ง (wax) ซึ่งเป็นของแข็ง มีคุณสมบัติ เป็นสารที่ไม่ระเหย สามารถละลายหรือเข้ากันได้กับของเหลวที่ละลายน้ำ และไม่ดูดความชื้น มีความเฉื่อยต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี จากการทดสอบ patch test พบว่าสารประกอบในกลุ่มนี้ไม่มีความเป็นพิษ และการใช้ต่อเนื่องเป็นเวลานานจะไม่ก่อให้เกิดการระคายเคือง โพลีเอทิลีน ไกลคอล มีสูตรโครงสร้างดังนี้



จุดหลอมเหลวของสารอยู่ที่อุณหภูมิ 58-62 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปมักใช้ส่วนผสมสองชนิดที่มีโมเลกุลสูงและโมเลกุลต่ำ เข้าด้วยกัน ซึ่งจะให้ผลที่ดีกว่า เช่น ผสม PEG 400 และ PEG 4000^{84,85} ในอัตราส่วน 3:2 มีวิธีการเตรียม คือ ให้ความร้อนแก่ส่วนประกอบทั้งสองใน water bath ให้มีอุณหภูมิประมาณ 65 องศาเซลเซียส ปล่อยให้เย็นลงและคนตลอดเวลาให้เข้ากันดีจนกระทั่งแข็งตัวจะได้สารที่มีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า โพลีเอทิลีนไกลคอล ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันมีฤทธิ์ในการต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลากหลายชนิดทั้ง *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis* และ *Escherichia coli*⁸⁶

โพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol; PG)

โพรพิลีนไกลคอล หรือ 1,2-propanediol ถูกแนะนำให้ใช้สำหรับเป็นกระสายยาในงาน เอนโดคอนติคส์ครั้งแรก โดย Laws ในปี 1962 เป็นสารเคมีที่ได้จากการสังเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยา ระหว่างโพรพิลีนออกไซด์ (Propylene oxide) กับน้ำ เป็นสารกลุ่มไกลคอล (Glycol) ตัวหนึ่ง มีความเป็นพิษน้อยมาก⁸⁷ มีลักษณะเป็นของเหลว ค่อนข้างหนืดข้น ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น ถูกนำมาใช้เป็นตัวทำละลายในยาทา ยาฉีด และเครื่องสำอาง รวมไปถึงเป็นส่วนผสมในอาหาร โพรพิลีนไกลคอล มีสูตรโครงสร้างดังนี้

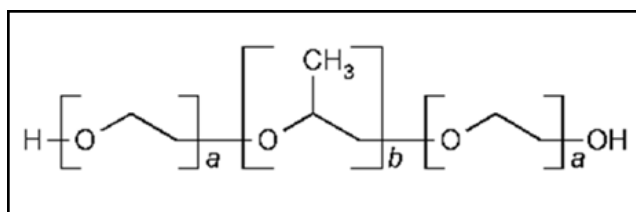


รูปที่ 1 ลักษณะโครงสร้างของโพรพิลีนไกลคอล

จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โพรพิลีนไกลคอล มีฤทธิ์ในการต้านจุลชีพที่พบเป็นประจำในคลองรากฟันที่คิดเชื่อได้⁸⁶⁻⁸⁹ และเมื่อนำมาเป็นกระสายยาสำหรับนำยาใส่ในคลองรากฟัน พบว่าโพรพิลีนไกลคอล ซึ่งเป็นสารหนืดที่มีค่าแรงตึงผิวต่ำสามารถนำยาแทรกซึมผ่านเข้าสู่ท่อเนื้อฟันได้เป็นอย่างดี⁹⁰ นอกจากนี้ โพรพิลีนไกลคอลยังมีคุณสมบัติที่ชอบดูดน้ำ ทำให้สามารถคงยาอยู่ในคลองรากฟันและปลดปล่อยยาได้เป็นระยะเวลาานาน⁹¹

โพลอกซาเมอร์ (Poloxamer)

โพลอกซาเมอร์เป็นสารที่ไม่มีประจุ (non-ionic poly (ethylene oxide) (PEO)- poly (propylene oxide) (PPO) copolymers)⁹², ไม่มีกลิ่นและรส (odorless and tasteless)⁹¹ โดยเป็นกลุ่มของสารประกอบที่มีการนำมาใช้ ในทางการแพทย์ตั้งแต่ปี 1960s โดยใส่ในอาหาร (food additives) และยา (pharmaceutical preparations)⁹³ มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ (water-soluble), ไม่เป็นพิษ (non toxic) และเป็นสารลดแรงตึงผิวที่มีความเฉื่อย (inert surfactants) โดยเป็นไตรบล็อกโคพอลิเมอร์ (triblock copolymer) ที่มีส่วนกลางของโครงสร้าง เป็น polyoxypropylene ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic part) และส่วนปลายของโครงสร้างทั้ง 2 ข้างเป็น polyoxyethylene ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถละลายน้ำ (hydrophilic part)⁹⁴ โดยมีลักษณะโครงสร้าง ดังนี้



รูปที่ 2 ลักษณะโครงสร้างของโพลอกซาเมอร์

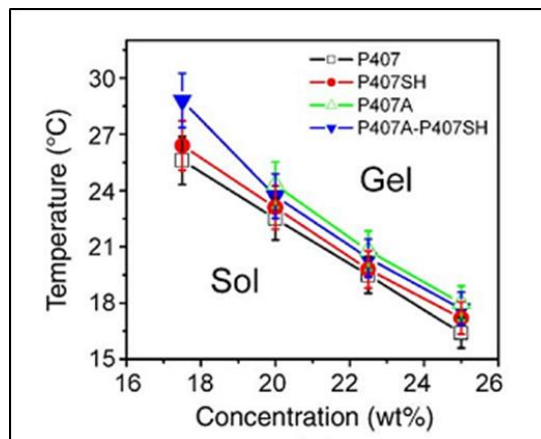
โพลอกซาเมอร์ มีชื่อเรียกได้หลายอย่าง เช่น Lutrol, Monolan, Pluronic, Poloxalkol เป็นต้น มีชื่อทางเคมี คือ α -Hydro- ω -hydroxypoly(oxyethylene)poly(oxypropylene)⁹¹ มีหลายชนิด (grade) ซึ่งทุกชนิดจะมีโครงสร้างทางเคมีที่เหมือนกัน แต่จะมีความแตกต่างกันที่น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) และองค์ประกอบของส่วนที่สามารถละลายน้ำ (hydrophilic PEO block) กับส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic PPO block) ซึ่งจะทำให้มีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพ (chemical and physical characteristics) ที่ต่างกัน^{92,94,95}

การเรียกชื่อโพลอกซาเมอร์ จะเรียก Poloxamer แล้วตามด้วยตัวเลข 3 ตัว โดย 2 ตัวแรกเมื่อนำมาคูณ 100 จะเป็นน้ำหนักของโมเลกุล polyoxypropylene โดยประมาณ และตัวเลขตัวสุดท้ายเมื่อนำมาคูณ 10 จะได้น้ำหนักโดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของ polyoxyethylene โดยชนิดและน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 1

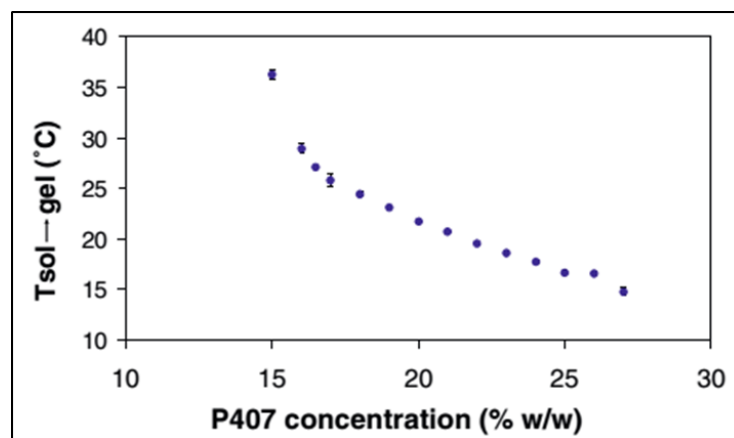
ตารางที่ 1 แสดงชนิดของโพลอกซาเมอร์⁹¹

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

โพลอกซาเมอร์เป็นสารที่มีคุณสมบัติสามารถเปลี่ยนแปลงสถานะได้เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนแปลง (thermoreversible gels) โดยสามารถเปลี่ยนสถานะระหว่างของเหลวและเจลได้ (sol-gel transition) โดยที่อุณหภูมิต่ำจะมีลักษณะเป็นของเหลว (aqueous solution) และเมื่อมีอุณหภูมิสูงขึ้นจะเปลี่ยนเป็นไฮโดรเจล (hydrogel) ทั้งนี้ การเปลี่ยนแปลงสถานะนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร³⁴ โดยโพลอกซาเมอร์ที่เป็นที่นิยมนำมาใช้คือ โพลอกซาเมอร์ 407 ดังแสดงในรูปที่ 3⁶ และ 4³⁴



รูปที่ 3 แสดงค่า Gelation temperature ของโพลอกซาเมอร์ ที่ความเข้มข้นต่างๆ



รูปที่ 4 แสดงค่า Gelation temperature ของโพลอกซาเมอร์ 407 ที่ความเข้มข้นต่างๆ

โพลอกซาเมอร์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ คือ โพลอกซาเมอร์ 407 (Poloxamer 407: P 407) ซึ่งเป็นสารที่นำมาใช้ทางการแพทย์ เพื่อเคลือบยาเม็ด และเพื่อเป็นตัวนำยาเข้าสู่ร่างกาย (drug delivery) เช่น โพลอกซาเมอร์ 407 ความเข้มข้น 0.001-0.85% w/v เพื่อใช้กับดวงตา (ocular delivery system)⁹⁷ หรือนำมาผสมกับยาชา lidocaine เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์⁹⁸ หรือผสมยา ibuprofen เพื่อให้รูปแบบยาชนิดซึ่งเป็นยาแก้ปวดที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ซึ่งพบว่าสามารถผ่านส่วนของเยื่อหุ้มสมองชั้นดูรา (dural membrane) ได้⁹⁹ หรือผสมกับยา vancomycin เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการออกฤทธิ์

ในการป้องกันและรักษาการติดเชื้อเฉพาะที่ (local prophylaxis of infections) ในบริเวณที่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงน้อย เช่นกระดูก หรือในตำแหน่งที่มีการใส่ prosthetic device ที่ยากต่อการออกฤทธิ์ของยาปฏิชีวนะที่ให้ทางระบบ (systemic antibiotic therapy)⁹⁴ เป็นต้น ส่วนในทางทันตกรรม จากการศึกษาของ Wannachaiyasit และ Phaechamud (2010)¹⁰⁰ ซึ่งศึกษาการพัฒนาคลอเฮกซิดีนเจล (Chlorhexidine gel) สำหรับมาใช้ในช่องปาก (mouth antiseptic) โดยใช้โพลอกซาเมอร์ 407 (Lutrol F127) เป็นเจลเบส พบว่าโพลอกซาเมอร์ 407 ความเข้มข้น 25 %w/w ช่วยชะลอการปลดปล่อยคลอเฮกซิดีนให้ออกมาอย่างช้าๆ

การทดสอบความเป็นพิษ

มีการศึกษาความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง (สุนัข และกระต่าย) พบว่าการให้โพลอกซาเมอร์ที่มีความเข้มข้น 5% w/v และ 10% w/v ในตา เหงือก และผิวหนัง จะไม่ทำให้เกิดการระคายเคือง (nonirritating) หรือการแพ้ (nonsensitizing) แก่สัตว์ทดลอง⁹¹

การศึกษาความไวของ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อสารทดสอบ

การศึกษาความไวของ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อสารทดสอบต่างๆ ในโมเดลฟันในการศึกษานี้ ดัดแปลงจากการศึกษาของ Haapasalo และ Ørstavik (1987)¹⁰¹ โดยใช้การบ่มฟันกับ *E. faecalis* และ *C. albicans* เป็นระยะเวลา 21 วัน และใช้หัวกรอฟันในการเก็บตัวอย่าง เป็นการจำลองสภาวะแวดล้อมของคลองรากฟัน โดยทำการศึกษาในฟันมนุษย์ที่ถูกถอน ซึ่งการเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษาผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารต่างๆ ในโมเดลฟัน มีหลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีมีข้อดี ข้อด้อยที่แตกต่างกัน เช่น

- การใช้แท่งกระดาษซับ (paper point) มีข้อดี คือ สะดวก แต่สามารถทดสอบได้เฉพาะเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟันเท่านั้น ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเชื้อที่อยู่ในท่อเนื้อฟันชั้นในได้
- การใช้ตะไบชนิดมือ (hand file) สามารถทดสอบเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันชั้นที่อยู่ติดกับคลองรากฟันบางส่วนได้ แต่ไม่สามารถควบคุมบริเวณ และปริมาณของเนื้อฟันที่จะเก็บตัวอย่างได้
- การใช้หัวกรอ สามารถทดสอบเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน และท่อเนื้อฟันในแต่ละชั้นที่ต้องการได้ โดยการเพิ่มขนาดของหัวกรอตามอัตราส่วนที่ต้องการได้ แต่เป็นวิธีการที่ยุ่งยากและต้องใช้เวลา

วัตถุประสงค์

1. เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 และอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* เมื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน
2. เพื่อเปรียบเทียบการคงฤทธิ์ในเนื้อฟันของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 และอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล เมื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน

สมมติฐาน

1. อนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ไม่แตกต่างจาก อนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล เมื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน
2. อนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในโพลอกซาเมอร์ 407 มีคุณสมบัติในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน ไม่แตกต่างจาก อนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล เมื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. สารเคมี
 - 1.) โพลอกซาเมอร์ 407; P407 (ICI plc, Wilton, UK)
 - 2.) โพลีเอทิลีนไกลคอล หรือมาโครกอล (Polyethylene glycol; PEG or Macrogol; Mc)
 - 3.) โพรพิลีนไกลคอล (Propylene glycol; PG)
 - 4.) คลอร์เฮกซิดีนสำเร็จรูป Consepsis® V (CHX; Ultradent Products Inc, South Jordan UT, USA)
 - 5.) สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน (จำแนกตามปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน ตัวทำละลาย สี และขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน)

ชนิดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน				
	ปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (PPM)	ตัวทำละลาย	สี	ขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน (nm)
1	200	กรดแทนนิก (Tannic Acid)	Yellow	 Yellow: 5-10
2	200	กรดแทนนิก (Tannic Acid)	Red-wine	 Red: 20-30
3	200	กรดแทนนิก (Tannic Acid)	Purple-blue	 Purple: 60-70
4	200	กรดแทนนิก (Tannic Acid)	Blue	 Blue: 80-100
5	300	แป้ง (Starch)	Red-orange	
6	300	แป้ง (Starch)	Purple	
7	800	แป้ง (Starch)	Blue	
8	1,000	แป้ง (Starch)	Yellow	
9	1,000	แป้ง (Starch)	Blue	
10	2,000	95% เอทานอล (Ethanol)	Yellow	
11	2,000	95% เอทานอล (Ethanol)	Blue	

* โดยสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับการสังเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยอุปกรณ์รับรู้ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

- 6.) น้ำกลั่นปราศจากเชื้อ (Distilled Water; DW)
- 7.) น้ำเกลือปราศจากเชื้อ (Normal saline solution; NSS)
- 8.) โซเดียมไฮโปคลอไรท์ (Sodium hypochlorite; NaOCl) ความเข้มข้น 5.25% (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
- 9.) กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก (Ethylenediaminetetraacetic acid; EDTA) ความเข้มข้น 17% (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)
- 10.) สารละลายไทมอล (Thymol) ความเข้มข้น 0.1 % (ฝ่ายเภสัชกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวเบรน ฮาร์ต อินฟิวชัน Brain heart infusion broth (BHI broth): Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD 37 กรัมต่อ 1 ลิตร
3. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเบรน ฮาร์ต อินฟิวชัน Brain heart infusion agar (BHI agar): Becton, Dickinson & Co, Sparks, MD 52 กรัมต่อ 1 ลิตร
4. อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดผสมเลือด Blood agar base (BA): RCI Labscan Asia Co., Ltd 40 กรัมต่อ 1 ลิตร
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose broth (SDB): Laboratories Conda S.A. 30 กรัมต่อ 1 ลิตร
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud dextrose agar (SDA): Laboratories Conda S.A. 65 กรัมต่อ 1 ลิตร
7. เชื้อแบคทีเรียชนิดเอ็นเทอโรค็อกคัส ฟีคอลลิส (*E. faecalis* ATCC 19433; American Type Culture Collection 19433)
8. เชื้อราแคนดิดา อัลบิแคนส์ (*C. albicans* ATCC 90028; American Type Culture Collection 90028)
9. ฟันแท่งที่มีรากเดี่ยว ที่ถอนจากมนุษย์
10. เรซินอะคริลิกชนิดบ่มเอง (self-curing acrylic resin: Triplex® Cold; Ivoclar Vivadent AG, FL-9494 Schaan, Liechtenstein)
11. ท่อพีวีซีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.8 เซนติเมตร
12. หัวกรอพีโซดริล (Peeso drill) เบอร์ 1-6
13. กระจกใส่น้ำยาล้างคลองรากฟันขนาด 10 มิลลิลิตร พร้อมเข็มขนาด 27
14. ขี้ผึ้งตามขอบ (Periphery wax) ปรมาจากเชื้อ
15. พาราฟิล์ม (Parafilm)
16. ผ้าก๊อชและสำลีปรมาจากเชื้อ
17. ไมโครไทเทอร์เพลท ขนาด 96 หลุมชนิดก้นแบน และก้นกลม (flat-bottomed & round-bottomed 96-well polystyrene microtiter plate)

อุปกรณ์

1. เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet® 4000 (Buehler Isomet® 4000, Buehler Ltd., USA)
2. เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic bath cleaner)
3. หม้อนึ่งควบคุมความดันไอน้ำ (Autoclave: Tomy, Tokyo, Japan)
4. ตู้อบความร้อนสูง (Hot air oven: Memmert, Germany)

5. ตู้บ่มเพาะเชื้อขนาด 400 ลิตร (Binder; Scientific promotion Co., Ltd, USA)
6. เครื่องกรองฟันทนกรดความเร็วช้า
7. เครื่องชั่ง Digital ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Digital electronic analytical balance รุ่น Sartorius A 200 S/ A200S: Scientific promotion Co., LTD, USA)
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microlitre centrifuge รุ่น Bench top centrifuge MIKRO 200, Andres Hettich GmbH & Co.KG (Hettich), Germany)
9. เครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง (UV Spectrophotometer รุ่น The Thermo Scientific Multiskan GO microplate spectrophotometer: Thermo Fisher Scientific Inc, USA)
10. Water bath (รุ่น WNE 45 SC, Memert, UK)
11. เครื่องเขย่าสาร (Vortex: New York, USA)
12. ขวดแก้วชนิดไอโซซันดิมีฝาปิดเกลียวพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร
13. ขวดแก้วใส่สารเคมีขนาดต่างๆ (Laboratory Glass Bottle)
14. จานเลี้ยงเชื้อ (petri plate)
15. บีกเกอร์ (Beaker)
16. ขวดปริมาตรทรงกรวย (conical flask)
17. แคนเดิลจาร์ (Candle jar)
18. ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 10, 50, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
19. กล้องไมโครสโคป (Microscope รุ่น ZEISS OPMI pico: Carl Zeiss Meditec AG, Germany)

วิธีการวิจัย

1. การทดสอบความไวของเชื้อจุลชีพต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ (Antimicrobial susceptibility test)

โดยจะเป็นการทดสอบความไวในการต้านเชื้อในสภาวะแฟลงไดนิค ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ

1.1 Agar diffusion method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบแบบกึ่งปริมาณวิเคราะห์ (semi-quantitative susceptibility test) ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI^{102,103} โดยอาศัยหลักการแพร่ของสารที่ต้องการทดสอบซึมผ่านอาหารผสมวุ้นเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อจุลชีพที่ต้องการทดสอบอยู่ โดยหากสารที่ต้องการทดสอบนั้นๆ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลชีพได้ จะปรากฏเป็นวงใสที่เรียกว่าโซนยับยั้ง (inhibition zone) ซึ่งหากสารที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้สูง จะปรากฏวงใสขนาดใหญ่ แต่หากสารที่ทดสอบมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้น้อย จะปรากฏวงใสขนาดเล็ก และหากสารที่ทดสอบไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จะไม่ปรากฏวงใสขึ้น

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *E. faecalis*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Brain Heart Infusion agar (BHI agar) ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร โดยนำไปต้มจนเหลว จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เติมเชื้อทดสอบ *E. faecalis* ปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร (Colony forming unit/ml : CFU/ml) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่มีวงแหวนโลหะขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางอยู่ โดยให้ความหนาของวุ้นสม่ำเสมอ รอนอาหารเลี้ยงเชื้อเย็นและแข็งตัว ถอดวงแหวนโลหะออก จะปรากฏหลุมสำหรับบรรจุสารที่ต้องการทดสอบ เขียนหมายเลขกำกับไว้ได้จานเพาะเชื้อ เติมสารละลายของอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ที่ต้องการทดสอบ ดังตารางที่ 2 ลงไปปริมาณ 80 ไมโครลิตร/หลุม นำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในแคนเดิลจาร์ ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หากพบวงใสรอบหลุมของสารที่ทดสอบ

แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งจะแปลผลโดยทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้ง

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *C. albicans*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Sabouraud dextrose agar (SDA) ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำไปต้มจนเหลว จากนั้นรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส จึงทำการเติมเชื้อ *C. albicans* โดยปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis* แล้วจึงนำไปบ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีออกซิเจน ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง หากพบวงใสรอบหลุมของสารที่ทดสอบ แสดงว่าสารนั้นมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ทำการแปลผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนยับยั้งเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis*

1.2 Broth microdilution method

เป็นวิธีการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative susceptibility test) ตามวิธีมาตรฐานของ CLSI¹⁰⁴⁻¹⁰⁶ โดยอาศัยหลักการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบให้ค่อยๆ ลดลงครึ่งละ 2 เท่า (serial-two-fold dilution) และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบดูว่าปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการทดสอบเท่าใดจึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC: Minimum Inhibitory Concentration) และปริมาณความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่ต้องการทดสอบเท่าใดจึงจะสามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC: Minimum Bactericidal Concentration) โดยการแปลผลสามารถอ่านค่า MIC ได้จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบแรกที่ไม่ขุ่นซึ่งอยู่ต่อจากหลุมที่ขุ่น เนื่องจากเชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญเติบโตได้ จากนั้นนำสารละลายในหลุมทดสอบทุกหลุมที่ใสขึ้นไปเพาะเลี้ยงต่อบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อผสมวุ้น และอ่านค่า MBC ได้จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบสุดท้ายที่เชื้อไม่ขึ้น ซึ่งอยู่ก่อนหลุมที่เชื้อขึ้น เนื่องจากเชื้อทดสอบไม่สามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อผสมวุ้นได้

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *E. faecalis*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Brain Heart Infusion (BHI broth) นำมาเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม หลังจากนั้นเติมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ต้องการทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตรในแถวแรก จากนั้นทำการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบให้ลดลงครึ่งละ 2 เท่า สุดท้ายจึงทำการเติมเชื้อทดสอบ *E. faecalis* ซึ่งปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงไปในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ดังนั้นปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมจึงมีปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม สำหรับหลุมควบคุมบวก (positive control) จะทำการเติมเชื้อทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อโดยไม่ผสมสารทดสอบ และหลุมควบคุมลบ (negative control) จะทำการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น ทำการบ่มเพาะภายในสภาวะที่เหมาะสม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแปลผลโดยอ่านค่า MIC จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบแรกที่ไม่ขุ่น หลังจากนั้นนำสารละลายในหลุมทดสอบทุกหลุมที่ใส ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อจำนวน 10 ไมโครลิตร/หลุม ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งผสมเลือด (blood agar) ทำการบ่มเพาะภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแปลผลโดยอ่านค่า MBC ได้จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบสุดท้ายที่เชื้อไม่ขึ้นซึ่งอยู่ก่อนหลุมที่เชื้อขึ้น ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยค่า MIC และ MBC ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนแต่ละชนิดที่ได้จะนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกชนิดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่จะนำไปใช้ในการทดสอบในขั้นต่อไป

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *C. albicans*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) นำมาเติมลงในจานเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis* สุดท้ายจึงทำการเติมเชื้อทดสอบ *C. albicans* ซึ่งปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1.0×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ลงไปในทุกหลุม ปริมาตร 100 ไมโครลิตร/หลุม ดังนั้นปริมาตรสุดท้ายของแต่ละหลุมจึงมีปริมาตร 200 ไมโครลิตร/หลุม ทำการบ่มเพาะภายในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแปลผลโดยอ่านค่า MIC จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบแรกที่ไม่ขุ่นซึ่งอยู่ต่อจากหลุมที่ขุ่น หลังจากนั้นนำสารละลายในหลุมทดสอบทุกหลุมที่ใส ซึ่งแสดงว่าไม่มีการเจริญเติบโตของเชื้อ จำนวน 10 ไมโครลิตร/หลุม ไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose agar (SDA) ทำการบ่มเพาะภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแปลผลโดยอ่านค่า MBC ได้จากค่าความเข้มข้นของสารทดสอบจากหลุมทดสอบ

สุดท้ายที่เชื้อไม่ขึ้นซึ่งอยู่ก่อนหลุมที่เชื้อขึ้น ทำการทดสอบซ้ำ 3 ครั้ง โดยค่า MIC และ MBC ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนแต่ละชนิดที่ได้จะนำไปใช้เป็นเกณฑ์ในการพิจารณาคัดเลือกชนิดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่จะนำไปใช้ในการทดสอบในขั้นตอนต่อไป

1.3 Agar dilution method

เป็นการทดสอบความไวของเชื้อต่อสารทดสอบแบบปริมาณวิเคราะห์ (quantitative susceptibility test) ซึ่งมีหลักการทดสอบคล้ายคลึงกับ Broth dilution method ต่างกันเพียงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่านั้น โดยจะทำการเจือจางสารที่ต้องการทดสอบในอาหารวุ้น แล้วจึงทำการหยดเชื้อทดสอบลงบนผิวของอาหารวุ้น ซึ่งค่าความเข้มข้นของสารทดสอบที่น้อยที่สุดที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแปลผลได้เป็นค่า MBC

การคัดเลือกสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้ในการทดสอบ

ทำการคัดเลือกสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ผ่านการทดสอบด้วยวิธี Broth microdilution method แล้วให้ค่า MIC และ MBC ค่าที่สุด ซึ่งแสดงว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมากที่สุดมาทำการทดสอบต่อ โดยพบว่าสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีตัวทำละลายเป็นกรดแทนนิก และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ให้ผลการทดสอบดีที่สุด จึงนำมาศึกษาต่อในการศึกษานี้ โดยสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนดังกล่าวนี้ ได้รับการสังเคราะห์ใหม่ให้มีปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มากกว่าเดิมคือ 10,000 PPM ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้รับการสังเคราะห์ใหม่นี้มาใช้ศึกษาต่อ

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *E. faecalis*

นำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ลดลงครึ่งละ 2 เท่า แล้วจึงนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Brain Heart Infusion agar (BHI agar) ซึ่งหลอมไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปเทในจานเพาะเชื้อ รอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว จึงทำการหยดเชื้อ *E. faecalis* ซึ่งปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^4 โคโลนีต่อมิลลิตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะในสภาวะที่เหมาะสมที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการแปลผลโดยอ่านค่า MBC ได้จากค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการทดสอบสำหรับเชื้อ *C. albicans*

นำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อให้ลดลงครึ่งละ 2 เท่า แล้วจึงนำมาใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง Sabouraud dextrose agar (SDA) ซึ่งหมอมไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันดี จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis* จากนั้นทำการหาค่า MBC ของเชื้อ *C. albicans* ซึ่งปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^3 โคโลนีต่อมิลลิเมตร จากนั้นนำไปบ่มเพาะภายในสภาวะที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการแปลผลโดยอ่านค่า MBC ได้จากค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ไม่พบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. การเตรียมสารที่ใช้ในการทดสอบในแบบจำลองฟันมนุษย์ (Tooth model)

เนื่องจากการศึกษาในขั้นตอนต่อไปนั้น จะนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ได้ผลจากการทดสอบข้างต้นดีที่สุดไปศึกษาต่อในแบบจำลองฟันมนุษย์ ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์จะอยู่ในสภาวะที่เป็นไบโอฟิล์ม ดังนั้นการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลนั้น จึงพิจารณาจากค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารทดสอบที่สามารถกำจัดเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ได้ 100% (Biofilm eradication) ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาอื่น โดยจะเป็นการเปรียบเทียบกับค่า MBC ซึ่งเป็นค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของสารทดสอบในการต้านเชื้อในสภาวะแพลงก์ตอนิก ดังแสดง

Biofilm eradication ของเชื้อ *E. faecalis* = 4 เท่าของค่า MBC

Biofilm eradication ของเชื้อ *C. albicans* = 16 เท่าของค่า MBC

ซึ่งในการศึกษานี้ จะทำการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลเป็น 2 เท่าของค่า Biofilm eradication ของเชื้อแต่ละชนิด ดังแสดง

2 เท่าของค่า Biofilm eradication ของเชื้อ *E. faecalis* = 8 เท่าของค่า MBC

2 เท่าของค่า Biofilm eradication ของเชื้อ *C. albicans* = 32 เท่าของค่า MBC

ค่า MBC ของเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธี agar dilution method ค่า Biofilm eradication และความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่า MBC ค่า Biofilm eradication และค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล

<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
MBC	156.25 PPM	MBC	19.53125 PPM
Biofilm eradication (x 4 MBC)	625 PPM	Biofilm eradication (x 16 MBC)	312.5 PPM
x 2 Biofilm eradication (x 8 MBC)	1,250 PPM (ใช้ใน tooth model)	x 2 Biofilm eradication (x 32 MBC)	625 PPM (ใช้ใน tooth model)

2.1 การเตรียมสารละลายพอลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407

2.1.1 การเตรียมสารละลาย 17% พอลอกซาเมอร์ 407 (P407)

นำสารพอลอกซาเมอร์ 407 จำนวน 17 กรัม เติมน้ำลงไปปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง คนให้เข้ากัน จากนั้นนำมาแช่ตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้สารละลายใสของพอลอกซาเมอร์ 407

2.1.2 การเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในพอลอกซาเมอร์ 407

สำหรับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis*

นำสารพอลอกซาเมอร์ 407 จำนวน 17 กรัม เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนของน้ำ และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นสัดส่วน ดังแสดงในตารางที่ 4 โดยให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเท่ากับ 1,250 PPM ซึ่งเป็น 1 ใน 8 ส่วนของความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 10,000 PPM

ตารางที่ 4 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ *E. faecalis*

17% Poloxamer		
P 407 17 g	ส่วนเหลว 100 ml	
	Ag (10,000 PPM)	น้ำ
	1/8 ส่วน = 1,250 PPM 1/8 (100) = 12.5 ml	7/8 (100) = 87.5 ml

สำหรับการทดสอบเชื้อ *C. albicans*

นำสารโพลอกซาเมอร์ 407 จำนวน 17 กรัม เติมส่วนเหลว 100 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วยส่วนของน้ำ และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นสัดส่วน ดังแสดงในตารางที่ 5 โดยให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเท่ากับ 625 PPM ซึ่งเป็น 1 ใน 16 ส่วนของความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 10,000 PPM

ตารางที่ 5 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ *C. albicans*

17 % Poloxamer		
P 407 17 g	ส่วนเหลว 100 ml	
	Ag (10,000 PPM)	น้ำ
	1/16 ส่วน = 625 PPM 1/16 (100) = 6.25 ml	15/16 (100) = 93.75 ml

2.2 การเตรียมมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล

2.2.1 การเตรียมมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล (MP)

เตรียมส่วนมาโครกอลโดยการผสม PEG 400 และ PEG 4000^{84,85} ในอัตราส่วน 3:2 โดยให้ความร้อนแก่ส่วนประกอบทั้งสองใน water bath ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และคนตลอดเวลาให้เข้ากันดี หลังจากนั้นนำมาโครกอลที่เตรียมได้มาผสมกับโพรพิลีนไกลคอลในอัตราส่วน 1:1^{35,36} จากนั้นปล่อยให้เย็นลงจนกระทั่งสารแข็งตัวจะได้สารลักษณะเป็นขี้ผึ้ง

2.2.2 การเตรียมสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล

สำหรับการทดสอบเชื้อ *E. faecalis*

นำมาโครกอลที่เตรียมได้จากการผสม PEG 400 และ PEG 4000^{84,85} ในอัตราส่วน 3:2 มาผสมกับส่วนเหลวซึ่งประกอบด้วยส่วนของโพรพิลีนไกลคอล และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ในอัตราส่วนเท่ากับ 1: 1 ดังแสดงในตารางที่ 6 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเท่ากับ 1,250 PPM ซึ่งเป็น 1 ใน 8 ส่วนของความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 10,000 PPM

ตารางที่ 6 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ *E. faecalis*

MP			
Mc 3:2	ส่วนเหลว		
	PG	Ag (10,000 PPM)	
1	1	1/8 ส่วน = 1,250 PPM	
4	4		
4 ml	3 ml	1 ml	

สำหรับการทดสอบเชื้อ *C. albicans*

นำมาโครกอลที่เตรียมได้จากการผสม PEG 400 และ PEG 4000^{84,85} ในอัตราส่วน 3:2 มาผสมกับส่วนเหลวซึ่งประกอบด้วยส่วนของโพรพิลีนไกลคอล และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ในอัตราส่วนเท่ากับ 1: 1 ดังแสดงในตารางที่ 7 ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยให้ได้ค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเท่ากับ 625 PPM ซึ่งเป็น 1 ใน 16 ส่วนของความเข้มข้นตั้งต้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน 10,000 PPM

ตารางที่ 7 แสดงค่าความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล ที่ใช้ในการทดสอบเชื้อ *C. albicans*

MP		
Mc 3:2	ส่วนเหลว	
	PG	Ag (10,000 PPM)
1	1	1/16 ส่วน = 625 PPM
8	8	
8 ml	7 ml	

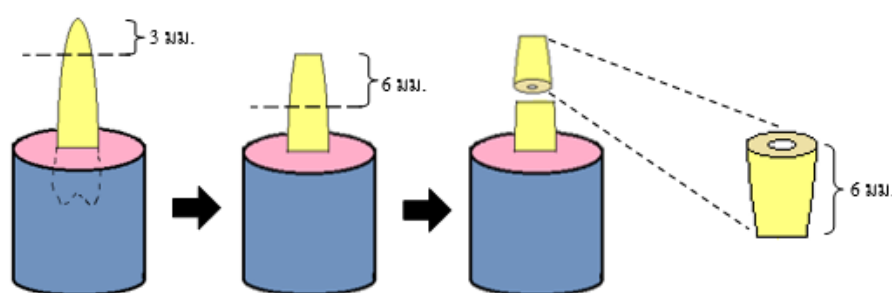
3. การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในคลองรากฟัน (Antimicrobial activity) และการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน (Antimicrobial substantivity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสม โพรพิลีนไกลคอล โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

นำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้ง 2 ชนิดที่เตรียมได้มา ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน ในแบบจำลองฟันมนุษย์

3.1 การเตรียมชิ้นฟัน

เตรียมฟันมนุษย์ ฟันหน้า หรือ ฟันกรามน้อย ที่มีส่วนรากที่สมบูรณ์ ไม่มีการแตกหัก ไม่มีรอยร้าว และ มีการสร้างรากฟันเสร็จสมบูรณ์ โดยมี 1 รากที่ตรง และมี 1 คลองรากฟัน จำนวน 112 ซี่ เก็บในสารละลายไทมอล ความเข้มข้น 0.1% จนกว่าจะใช้

ทำการกำจัดส่วนของเนื้อเยื่อปริทันต์ออกโดยแช่ในโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5.25% เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำฟันยึดกับท่อ PVC ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร ด้วยเรซิน อะคริลิกชนิดบ่มเอง โดยให้ส่วนของตัวฟันฝังลงในท่อ PVC ใช้เครื่องตัดชิ้นตัวอย่างรุ่น Isomet 4000 ทำการตัดส่วนปลายรากฟัน 3 มิลลิเมตร และตัดส่วนตัวฟันที่ได้ต่อระดับรอยต่อเคลือบฟันกับเคลือบ รากฟัน (cementoenamel junction) โดยให้เหลือส่วนรากฟันประมาณ 6 มิลลิเมตร จากนั้นใช้เครื่องมือ พีโซคริล เบอร์ 1-3 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเท่ากับ 1.1 มิลลิเมตร และทำการวัดความหนาของเนื้อฟันที่เหลือ จากนั้นนำชิ้นฟันไปสำรวจด้วยกล้องไมโครสโคปที่ กำลังขยาย 4 เท่า หากพบว่าชิ้นฟันใดมีรอยแตกหักหรือรอยร้าวจะถูกตัดออกจากการทดสอบ



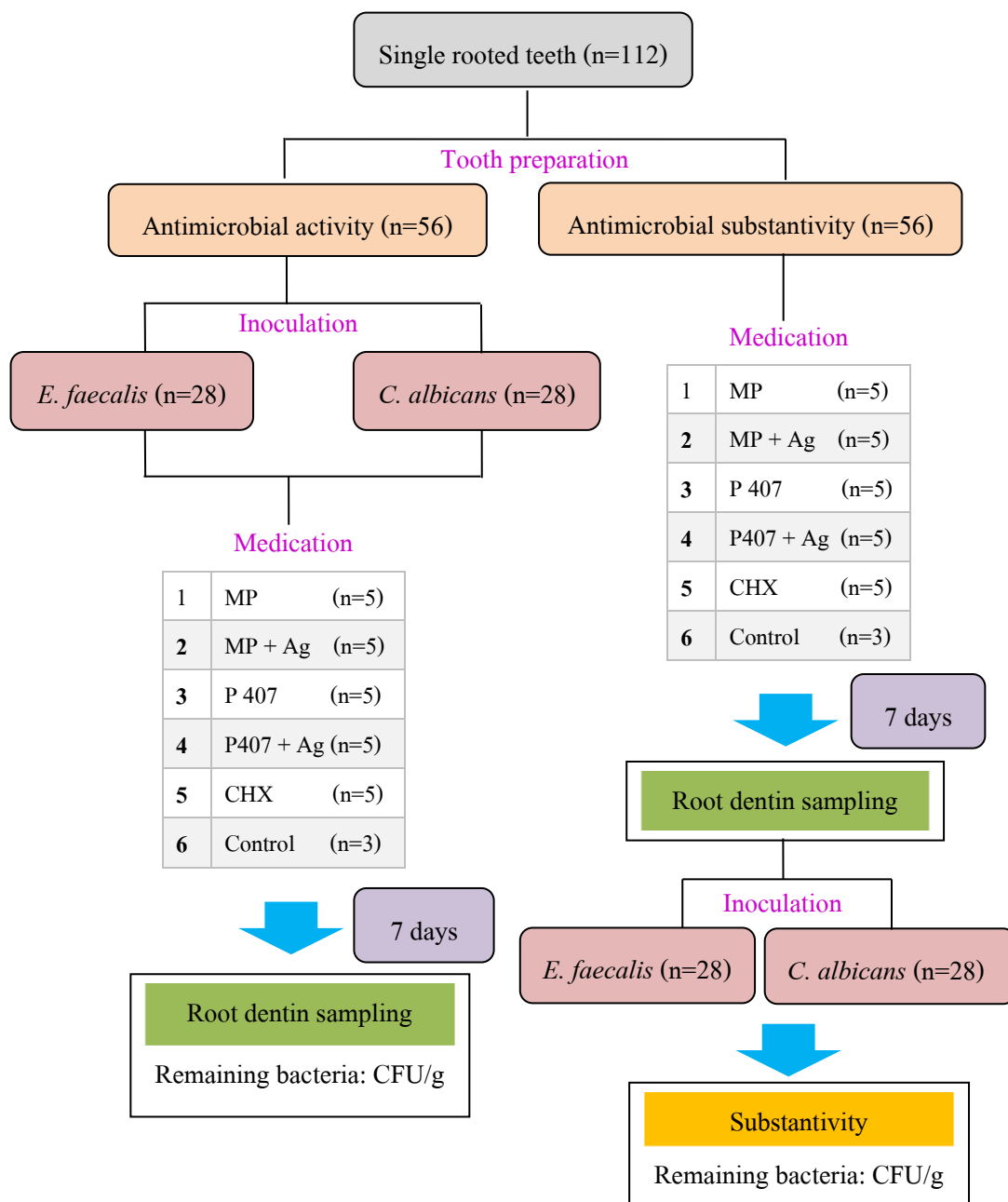
รูปที่ 5 รูปวาดแสดงการเตรียมชิ้นฟัน

ทำการกำจัดชั้นสเมียร์ (smear layer) โดยนำชิ้นฟันใส่ในเครื่องล้างความถี่สูง ที่มีกรด เอทิลีนไดอามีนเตตราอะเซติก ความเข้มข้น 17% เป็นเวลา 4 นาที แล้วตามด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรท์ ความเข้มข้น 5.25% เป็นเวลา 4 นาที หลังจากนั้นแช่ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อกำจัดสารที่อาจ หลงเหลืออยู่ ทำการปราศจากเชื้อ โดยนำชิ้นฟันจำนวนครึ่งหนึ่งใส่ในขวดแก้ว ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด เหลว Brain heart infusion (BHI broth) สำหรับทดสอบเชื้อ *E. faecalis* และนำชิ้นฟันจำนวนครึ่งหนึ่ง ใส่ในขวดแก้วที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว Sabouraud Dextrose Broth (SDB) สำหรับทดสอบเชื้อ *C. albicans* แล้วนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาบ่มเพาะ เชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อ ทดสอบความปราศจากเชื้อของชิ้นฟัน

นำชิ้นฟันที่ผ่านการเตรียมดังกล่าวข้างต้นมาทำการทดสอบ ดังนี้

- การทดสอบประสิทธิภาพของสารทดสอบในการต้านเชื้อ เป็นจำนวน 56 ซี่
- การทดสอบการคงฤทธิ์ของสารทดสอบในเนื้อฟัน เป็นจำนวน 56 ซี่

ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงการแบ่งกลุ่ม และจำนวนตัวอย่าง สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อและการคงฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในเนื้อฟัน ในตัวนำส่งสารแต่ละชนิด

3.2 การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* (Antimicrobial activity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอดผสมโพรพิลีนไกลคอล ในคลองรากฟัน โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์ (ดัดแปลงจากการศึกษาของ Haapasalo และ Ørstavik)¹⁰¹

3.2.1 การบ่มเพาะเชื้อในชิ้นฟัน

เชื้อ *E. faecalis*

นำเชื้อทดสอบ *E. faecalis* (ATCC 19433) ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth มาทำการปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าความขุ่น (turbidity) ของสารแขวนลอยเชื้อ *E. faecalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ด้วยเครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความทึบแสง (optical density; OD) เท่ากับ 0.1

นำเชื้อ *E. faecalis* ที่ปรับให้มีปริมาณเชื้อดังกล่าวข้างต้น ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดแก้วที่มีชิ้นฟัน 6 ชิ้นต่อขวด บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยจะทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน และทำการดูดสารละลายมาบ่มเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blood agar เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำชิ้นฟันที่ได้ล้างด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้ววางชิ้นฟันบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ

เชื้อ *C. albicans*

นำเชื้อทดสอบ *C. albicans* (ATCC 90028) ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB มาทำการปรับให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยวัดค่าความขุ่นของสารแขวนลอยเชื้อ *C. albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ด้วยเครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความทึบแสง เท่ากับ 1

จากนั้นทำตามขั้นตอนเช่นเดียวกับเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 วัน และทำการดูดสารละลายมาบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA เพื่อทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบตามกำหนดเวลา นำชิ้นฟันที่ได้ล้างด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้ววางชิ้นฟันบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ

3.2.2 การทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล ในคลองรากฟัน

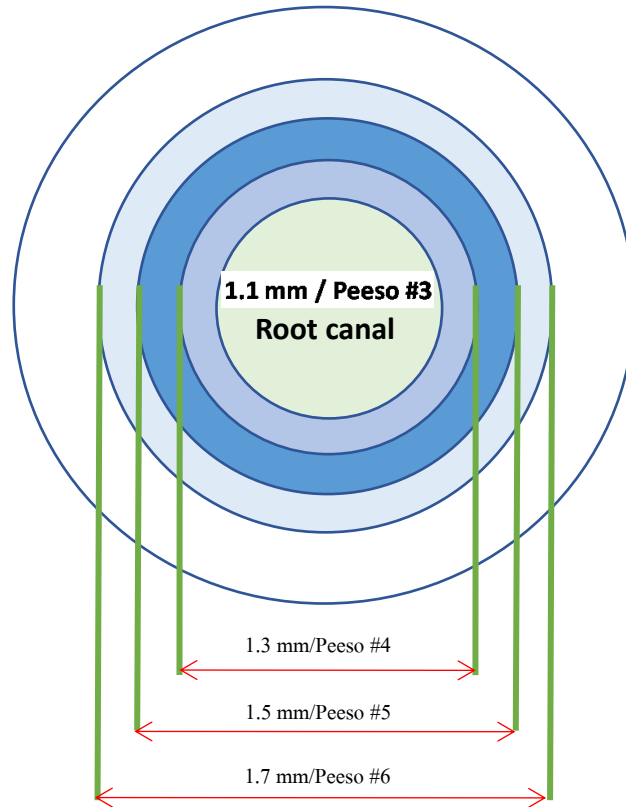
นำชิ้นฟันที่ผ่านการบ่มเพาะเชื้อดังกล่าวข้างต้น มาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1 จากนั้นวางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ 6 ชิ้นต่อจาน ยึดส่วนล่างกับจี้ฝังตามขอบที่ปราศจากเชื้อ ใส่สารทดสอบแต่ละกลุ่มในคลองรากฟันด้วยไมโครปิเปต ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ปิดส่วนบนด้วยจี้ฝังตามขอบที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นวางสำลิจับน้ำกลั่นพหุภาคที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อและปิดด้วยพาราฟิล์ม เพื่อให้ภายในมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน



รูปที่ 7 แสดงการวางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ

เมื่อครบกำหนดเวลา นำชิ้นฟันมาล้างสารทดสอบที่ใส่ในคลองรากฟันออก ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อปริมาณ 10 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยวางบนผ้าก๊อชที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้เครื่องมือพีโซคริต เบอร์ 4, 5 และ 6 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อเป็นการเก็บตัวอย่างเนื้อฟันที่มีความลึก 0.1, 0.2 และ 0.3 มิลลิเมตร จากผนังคลองรากฟันตามลำดับ นำส่วนผงเนื้อฟัน (dentin chips) แต่ละชั้นที่ได้มาชั่งน้ำหนัก และผสมกับน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ความเข้มข้น 0.85% ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นทำ 10-fold serial dilution 8 ครั้ง แล้วนำสารแขวนลอยของเนื้อฟันแต่ละความเข้มข้นที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dot plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยใช้ Blood agar สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *E. faecalis* และใช้ SDA สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *C. albicans*

จากนั้นบ่มเพาะเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปลผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อ น้ำหนักผงเนื้อฟัน (CFU/g)



รูปที่ 8 แสดงเส้นผ่านศูนย์กลางของคลองรากฟันในการกรอฟันแต่ละชั้น



รูปที่ 9 แสดงผงเนื้อฟันที่กรอออกมาในขวดแก้ว

3.3 การศึกษาการคงฤทธิ์ (Antimicrobial substantivity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลในเนื้อฟัน โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

(ดัดแปลงจากการศึกษาของ Basrani และคณะ¹⁰⁷, Baca และคณะ¹⁰⁸)

3.3.1 การใส่สารทดสอบในคลองรากฟัน

นำชิ้นฟันที่ผ่านการเตรียมดังกล่าวข้างต้นมาแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังแสดงในแผนภูมิที่ 1 จากนั้นวางชิ้นฟันลงในจานเพาะเชื้อ 6 ชั้นต่อจาน ยึดส่วนล่างกับจีฟิ่งตามขอบที่ปราศจากเชื้อ ใส่สารทดสอบแต่ละกลุ่มในคลองรากฟันด้วยไมโครปิเปต ปริมาตร 6 ไมโครลิตร ปิดส่วนบนด้วยจีฟิ่งตามขอบที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นวางสำลีชุบน้ำกลั่นพอหมาดที่ปราศจากเชื้อลงในจานเพาะเชื้อและปิดด้วยพาราฟิล์ม เพื่อให้ภายในมีความชื้นสัมพัทธ์ 100% ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

เมื่อครบกำหนดเวลา นำชิ้นฟันมาล้างสารทดสอบที่ใส่ในคลองรากฟันออก ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำให้แห้งโดยวางบนผ้าก๊อซที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นใช้เครื่องมือพีโซดริลเบอร์ 4, 5 และ 6 กรอภายในคลองรากฟัน เพื่อเป็นการเก็บตัวอย่างเนื้อฟัน จากนั้นนำมาชั่งให้ได้น้ำหนักเท่าๆกันในทุกกลุ่มทดสอบ โดยมีน้ำหนักเท่ากับ 0.01 กรัม

3.3.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อ *E. faecalis*

นำเชื้อทดสอบ *E. faecalis* (ATCC 19433) ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth มาทำการวัดค่าความขุ่นของสารแขวนลอยเชื้อ *E. faecalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ด้วยเครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความทึบแสงเท่ากับ 0.01 หลังจากนั้นนำไปเจือจางใน BHI broth ที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:500 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^4 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

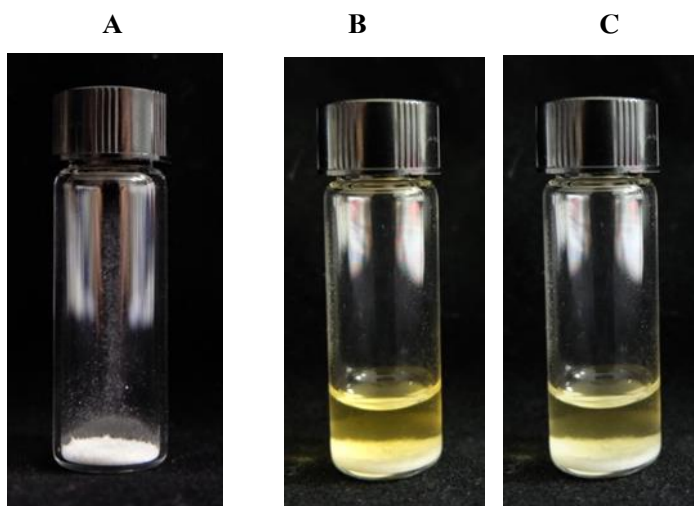
เชื้อ *C. albicans*

นำเชื้อทดสอบ *C. albicans* (ATCC 90028) ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB มาทำการวัดค่าความขุ่นของสารแขวนลอยเชื้อ *C. albicans* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB ด้วยเครื่องวัดดัชนีการหักเหแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าความทึบแสงเท่ากับ 0.1 หลังจากนั้นนำไปเจือจางใน SDB ที่ปราศจากเชื้อในอัตราส่วน 1:100 เพื่อให้มีปริมาณเชื้อ 1×10^3 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.3.3 การทดสอบการคงอยู่ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซามเมอร์ 407 และ สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลในเนื้อฟัน

นำส่วนผงเนื้อฟันที่กรอออกมาแล้วข้างต้นมาผสมกับเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ผ่านการปรับให้มีปริมาณเชื้อดังกล่าวแล้วข้างต้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในขวดแก้วใสที่มีฝาปิดที่ปราศจากเชื้อ นำขวดแก้วใสในบีกเกอร์ที่มีสาลิซุบน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นคลุมด้วยพลาสติกเพื่อให้ความชื้นสัมพัทธ์ 100% ทำการบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน โดยจะทำการเก็บตัวอย่างสารละลายปริมาตร 20 ไมโครลิตร/ขวด ทุก 48 ชั่วโมง (เก็บตัวอย่าง 7 ครั้ง ในแต่ละชั้นทดสอบ) และในทุกครั้งที่เก็บตัวอย่าง จะทำการเติมเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ *C. albicans* ที่ผ่านการปรับให้มีปริมาณเชื้อดังกล่าวแล้วข้างต้นกลับด้วยปริมาตร 20 ไมโครลิตร/ขวด เช่นกัน

จากนั้นนำตัวอย่างสารละลายที่เก็บมาทำ 10-fold serial dilution 8 ครั้ง แล้วนำแต่ละความเข้มข้นที่ได้จำนวน 10 ไมโครลิตร ไปบ่มเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี dot plate ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ โดยใช้ Blood agar สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *E. faecalis* และใช้ SDA สำหรับกลุ่มตัวอย่างที่ใส่เชื้อ *C. albicans* จากนั้นบ่มเพาะเชื้อตามสภาวะที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิด ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแปลผล โดยหากมีเชื้อขึ้นจะทำการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อน้ำหนักผงเนื้อฟัน (CFU/g) ส่วนในกรณีที่ตัวอย่างใดไม่มีเชื้อขึ้นจะถือว่าเป็นผลลบ



รูปที่ 10 (A) แสดงผงเนื้อฟันที่กรอออกมาในขวดแก้ว

(B) แสดงผงเนื้อฟันในขวดแก้วที่ผสมกับเชื้อ *E. faecalis* ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth

(C) แสดงผงเนื้อฟันในขวดแก้วที่ผสมกับเชื้อ *C. albicans* ที่ถูกเตรียมในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDB

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. การทดสอบความไวของเชื้อจุลชีพ (Antimicrobial susceptibility test) ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ด้วยวิธี Agar diffusion method, Broth microdilution method และ Agar dilution method

- ใช้สถิติเชิงพรรณนา โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และใช้การทดสอบ Kruskal-Wallis test นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และหากพบความแตกต่างทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

2. การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในคลองรากฟัน (Antimicrobial activity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอดผสมโพรพิลีนไกลคอล โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

2.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อระหว่างกลุ่ม

- ใช้การทดสอบ Kruskal-Wallis test นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และหากพบความแตกต่างทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

2.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน

- ใช้การทดสอบ Kruskal-Wallis test นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และหากพบความแตกต่างทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบระหว่างระดับชั้นเนื้อฟัน โดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

3. การศึกษาการคงฤทธิ์ (Antimicrobial substantivity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซามเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลในเนื้อฟัน โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

3.1 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อในช่วงระยะเวลาที่ศึกษาในแต่ละกลุ่ม

- ใช้การทดสอบ Wilcoxon Signed Ranks test นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.2 การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีของเชื้อระหว่างกลุ่ม

- ใช้การทดสอบ Kruskal-Wallis test นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และหากพบความแตกต่างทางสถิติจะทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการศึกษาโดยใช้สถิติ Mann-Whitney U test

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. การทดสอบความไวของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ (Antimicrobial susceptibility test)

1.1 Agar diffusion method

จากผลการศึกษาพบว่าสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนทุกชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดของโซนการยับยั้งอยู่ที่ 1.7-4.0 มิลลิเมตร และเมื่อทำการทดสอบด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารที่นำมาทดสอบ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ผลการทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* พบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และชนิดที่ละลายใน 95% ethanol ความเข้มข้น 2,000 PPM ซึ่งมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร ให้ค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งสูงสุด คือ 3.5 ± 0.25 และ 3.5 ± 0.67 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเนื่องจาก 95% ethanol มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปได้ จึงทำการทดสอบผลของ 95% ethanol ซึ่งเป็นตัวทำละลายของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายใน 95% ethanol ผลการทดสอบพบว่าค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งคือ 1.8 ± 0.23 มิลลิเมตร ดังนั้นฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายใน 95% ethanol ซึ่งเป็นผลมาจากสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนอย่างเดียว โดยไม่ขึ้นกับอิทธิพลของความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อของตัวทำละลาย 95% ethanol จึงมีค่าน้อยกว่าฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิก และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งระหว่างสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ พบว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง และมีขนาดเล็กของอนุภาคซิลเวอร์นาโน มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* ได้ดีกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำ และมีขนาดอนุภาคใหญ่ และในสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากัน และมีตัวทำละลายชนิดเดียวกัน สารละลายที่มีขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนเล็ก มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. faecalis* ได้ดีกว่าสารละลายที่มีขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนใหญ่ โดยเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งระหว่างสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และสถิติ Mann-Whitney test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารที่นำมาทดสอบ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 8

ผลการทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* พบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร ให้ค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งสูงสุด คือ 4.0 ± 0.31 มิลลิเมตร และเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งระหว่างสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ พบว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง และมีขนาดเล็กของอนุภาคซิลเวอร์นาโน มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ได้ดีกว่าสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำและมีขนาดอนุภาคใหญ่ และในสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากัน และมีตัวทำละลายชนิดเดียวกัน สารละลายที่มีขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนเล็ก มีแนวโน้มให้ฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *C. albicans* ได้ดีกว่าสารละลายที่มีขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโนใหญ่ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยขนาดของโซนยับยั้งระหว่างสารละลายของอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และสถิติ Mann-Whitney test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารที่นำมาทดสอบ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงขนาดโชนการยับยั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆต่อเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในหน่วยมิลลิเมตร (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ชนิดของสาร	ความเข้มข้น (PPM)	ขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน (nm)	ขนาดเฉลี่ยของโชนการยับยั้ง (mm)	
			<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
AgNPs in Tannic acid	200	5-10	3.5 ± 0.25 ^{a*}	4.0 ± 0.31 ^{c*}
	200	20-30	2.7 ± 0.63	3.3 ± 0.30
	200	60-70	2.3 ± 0.51	2.8 ± 0.44
	200	80-100	1.7 ± 0.29 ^b	2.6 ± 0.64 ^f
AgNPs in Starch	300	20-30	2.6 ± 0.23	3.1 ± 0.54
	300	60-70	2.1 ± 0.21 ^c	2.5 ± 0.47
	800	80-100	2.2 ± 0.38 ^d	2.7 ± 0.40
	1000	5-10	3.0 ± 0.50	3.7 ± 0.60
	1000	80-100	2.3 ± 0.38	2.9 ± 0.28
AgNPs	2000	5-10	3.5 ± 0.67 [*]	3.9 ± 0.44
in 95% ethanol	2000	80-100	2.4 ± 0.38	3.3 ± 0.68
95% ethanol			1.8 ± 0.23	2.6 ± 0.55

* มีขนาดเฉลี่ยของโชนการยับยั้งสูงที่สุดเมื่อเทียบในสดมภ์เดียวกัน

(a) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 4, 6, 7 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

(b) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 5, 8, 10 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่

($p < 0.05$)

(c) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 8, 10 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

(d) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 10 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

(e) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 4 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

(f) คือมีความแตกต่างกับสารชนิดที่ 10 ในสดมภ์เดียวกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

1.2 Broth microdilution method

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) ของสารทดสอบชนิดต่างๆ ต่อเชื้อทั้งสองชนิดพบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดดีที่สุด โดยให้ค่า MIC ต่ำที่สุดทั้งในเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* คือ 50.00 ± 0.00 PPM และ 25.00 ± 0.00 PPM ตามลำดับ

จากการศึกษาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ของสารทดสอบชนิดต่างๆ ต่อเชื้อทั้งสองชนิดพบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโน 5-10 นาโนเมตร ไม่มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *E. faecalis* แต่พบว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อ *C. albicans* ดีที่สุด โดยให้ค่า MBC ต่ำที่สุด คือ 100.00 ± 0.00 PPM

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า MIC และ MBC ระหว่างสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างสารที่นำมาทดสอบ ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9ฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ในหน่วย PPM (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ชนิดของสาร		ความเข้มข้นของสารต่อเชื้อชนิดต่าง ๆ (PPM)			
		<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
		MIC	MBC	MIC	MBC
1	AgNPs in Tannic acid	50.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^a	25.00 ± 0.00 ^a	100.00 ± 0.00 ^a
2		100.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	50.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
3		100.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	50.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
4		100.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^a	50.00 ± 0.00 ^b	0.00 ± 0.00 ^b
5	AgNPs in Starch	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
6		0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
7		0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^b
8		125.00 ± 0.00 ^d	0.00 ± 0.00 ^a	62.50 ± 0.00 ^d	250.00 ± 0.00 ^c
9		0.00 ± 0.00 ^c	0.00 ± 0.00 ^a	250.00 ± 0.00 ^e	500.00 ± 0.00 ^d
10	AgNPs	250.00 ± 0.00 ^e	500.00 ± 0.00 ^b	62.50 ± 0.00 ^d	125.00 ± 0.00 ^e
11	in 95% ethanol	250.00 ± 0.00 ^c	500.00 ± 0.00 ^b	62.50 ± 0.00 ^d	125.00 ± 0.00 ^c
12	95% ethanol	11.88 ± 0.00 ^f	47.5 ± 0.00 ^c	5.94 ± 0.00 ^f	11.88 ± 0.00 ^f

* ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกันที่มีตัวอักษรต่างกันคือมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

1.3 Agar dilution method

เนื่องจากวิธีการทดสอบความไวของเชื้อด้วยวิธี Agar diffusion method และ Broth microdilution method มีข้อจำกัดในเรื่องการแพร่ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมวุ้น จึงทำการศึกษาต่อด้วยวิธี Agar dilution method โดยผลจากการทดสอบความไวของ เชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ด้วยวิธี Agar diffusion method และ Broth microdilution method พบว่าสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีตัวทำละลายเป็นกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ให้ผลการทดสอบดีที่สุด จึงนำมาศึกษาต่อในการศึกษานี้ โดยสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนดังกล่าวนี้ ได้รับการสังเคราะห์ใหม่ให้มีปริมาณความเข้มข้นของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มากกว่าเดิมคือ 10,000 PPM

จากการทดสอบความไวของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีตัวทำละลายเป็นกรดแทนนิก ความเข้มข้น 10,000 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ด้วยวิธี Agar dilution method พบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) *E. faecalis* และ *C. albicans* คือ 156.25 ± 0.00 และ 19.53 ± 0.00 PPM ตามลำดับ ดังตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดที่ละลายในกรดแทนนิกและมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นตั้งต้น 10,000 PPM ในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อ (MBC) ในหน่วย PPM (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน)

ค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถฆ่าเชื้อชนิดต่าง ๆ (MBC)		
(PPM)		
ชนิดของสาร	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
AgNPs in Tannic acid 10,000 PPM	156.25 ± 0.00	19.53 ± 0.00

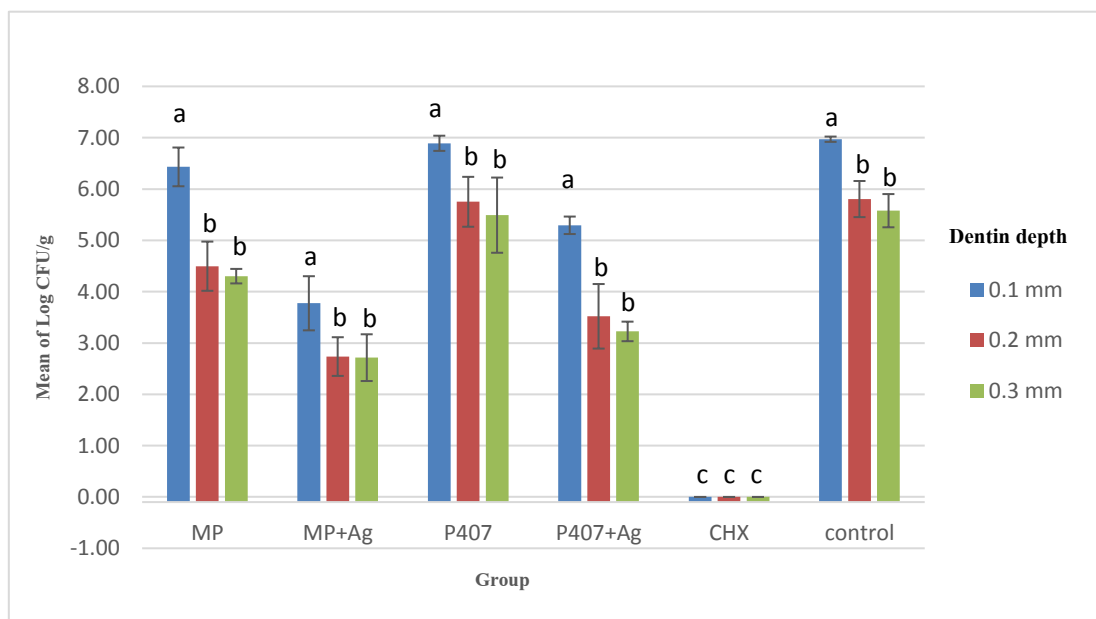
2. การศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* (Antimicrobial activity) ในคลองรากฟันของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอล โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในหน่วย log CFU/g ในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเมื่อใส่สารทดสอบชนิดต่าง ๆ ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน แสดงในตารางที่ 11 และ 12 ตามลำดับ โดยเมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* พบการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกระดับชั้นเนื้อฟันในกลุ่ม MP, MP+Ag, P407, P407+Ag และ control และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* พบการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกระดับชั้นเนื้อฟันในกลุ่ม MP, P407, P407+Ag และ control ซึ่งพบว่าปริมาณเชื้อแปรผกผันกับระดับความลึกของเนื้อฟัน โดยพบปริมาณเชื้อมากที่สุดที่ระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.1 มิลลิเมตร และน้อยที่สุดที่ระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.3 มิลลิเมตร เมื่อวิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณเชื้อในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบว่ามีความแตกต่างของปริมาณเชื้อระหว่างระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.1 กับ 0.2 มิลลิเมตร และ 0.1 กับ 0.3 มิลลิเมตร ส่วนระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.2 กับ 0.3 มิลลิเมตร มีปริมาณเชื้อไม่ต่างกัน ในขณะที่กลุ่ม MP+Ag ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกระดับความลึกของเนื้อฟัน เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* เช่นเดียวกับกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิด ในทุกระดับความลึกของเนื้อฟัน ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 13

เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ระหว่างกลุ่มทดสอบ โดยวิเคราะห์ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดระหว่างกลุ่ม โดยในเชื้อทั้งสองชนิดพบว่า กลุ่ม P407 และ control มีปริมาณเชื้อไม่ต่างกัน ในขณะที่กลุ่ม MP มีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่ากลุ่ม P407 และ control อย่างมีนัยสำคัญ และกลุ่ม P407+Ag มีปริมาณเชื่อน้อยกว่ากลุ่ม P407 ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* พบว่าในกลุ่ม MP+Ag มีปริมาณเชื่อน้อยกว่ากลุ่ม MP ในขณะที่เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม MP+Ag ในทุกระดับชั้นเนื้อฟัน เช่นเดียวกับในกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อเช่นกันในเชื้อทั้งสองชนิด และพบว่ากลุ่ม MP+Ag มีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่ากลุ่ม P407+Ag ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในรูปที่ 12 และ 14

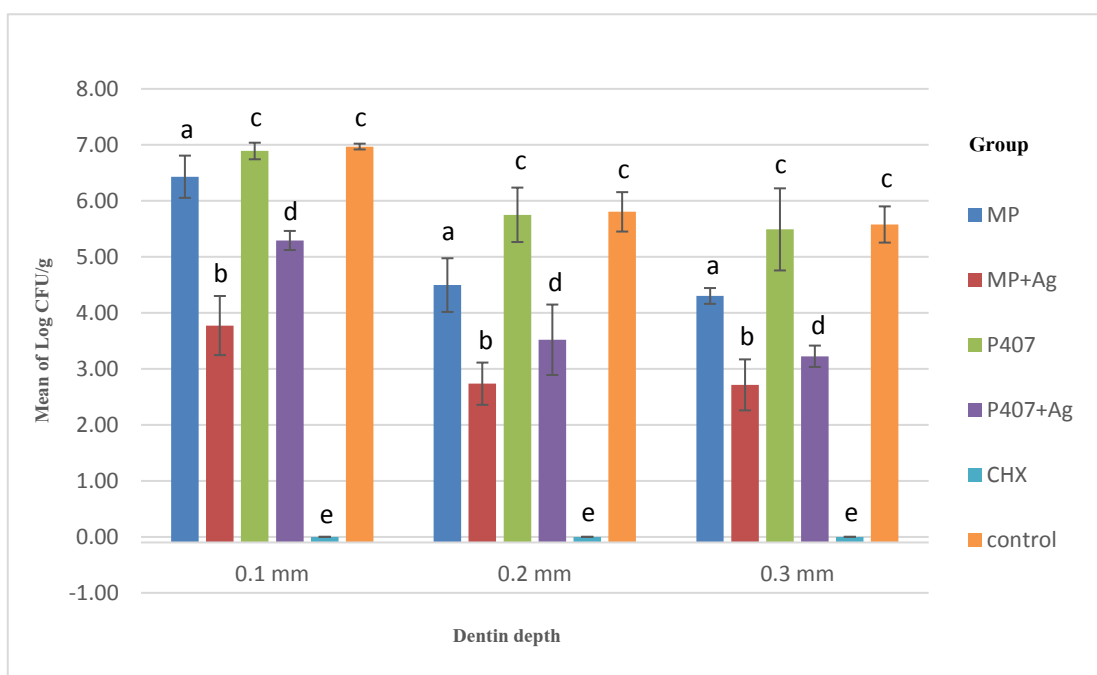
ตารางที่ 11 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยในหน่วย Log CFU/g		
	0.1 mm	0.2 mm	0.3 mm
MP	6.43 ± 0.38	4.50 ± 0.48	4.30 ± 0.14
MP+Ag	3.77 ± 0.53	2.74 ± 0.38	2.71 ± 0.46
P407	6.89 ± 0.15	5.75 ± 0.49	5.49 ± 0.73
P407+Ag	5.29 ± 0.17	3.52 ± 0.63	3.23 ± 0.19
CHX	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
Control	6.97 ± 0.05	5.80 ± 0.35	5.58 ± 0.32



รูปที่ 11 ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการศึกษา หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

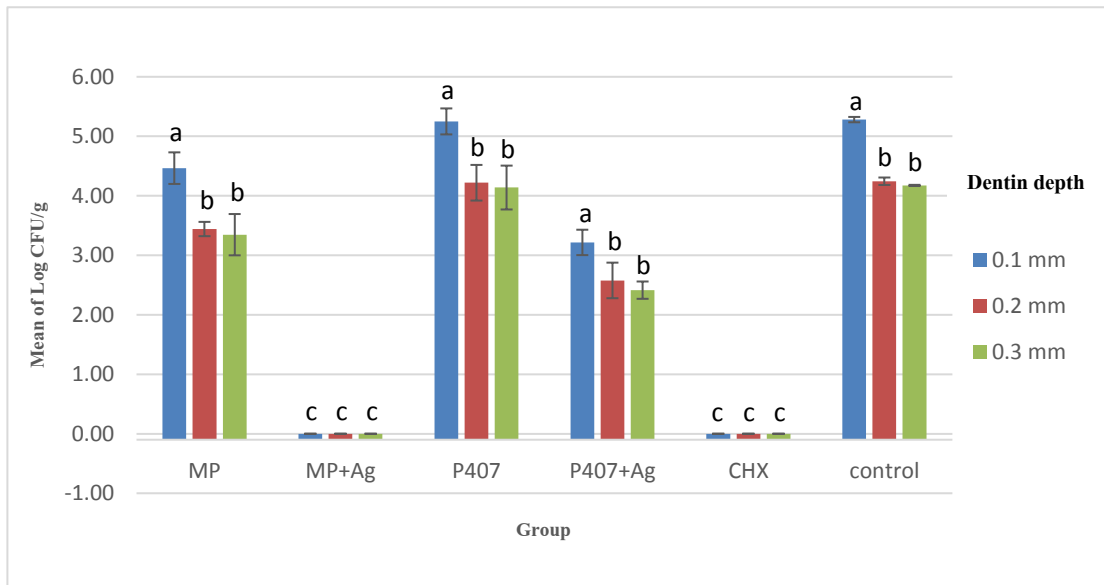


รูปที่ 12 ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

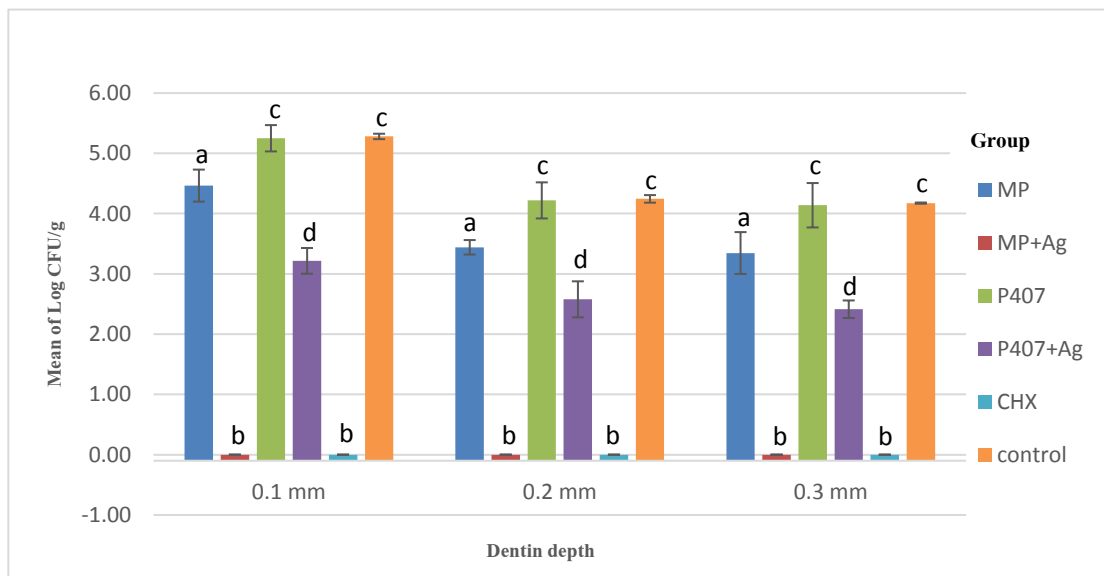
ตารางที่ 12 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *C. albicans* ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยในหน่วย Log CFU/g		
	0.1 mm	0.2 mm	0.3 mm
MP	4.46 ± 0.27	3.44 ± 0.12	3.35 ± 0.35
MP+Ag	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
P407	5.25 ± 0.22	4.22 ± 0.30	4.14 ± 0.37
P407+Ag	3.22 ± 0.21	2.58 ± 0.30	2.41 ± 0.15
CHX	0 ± 0.00	0 ± 0.00	0 ± 0.00
Control	5.28 ± 0.04	4.24 ± 0.06	4.17 ± 0.01



รูปที่ 13 ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการศึกษา หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 14 ค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

* ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

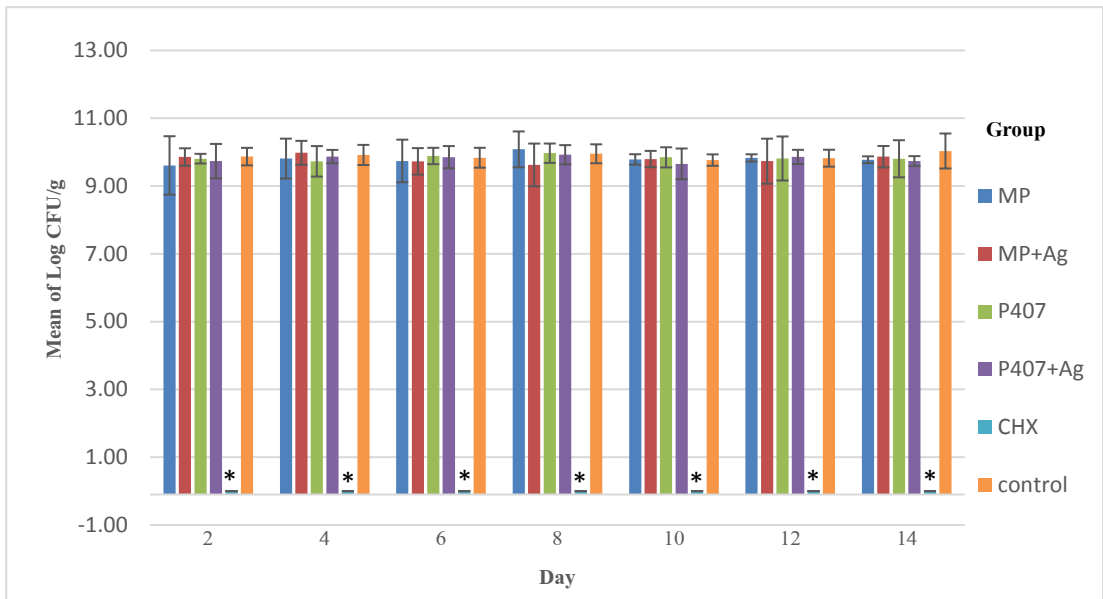
3. การศึกษาการคงฤทธิ์ (Antimicrobial substantivity) ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมโพรพิลีนไกลคอลในเนื้อฟัน โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์

ความสามารถในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ของสารทดสอบชนิดต่างๆ ที่หลงเหลืออยู่ในเนื้อฟัน ในช่วงระยะเวลา 14 วัน หลังจากใส่สารทดสอบไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน แสดงในตารางที่ 13 และ 14 ตามลำดับ โดยพบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกกลุ่มทดสอบ ตั้งแต่การเก็บตัวอย่างสารละลายครั้งแรกที่ 2 วัน ยกเว้นกลุ่มควบคุมบวก CHX ที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบในแต่ละครั้งที่เก็บตัวอย่างสารละลาย โดยวิเคราะห์ด้วยสถิติ Kruskal-Wallis test และ Mann-Whitney U test ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดระหว่างกลุ่มทดสอบทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งพบว่ามี ความแตกต่างกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของช่วงเวลา ที่เก็บตัวอย่างสารละลายในแต่ละกลุ่มทดสอบ โดยวิเคราะห์ด้วยสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test ที่ระดับนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกกลุ่มทดสอบ ดังแสดงในรูปที่ 15 และ 16

ตารางที่ 13 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยในหน่วย Log CFU/g						
	Day						
	2	4	6	8	10	12	14
MP	9.61 ± 0.86	9.81 ± 0.59	9.74 ± 0.63	10.08 ± 0.53	9.78 ± 0.15	9.83 ± 0.11	9.78 ± 0.10
MP+Ag	9.86 ± 0.26	9.98 ± 0.35	9.73 ± 0.39	9.62 ± 0.63	9.80 ± 0.24	9.73 ± 0.67	9.86 ± 0.32
P407	9.81 ± 0.14	9.73 ± 0.45	9.89 ± 0.24	9.97 ± 0.29	9.85 ± 0.30	9.81 ± 0.65	9.80 ± 0.55
P407+Ag	9.73 ± 0.51	9.87 ± 0.20	9.85 ± 0.33	9.92 ± 0.28	9.65 ± 0.45	9.86 ± 0.21	9.73 ± 0.15
CHX	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*
Control	9.87 ± 0.26	9.92 ± 0.30	9.83 ± 0.29	9.95 ± 0.28	9.76 ± 0.17	9.82 ± 0.25	10.03 ± 0.52

* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวัน

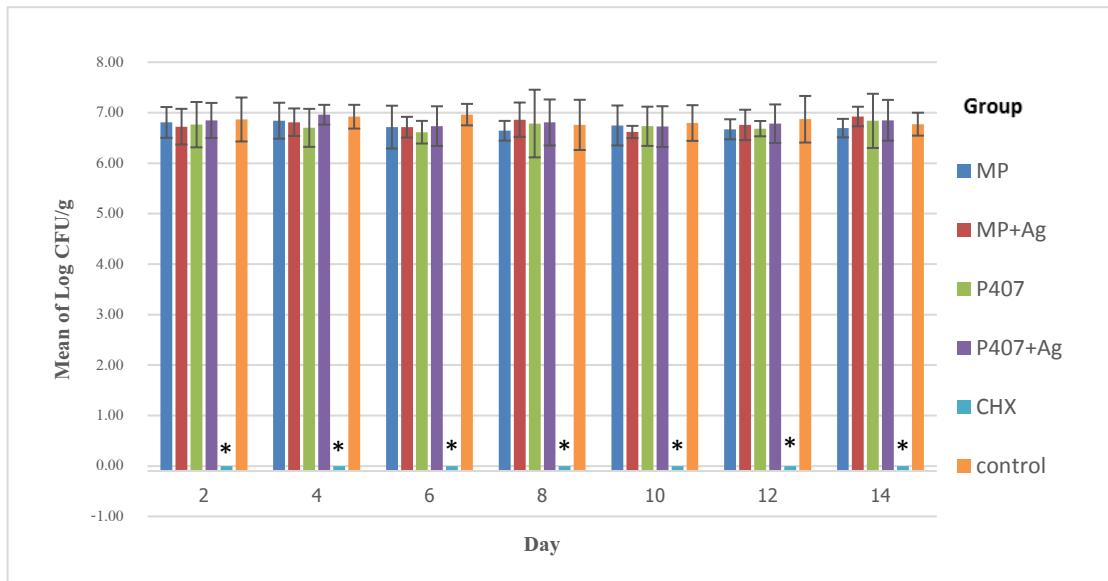


รูปที่ 15 ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *E. faecalis* ในหน่วย Log CFU/g ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน
* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวัน

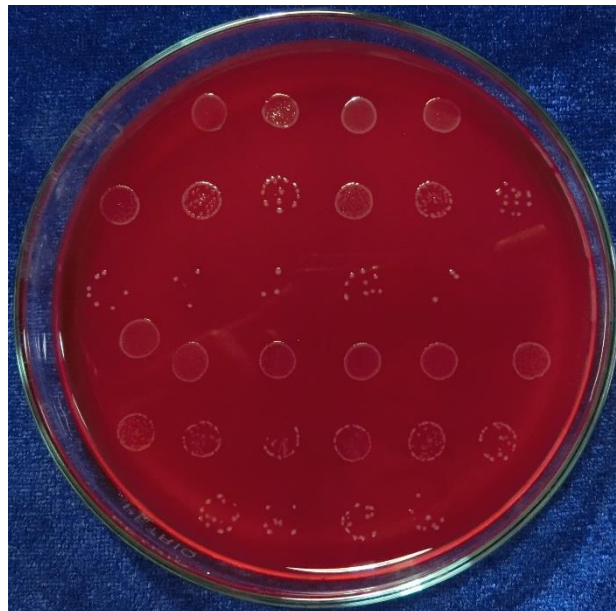
ตารางที่ 14 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *C. albicans* ในหน่วย Log CFU/g (ค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยในหน่วย Log CFU/g						
	Day						
	2	4	6	8	10	12	14
MP	6.81 ± 0.31	6.84 ± 0.36	6.71 ± 0.42	6.64 ± 0.20	6.75 ± 0.40	6.67 ± 0.20	6.69 ± 0.18
MP+Ag	6.72 ± 0.35	6.81 ± 0.27	6.71 ± 0.21	6.86 ± 0.34	6.62 ± 0.12	6.76 ± 0.30	6.92 ± 0.19
P407	6.76 ± 0.45	6.70 ± 0.38	6.61 ± 0.22	6.78 ± 0.67	6.73 ± 0.39	6.68 ± 0.15	6.84 ± 0.54
P407+Ag	6.84 ± 0.35	6.96 ± 0.20	6.73 ± 0.39	6.81 ± 0.46	6.72 ± 0.40	6.78 ± 0.38	6.85 ± 0.40
CHX	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*	0 ± 0.00*
Control	6.86 ± 0.44	6.92 ± 0.24	6.96 ± 0.21	6.76 ± 0.50	6.79 ± 0.35	6.87 ± 0.46	6.77 ± 0.23

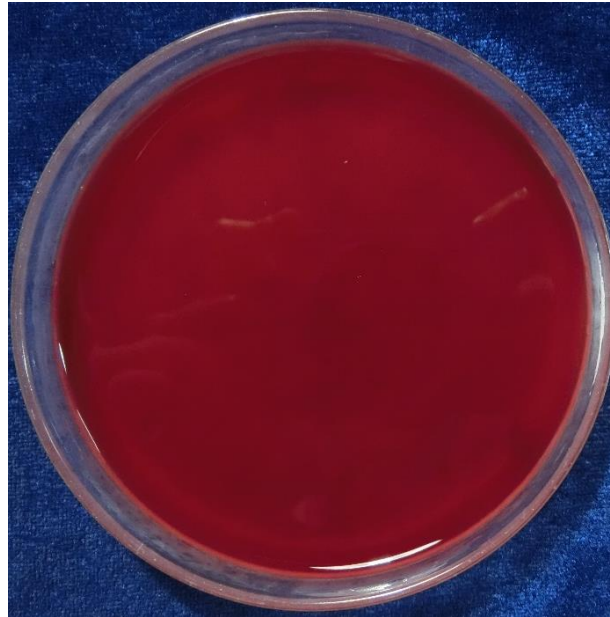
* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวัน



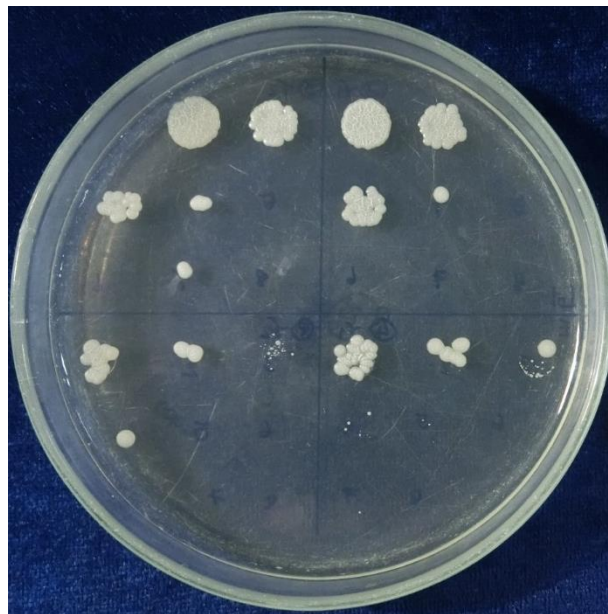
รูปที่ 16 ค่าเฉลี่ยจำนวนเชื้อ *C. albicans* ในหน่วย Log CFU/g ในช่วงระยะเวลา 14 วัน ของแต่ละกลุ่มการศึกษา หลังจากใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน
* หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวัน



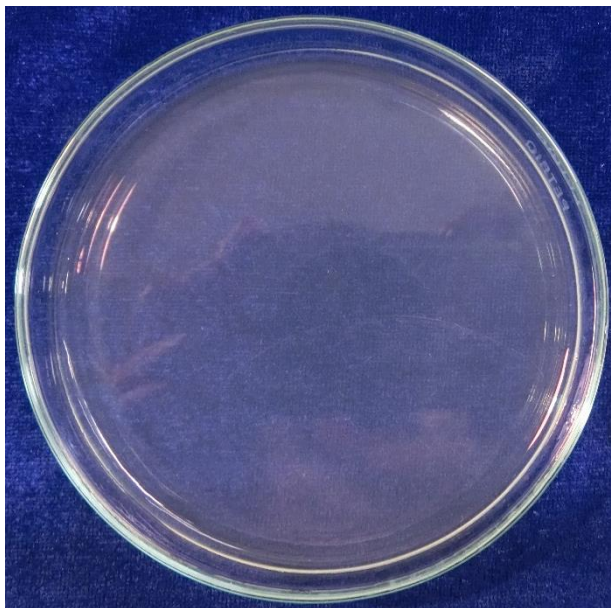
รูปที่ 17 แสดงกลุ่มที่มีเชื้อ *E. faecalis* ขึ้นและลักษณะโคโลนีของเชื้อ *E. faecalis* เมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar



รูปที่ 18 แสดงกลุ่มที่ไม่มีเชื้อ *E. faecalis* ขึ้นเมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ blood agar



รูปที่ 19 แสดงกลุ่มที่มีเชื้อ *C. albicans* ขึ้นและลักษณะ โคลินิของเชื้อ *C. albicans* เมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA



รูปที่ 20 แสดงกลุ่มที่ไม่มีเชื้อ *C. albicans* ขึ้นเมื่อนำตัวอย่างสารละลายมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA

บทที่ 4

บทวิจารณ์

ปัจจุบันมีการใช้สารหลายชนิดเพื่อฆ่าเชื้อในคลองรากฟัน โดยสารที่นิยมใช้ใส่ในคลองรากฟันคือ แคลเซียมไฮดรอกไซด์^{5,6} ซึ่งแม้จะมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ แต่จากการศึกษาพบว่าไม่สามารถทำลายเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans*¹¹⁻¹³ ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในการรักษาคลองรากฟันที่ล้มเหลว^{3,14,15} จากคุณสมบัติของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สามารถฆ่าเชื้อได้หลายชนิด จึงได้มีการนำมาใช้ในงานรักษาคลองรากฟัน ในรูปแบบต่างๆ เช่น เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน³⁰ อย่างไรก็ตามอนุภาคซิลเวอร์นาโนอยู่ในรูปแบบของสารละลายซึ่งเป็นของเหลวและไม่สามารถแข็งตัว ทำให้มีข้อจำกัดในการนำไปใช้งาน โดยไม่สามารถคงสภาพอยู่ในคลองรากฟัน จึงไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกันเชิงกายภาพ หรือ รักษาระดับความเข้มข้นของสารให้อยู่ในคลองรากฟันตลอดช่วงเวลารักษา จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้ เพื่อที่จะพัฒนาอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ เพื่อให้อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมในการใช้ใส่ในคลองรากฟันตลอดจนเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* และความสามารถในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน โดยจะทำการคัดเลือกจากสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีชนิดตัวทำละลาย ความเข้มข้น และ ขนาดอนุภาคที่แตกต่างกัน ที่ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด มาใช้ในการผสมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ

จากผลการศึกษาความไวของเชื้อต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ที่มีตัวทำละลายชนิดต่างๆ คือกรดแทนนิก แปะง และ 95% ethanol ความเข้มข้น 200-2,000 PPM และมีขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนอยู่ในช่วง 5-100 PPM พบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ให้ผลการทดสอบที่ดีที่สุด โดยจากผลการทดสอบ agar diffusion method พบว่าให้ขนาดเฉลี่ยของโซนยับยั้งมากที่สุด ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด และจากผลการทดสอบ broth microdilution method ซึ่งแม้จะไม่สามารถฆ่าเชื้อ *E. faecalis* ได้ แต่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อได้โดยให้ค่า MIC ต่ำที่สุด และในเชื้อทดสอบ *C. albicans* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและฆ่าเชื้อได้โดยให้ค่า MIC และ MBC ต่ำที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Morones และคณะ (2005)²⁸ ซึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการต้านเชื้อของอนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้นขึ้นกับ ขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นสำคัญ โดยพบว่าขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่สามารถฆ่าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพอยู่ในช่วง 1-10 นาโนเมตร เนื่องจากขนาดอนุภาคที่เล็ก ทำให้มีสัดส่วนของพื้นผิวของอนุภาคในการสัมผัสกับเชื้อได้

มากกว่าขนาดอนุภาคที่ใหญ่ ทำให้ความแข็งแรงในการจับของอนุภาคซิลเวอร์นาโนกับเชื้อ ซึ่งขึ้นกับพื้นที่ผิวสัมผัสเพิ่มขึ้นเมื่ออนุภาคมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า อนุภาคขนาดเล็กจะแสดงอิทธิพลของอิเล็กโทรนิคส์ เอฟเฟกต์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างพื้นผิวของอนุภาค ส่งผลให้เกิดความว่องไวของพื้นผิวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในการเกิดปฏิกิริยาสูงขึ้น จึงทำให้ประสิทธิภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีขนาดอนุภาคเล็กเพิ่มขึ้น¹⁰⁹ นอกจากนี้ขนาดอนุภาคที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อเป็นสิ่งสำคัญแล้ว ประสิทธิภาพในการต้านเชื้อยังขึ้นกับความเข้มข้นของสารด้วย โดยพบว่าในตัวทำละลายชนิดเดียวกัน และขนาดอนุภาคเท่ากัน เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีขึ้น โดยจากผลการทดสอบ agar dilution method พบว่าเมื่อใช้สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในกรดแทนนิก และมีขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้นคือ 10,000 PPM สามารถฆ่าเชื้อได้ทั้งสองชนิด ในขณะที่ผลจากการทดสอบ broth microdilution method ซึ่งใช้ที่ความเข้มข้น 200 PPM ทำได้เพียงการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bo และ Kayombo (2014)¹¹⁰ ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ในสภาวะที่เป็นไบโอฟิล์ม ของ 0.05% AgNPs gel, 0.1% AgNPs gel, 0.2% AgNPs gel, 2% CHX และ camphorated phenol ด้วยวิธี methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay และ confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis พบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมากที่สุดคือ 0.2% AgNPs gel, 0.1% AgNPs gel, 0.05% AgNPs gel, 2% CHX และ camphorated phenol ตามลำดับ และการศึกษาของ Wu และคณะ (2014)³⁰ ที่ทำการศึกษาดูด้วยวิธี scanning electron microscopy (SEM) และ confocal laser scanning microscopy analysis โดยนำ 0.01% AgNPs gel, 0.02 % AgNPs gel และ Ca(OH)₂ มาใส่ในคลองรากฟันที่ทำให้ติดเชื้อ *E. faecalis* เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าสารที่มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อมากที่สุดคือ 0.02 % AgNPs gel, 0.01% AgNPs gel และ Ca(OH)₂ ตามลำดับ สำหรับผลของชนิดตัวทำละลายของอนุภาคซิลเวอร์นาโนต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื่อนั้น เนื่องจากตัวทำละลายแต่ละชนิดมีความเข้มข้น และขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนที่ไม่เท่ากัน จึงทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลของตัวทำละลายต่อประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ จากผลการศึกษาคความไวของเชื้อต่อสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ซึ่งให้ผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้น ดังนั้นในการศึกษานี้จึงเลือกใช้ สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในกรดแทนนิก ขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร ความเข้มข้น 10,000 PPM ซึ่งให้ผลดีที่สุด มาพัฒนาโดยผสมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ สำหรับการศึกษานี้ต่อไป

การศึกษาความสามารถในการต้านเชื้อของสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสาร P407 และ MP ในแบบจำลองฟันมนุษย์พบว่า ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด กลุ่ม P407 มีปริมาณเชื้อไม่ต่างจากกลุ่ม control ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร Poloxamer 407 ไม่มี

ฤทธิ์ในการต้านเชื้อที่อยู่ในคลองรากฟัน ในขณะที่กลุ่ม MP มีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่ม P407 และกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร MP มีคุณสมบัติในการต้านเชื้อในคลองรากฟันได้ ซึ่งสอดคล้องกับหลายการศึกษาที่พบว่า Propylene glycol ซึ่งเป็นส่วนผสมของสาร MP มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้^{85,111} และพบว่ากลุ่ม P407+Ag มีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่ม P407 ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด และ เมื่อทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* พบว่ากลุ่ม MP+Ag มีปริมาณเชื้อน้อยกว่ากลุ่ม MP ในขณะที่เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในกลุ่ม MP+Ag ในทุกระดับชั้นเนื้อฟัน เช่นเดียวกับในกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อเช่นกันในเชื้อทั้งสองชนิด ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับตัวนำส่งสารอย่างเดียว นอกจากนี้ผลจากการศึกษาพบว่ากลุ่ม MP+Ag มีปริมาณเชื้อที่น้อยกว่ากลุ่ม P407+Ag ในเชื้อทดสอบทั้งสองชนิดอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนใน MP มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่า สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนใน P407

เมื่อพิจารณาถึงความสามารถในการต้านเชื้อของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสาร P407 และ MP ที่แต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน พบปริมาณเชื้อมากที่สุด และน้อยที่สุด ที่ระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.1 มิลลิเมตร และ 0.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างปริมาณเชื้อที่ระดับความลึกของเนื้อฟัน 0.2 มิลลิเมตรกับ 0.3 มิลลิเมตร ในทุกกลุ่มทดสอบในเชื้อทั้งสองชนิด ยกเว้นในกลุ่ม MP+Ag ที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อในทุกระดับความลึกของเนื้อฟัน เมื่อทดสอบกับเชื้อ *C. albicans* และกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิด ในทุกระดับความลึกของเนื้อฟัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เชื้อทดสอบทั้งสองชนิด มีปริมาณเชื้อแปรผกผันกับระดับความลึกของเนื้อฟัน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความสามารถในการแทรกซึมของเชื้อในท่อเนื้อฟัน โดยที่ระดับความลึกของท่อเนื้อฟันมากขึ้น เชื้อจะสามารถแทรกซึมได้น้อยลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nair และคณะ (2017)¹¹² ที่ทำการศึกษการแทรกซึมและการยึดเกาะของเชื้อ *E. faecalis* ในท่อเนื้อฟันที่ทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 21 วันเช่นเดียวกับการศึกษานี้ ด้วยวิธี confocal laser scanning microscopy analysis พบว่า *E. faecalis* สามารถแทรกซึมเข้าไปในท่อเนื้อฟันได้ที่ความลึก 1-400 ไมโครเมตร และสามารถยึดเกาะที่ผิวของท่อเนื้อฟันได้ที่ความลึก 1-200 ไมโครเมตร โดยพบว่าปริมาณเชื้อส่วนใหญ่จะยึดเกาะอยู่ที่ระดับความลึกของท่อเนื้อฟัน 1-100 ไมโครเมตร ถึง 90% และที่ระดับความลึก 100-200 ไมโครเมตร พบการยึดเกาะของเชื้อเพียง 10% ส่วนที่ระดับความลึก 200-300 ไมโครเมตรไม่พบการยึดเกาะของเชื้อเลย และจากการศึกษาของ Al-Nazhan และคณะ (2014)¹¹³ ที่ทำการศึกษการแทรกซึมของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในท่อเนื้อฟันที่ทำให้ติดเชื้อเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ด้วย

วิธี scanning electron microscopy analysis พบว่า เชื้อ *E. faecalis* สามารถแทรกซึมเข้าสู่ท่อเนื้อฟัน ได้ลึก 244 ไมโครเมตร ซึ่งลึกกว่าเชื้อ *C. albicans* ที่มักยึดเกาะตามพื้นผิวของผนังคลองรากฟัน และมีการแทรกซึมเข้าสู่ท่อเนื้อฟันเฉพาะส่วนของสาหร่าย (hyphae) เท่านั้น ซึ่งสามารถแทรกซึมเข้าไปได้ลึก 183 ไมโครเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *E. faecalis* สามารถแทรกซึมในท่อเนื้อฟันได้ลึกมากกว่าเชื้อ *C. albicans* เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ที่พบปริมาณเชื้อ *E. faecalis* มากกว่า *C. albicans* ในทุกระดับชั้นเนื้อฟัน

ในการศึกษานี้ ใช้ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่นำมาผสมกับตัวนำส่งสาร เพื่อใช้ในแบบจำลองฟันมนุษย์เป็น 2 เท่าของความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ซึ่งอ้างอิงจากการศึกษาอื่น โดยพบว่าค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถต้านเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ในเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* เป็น 4 และ 16 เท่า ของค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการต้านเชื้อในสภาวะแพลงโตนิค ตามลำดับ เนื่องจากผลการศึกษาของ Shrestha และคณะ (2010)¹⁴ พบว่ากลไกในการต้านเชื้อในสภาวะแพลงโตนิคของ อนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้น ขึ้นกับการสัมผัสโดยตรง (direct contact) ของเชื้อกับอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งเมื่อเชื้ออยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ประจุลบของ extracellular polymeric matrix จะต้านการซึมผ่านของอนุภาคซิลเวอร์นาโน จึงจำเป็นต้องใช้ความเข้มข้นที่สูงกว่าในการต้านเชื้อที่อยู่ในสภาวะไบโอฟิล์ม ซึ่งในการศึกษานี้ใช้ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่นำมาผสมกับตัวนำส่งสาร ในเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ *C. albicans* เป็น 1,250 และ 625 PPM หรือ (0.125 และ 0.0625 %) ตามลำดับ ซึ่งในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่นำมาใช้มีความแตกต่างกันไป ขึ้นกับรูปแบบในการนำไปใช้งาน และวิธีในการศึกษา โดยการศึกษาของ Wu และคณะ (2014)³⁰ มีการนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน โดยใช้ความเข้มข้น 0.1% และใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน โดยใช้ความเข้มข้น 0.02% และ 0.01% ทำการศึกษาโดยใช้แผ่นเนื้อฟัน พบว่าการใช้สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน ไม่สามารถกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ แต่เมื่อนำมาใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟันพบว่าสามารถกำจัดเชื้อ *E. faecalis* ได้ และมีการนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาผสมกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ โดยในการศึกษาของ Afkhami และคณะ (2015)³² ได้ทำการศึกษาโดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์โดยนำ Ca(OH)_2 , $\text{Ca(OH)}_2 + 2\% \text{ CHX gel}$, $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNPs}$ โดยความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้คือ 100 PPM และมีขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนโดยเฉลี่ย 20 นาโนเมตร มาใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อ *E. faecalis* เป็นเวลา 1 สัปดาห์ และ 1 เดือนพบว่า ที่ 1 สัปดาห์ $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNPs}$ มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีที่สุด แต่ไม่พบความแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่เวลา 1 เดือน และการศึกษาของ Javidi และคณะ (2014)³¹ ได้ทำการศึกษาโดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์ โดยเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัด

เชื้อ *E.faecalis* ของ Ca(OH)_2 กับ $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNPs}$ ซึ่งนำมาใส่ในคลองรากฟันเป็นเวลา 1 และ 7 วัน พบว่า $\text{Ca(OH)}_2 + \text{AgNPs}$ มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่า Ca(OH)_2 อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ 1 และ 7 วัน โดยความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้คือ 200 PPM นอกจากนี้มีการนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาผสมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ เช่นเดียวกับในการศึกษานี้ โดยในการศึกษาของ Mozayeni และคณะ (2014)¹¹⁵ ได้ทำการศึกษาในแบบจำลองฟันมนุษย์ โดยนำสาร Ca(OH)_2 , 2%CHX, TAP, AgNPs โดยความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้คือ 50 PPM หรือ (0.005%) และมีขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโน 20 นาโนเมตร มาผสมกับตัวนำส่งสาร methyl cellulose เพื่อให้มีลักษณะเป็นเจล และนำมาใส่ในคลองรากฟันที่ติดเชื้อ *E.faecalis* เป็นเวลา 7 วัน พบว่า AgNPs gel ไม่มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E.faecalis* และ 2%CHX, TAP มีประสิทธิภาพดีกว่า Ca(OH)_2 ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Bo และ Kayombo (2014)¹¹⁰ ที่ทำการศึกษาโดยใช้วิธี methyl thiazolyl tetrazolium assay และ confocal laser scanning microscopy analysis เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อ *E.faecalis* ที่อยู่ในสถานะไบโอฟิล์มของสาร AgNPs gel (ความเข้มข้น 0.05%, 0.1%, 0.2%), 2% CHX, camphorated phenol พบว่า 0.1% และ 0.2% AgNPs gel มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่า 2% CHX และ camphorated phenol ซึ่งความแตกต่างของผลการศึกษามาจากรูปแบบการศึกษา วิธีการทดสอบ ตลอดจนความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ซึ่งมีความแตกต่างกัน นอกจากนี้มีการศึกษาที่นำสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ มาทำการเปรียบเทียบ โดยในการศึกษาของ Bruniera และคณะ (2014)¹¹⁶ ได้ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติทางกายภาพของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสาร 3 ชนิดคือ hydroxyethylcellulose, carbomer, polyethylene glycol พบว่า hydroxyethylcellulose ให้ผลดีที่สุด และเมื่อนำไปทดสอบกับเชื้อชนิดต่างๆ ที่อยู่ในสถานะแพลงทอนิก พบว่าสามารถกำจัดเชื้อได้โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่แตกต่างกัน โดยในเชื้อ *E.faecalis* พบว่าใช้ความเข้มข้น 7,100 ng/ml หรือ (7.1 PPM) ซึ่งจะเห็นได้ว่าในแต่ละการศึกษาให้ผลการทดลองที่แตกต่างกันไป ซึ่งอาจเป็นผลมาจากรูปแบบในการนำมาใช้งาน วิธีการศึกษา ตลอดจนความเข้มข้นของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่แตกต่างกัน แต่พบว่า สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมีแนวโน้มช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดียิ่งขึ้น และการนำมาใช้ในรูปแบบเป็นสารใส่ในคลองรากฟัน มีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่าการใช้ในรูปแบบเป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน เนื่องจากกลไกในการต้านเชื้อของอนุภาคซิลเวอร์นาโนนั้น ขึ้นกับการสัมผัสโดยตรงของเชื้อกับอนุภาคซิลเวอร์นาโน ดังนั้นการใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟันซึ่งมีระยะเวลาของการสัมผัสของเชื้อกับสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมากกว่าการใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟัน จึงมีมีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อได้ดีกว่า ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการพัฒนาประสิทธิภาพของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน

เพื่อใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน โดยการผสมกับตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ เพื่อให้มีความเหมาะสมในการใช้งาน ตลอดจนสามารถคงสภาพในคลองรากฟันได้ เพื่อทำหน้าที่เป็นตัวกั้นเชิงกายภาพ หรือ รักษาระดับความเข้มข้นของสารให้อยู่ในคลองรากฟันตลอดช่วงเวลาการรักษา

จากผลการศึกษาการคงฤทธิ์ของสารทดสอบในเนื้อฟัน ในช่วงระยะเวลา 14 วัน หลังจากใส่สารทดสอบไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน พบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกกลุ่มทดสอบ ตั้งแต่การเก็บตัวอย่างสารละลายครั้งแรกที่ 2 วัน ยกเว้นกลุ่มควบคุมบวก CHX ที่ไม่พบการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกครั้งที่เก็บตัวอย่างสารละลาย โดยไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่มควบคุมบวก CHX ซึ่งพบว่ามีแตกต่างกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของช่วงเวลาที่เก็บตัวอย่างสารละลายในแต่ละกลุ่มทดสอบ ไม่พบความแตกต่างของการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิดในทุกกลุ่มทดสอบ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด ไม่สามารถคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Fan และคณะ (2016)⁸³ ซึ่งทำการศึกษาคงฤทธิ์ในเนื้อฟันของสาร Ag-Ca-Si mesoporous nanoparticle (Ag-MCSNs) ในการต้านเชื้อ *E.faecalis* โดยทำการศึกษาโดยนำสารมาวางบนแผ่นเนื้อฟันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า สาร Ag-MCSNs มีความสามารถในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟันได้เป็นอย่างดี โดยจากภาพที่ได้จากการศึกษาโดยวิธี scanning electron microscopy analysis พบว่า Ag-MCSNs ที่มีการสัมผัสโดยตรงกับผิวเนื้อฟันสามารถจับกับเนื้อฟันได้ แม้จะยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจน แต่เป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่สารสามารถจับกับไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxy apatite) บนผิวเนื้อฟันทำให้เกิดเป็นพันธะทางเคมีขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถปลดปล่อยซิลเวอร์ไอออนออกมาอย่างช้าๆ ทำให้มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E.faecalis* ได้ดี ซึ่งผลการศึกษาที่แตกต่างกันนี้ อาจเนื่องมาจากรูปแบบการศึกษา วิธีการทดสอบ โดยในการศึกษานี้ใช้วิธีทดสอบโดยการเก็บตัวอย่างเนื้อฟัน ซึ่งแตกต่างจากการใช้ scanning electron microscopy analysis และกระบวนการสังเคราะห์สารที่แตกต่างกัน ทำให้ลักษณะโครงสร้างและคุณสมบัติทางกายภาพของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ได้มีความแตกต่างกัน เช่น ขนาดอนุภาค ความเข้มข้น อัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรของอนุภาค เป็นต้น

ในการศึกษานี้ใช้ตัวนำส่งสารสองชนิด คือ สารละลาย poloxamer 407 (P 407) และ macrogol + propylene glycol (MP) มาผสมกับสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน เพื่อให้ที่อยู่ในรูปแบบที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน ซึ่งสารละลาย P407 เป็นสารที่ไวต่ออุณหภูมิ โดยที่อุณหภูมิต่ำจะมีลักษณะเป็นของเหลว ทำให้สามารถฉีดเข้าคลองรากฟันได้ง่าย และทั่วถึง โดยในการศึกษานี้ใช้อุณหภูมิของสารขณะฉีดเข้าสู่คลองรากฟันที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้เก็บสารในตู้แช่เย็น และเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นจะแข็งตัวเป็นเจลกึ่งแข็ง สามารถทำหน้าที่เป็นตัวกั้นเชิงกายภาพได้ โดยในการศึกษานี้จะนำสารที่ใส่ในคลองรากฟันแล้ว ไปบ่มเพาะที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิในร่างกายของมนุษย์ สำหรับความเข้มข้นของ P407 ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้เลือกความเข้มข้นที่ 17% w/w เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวมีค่า Gelation temperature เหมาะสมที่จะนำมาใช้งาน สำหรับสารละลาย MP พบว่าที่อุณหภูมิสูงจะมีลักษณะเป็นของเหลว ทำให้สามารถฉีดเข้าคลองรากฟันได้ง่าย และเมื่อตั้งทิ้งไว้ให้เย็นลงจะมีลักษณะเป็นขี้ผึ้ง ดังนั้นเมื่ออยู่ในคลองรากฟันจึงสามารถทำหน้าที่เป็นตัวกั้นเชิงกายภาพได้เช่นเดียวกับ P 407 ซึ่งผลจากการศึกษานี้พบว่า สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนใน MP มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่า สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนใน P407 ดังนั้นเมื่อพิจารณาจากคุณสมบัติทางกายภาพที่ใกล้เคียงกัน และคุณสมบัติทางชีวภาพที่พบว่าสาร MP มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีกว่านั้น ทำให้สาร MP มีแนวโน้มที่ดีกว่า P407 ในการนำมาใช้พัฒนาสารใส่ในคลองรากฟัน

สำหรับการเปลี่ยนแปลงสีของฟัน ภายหลังจากใส่สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า เนื้อฟันในกลุ่มที่ใส่สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด ไม่พบการเปลี่ยนสีของเนื้อฟัน โดยไม่พบความแตกต่างของสีฟันเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ใส่เพียงตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด หรือกลุ่มควบคุม เมื่อสังเกตด้วยตา โดยจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ากลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของเนื้อฟัน มาจากการที่ซิลเวอร์มีความสามารถจับกับโปรตีนได้ดี เช่น คอลลาเจนในเนื้อฟัน โดยคุณสมบัติดังกล่าวเป็นผลมาจาก ซิลเวอร์ไอออนซึ่งมีค่าสัมพรรคภาพอิเล็กตรอนที่สูง (high affinity)¹¹⁷ จึงสามารถเกิดพันธะทางเคมีกับหมู่ไนโตรเจนหรือซัลเฟอร์ (nitrogen or sulfur group) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนในเนื้อฟัน²⁶ ทำให้เกิดปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของซิลเวอร์ไอออน ไปเป็นเมทัลลิกซิลเวอร์ (metallic silver) ทำให้เนื้อฟันมีสีเข้มขึ้น โดยพบว่าซิลเวอร์ฟอสเฟตคริสตัล (silver phosphate crystal) ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากปฏิกิริยาดังกล่าวจะมีสีเหลืองในช่วงแรก และเมื่อสัมผัสกับแสงจะเกิดปฏิกิริยารีดักชัน ทำให้มีสีเข้มขึ้น¹¹⁸ นอกจากนี้จากการศึกษาของ Hou และคณะ (2013)¹¹⁹ พบว่าเมื่อซิลเวอร์ไอออนสัมผัสกับแสงสามารถเกิดปฏิกิริยารีดักชันกลายเป็นอนุภาคซิลเวอร์นาโน ซึ่งการเปลี่ยนสีของอนุภาคซิลเวอร์นาโน สามารถเกิดขึ้นได้จากการรวมตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีขนาดเล็กกว่า 20 นาโนเมตร ดังนั้นการเพิ่มขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใหญ่ขึ้น จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีได้มากขึ้น ดังนั้นผลที่ได้จากการศึกษานี้ ซึ่งไม่พบความเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อฟัน อาจมาจากการที่สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ใช้ในการศึกษานี้อาจมีสมการทางเคมีที่แตกต่างออกไป โดยอาจไม่เกิดซิลเวอร์ฟอสเฟต คริสตัล ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อฟัน หรืออาจเกิดจากการรวมตัวของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่ไม่ใหญ่พอที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเนื้อฟัน

แม้ว่าการศึกษานี้จะทำการศึกษาโดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์ ซึ่งใช้ฟันมนุษย์ที่ถูกถอนและทำบ่มเพาะที่อุณหภูมิร่างกาย เพื่อจำลองสภาวะในร่างกายมนุษย์ แต่ไม่สามารถทดแทนสภาวะจริงในช่องปากได้ ดังนั้นหากทำการศึกษาจริงในมนุษย์ อาจทำให้ผลการศึกษามีความแตกต่างกันได้

ภายใต้ข้อจำกัดต่างๆในการศึกษาครั้งนี้อาจกล่าวได้ว่า การพัฒนาสารใส่ในคลองรากฟันโดยนำสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนมาผสมกับตัวนำส่งสาร P407 และ MP นั้น มีคุณสมบัติทางกายภาพที่เหมาะสมในการนำไปใช้งาน และเมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ ซึ่งแม้สารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารทั้งสองชนิด จะมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *E. faecalis* ได้น้อยกว่า 2% CHX แต่พบว่าสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนใน MP มีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อ *C. albicans* ได้เทียบเท่า 2% CHX ดังนั้นอาจนำมาใช้เป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นส่วนใส่ในคลองรากฟัน และสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ มาใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในตัวนำส่งสารให้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้นต่อไป

บทที่ 5

บทสรุป และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

จากผลการวิจัย สรุปได้ว่า

1. ความสามารถของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในสถานะแพลงโทนิค พบว่า ชนิดที่ให้ฤทธิ์ในการต้านเชื้อทั้งสองชนิดได้ดีที่สุดคือ สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่มีตัวทำละลายเป็นกรดแทนนิก ความเข้มข้น 200 PPM และมีขนาดอนุภาคของซิลเวอร์นาโนในช่วง 5-10 นาโนเมตร
2. ความสามารถในการต้านเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ในแบบจำลองฟันมนุษย์ เมื่อใส่สารทดสอบไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า
 - สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 มีความสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองชนิด ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุมมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และโพลอกซาเมอร์ 407 ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)
 - สารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในมาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ได้ดีกว่าสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในโพลอกซาเมอร์ 407 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)
3. ความสามารถในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน เมื่อใส่สารทดสอบไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน ในแบบจำลองฟันมนุษย์ พบว่าทุกกลุ่มทดสอบ ยกเว้น คลอร์เฮกซิดีน ไม่มีความสามารถในการคงฤทธิ์ในเนื้อฟัน และไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบทุกกลุ่ม ยกเว้นกลุ่ม คลอร์เฮกซิดีน ซึ่งพบว่ามีความแตกต่างกับกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีชนิดของตัวทำละลาย ความเข้มข้น และขนาดของอนุภาคซิลเวอร์นาโนที่แตกต่างกัน เพื่อนำมาพัฒนาสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในระบบนำส่งสารชนิดต่างๆ สำหรับใช้เป็นสารใส่ในคลองรากฟัน โดยทำการทดสอบกับเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ซึ่งเป็นเชื้อที่มักพบในการรักษาคคลองรากฟันที่ล้มเหลว โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์ที่มีคลองรากเดียว และมีการตัดปลายรากฟัน ทำให้มีความแตกต่างจากสภาวะจริงในช่องปากที่ระบบคลองรากฟันมีความซับซ้อน และประกอบด้วยเชื้อหลายชนิด สำหรับคุณสมบัติของสารผสมของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนในระบบนำส่งสารทั้งสองชนิดคือ มาโครกอลผสมกับโพรพิลีนไกลคอล และ โพลอกซาเมอร์ 407 นั้นยังมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาเพิ่มเติมก่อนนำมาใช้จริงในช่องปาก ทั้งในเรื่องรูปแบบในการนำไปใช้งาน การคงสภาพของสารผสมในคลองรากฟัน การเปลี่ยนสถานะของสาร ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ ผลต่อการปิดผนึกของวัสดุอุดคลองรากฟัน (sealing ability) ตลอดจนอายุการใช้งาน อย่างไรก็ตามสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้ มาใช้เป็นพื้นฐานในการพัฒนาสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน เพื่อเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเป็นสารใส่ในคลองรากฟัน

เอกสารอ้างอิง

1. Nair PNR. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J* 2006 Apr; 39(4): 249–81.
2. Siqueira JF, de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod* 1998 Oct; 24(10): 663–5.
3. Sen BH, Piskin B, Demirci T. Observation of bacteria and fungi in infected root canals and dentinal tubules by SEM. *Endod Dent Traumatol* 1995 Feb; 11(1): 6–9.
4. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med Off Publ Am Assoc Oral Biol* 2002; 13(2): 171–83.
5. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999 Aug; 32(4): 257–82.
6. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999 Sep; 32(5): 361–9.
7. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 1981 Jan; 7(1): 17–21.
8. Andersen M, Lund A, Andreasen JO, Andreasen FM. In vitro solubility of human pulp tissue in calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *Endod Dent Traumatol* 1992 Jun; 8(3): 104–8.
9. Camargo CHR, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho CAT, de Oliveira LD, Menezes MM, et al. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent Traumatol Off Publ Int Assoc Dent Traumatol* 2006 Dec; 22(6): 302–6.
10. Sathorn C, Parashos P, Messer H. Antibacterial efficacy of calcium hydroxide intracanal dressing: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J* 2007 Jan; 40(1): 2–10.
11. Waltimo TM, Sirén EK, Torkko HL, Olsen I, Haapasalo MP. Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997 Mar; 30(2): 96–101.
12. Waltimo TM, Sirén EK, Orstavik D, Haapasalo MP. Susceptibility of oral *Candida* species to calcium hydroxide in vitro. *Int Endod J* 1999 Mar; 32(2): 94–8.
13. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. In vitro assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006 Aug; 102(2): e27-31.

14. Nair PN, Sjögren U, Krey G, Kahnberg KE, Sundqvist G. Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990 Dec; 16(12): 580–8.
15. Sen BH, Safavi KE, Spångberg LS. Colonization of *Candida albicans* on cleaned human dental hard tissues. *Arch Oral Biol* 1997 Jul; 42(7): 513–20.
16. Love RM. *Enterococcus faecalis*-- a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001 Jul; 34(5): 399–405.
17. George S, Kishen A, Song KP. The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005 Dec; 31(12): 867–72.
18. Evans M, Davies JK, Sundqvist G, Figdor D. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002 Mar; 35(3): 221–8.
19. Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod* 2004 May; 30(5): 315–20.
20. Hannula J, Saarela M, Alaluusua S, Slots J, Asikainen S. Phenotypic and genotypic characterization of oral yeasts from Finland and the United States. *Oral Microbiol Immunol* 1997 Dec; 12(6): 358–65.
21. Sweet SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis* 1997 May; 3 Suppl 1: S88-95.
22. Siqueira JF, Sen BH. Fungi in endodontic infections. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004 May; 97(5): 632–41.
23. Spadaro JA, Webster DA, Becker RO. Silver polymethyl methacrylate antibacterial bone cement. *Clin Orthop* 1979 Sep; (143): 266–70.
24. Alt V, Bechert T, Steinrücke P, Wagener M, Seidel P, Dingeldein E, et al. An in vitro assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement. *Biomaterials* 2004 Aug; 25(18): 4383–91.
25. Shantiaee Y, Maziar F, Dianat O, Mahjour F. Comparing microleakage in root canals obturated with nanosilver coated gutta-percha to standard gutta-percha by two different methods. *Iran Endod J* 2011; 6(4): 140–5.
26. Rosenblatt A, Stamford TCM, Niederman R. Silver diamine fluoride: a caries “silver-fluoride bullet.” *J Dent Res* 2009 Feb; 88(2): 116–25.

27. Peng JJ- Y, Botelho MG, Matinlinna JP. Silver compounds used in dentistry for caries management: a review. *J Dent* 2012 Jul; 40(7): 531–41.
28. Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A, Holt K, Kouri JB, Ramírez JT, et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005 Oct; 16(10): 2346–53.
29. Rai M, Yadav A, Gade A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009 Feb; 27(1): 76–83.
30. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2014 Feb; 40(2): 285–90.
31. Javidi M, Afkhami F, Zarei M, Ghazvini K, Rajabi O. Efficacy of a combined nanoparticulate/calcium hydroxide root canal medication on elimination of *Enterococcus faecalis*. *Aust Endod J J Aust Soc Endodontology Inc* 2014 Aug; 40(2): 61–5.
32. Guzman M, Dille J, Godet S. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2012 Jan; 8(1): 37–45.
33. Haapasalo HK, Sirén EK, Waltimo TM, Ørstavik D, Haapasalo MP. Inactivation of local root canal medicaments by dentine: an in vitro study. *Int Endod J* 2000 Mar; 33(2): 126–31.
34. 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 Off J Control Release Soc* 2009 Aug 19; 138(1): 49–56.
35. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J* 2004 Feb; 37(2): 132–8.
36. Takushige T, Hoshino E. Clinical evaluation of 3Mix-MP method in endodontic treatment. *Jap J Conserv Dent* 1998; (41): 970–4.
37. Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol* 2010 Nov; 28(11): 580–8.
38. รวี เกียรติไพศาล. แบคทีเรียและโรคติดเชื้อที่พบบ่อยในช่องปาก. พิมพ์ครั้งที่หนึ่งสงขลา: สำนักพิมพ์ไอคิว มีเดีย; 2552
39. Fouad AF, editor. Endodontic Microbiology. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017
40. Sundqvist G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. *Umea Univ Odontol Diss* 1976; (7): 1–94.

41. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Microbiology and treatment of endodontic infections. In: Hargreaves KM, Cohen S, Berman LH, editors. *Cohen's Pathways of the Pulp*. 10th ed. St. Louis: Mosby; 2011.
42. แสงอุษา เขมาลีลากุล. การติดเชื้อในคลองรากฟัน. *J Endod Soc Thai* 2008; 13(2): 3–8.
43. Gomes BPF, Pinheiro ET, Gadê- Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004 Apr; 19(2): 71–6.
44. Jayakodi H, Kailasam S, Kumaravadivel K, Thangavelu B, Mathew S. Clinical and pharmacological management of endodontic flare-up. *J Pharm Bioallied Sci* 2012; 4(6): 294.
45. 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 Feb; 32(2): 93–8.
46. Zehnder M, Guggenheim B. The mysterious appearance of enterococci in filled root canals. *Int Endod J* 2009 Apr; 42(4): 277–87.
47. Figdor D, Davies JK, Sundqvist G. Starvation survival, growth and recovery of *Enterococcus faecalis* in human serum. *Oral Microbiol Immunol* 2003 Aug; 18(4): 234–9.
48. Schäfer E, Bössmann K. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and two calcium hydroxide formulations against *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2005 Jan; 31(1): 53–6.
49. 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 Nov; 96(5): 618–24.
50. Distel JW, Hatton JF, Gillespie MJ. Biofilm formation in medicated root canals. *J Endod* 2002 Oct; 28(10): 689–93.
51. Weckwerth PH, Carnietto C, Weckwerth ACVB, Duarte MAH, Kuga MC, Vivian RR. In vitro susceptibility of oral *Candida albicans* strains to different pH levels and calcium hydroxide saturated aqueous solution. *Braz Dent J* 2012; 23(3): 192–8.
52. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 2013 Feb 15; 4(2): 119–28.
53. Waltimo TM, Ørstavik D, Sirén EK, Haapasalo MP. In vitro yeast infection of human dentin. *J Endod* 2000 Apr; 26(4): 207–9.
54. Siqueira JF, Rôças IN, Lopes HP, Elias CN, de Uzeda M. Fungal infection of the radicular dentin. *J Endod* 2002 Nov; 28(11): 770–3.

55. Cvek M, Hollender L, Nord CE. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. *Odontol Revy* 1976; 27(2): 93–108.
56. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985 Oct; 1(5): 170–5.
57. Tronstad L. Root resorption--etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 1988 Dec; 4(6): 241–52.
58. Hasselgren G, Olsson B, Cvek M. Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine muscle tissue. *J Endod* 1988 Mar; 14(3): 125–7.
59. Foreman PC, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990 Nov; 23(6): 283–97.
60. Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod* 1990 Oct; 16(10): 498–504.
61. De Moor RJG, De Witte AMJC. Periapical lesions accidentally filled with calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002 Nov; 35(11): 946–58.
62. Farhad A, Mohammadi Z. Calcium hydroxide: a review. *Int Dent J* 2005 Oct; 55(5): 293–301.
63. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *J Br Endod Soc* 1975 Jul; 8(2): 74–93.
64. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Investig J Tech Methods Pathol* 1982 Nov; 47(5): 412–26.
65. Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999 Sep; 32(5): 361–9.
66. Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995; 6(2): 85–90.
67. Dianat O, Saedi S, Kazem M, Alam M. Antimicrobial Activity of Nanoparticle Calcium Hydroxide against *Enterococcus Faecalis*: An In Vitro Study. *Iran Endod J* 2015; 10(1): 39–43.
68. Halliwell B. Oxidants and human disease: some new concepts. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Bio.* 1987 Nov; 1(5): 358–64.
69. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci Rev FOB* 2003 Dec; 11(4): 269–82.

70. Imlay JA, Linn S. DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science* 1988 Jun 3; 240(4857): 1302–9.
71. Rehman K, Saunders WP, Foye RH, Sharkey SW. Calcium ion diffusion from calcium hydroxide-containing materials in endodontically-treated teeth: an in vitro study. *Int Endod J* 1996 Jul; 29(4): 271–9.
72. Wang JD, Hume WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J* 1988 Jan; 21(1): 17–26.
73. Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH changes in root dentin over a 4-week period following root canal dressing with calcium hydroxide. *J Endod* 1993 Jun; 19(6): 302–6.
74. Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J* 1991 May; 24(3): 119–25.
75. Klasen HJ. Historical review of the use of silver in the treatment of burns. I. Early uses. *Burns J Int Soc Burn Inj* 2000 Mar; 26(2): 117–30.
76. Zhao G, Stevens SE. Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem Med* 1998 Jan; 11(1): 27–32.
77. Kim JS, Kuk E, Yu KN, Kim J-H, Park SJ, Lee HJ, et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. *Nanomedicine Nanotechnol Biol Med* 2007 Mar; 3(1): 95–101.
78. Matsumura Y, Yoshikata K, Kunisaki S, Tsuchido T. Mode of bactericidal action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. *Appl Environ Microbiol* 2003 Jul; 69(7): 4278–81.
79. Gupta A, Maynes M, Silver S. Effects of halides on plasmid-mediated silver resistance in *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1998 Dec; 64(12): 5042–5.
80. Feng QL, Wu J, Chen GQ, Cui FZ, Kim TN, Kim JO. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000 Dec 15; 52(4): 662–8.
81. Nover L, Scharf KD, Neumann D. Formation of cytoplasmic heat shock granules in tomato cell cultures and leaves. *Mol Cell Biol* 1983 Sep; 3(9): 1648–55.
82. Afkhami F, Pourhashemi SJ, Sadegh M, Salehi Y, Fard MJK. Antibiofilm efficacy of silver nanoparticles as a vehicle for calcium hydroxide medicament against *Enterococcus faecalis*. *J Dent* 2015 Dec; 43(12): 1573–9.

83. Fan W, Wu Y, Ma T, Li Y, Fan B. Substantivity of Ag-Ca-Si mesoporous nanoparticles on dentin and its ability to inhibit *Enterococcus faecalis*. *J Mater Sci Mater Med* 2016 Jan; 27(1): 16.
84. Ugriné Hunyadvári E, Hadi IA, Kassem MA, Farouk AM, Selmeczi B. Formulation of Polyethylene Glycol ointment bases suitable for tropical and subtropical climates. II. *Acta Pharm Hung* 1989 Jul; 59(4): 157–65.
85. Nalawade T, Sogi SP, Bhat K. Bactericidal activity of propylene glycol, glycerine, polyethylene glycol 400, and polyethylene glycol 1000 against selected microorganisms. *J Int Soc Prev Community Dent* 2015; 5(2): 114.
86. Thomas PA, Bhat KS, Kotian KM. Antibacterial properties of dilute formocresol and eugenol and propylene glycol. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980 Feb; 49(2): 166–70.
87. Bhat KS, Walkevar S. Evaluation of bactericidal property of propylene glycol for its possible use in endodontics. *Arogya J Health Sci* 1975(1): 54–9.
88. Olitzky I. Antimicrobial properties of a propylene glycol based topical therapeutic agent. *J Pharm Sci* 1965 May; 54(5): 787–8.
89. Cruz EV, Kota K, Huque J, Iwaku M, Hoshino E. Penetration of propylene glycol into dentine. *Int Endod J* 2002 Apr; 35(4): 330–6.
90. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999 Aug; 32(4): 257–82.
91. Rowe RC, Sheskey PJ, Weller PJ. Handbook of Pharmaceutical excipient. 4th ed.: Washington, DC; Pharmaceutical Press. 2003.
92. PATEL HR, PATEL RP, PATEL MM. Poloxamers: A pharmaceutical excipients with therapeutic behaviors. *Int J Pharmtech Res* 2009; 1(2): 299-303.
93. Alexandridis P, Alan Hatton T. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide)-poly(ethylene oxide) block copolymer surfactants in aqueous solutions and at interfaces: thermodynamics, structure, dynamics, and modeling. *Colloids Surf Physicochem Eng Asp* 1995 Mar; 96(1–2): 1–46.
94. Veyries ML, Couarraze G, Geiger S, Agnely F, Massias L, Kunzli B, et al. Controlled release of vancomycin from poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 1999 Dec 10; 192(2): 183–93.
95. Garcia SF, Guzman M, Molpereiches J, Aberturas MR. Pluronic Copolymers—Characteristics, Properties, and Pharmaceutical Applications. 1994a: Part I : 46–56.
96. Dumortier G, Grossiord JL, Agnely F, Chaumeil JC. A review of poloxamer 407 pharmaceutical and pharmacological characteristics. *Pharm Res* 2006 Dec; 23(12): 2709–28.

97. 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 Mar; 162 (1–2): 119–27.
98. Ricci EJ, Lunardi LO, Nanclares DMA, Marchetti JM. Sustained release of lidocaine from Poloxamer 407 gels. *Int J Pharm* 2005 Jan 20; 288(2): 235–44.
99. Paavola A, Kilpeläinen I, Yliruusi J, Rosenberg P. Controlled release injectable liposomal gel of ibuprofen for epidural analgesia. *Int J Pharm* 2000 Apr 10; 199(1) :85–93.
100. WANNACHAIYASIT S, PHAECHAMUD T. Development of Chlorhexidine Thermosensitive Gels as a Mouth Antiseptic. *JOM* 2010; 20(3): 165–8.
101. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987 Aug; 66(8): 1375–9.
102. CLSI, Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Guideline. CLSI document M44-A. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2004.
103. CLSI, Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, Approved Standard, 7th ed. , CLSI document M02- A11. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
104. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07- A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.
105. CLSI, Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27- A2. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, 2002.
106. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 10th ed., CLSI document M07-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2015.
107. Basrani B, Santos JM, Tjäderhane L, Grad H, Gorduysus O, Huang J, et al. Substantive antimicrobial activity in chlorhexidine-treated human root dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002 Aug; 94(2): 240–5.
108. Baca P, Junco P, Arias- Moliz MT, Castillo F, Rodríguez- Archilla A, Ferrer- Luque CM. Antimicrobial substantivity over time of chlorhexidine and cetrimide. *J Endod* 2012 Jul; 38(7): 927–30.

109. Raimondi F, Scherer GG, Kotz R, Wokaun A. Nanoparticles in energy technology: examples from electrochemistry and catalysis. *Angew Chem Int Ed Engl* 2005 Apr 8; 44(15): 2190-209.
110. Bo D, Kayombo CM. Effect of Nanosilver Gel, Chlorhexidine Gluconate, and Camphorated Phenol on *Enterococcus faecalis* Biofilm. *Int Sch Res Not* 2014; 2014: 1–5.
111. Kinnunen T, Koskela M. Antibacterial and antifungal properties of propylene glycol, hexylene glycol, and 1,3-butylene glycol in vitro. *Acta Derm Venereol* 1991; 71(2): 148–50.
112. Nair VS, Nayak M, Ramya MK, Sivadas G, Ganesh C, Devi SL, et al. Detection of Adherence of *Enterococcus faecalis* in Infected Dentin of Extracted Human Teeth Using Confocal Laser Scanning Microscope: An In vitro Study. *J Pharm Bioallied Sci* 2017 Nov; 9(Suppl 1): S41–4.
113. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study. *Restor Dent Endod* 2014 Nov; 39(4): 258–64.
114. Shrestha A, Shi Z, Neoh KG, Kishen A. Nanoparticulates for antibiofilm treatment and effect of aging on its antibacterial activity. *J Endod* 2010 Jun; 36(6): 1030–5.
115. Mozayeni MA, Haeri A, Dianat O, Jafari AR. Antimicrobial effects of four intracanal medicaments on *enterococcus faecalis*: an in vitro study. *Iran Endod J* 2014; 9(3): 195–8.
116. Bruniera JFB, Silva-Sousa YTC, Lara MG, Pitondo-Silva A, Marcaccini AM, Miranda CES. Development of intracanal formulation containing silver nanoparticles. *Braz Dent J* 2014; 25(4): 302–6.
117. Zhao IS, Mei ML, Burrow MF, Lo EC-M, Chu C-H. Prevention of secondary caries using silver diamine fluoride treatment and casein phosphopeptide-amorphous calcium phosphate modified glass-ionomer cement. *J Dent* 2017 Feb; 57: 38–44.
118. Lou YL, Botelho MG, Darvell BW. Reaction of silver diamine [corrected] fluoride with hydroxyapatite and protein. *J Dent* 2011 Sep; 39(9): 612–8.
119. Hou W-C, Stuart B, Howes R, Zepp RG. Sunlight-driven reduction of silver ions by natural organic matter: formation and transformation of silver nanoparticles. *Environ Sci Technol* 2013 Jul 16; 47(14): 7713–21

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain heart infusion broth (BHI broth)

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 ± 0.2
- นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- รอให้เย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

2. Brain heart infusion agar (BHI agar)

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 ± 0.2
 - นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 45 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
 - รอให้เย็นที่ $45-50^{\circ}\text{C}$ เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น
- ** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

3. Sabouraud dextrose broth (SDB)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Animal tissue	15	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouraud dextrose broth commercial product)

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 5.6 ± 0.2
 - นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
 - รอให้อาหารเย็นตัวลงแล้วเก็บในตู้เย็น
- ** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

4. Sabouraud dextrose agar (SDA)

ส่วนประกอบต่อลิตร

Dextrose	40	กรัม
Casein	10	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม (สำหรับ Sabouraud dextrose agar commercial product)

- ชั่งอาหารตามฉลากข้างบรรจุภัณฑ์ เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 5.6 ± 0.2
- นำเข้า autoclave ที่ 121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

- c. รอให้เย็นที่ 45-50°C เทลงจากอาหารเลี้ยงเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวเก็บในตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

5. 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 เติมน้ำกลั่นลงไปตามปริมาตรที่ต้องเตรียม จากนั้นปรับ pH ประมาณ 7.3 ± 0.2
- นำเข้า autoclave ที่ 118-121°C ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที
- รอให้เย็นที่ 45-50°C เติม sterile expired human blood ในอัตราส่วน 5% โดยปริมาตร เขย่าอาหารที่เตรียมเบา ๆ ให้เป็นเนื้อเดียวกัน
- เทลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ รอให้อาหารแข็งตัวและเก็บตู้เย็น

** ควรทดสอบคุณภาพของอาหารว่าไม่มีการปนเปื้อนก่อนการใช้งาน

ภาคผนวก 2

ข้อมูลผลการศึกษา

ตารางที่ 15 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของ โชน
ยับยั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ต่อเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ
C. albicans

ชนิดของสาร		ความเข้มข้น (PPM)	ขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน (nm)	<i>E. faecalis</i>			<i>C. albicans</i>		
				Chi-square	df	Sig.	Chi-square	df	Sig.
1	AgNP in Tannic acid	200	5-10	24.686	11	0.010	21.107	11	0.032
2		200	20-30						
3		200	60-70						
4		200	80-100						
5	AgNP in Starch	300	20-30						
6		300	60-70						
7		800	80-100						
8		1,000	5-10						
9		1,000	80-100						
10	AgNP	2,000	5-10						
11	in 95% ethanol	2,000	80-100						
12	95% ethanol								

ตารางที่ 16 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยขนาดของ โชนัยบั้งของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ต่อเชื้อทดสอบ *E. faecalis* และ *C. albicans* เป็นคู่

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U		
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>	
AgNP in Tannic acid	200	5-10	AgNP in Tannic acid	200	20-30	0.077	0.077	
					60-70	0.050	0.050	
					80-100	0.046	0.046	
			AgNP in Starch	300	20-30	0.050	0.077	
					60-70	0.046	0.050	
					800	80-100	0.046	0.050
					1,000	5-10	0.184	0.376
			80-100	0.050		0.050		
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.513	1.000	
					80-100	0.050	0.127	
95% ethanol			0.050	0.050				
AgNP in Tannic acid	200	20-30	AgNP in Tannic acid	200	60-70	0.376	0.127	
					80-100	0.072	0.105	
			AgNP in Starch	300	20-30	0.658	0.658	
					60-70	0.246	0.050	
				800	80-100	0.246	0.077	
					1,000	5-10	0.513	0.376
			80-100	0.500		0.184		
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.275	0.077	
					80-100	0.500	0.827	
			95% ethanol			0.127	0.077	

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U	
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
AgNP in Tannic acid	200	60-70	AgNP in Tannic acid	200	80-100	0.121	0.825
			AgNP in Starch	300	20-30	0.500	0.376
					60-70	0.653	0.827
				800	80-100	0.825	0.827
				1,000	5-10	0.127	0.127
			80-100		1.000	0.658	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.050	0.050
80-100	0.822	0.275					
95% ethanol			0.184	0.827			
AgNP in Tannic acid	200	80-100	AgNP in Starch	300	20-30	0.046	0.268
					60-70	0.099	0.507
				800	80-100	0.099	0.817
				1,000	5-10	0.046	0.105
			80-100		0.072	0.487	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.046	0.046
					80-100	0.072	0.268
95% ethanol			0.268	0.817			
AgNP in Starch	300	20-30	AgNP in Starch	300	60-70	0.072	0.275
				800	80-100	0.268	0.275
				1,000	5-10	0.184	0.275
					80-100	0.376	0.513
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.050	0.077
					80-100	0.500	0.827
			95% ethanol			0.050	0.275

ตารางที่ 16 (ต่อ)

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U	
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
AgNP in Starch	300	60-70	AgNP in Starch	800	80-100	0.796	0.658
				1,000	5-10	0.046	0.050
			80-100		0.487	0.275	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.046	0.050
					80-100	0.346	0.275
95% ethanol			0.268	0.500			
AgNP in Starch	800	80-100	AgNP in Starch	1,000	5-10	0.121	0.077
					80-100	0.487	0.376
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.046	0.050
					80-100	0.487	0.275
95% ethanol			0.268	1.000			
AgNP in Starch	1,000	5-10	AgNP in Starch	1,000	80-100	0.127	0.184
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.376	0.827
					80-100	0.127	0.376
			95% ethanol			0.050	0.077
AgNP in Starch	1,000	80-100	AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.050	0.050
			80-100		0.822	0.275	
			95% ethanol			0.127	0.376
AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	AgNP in 95% ethanol	2,000	80-100	0.050	0.275
			95% ethanol			0.050	0.050
AgNP in 95% ethanol	2,000	80-100	95% ethanol			0.127	0.275

ตารางที่ 17 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

ชนิดของสาร		ความเข้มข้น (PPM)	ขนาดอนุภาคซิลเวอร์นาโน (nm)	<i>E. faecalis</i>	<i>C. albicans</i>
				MIC & MBC	MIC & MBC
1	AgNP in Tannic acid	200	5-10	Chi-square = 35.000 df. = 11 Sig. = 0.000	Chi-square = 35.000 df. = 11 Sig. = 0.000
2		200	20-30		
3		200	60-70		
4		200	80-100		
5	AgNP in Starch	300	20-30		
6		300	60-70		
7		800	80-100		
8		1,000	5-10		
9		1,000	80-100		
10	AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10		
11		2,000	80-100		
12	95% ethanol				

ตารางที่ 18 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโนขนาดต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ *E. faecalis* และ *C. albicans* ด้วยค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ (MIC) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) เป็นคู่

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U			
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
						MIC	MBC	MIC	MBC
AgNP in Tannic acid	200	5-10	AgNP in Tannic acid	200	20-30	0.025	1.000	0.025	0.025
					60-70	0.025	1.000	0.025	0.025
					80-100	0.025	1.000	0.025	0.025
			AgNP in Starch	300	20-30	0.025	1.000	0.025	0.025
					60-70	0.025	1.000	0.025	0.025
				800	80-100	0.025	1.000	0.025	0.025
				1,000	5-10	0.025	1.000	0.025	0.025
			80-100		0.025	1.000	0.025	0.025	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
			AgNP in Tannic acid	200	20-30	AgNP in Tannic acid	200	60-70	1.000
80-100	1.000	1.000						1.000	1.000
AgNP in Starch	300	20-30				0.025	1.000	0.025	1.000
		60-70				0.025	1.000	0.025	1.000
	800	80-100				0.025	1.000	0.025	1.000
	1,000	5-10				0.025	1.000	0.025	0.025
80-100		0.025				1.000	0.025	0.025	
AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10				0.025	0.025	0.025	0.025
		80-100				0.025	0.025	0.025	0.025
95% ethanol						0.025	0.025	0.025	0.025

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่าที่สำคัญ Mann-Whitney U			
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
						MIC	MBC	MIC	MBC
AgNP in Tannic acid	200	60-70	AgNP in Tannic acid	200	80-100	1.000	1.000	1.000	1.000
			AgNP in Starch	300	20-30	0.025	1.000	0.025	1.000
					60-70	0.025	1.000	0.025	1.000
				800	80-100	0.025	1.000	0.025	1.000
				1,000	5-10	0.025	1.000	0.025	0.025
			80-100		0.025	1.000	0.025	0.025	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
			AgNP in Tannic acid	200	80-100	AgNP in Starch	300	20-30	0.025
60-70	0.025	1.000						0.025	1.000
800	80-100	0.025					1.000	0.025	1.000
	1,000	5-10					0.025	1.000	0.025
80-100		0.025				1.000	0.025	0.025	
AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10				0.025	0.025	0.025	0.025
		80-100				0.025	0.025	0.025	0.025
95% ethanol						0.025	0.025	0.025	0.025
AgNP in Starch	300	20-30	AgNP in Starch	300	60-70	1.000	1.000	1.000	1.000
				800	80-100	1.000	1.000	1.000	1.000
				1,000	5-10	0.025	1.000	0.025	0.025

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U			
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
						MIC	MBC	MIC	MBC
				1,000	80-100	1.000	1.000	0.025	0.025
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
AgNP in Starch	300	60-70	AgNP in Starch	800	80-100	1.000	1.000	1.000	1.000
				1,000	5-10	0.025	1.000	0.025	0.025
				80-100	1.000	1.000	0.025	0.025	
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
		95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025	
AgNP in Starch	800	80-100	AgNP in Starch	1,000	5-10	0.025	1.000	0.025	0.025
					80-100	1.000	1.000	0.025	0.025
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
		95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025	
AgNP in Starch	1,000	5-10	AgNP in Starch	1,000	80-100	0.025	1.000	0.025	0.025
			AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	1.000	0.025
					80-100	0.025	0.025	1.000	0.025

ตารางที่ 18 (ต่อ)

ชนิดของสารที่เปรียบเทียบกัน						ค่าัยสำคัญ Mann-Whitney U			
ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	ชนิดสาร	ความเข้มข้น	ขนาดอนุภาค	<i>E. faecalis</i>		<i>C. albicans</i>	
						MIC	MBC	MIC	MBC
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
AgNP in Starch	1,000	80-100	AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	0.025	0.025	0.025	0.025
					80-100	0.025	0.025	0.025	0.025
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
AgNP in 95% ethanol	2,000	5-10	AgNP in 95% ethanol	2,000	80-100	1.000	1.000	1.000	1.000
			95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025
AgNP in 95% ethanol	2,000	80-100	95% ethanol			0.025	0.025	0.025	0.025

ตารางที่ 19 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้นในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	Chi-square	df	Sig.
MP	9.928	2	0.007
MP+Ag	9.380	2	0.009
P407	9.620	2	0.008
P407+Ag	9.380	2	0.009
CHX	0.000	2	1.000
Control	6.006	2	0.050

ตารางที่ 20 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเป็นคู่ ในแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้นในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

ระดับชั้นเนื้อฟันที่ เปรียบเทียบกัน		ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U					
		MP	MP+Ag	P407	P407+Ag	CHX	Control
0.1 mm	0.2 mm	0.009	0.009	0.009	0.009	1.000	0.046
0.1 mm	0.3 mm	0.009	0.009	0.009	0.009	1.000	0.046
0.2 mm	0.3 mm	0.293	0.917	0.465	0.917	1.000	0.275

ตารางที่ 21 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไว้นในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

ระดับชั้นเนื้อฟัน	Chi-square	df	Sig.
0.1 mm	25.482	5	0.000
0.2 mm	25.427	5	0.000
0.3 mm	25.745	5	0.000

ตารางที่ 22 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ตามกลุ่มการศึกษาเป็นคู่ ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่เปรียบเทียบกัน		ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U		
		0.1 mm	0.2 mm	0.3 mm
MP	MP+Ag	0.009	0.009	0.009
MP	P407	0.047	0.016	0.009
MP	P407+Ag	0.009	0.009	0.009
MP	CHX	0.005	0.005	0.005
MP	Control	0.034	0.024	0.025
MP+Ag	P407	0.009	0.009	0.009
MP+Ag	P407+Ag	0.009	0.036	0.021
MP+Ag	CHX	0.005	0.005	0.005
MP+Ag	Control	0.024	0.025	0.025
P407	P407+Ag	0.009	0.009	0.009
P407	CHX	0.005	0.005	0.005
P407	Control	0.294	0.881	0.655
P407+Ag	CHX	0.005	0.005	0.005
P407+Ag	Control	0.024	0.025	0.025
CHX	Control	0.010	0.010	0.010

ตารางที่ 23 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน แยกตามกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไวไวในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่ม	Chi-square	df	Sig.
MP	10.220	2	0.006
MP+Ag	0.000	2	1.000
P407	9.420	2	0.009
P407+Ag	9.757	2	0.008
CHX	0.000	2	1.000
Control	6.214	2	0.045

ตารางที่ 24 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟันเป็นคู่ ในแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไวไวในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

ระดับชั้นเนื้อฟันที่เปรียบเทียบกัน		ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U					
		MP	MP+Ag	P407	P407+Ag	CHX	Control
0.1 mm	0.2 mm	0.009	1.000	0.009	0.028	1.000	0.046
0.1 mm	0.3 mm	0.009	1.000	0.009	0.009	1.000	0.046
0.2 mm	0.3 mm	0.175	1.000	0.754	0.075	1.000	0.239

ตารางที่ 25 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ของแต่ละกลุ่มการศึกษา แยกตามระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไวไวในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

ระดับชั้นเนื้อฟัน	Chi-square	df	Sig.
0.1 mm	26.042	5	0.000
0.2 mm	26.050	5	0.000
0.3 mm	25.870	5	0.000

ตารางที่ 26 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Mann-Whitney U test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ตามกลุ่มการศึกษาเป็นคู่ ของแต่ละระดับชั้นเนื้อฟัน เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่เปรียบเทียบกัน		ค่านัยสำคัญ Mann-Whitney U		
		0.1 mm	0.2 mm	0.3 mm
MP	MP+Ag	0.005	0.005	0.005
MP	P407	0.009	0.009	0.016
MP	P407+Ag	0.009	0.009	0.009
MP	CHX	0.005	0.005	0.005
MP	Control	0.025	0.024	0.024
MP+Ag	P407	0.005	0.005	0.005
MP+Ag	P407+Ag	0.005	0.005	0.005
MP+Ag	CHX	1.000	1.000	1.000
MP+Ag	Control	0.010	0.010	0.010
P407	P407+Ag	0.009	0.009	0.009
P407	CHX	0.005	0.005	0.005
P407	Control	0.881	0.881	0.653
P407+Ag	CHX	0.005	0.005	0.005
P407+Ag	Control	0.025	0.024	0.024
CHX	Control	0.010	0.010	0.010

ตารางที่ 27 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

วัน	Chi-square	df	Sig.
Day 2	12.455	5	0.029
Day 4	12.392	5	0.030
Day 6	12.210	5	0.032
Day 8	12.716	5	0.026
Day 10	13.552	5	0.019
Day 12	13.103	5	0.022
Day 14	13.574	5	0.019

ตารางที่ 29 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *E. faecalis* ในช่วงระยะเวลา 14 วันเป็นคู่ ของแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้นโคลงรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

วันที่เปรียบเทียบ		กลุ่ม					
		MP	MP+Ag	P407	P407+Ag	CHX	Control
Day 2	Day 4	0.893	0.686	0.893	0.500	1.000	0.285
Day 2	Day 6	0.893	0.498	0.273	0.500	1.000	0.180
Day 2	Day 8	0.138	0.686	0.080	0.279	1.000	0.109
Day 2	Day 10	0.500	0.686	0.684	0.715	1.000	0.593
Day 2	Day 12	0.686	0.500	0.500	0.686	1.000	0.593
Day 2	Day 14	0.500	0.854	0.500	1.000	1.000	0.655
Day 4	Day 6	1.000	0.279	0.686	0.686	1.000	0.109
Day 4	Day 8	0.500	0.279	0.684	0.500	1.000	0.180
Day 4	Day 10	0.500	0.588	0.500	0.500	1.000	0.285
Day 4	Day 12	0.686	0.225	0.892	0.893	1.000	0.285
Day 4	Day 14	0.498	0.345	0.500	0.279	1.000	1.000
Day 6	Day 8	0.225	0.593	0.225	0.225	1.000	0.109
Day 6	Day 10	0.893	0.786	0.684	0.588	1.000	0.593
Day 6	Day 12	0.686	0.893	0.686	0.893	1.000	0.785
Day 6	Day 14	0.893	0.686	0.686	0.686	1.000	0.109
Day 8	Day 10	0.225	0.893	0.686	0.416	1.000	0.285
Day 8	Day 12	0.223	0.686	0.686	0.588	1.000	0.285
Day 8	Day 14	0.138	0.500	0.414	0.345	1.000	1.000
Day 10	Day 12	0.581	0.893	0.500	0.684	1.000	0.785
Day 10	Day 14	1.000	0.686	0.893	0.715	1.000	0.593
Day 12	Day 14	0.686	0.500	0.686	0.500	1.000	0.593

ตารางที่ 30 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Kruskal-Wallis test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ระหว่างกลุ่มการศึกษา ในแต่ละวันที่เก็บตัวอย่างสารละลาย เมื่อใส่สารไว้ในคลองรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

วัน	Chi-square	df	Sig.
Day 2	12.998	5	0.023
Day 4	14.022	5	0.015
Day 6	13.803	5	0.017
Day 8	13.820	5	0.017
Day 10	15.221	5	0.009
Day 12	12.975	5	0.024
Day 14	14.270	5	0.014

ตารางที่ 32 แสดงค่านัยสำคัญทางสถิติ Wilcoxon Signed Ranks test เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย Log CFU/g เชื้อ *C. albicans* ในช่วงระยะเวลา 14 วันเป็นคู่ ของแต่ละกลุ่มการศึกษา เมื่อใส่สารไว้นโคลงรากฟันเป็นเวลา 7 วัน

วันที่เปรียบเทียบ		กลุ่ม					
		MP	MP+Ag	P407	P407+Ag	CHX	Control
Day 2	Day 4	0.893	0.893	0.686	0.345	1.000	0.109
Day 2	Day 6	0.500	0.893	0.715	0.686	1.000	0.109
Day 2	Day 8	0.223	0.500	0.893	0.893	1.000	0.109
Day 2	Day 10	0.893	0.465	0.686	0.500	1.000	0.593
Day 2	Day 12	0.138	0.786	0.686	0.893	1.000	0.285
Day 2	Day 14	0.345	0.138	0.893	0.686	1.000	0.593
Day 4	Day 6	0.345	0.500	0.686	0.225	1.000	0.655
Day 4	Day 8	0.138	0.786	0.715	0.893	1.000	0.109
Day 4	Day 10	0.786	0.225	0.109	0.343	1.000	0.593
Day 4	Day 12	0.225	0.686	0.686	0.416	1.000	0.109
Day 4	Day 14	0.225	0.498	0.109	0.500	1.000	1.000
Day 6	Day 8	1.000	0.686	0.893	0.893	1.000	0.109
Day 6	Day 10	0.893	0.285	0.581	1.000	1.000	0.593
Day 6	Day 12	0.500	0.465	0.465	0.893	1.000	0.109
Day 6	Day 14	1.000	0.138	0.500	0.686	1.000	0.655
Day 8	Day 10	0.500	0.138	0.715	0.686	1.000	0.285
Day 8	Day 12	0.500	0.500	0.893	0.893	1.000	0.102
Day 8	Day 14	0.180	0.715	0.715	0.893	1.000	0.285
Day 10	Day 12	0.500	0.345	0.715	0.715	1.000	0.593
Day 10	Day 14	0.498	0.080	1.000	0.345	1.000	0.285
Day 12	Day 14	0.786	0.225	0.500	0.686	1.000	0.593

RESEARCH ETHICS COMMITTEE (REC)
 BUILDING 1 5TH FLOOR ROOM 504
 TEL. 66-74-287533, 66-74-287504
 FAX. 66-74-287533



FACULTY OF DENTISTRY
 PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY
 HADYAI, SONGKHLA 90112, THAILAND
 TEL. 66-74-212914, 66-74-429871, 66-74-287500
 FAX. 66-74-429871, 66-74-212922

Documentary Proof of Ethical Clearance
Research Ethics Committee (REC)
Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University

The Project Entitled : Comparison of Antimicrobial Activity and Substantivity of Various Sizes of Silver Nanoparticles in Poloxamer 407 Gel and in Macrogol Mixed with Propylene Glycol as an Intracanal Medicament

REC Project No. : EC6106-24-P-LR

Principal Investigator : Prof. Dr.Rawee Teanpaisan

Affiliation : Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, PSU

Co-Principal Investigator : Asst.Prof.Dr.Kewalin Thammasitboon / Miss Naruhporn Thatthai

Approved Documents :

- Submission Form
- Research Proposal
- Informed Consent
- Consent Form

Approved by Research Ethics Committee (REC), Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University.

This is to certify that REC is in full compliance with International Guidelines for Human Research Protection such as the Declaration of Helsinki, the Belmont Report, CIOMS Guidelines and the International Conference on Harmonization in Good Clinical Practice (ICH-GCP)

This review is documented in the meeting minutes of the meeting 8/2018

Agenda 3.2.3 on 30 AUGUST 2018

Please submit the Progress Report every 12 months. (Renewal must be submitted at least 30 days prior to expired date.)

(For Exemption Determination, Please submit a Final Report after study completion)

Surapong Vongvatcharanon

(Asst.Prof.Dr.Surapong Vongvatcharanon)

Acting of Behalf Chairman of Research Ethics Committee

Date of Approval : 16 AUGUST 2018

Date of Expiration : 15 AUGUST 2019

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวนฤพร ทาไทย

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5810820013

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	2554

ทุนการศึกษา

1. ทุนอุดหนุนวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ประจำปีงบประมาณ 2560
2. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/โครงการวิจัยสำหรับนักศึกษาหลังปริญญา จากเงินกองทุนวิจัย
3. ทุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์/โครงการวิจัย/โครงการงานพิเศษสำหรับนักศึกษาหลังปริญญา จากเงินรายได้คณะทันตแพทยศาสตร์

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

ทันตแพทย์ชำนาญการ กลุ่มงานทันตกรรม โรงพยาบาลแก่งคอย

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

นฤพร ทาไทย, รวี เกียรติไพศาล, เกวลิน ธรรมสิทธิบูรณ์ การศึกษาประสิทธิภาพในการด้านเชื้อของสารละลายอนุภาคซิลเวอร์นาโน ในตัวนำส่งสารชนิดต่างๆ สำหรับใช้ในคลองรากฟัน โดยใช้แบบจำลองฟันมนุษย์. นำเสนอแบบโปสเตอร์ (Proceeding หน้า 10-19) ในงานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 14 เรื่อง “วิถีนวัตกรรมเพื่อการพัฒนางานวิจัยสู่เศรษฐกิจชุมชนไทยให้ยั่งยืน” วันที่ 27-28 เมษายน 2562 มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นุสรา เกิดประทุม รองอธิการบดี มหาวิทยาลัยเวสเทิร์น